

## *Streptomyces* sp. YBE-316이 생산하는 항암성 항생물질의 정제 및 특성

박재홍 · 함병권 · 배동훈<sup>1</sup> · 유주현\*

연세대학교 식품·생물공학과 생물산업소재연구센터, <sup>1</sup>단국대학교 식품공학과

### Purification and Characterization of the Antitumor Antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316

Jae-Hong Park, Byoung-Kwon Hahm, Dong-Hoon Bai<sup>1</sup> and Ju-Hyun Yu\*

Department of Food and Biotechnology, Bioproducts Research Center,  
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-180, Korea

**Abstract** — For the development of new antitumor antibiotics produced by microorganisms, *Streptomyces* sp. YBE-316 was isolated from soil. The productivity of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316 gradually increased after 60 hours, and was maximum after 100 hours after inoculation in growth medium (2.0% sucrose, 1.0% soybean meal, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0) at 30°C, 150 rpm, 5 NL/min by 30 l jar fermentor. This antitumor antibiotic was present only in mycelium, and stable in pH 5.0~10.0 for 20 minutes at 100°C. Antitumor and antibiotic activities were maintained at neutral pH, and heat stability was low. This antitumor antibiotic was soluble in methanol and ethanol, and insoluble in water, ethyl acetate, chloroform, and n-hexane. This antitumor antibiotic was sequentially purified by acetone extraction from mycelium, butanol extraction, and silica gel column chromatography. Antitumor activity was low against most tested cell lines, but antibiotic activity was high and low against yeasts and bacteria, respectively. The visualization test showed that this antitumor antibiotic had higher hydroxyl, ketone, amino, carboxyl groups, and sugar(s) in its structure. Instrumental analyses showed that this antitumor antibiotic was a pentaene in polyene class antibiotics. In pentaene class antibiotics, this was considered as an eurocidin or capacidin type antibiotics. The molecular weight of this antitumor antibiotic was higher than 683.0 daltons, and this antitumor antibiotic might be glycosylated by other sugar(s), instead of mycosamine or perosamine, an amino sugar.

암치료 방법에 있어서 화학적 요법은 비교적 최근의 방법이다. 수술에 의한 암치료방법은 약 1세기, 방사선 치료법은 최소한 사반세기동안, 화학적 요법은 2차 세계대전 중에 처음으로 사용되었다. 백혈병과 같은 악성 질병 또는 파종성의 암은 그때까지는 치유될 수 없는 것이었다. 화학적 요법은 그러한 질병의 치유에 있어 최초의 약속이었다. 머스타드 가스 유사체의 개발과 그들의 림프계에 대한 강력한 영향은 림프종이나 림프계에서 발생하는 종양의 치료에 유용함을 제시하였다. 이러한 약제의 사용은 1948년에

항대사물질인 'amethopterin'을 사용한 아동성 림프아구 백혈병의 치료에 성공한 사례가 보고될 때까지 비교적 많이 발전되어 있었다. 50년대를 지나면서 알킬화 약제와 항대사물질의 임상적 사용의 개시로 일반적으로 잘 알려지거나 보기 드문 악성 종양들이 치료되기 시작하였다(1).

지난 20년동안 임상적으로 효과가 있는 수많은 약제가 개발되었으며, 일부는 종양세포에 직접 작용하기도 하며 어떠한 것들은 대사작용에 의해 활성화가 되어 효과를 나타낸다(1, 2). 몇몇 약제는 대사과정을 억제하는 점을 이용하여 계획적으로 탐색하였던 것이나 대부분의 것들은 순수하게 우연히 발견한 것들이다. 일 예로 vincristine은 항당뇨병제제, procarba-

**Key words:** Purification, antitumor antibiotic, *Streptomyces* sp. YBE-316, pentaene

\*Corresponding author

zine은 진정제제, 그리고 다수의 항암성 항생제제는 새로운 항세균제제를 탐색하는 중에 발견되었다(1).

미생물은 다양한 생리대사기작을 지니고 있기 때문에 탐색되지 않은 미생물을 대상으로 새로운 생체 활성물질을 발견할 수 있는 가능성이 높다. 또한 이러한 미생물 대사산물의 다양성을 이용하여 신규 항암·항생물질을 생산하는 토양미생물자원의 탐색을 통해 임상적으로 유용하고 새로운 화학구조를 지닌 신규 항암·항생물질을 발견할 수 있는 기술의 개발을 도모할 수 있다. 아울러 기존물질보다 약효가 우수하고 독성은 적은 신물질의 개발시에는 이를 통한 수입대체효과는 물론 세계시장으로의 진출이 가능하다. 본 연구에서는 미생물로부터의 새로운 항암물질을 개발할 목적으로 토양으로부터 분리한 *Streptomyces* sp. YBE-316이 생산하는 항암성 항생물질을 정제하고 기본적인 기기분석을 행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 배양 및 항암성 항생물질의 정제

항암성 항생물질 생산을 위한 배지로는 2.0% sucrose, 1.0% soybean meal, 0.1%  $K_2HPO_4$  (pH 7.0)을 사용하였다. 본 배지에서 24시간 동안 생육시킨 균주의 초기 종배양액 20 ml을 1000 ml에 접종한 후 다시 24시간 동안 생육시키고 이 종배양액을 25 l에 접종한 후 30 l jar fermentor(한국발효기(주))를 사용하여 30°C, 150 rpm, 5.0 NL/min으로 100시간 동안 배양하였다.

우선 항암성 항생물질이 균체내와 외에 어느 정도 존재하는지의 여부를 알기 위해 배양액을 5000×g에서 5분간 원심분리(Hitachi 20PR-52D, rotor RPR 12-2)한 후 상등액과 균체를 분리하였다. 증류수로 3회 세척 및 원심분리하여 얻은 세척된 균체에 1배 부피의 acetone을 첨가하여 추출 및 여과를 하였다. 항암성 항생물질의 존재여부는 bioassay와 TLC를 통하여 측정하였다. 또한 이후의 정제과정에 있어서의 기초 자료로 참고하기 위하여 acetone 추출 후 감압농축하여 소량의 물에 녹인 시료를 여러 온도와 pH에서 안정성을 검토하였다. 유기용매 추출성은 acetone 추출 후 여과액을 감압농축하고 3차 증류수에 녹인 후 이를 각각 pH 3, 7, 10, 13으로 조절하고 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol을 사용해 각각 3회씩 순차적으로 추출하여 나온 유기용매층과 물층의 활성을 측정하여 결정하였다. 이러한 방법으로 추출된 시료를 농축한 후 우선적으로 이온교환수지와 흡착수지를 이용하여 정제를 시도하였으며, silica gel

(Merck, 230~400 mesh) column chromatography를 반복 사용하여 정제하였다.

