

Streptomyces peucetius subsp. *caesius* 돌연변이주에 의한 doxorubicin 생산의 최적배양조건

김 승 옥 · 송 수 문* · 문 순 옥*

고려대학교 화학공학과, *수원대학교 유전공학과
(1997년 4월 22일 접수, 1997년 6월 5일 채택)

Optimal Culture Conditions for Doxorubicin Production by a Mutant of *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*

Seung-Wook Kim, Soo-Moon Song*, and Soon-Ok Moon*

Department of Chemical Engineering, Korea University, 1, Anam-Dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

*Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea

(Received April 22, 1997, Accepted June 5, 1997)

요 약 : 본 연구에서는 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* 돌연변이주에 의한 doxorubicin의 생산에 있어서 배양조건 및 배지의 성분을 확립하여 doxorubicin의 생산성을 높이는데 목적이 있다. Doxorubicin 생산을 위한 최적 배지조성은 4% maltose, 0.5% HEPES, 0.02% K_2HPO_4 , 0.01% $MgSO_4$ 로 나타났고, 가장 적합한 종균 접종량과 시기는 10% (v/v), 72시간이었다. Doxorubicin 생산에 적합한 소포체를 찾기 위해 여러 종류의 소포체를 배지에 첨가한 결과 가장 적합한 소포체는 KG(10% K + 10% G)이었으며 최적농도는 0.01%이었다. 교반식 반응기에서 배양할 경우 적합한 통기량은 1.5 v/v min으로 최대 29 mg/l의 doxorubicin을 생산하였고, 1.0 v/v min의 경우에도 플라스크 배양보다 15% 증가된 23 mg/l의 doxorubicin을 생산하였다.

Abstract : The production of doxorubicin by a mutant of *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* was studied. The optimal culture conditions, such as inoculum size and medium composition were established to improve the productivity of doxorubicin. The optimal medium composition was found to be 4% maltose, 0.5% HEPES, 0.02% K_2HPO_4 , 0.01% $MgSO_4$. As an antiform agent, 0.01% KG(10% Adekanol + 10% Silicone) was suitable one among various agents. Culture was carried out in 2.5L jar-fermenter with different aeration rates of 1.5, 1.0, and 1.5 v/v min. The maximum production of doxorubicin(29 mg/l) was obtained at 1.5 v/v min of aeration rate, and even at 1.0 v/v min, the production of doxorubicin was increased up to 15% compared with that of shake-flask culture.

1. 서 론

Anthracycline계 물질은 현재까지 500여종 이상 발견되었거나 합성되었고 화학적 구조의 특징으로 anthraquinone moiety를 가지며, 한개 또는 그 이상의 당으로 치환되어 있다[1, 2]. Anthracycline계 물질에 대한 연구는 1950년대에 본격적으로 시작되어서 여러 anthracycline계열의 물질들이 발견되기 시작했는데 가장 처음으로 임상적 효과가 있는 daunorubicin이 1963년 프랑스와 이탈리아에서 각각 독립적으로 발견되었다[1]. 그 후 Arcamone등[3]에 의해 daunorubicin 생산 균주인 *Streptomyces peucetius*의 mutagen 처리에 의한 돌연변이 균주를 개발하는 과정에서 변이주인 *S. peucetius* subsp. *caesius*

를 발견하였고 daunorubicin과 다른 물질인 14-hydroxydaunorubicin을 생산하는 것이 밝혀져 이 물질을 doxorubicin(adriamycin)이라 명명하였다. 이 anthracycline계 항생물질은 DNA replication과 transcription에 관여하는 helicase를 저해하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다[4]. 현재 anthracycline계 항생물질중 가장 잘 알려진 것으로는 daunorubicin, doxorubicin, aclacinomycin등이 있다. Yoshimoto등[5]에 의하면 daunorubicin생성 균주에서는 이 시작 물질로 부터 aklavinone, ϵ -rhodomycin이 차례로 합성된 후 처음으로 당이 치환된 D788-6이 생성되고 daunorubicin이 만들어진다고 보고하고 있다. Doxorubicin은 daunorubicin이 만들어진 후 효소적 반응에 의한 C14 산화반응에 의해 형성되며 이러한 효소의 활성화는 분쇄한 균사체에

서 검출되었고 효소의 기능은 산소 및 마그네슘의 이온 요구량에 의해 알 수 있다고 보고되었다[6].