### 세포 기질의 조제

항암활성 측정에 사용한 세포는 A549(Lung carcinoma, human)(3), CHO(Ovary, chinese hamster), COLO320(Colon, adenocarcinoma, human), NIH 3T3 (Contact-inhibited NIH swiss mouse embryo) 등이며, 항암물질의 정제시 bioassay 용 기질로는 A549 세포를 사용하였다. 실험에 사용한 세포의 배양에는 RPMI-1640(4)에 10% fetal bovine serum을 혼합한 배지에 100 units의 penicillin/streptomycin을 첨가한 것을 사용하였으며, pH를 7.2~7.6(5)으로 조절하기 위해 0.2%  $NaHCO_3$ 와 4 N HCl을 첨가하였다(6). 배양은 37°C의  $CO_2$  배양기(5%  $CO_2$ )에서 행하였으며, 세포를 배양용기에서 분리하기 위한 trypsin 용액(7)은 Hank's balanced salts solution(HBSS)(8)에 0.05% (w/v) trypsin과 0.53 mM EDTA가 첨가된 것을 사용하였고 배양세포의 세척 등에는 HBSS를 사용하였다.

세포수의 측정에는 hemacytometer와 trypan blue 염색법(9, 10)을 이용하였다. 분리한 세포배양액 10  $\mu$ l와 trypan blue solution(0.4% trypan blue, 0.8% NaCl, 0.06%  $KH_2PO_4$ , 0.05% methyl-*p*-hydroxybenzoate, pH 7.2) 10  $\mu$ l를 잘 혼합한 후 혼합액 10  $\mu$ l를 hemacytometer에 취해 inverted microscope를 이용해 세포수를 측정하였다. Hemacytometer의 0.1 mm<sup>3</sup>의 5구간을 정해 청색으로 염색되지 않고 살아있는 세포수를 측정한 후 다음 식에 대입하여 ml 당 생존 세포수를 계산하였다.

$$\text{Cell No. (/ml)} = \text{Counted cell No.} \\ \times 2 (\text{dilution factor}) \times 10^4$$

항암활성의 측정을 위해서는 우선 T-flask에서 배양된 여러 세포들을 trypsin solution으로 처리하여 배양용기로부터 분리하였다. 96-microwell plate에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 90  $\mu$ l 씩 세포배양액을 분주한 후 24시간 동안 배양한 후 여기에 시료 10  $\mu$ l를 가한 후 세포의 생육상태를 inverted microscope(Olympus CK-2)로 관찰하여 활성을 결정하였다.

항균활성의 측정을 위해서는 *Candida albicans* KCCM 11282를 기질로 사용하였다. YM agar 배지(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 1.5% agar) 15 ml을 petri dish에 취해 굳힌 후, soft agar 배지(0.6% agar) 4 ml에 36시간 배양한 세포 배양액 1%를 현탁하여 평판배지에

overlay 하였다. 항균활성은 paper disc 법으로 측정하였다. Bioautography는 silica gel plate(Sigma Co.) 상에서 시료를 전개한 후 전개용매를 날려보낸 후 위에서 조제된 *Candida albicans* KCCM 11282가 미리 overlay 되어 있는 petri dish에 silica gel plate를 5분 동안 얹어놓고 피검물질이 확산되게 하였다. 5분 후 silica gel plate를 들어내고 petri dish를 30°C에서 배양하여 형성된 저지환의 위치로 활성물질의  $R_f$ 치를 계산하였다.

### 항암 및 항균활성의 측정

항암활성은 MTT 법(11, 12)을 사용하여  $IC_{50}$  (inhibitory concentration) 치를 통해 측정하였다. MTT solution은 phosphate buffer solution(PBS)에 5 mg/ml의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 용해한 것을 사용하였다. 미리 1600.0~0.1 µg/ml로 2<sup>n</sup> 배로 희석되어 있는 각각의 시료 10 µl를 96-microwell plate에 5×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 분주되어 24시간 배양된 세포배양액 90 µl에 가하고 24시간 배양 후 조제한 MTT solution을 10 µl/well 씩 첨가하여 4시간을 더 배양하고 배지를 흡인, 제거한 다음 0.04 N HCl을 함유한 isopropyl alcohol을 100 µl/well 씩 가하고 plate-mixer에서 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 660 nm를 reference wavelength로 하여 550 nm에서 2-wavelength microplate photometer를 사용하여 측정하였다. 종양증식 억제율은 다음의 식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{종양증식 억제율(\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A : 시료 무첨가 well의  $A_{550}$

B : 시료 첨가 well의  $A_{550}$

항균활성은 MIC(minimal inhibitory concentration) 치로 측정하였다. 세균은 Mueller Hinton 배지(30.0% beef, 1.75% casamino acid, 0.15% starch, 1.7% agar)에서, 효모와 곰팡이는 Sabouraud Dextrose 배지(1.0% neopeptone, 4.0% dextrose, 1.5% agar)에서 배양하였다. 각각의 배지에 시료를 첨가한 후 2<sup>n</sup> 배로 희석하여 1600.0~0.1 µg/ml의 시료가 포함된 평판배지를 조제한 후 미리 12시간동안 배양시킨 각 균주를 streaking 하고 세균의 경우는 37°C, 효모 및 곰팡이의 경우는 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 평판배지에서의 균의 생육여부를 관찰하여 MIC 치를 결정하였다.

### 항암성 항생물질의 이화학적 성질

**용해도 및 안정성** 항암성 항생물질의 용해도는 시료를 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, methanol, water의 용매에 녹인 후, 각각 4°C와 50°C에서 overnight 방치한 후 그 잔존활성을 측정하여 결정하였다.

**TLC  $R_f$  치와 발색반응** 여러 다양한 용매조건에서 본 항암성 항생물질의  $R_f$  치를 관찰하였으며, 이렇게 전개한 후에 물질구조에 대한 기본 자료를 알아보기 위해 다양한 발색시약을 사용하여 정색반응을 하여 그 발색여부를 관찰하였다(13).

**구조추정을 위한 기기분석** 최종적으로 얻어진 정제시료를 UV scanning(Hawlett Packard 8452A, Diode array spectrophotometer), Infra Red spectroscopy(Perkin-Elmer 1710), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy(Jeol GSX400, 400 MHz), Mass spectroscopy(VG Trio-2 spectrometer) 등을 행하였다.

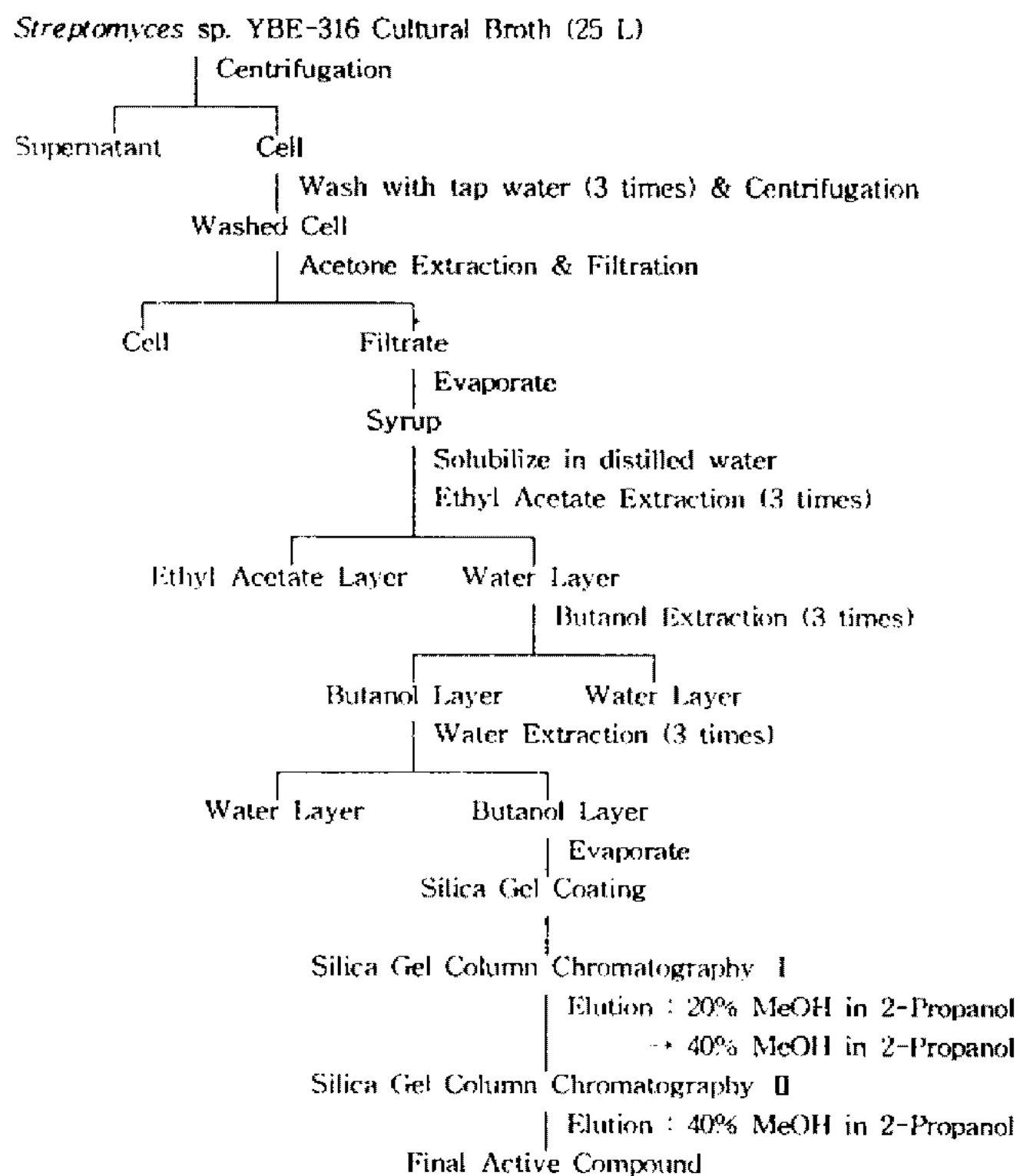
## 결과 및 고찰

### 항암성 항생물질의 정제

본 항암성 항생물질은, acetone 추출을 행한 결과, 균체의 내부에만 존재한다는 것을 알았으며 pH 중성에서 가장 안정하고, pH 4.0에서 그 활성이 완전히 상실되었으며 pH 10.0에서 60%의 활성을 유지하였다. 온도 안정성을 검토한 결과 100°C에서 20분간 안정하여 열 안정성은 매우 낮았다. 또한 유기용매에 대한 추출성은 pH 중성에서 오직 n-butanol에만 추출이 되었다. 따라서, 추출을 위해서는 우선 배양액을 원심분리하여 균체를 얻어 이를 증류수로 3회 세척하고 동일부피의 acetone으로 추출한 후 얻어진 여과액을 감압농축하였다. 이후 이를 3차 증류수에 녹이고 중성에서 n-butanol로 3회 추출하고 용매층을 감압농축하여 정제로 사용하였다. 또한, 불활성화를 방지하기 위해 모든 과정은 4°C에서 행하였다.

이렇게 균체로부터 acetone 추출과 n-butanol 추출을 하여 얻어진 시료를 각종 이온교환수지와 흡착수지를 사용하여 정제하고자 하였으나, TLC 분석 결과를 통해 볼 때, 대부분의 동일 활성물질이 binding 되지 않고 용리되어 그 수율이 10% 내외이었으며 열 안정성이 매우 낮았고 장시간 보관시 많은 침전물이 형성되었기 때문에 이러한 수지를 사용한 정제를 행하는 것이 의미가 없어서 바로 silica gel column chromatography를 행하는 것이 바람직하였다. 본 항암성 항생물질의 정제과정은 Fig. 1에 나타낸 바와 같다.

Silica gel column chromatography를 행하기에 앞



**Fig. 1. Purification procedure of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316.**

서 본 항암성 항생물질의 여러 유기용매에 대한  $R_f$  치를 검토한 결과(Table 1) isopropanol과 methanol을 섞어서 사용한 용매조건에서 분해능이 가장 좋았기 때문에 column chromatography는 이러한 용매조건에서 실행하였다. 우선 추출을 행하여 얻어진 시료 12.5 g을 silica gel에 흡착시키고 이것을 20% methanol in isopropanol의 용매조건으로 충전된 silica gel에 loading 하였다. 이후 이 용매조건으로, spectrophotometer와 TLC를 통해 분석하여, 더 이상 물질이 나오지 않을 때까지 용리시킨 후에 40% methanol in isopropanol의 용매조건으로 활성물질 510 mg을 용리할 수 있었다(Fig. 2). 이 활성물질을 methanol에 녹여 UV scanning을 행한 결과  $\lambda_{max}$ 가 318 nm이었으므로 두번째 silica gel column chromatography는 이 파장에서도 관찰하였다. 두번째 silica gel column chromatography는 40% methanol in isopropanol의 단일용매조건으로 행하여 활성물질 130.5 mg을 얻었으며 그 활성은 A318nm와 정확히 일치하였다(Fig. 3). 최종적으로 얻어진 시료의 순도를 검토하기 위해 TLC를 행한 결과  $R_f$  치 0.3에서의 단일물질을 얻었음을 확인하였다(Fig. 4).

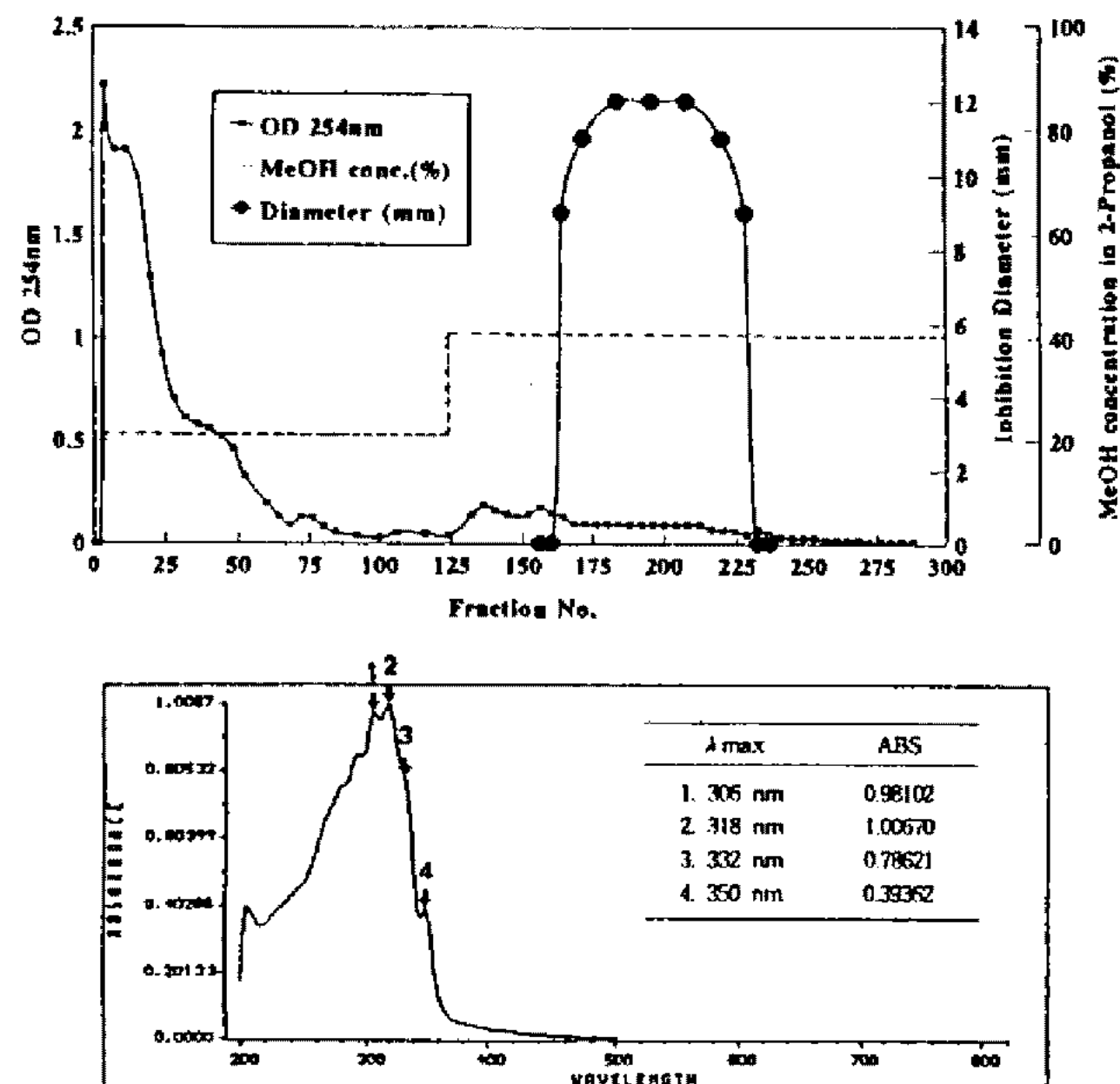
**항암 및 항균활성**

여러 종류의 동물세포와 미생물 균주에 대한  $IC_{50}$

**Table 1. Comparison of  $R_f$  values in various solvent systems**

Solvent System	$R_f$ values
<b>Single Solvent Systems</b>	
n-Hexane	0.00
Ethyl acetate (EtOAc)	0.00
2-Propanol	0.00
Acetone	0.00
Methanol (MeOH)	0.45
<b>Two Solvent Systems</b>	
EtOAc:MeOH (6:4)	0.04
2-Propanol:MeOH (6:4)	0.24
EtOAc:MeOH (4:6)	0.16
2-Propanol:MeOH (4:6)	0.30
n-Propanol:Acetic acid (HOAc) (3:1)	0.13
<b>Three Solvent Systems</b>	
$CHCl_3$ :MeOH:water (10:5:1)	0.25
n-Butanol:HOAc:water (5:2:3)	0.55
n-Propanol:water:HOAc:pyridine (8:2:1:1)	0.75
n-Propanol:water:HOAc:pyridine (8:2:1:1)*	0.83
$NH_4OH$ :MeOH: $CHCl_3$ (4:20:76)	0.00

\* $R_f$  value on cellulose TLC plate



**Fig. 2. Silica gel column chromatogram I (top) and UV spectrum (bottom) of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316.**

Column measured 5.5×45 cm and fractions of 200 ml/20 min were collected.

와 MIC를 검토한 결과, 동물세포에 대해서는 특이적으로 COLO320 세포에 대해 강한 활성( $197.65 \pm 0.49$



μg/ml)을 가지고 있었으며, 미생물 균주에 대해서는 사용되어진 모든 그람 양성균과 음성 세균에 대해서는,

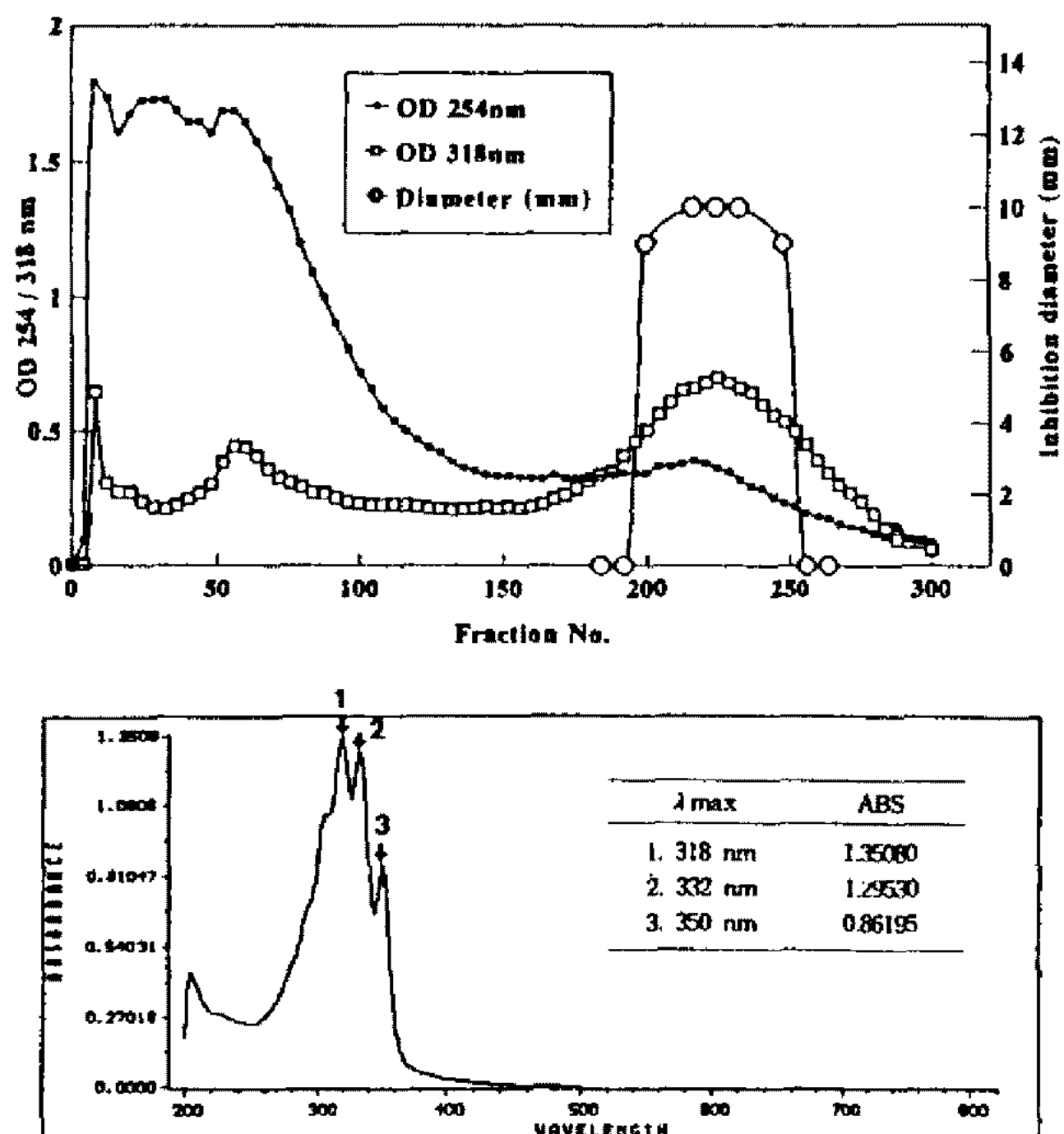


Fig. 3. Silica gel column chromatogram II (top) and UV spectrum (bottom) of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316. Column measured 3.2×30 cm and fractions of 15 ml/10 min were collected.

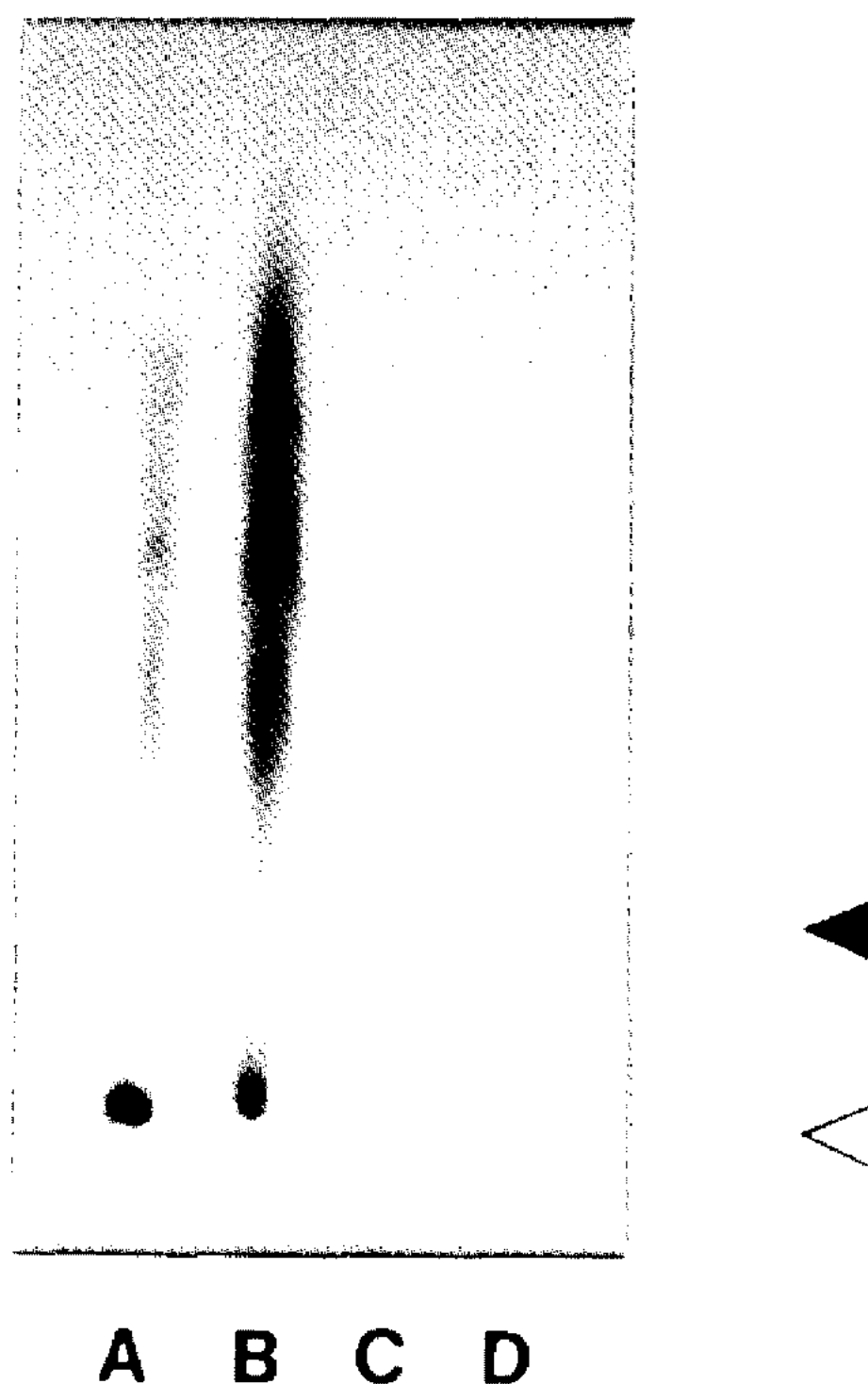


Fig. 4. TLC analysis of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316. Lane A; sample after acetone extraction, Lane B; sample after BuOH extraction, Lane C; active fractions from silica gel column chromatography I, Lane D; active fractions from silica gel column chromatography II, ◀; active spot, △; origin

Table 2. Antitumor and antibiotic activity of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316

Cell Lines		IC <sub>50</sub> (μg/ml)
A549 (lung carcinoma, human)		N.D.*
CHO (ovary, chinese hamster)		655.75 ± 59.75
COLO320 (colon, adenocarcinoma, human)		197.65 ± 0.49
HL60 (peripheral blood, promyelocytic leukemia, human)		N.D.
KATO III (gastric carcinoma, human)		N.D.
L929 (fibroblast, mouse)		N.D.
NIH 3T3 (contact-inhibited NIH swiss mouse embryo)		N.D.
Microorganisms		MIC (μg/ml)
Bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 12255	N.D.
<i>Streptococcus fecalis</i>	KCCM 11814	N.D.
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11316	N.D.
<i>Bacillus megaterium</i>	KCCM 11776	N.D.
<i>Escherichia coli</i>	KCCM 11234	N.D.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCCM 11789	N.D.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCCM 11328	N.D.
Yeast		
<i>Candida albicans</i>	KCCM 11282	100.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 11991	50.0

\*N.D.: Not Determined

**Table 3. Results of visualization method of the anti-tumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316**

Reagent	Result
Sulfuric acid	black
Bromocresol green	—
Bromocresol purple	—
Vanillin-sulfuric acid	blue-green
Hydrazine sulfate	brown
Bromocresol green	—
Ninhydrin	pink-red
Vanillin-potassium hydroxide	brown
Anthrone	—
Phenol-sulfuric acid	brown
Orcinol	—
Bromothymol blue	—
Silver nitrate-pyrogallol	dark brown

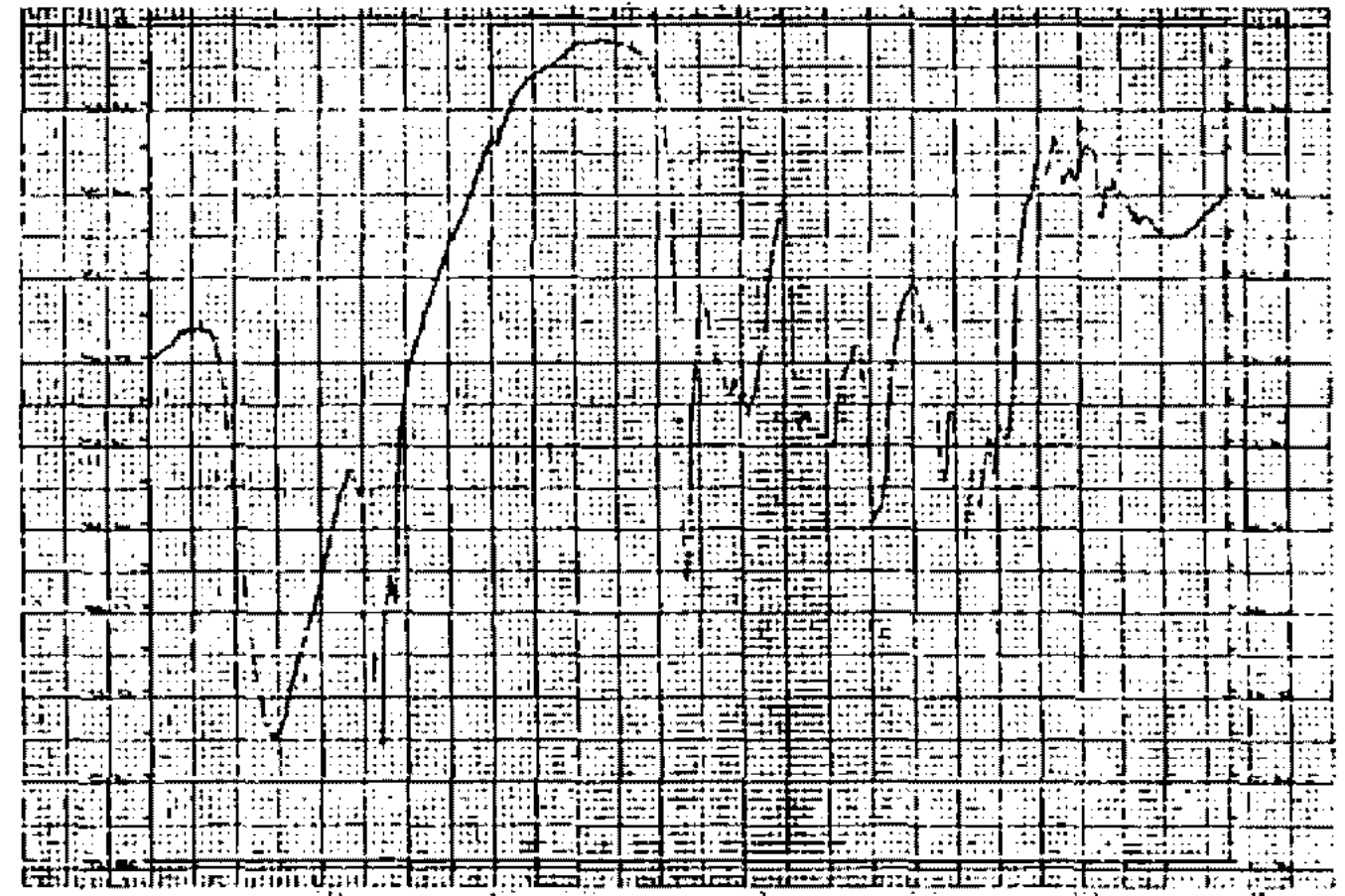
1600.0 µg/ml의 농도까지 실험을 하였을 때, 활성이 없었으며 오직 효모에 대해서만 50.0~100.0 µg/ml의 농도에서 활성을 나타내었다(Table 2).

**항암성 항생물질의 이화학적 성질**

본 항암성 항생물질은 오직 methanol에서만 용해도와 안정성이 높았다. 발색반응 결과(Table 3), vanillin-sulfuric acid에 발색되어 higher hydroxyl기나 ketone기가, hydrazine sulfate에 발색되어 aldehyde기나 ketone기가, ninhydrine에 발색되어 amino기가, vanillin-KOH에 발색되어 amino기가, phenol-sulfuric acid에 발색되어 당이 존재하리라 추측되었으나 anthrone에 발색이 되지 않아 ketose나 oligosaccharide가 아닌 다른 종류의 당이, silver nitrate-pyrogallol에 발색되어 carboxyl기가 본 항암성 항생물질의 구조내에 있을 것으로 추측되었다. 따라서, 상기의 결과를 종합하여 보면 본 항암성 항생물질의 구조는 higher hydroxyl기나 ketone기, aldehyde기나 ketone기, amino기, carboxyl기, 그리고 당으로 구성되어 있는 것으로 추측되었다.

**구조추정을 위한 기기분석**

본 항암성 항생물질은, 정제과정 중에 이미 검토한 UV spectrum의 결과를 볼 때, λ<sub>max</sub>가 306, 318, 332, 350 nm이었으며 이는 polyene계의 peptaene계 항생물질의 spectrum과 정확히 일치하였다(14). Polyene계 항생물질은 구조내에 여러개의 이중결합이 conjugation되어 있으며 그 conjugation 되어 있는 이중결합의 수에 따라 trienes, tetraenes, pentaenes, hexae-



**Fig. 5. IR spectrum of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316.**

nes, heptaenes, octaenes 등으로 나뉜다. 구조내에 여러개의 이중결합이 conjugation 되어 있으므로 쉽게 산화될 수 있으며 그 분자량이 매우 큰 관계로 열에 의해 쉽게 불활성화 될 수 있다. 또한, 구조내에 amino기와 carboxyl기가 존재하여 양성의 성질을 가지며 보통의 경우 중성에서 가장 안정하나 쉽게 침전물을 형성한다. Polyene 중 pentaene계 항생물질은 5개의 이중결합이 conjugation 되어 있으며 보통 amino sugar 인 mycosamine이나 perosamine 등으로 glycosylation 되어 있다. Pentaene계 항생물질에는 (1) 가장 흔한 eurocidin 형, (2) 특이적인 항암효과를 가진 capacidin 형, (3) 365~368 nm에서 또 다른 λ<sub>max</sub>를 가지는 gangtokomycin 형 등이 있다. 따라서 본 항암성 항생물질은 gangtokomycin 형에서 나타나는 365~368 nm에서의 peak가 없었기 때문에 eurocidin이나 capacidin 형의 물질임을 알 수 있었다(Fig. 3)(14). 본 항암성 항생물질의 IR spectrum을 검토한 결과, ~1710 cm<sup>-1</sup>에서 polyene계 항생물질에서의 특징적인 carbonyl peak가 있었고, ~3400 cm<sup>-1</sup>에서 hydroxyl기, 1680~1600 cm<sup>-1</sup>에서 -C=C-, 1300~1000 cm<sup>-1</sup>에서 -C-O-의 peak 등이 존재하여 본 항암성 항생물질은 polyene계 항생물질임이 증명되었다. 또한, 1680~1600 cm<sup>-1</sup>에서의 -C=C-에 해당하는 peak가 최소한 3개 이상 존재하는 것으로 보아 본 항암성 항생물질의 구조내에는 double bond가 3개 이상 conjugation 되어 있는 것으로 추측되었다. Polyene계 항생물질은 대부분 amino sugar가 존재하거나 본 구조내에 amino기가 있어 양성물질로서의 특성을 부여하게 되므로 IR spectrum에서 amino기의 peak가 있을 것으로 예상되었으나 본 결과에서는 hydroxyl기의 broad peak에 의해 관

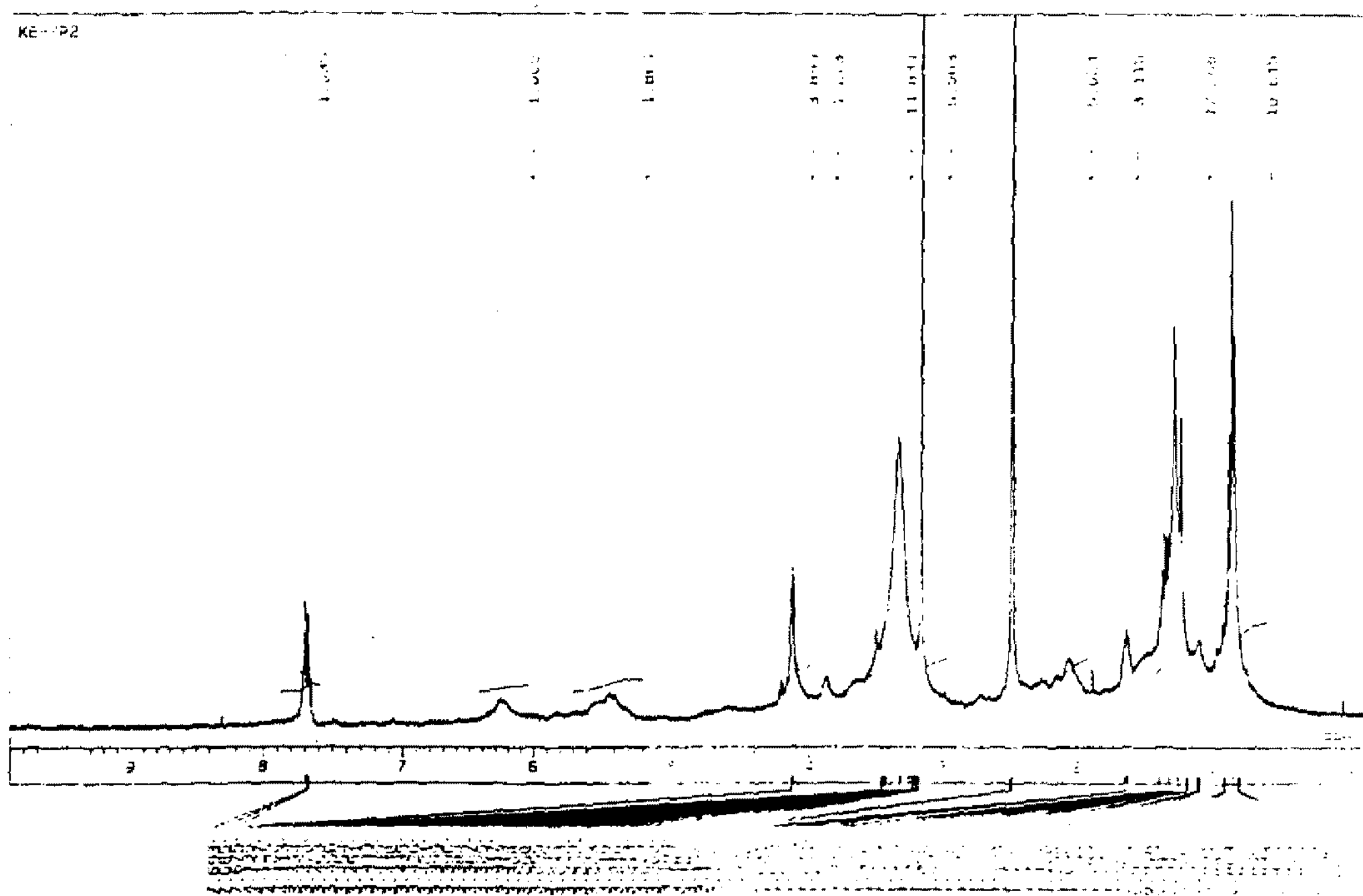


Fig. 6. 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316.

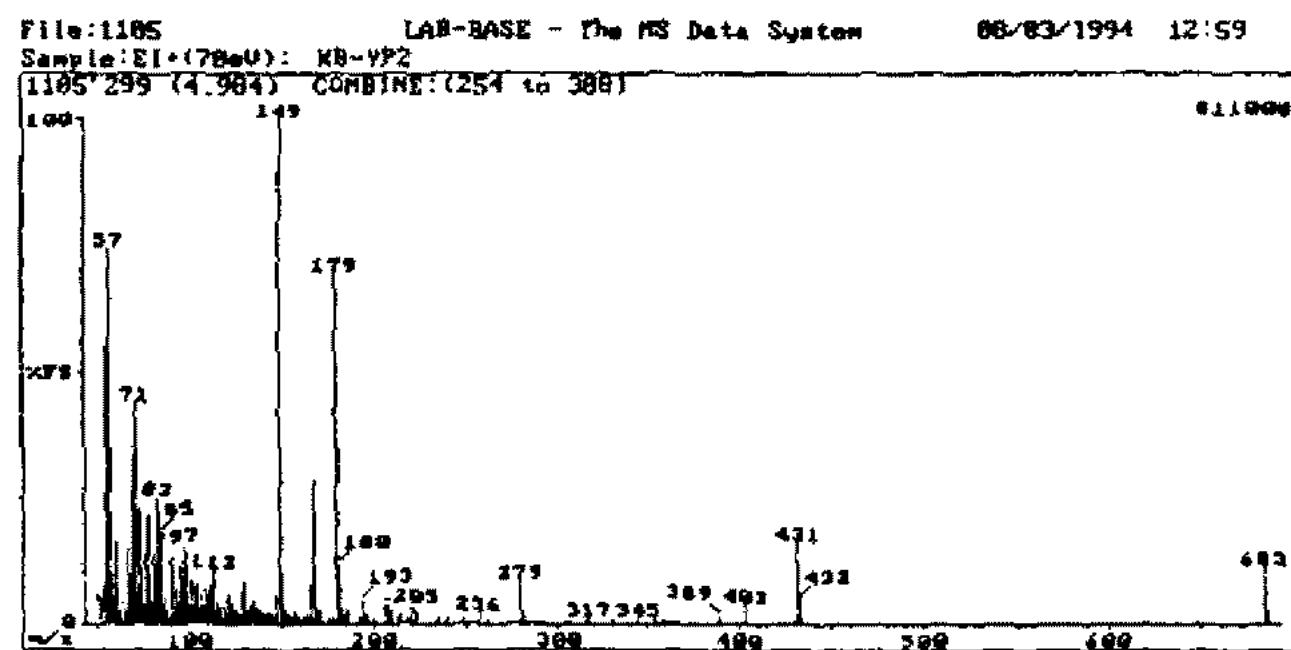


Fig. 7. Mass spectrum of the antitumor antibiotic from *Streptomyces* sp. YBE-316.

찰되지 못한 것으로 생각되었다(Fig. 5). NMR spectrum을 검토한 결과,  $\delta(\text{DMSO}-d_6)$   $\sim 0.9$  ppm에서 triplet의 methyl기와  $\sim 1.3$  ppm에서  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 의 peak가 존재하였다. 다른 peak와 비교할 때 농도가 비교적 낮기는 하였지만  $\sim 5.4$ 와  $\sim 6.2$  ppm에서 conjugated double bond에 해당하는 peak가 있어 polyene계 물질임을 확인하였다. 또한  $\delta 3.0\sim 4.0$  ppm 사이의 peak들은 polyene계 항생물질의 주 구조에 glycosylation 된 당의 peak들에 해당하는 것을 확인하였다(Fig. 6)(15-19). Mass spectrum을 검토한 결과, 본 항암성 항생물질이 열에 매우 불안정하다는 것을 감안할 때, gas chromatography 중에 fragmentation이 쉽게 되어 실제 분자량보다 작은, 그리고 여러 fragment가 존재하여 불순하게 관찰될 수 있을 것이라고 생각되었다. Spectrum 상 최대 분자량은 683.0이었

으며 그 다음으로 큰 분자량에 해당하는 peak는 431.0이었으나, 최대 분자량에서 431.0을 제외한 252.0에 해당하는 peak가 관찰되지 않아, 본 항암성 항생물질의 분자량은 최소한 683.0 dalton 이상인 것으로 추측되었으며, polyene계 항생물질에 주로 glycosylation 되어 있는 mycosamine이나 perosamine(M.W. = 163.0) 등의 amino sugar에 해당하는 peak가 없음이 관찰되어 본 항암성 항생물질은 위와 같은 amino sugar가 아닌 다른 당으로 glycosylation 되어 있는 것으로 추측되었다(Fig. 7). 위의 결과를 모두 종합하여 볼 때, 본 항암성 항생물질은 polyene계의 pentaene계 항생물질중 eurocidin이나 capacidin 계열의 물질이었으며 그 분자량은 최소한 683.0 dalton 이상으로 추측되었다.

### 요 약

미생물로부터의 새로운 항암성 항생물질 개발을 목적으로 토양으로부터 분리한 *Streptomyces* sp. YBE-316이 생산하는 항암성 항생물질은 오직 균체 내에만 존재하였고 pH 5.0~10.0까지 안정하였으며 중성에서 활성이 가장 높았고 열에 대한 안정성은 낮았다. 본 항암성 항생물질의 유기용매에 대한 용해도와 안정성을 검토한 결과 methanol에서 가장 좋았으며, 정제는 균체로부터 acetone 추출, butanol 추출, silica gel column chromatography 등을 이용하여 순차적

으로 행하였다. 본 물질의 항암활성은 낮았으며, 항균활성은 항세균보다는 항진균 활성이 강하였다. 본 항암성 항생물질은, 기초적인 기기분석을 행한 결과, polyene계의 pentaene계 항생물질중 eurocidin이나 capacidin type의 물질로 추측되었으며, 그 분자량은 최소한 683.0 dalton 이상이었고, mycosamine이나 perosamine 등의 amino sugar가 아닌 당으로 glycosylation 되어 있는 것으로 추측되었다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학기술처 주관 G7 Project 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

### 참고문헌

1. Franks, L.M. and N.M. Teich. 1991. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 2nd edition. Pp. 451-467. Oxford University Press.
2. Wingard, L.B. et al. 1991. *Human Pharmacology: Molecular to Clinical*, Pp. 585-610. Wolfe Publishing Ltd.
3. Moore, A.E., L. Sabachewsky, and H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598-602.
4. Moore, G.E., R.E. Gerner, and H.A. Franklin. 1967. Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**: 519-524.
5. Eagle, H. 1973. The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell. Physiol.* **82**: 1-8.
6. Waymouth, C. 1979. Autoclavable medium AM 77B. *J. Cell. Physiol.* **100**: 548-550.
7. Waymouth, C. 1974. To disaggregate or not to diaggregate: Injury and cell diaggregation, transient or permanent? *In Vitro.* **10**: 97-111.
8. Hanks, J.H. and R.E. Wallace. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Exp. Biol. Med.* **71**: 196-201.
9. Patterson, M.K. 1979. *Method in Enzymology: Cell Culture* (Jakoby, W.B. and I.H. Pastan, eds). 58. Academic Press. New York.
10. Butler, M. and M. Dawson. 1992. *Cell Culture: Lab Fax*, Pp. 27-30. Blackwell Scientific Publications.
11. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
12. Keepers, Y.P. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer.* **27**: 897-900.
13. Touchstone, J.C. and M.F. Dobbins. 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 2nd edition. Pp. 163-224. John Wiley & Sons Inc.
14. Bērdy, J. 1980. *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*. Vol. II. Macrocyclic lactone (Lactam) Antibiotics. Pp. 165-313. CRC Press Inc.
15. Hori, S., T. Shima, and A. Ouchida. 1970. Partial structure of the eurocidin complex. *J. Antibiot.* **23**: 102-104.
16. Mechlinski, W. and C.P. Schaffner. 1974. Separation of polyene antifungal antibiotics by high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **99**: 619-633.
17. Pawlak, J., J. Zielinski, J. Golik, J. Gumieniak, and E. Borowski. 1980. The structure of lienomycin, a pentaene macrolide antitumor antibiotic. I. The structure of the carbon skeleton and the location of functionalities. *J. Antibiot.* **33**: 989-997.
18. Pawlak, J., J. Zielinski, J. Golik, E. Jereczek, and E. Borowski. 1980. The structure of lienomycin, a pentaene macrolide antitumor antibiotic. II. The location of the pentaene chromophore and of six isolated double bonds: The complete structure of the antibiotic. *J. Antibiot.* **33**: 998-1004.
19. Pawlak, J., J. Zielinski, P. Kolodziejczyk, J. Golik, J. Gumieniak, E. Jereczek, and E. Borowski. 1979. The structures of lienomycin, a novel type of polyene macrolide antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **17**: 1533-1536.

(Received 20 February 1995)