Dekleva 등[7, 8]은 방선균 배양시에 균의 특성을 파악하기 위해 균의 성장과 항생제 생산이 비교적 일정한 합성배지를 이용하는 것이 복합배지 사용보다 잇점이 있다고 하였고, daunorubicin 생산 균주인 *S. peucetius* ATCC 29050을 이용해서 합성배지를 발전시켰으며 가장 적합한 탄소원은 glucose라 하였다. 그러나 glucose를 탄소원으로 쓸 경우에 10번 배양할 경우 3번 정도는 anthracycline을 생산하지 않고 pH가 낮아지며 산성물질을 생산하는 경우도 있다고 보고하고 있다. 또한 McGuire 등[9]은 daunorubicin 발효과정을 발전시켜 원균주보다 daunorubicin 생산량을 2배 가량 증가시켰다고 보고하였다.

Doxorubicin은 daunomycin 생산균주인 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesioides*에 의해서만 소량으로 생산된다[3]. Vandamme [1]에 의하면 현재 암치료용으로 가장 많이 사용되고 있는 항암제는 daunorubicin, doxorubicin이라 추측하고 있으며 doxorubicin은 solid tumor에 탁월한 효과가 있어서 유방암, 방광암, 폐암 등에 우수한 치료 계수를 나타내며 급성 백혈병에도 효과가 있는 것으로 보고되었다[10]. Daunorubicin도 점차 보다 넓은 항암범위와 우수한 치료 효과를 나타내는 doxorubicin으로 대체되어 가는 실정이며 또한 doxorubicin의 세계 시장의 판매량은 1980년 현재 약 897억원에 이른다고 보고하고 있다 [1]. 그러나 doxorubicin은 이런 우수한 치료 잇점에 의해 널리 쓰이고 있으면서도 doxorubicin에 대한 생산성 향상과 관련된 연구논문 및 저서는 거의 없으며 위에서 언급한 바와 같이 doxorubicin과 유사한 daunorubicin에 대한 균주개발과 생산공정 개발에 대한 몇가지의 보고가 있을 뿐이다. 이러한 배경으로 볼 때 현재 doxorubicin 경우는 생산성을 높이기 위한 연구가 필요한 실정이라 여겨진다.

그래서 본 연구에서는 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesioides* 돌연변이주에 의한 doxorubicin의 생산에 있어서 배양 조건 및 배지의 성분을 확립하여 doxorubicin 생산성을 높이고자 하였다.

2. 실험

2.1. 사용균주 및 배지

Streptomyces peucetius subsp. *caesioides* ATCC 27952의 변이주인 *S. peucetius* subsp. *caesioides* SK를 YMA배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 1ml trace element solution, 2% agar)를 포함한 사면배지에 접종하여 28°C에서 1주일간 배양시킨 후 4°C에서 보관하여 사용하였다. 종균배지는 YMD배지(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 1% MOPS, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 ml trace element, 0.2% NaCl, 2.5% glucose)를 사용하였다. Doxorubicin 생산배지는 NDY배지(0.4% $NaNO_3$, 0.02% K_2HPO_4 , 0.5% HEPES, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2ml 10X trace element solution, 0.5% yeast extract, 2% glucose)를 기본배지로 한다. NMY 배지는 glucose대신 maltose를 4% 첨가하였다. Trace element solution은 0.4% $ZnCl_2$, 2% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.1% $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.1% $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.1% $(NH_4)_2MO_7 \cdot 2H_2O$ 를 포함한다.

2.2. 배양조건

종균배양을 위해 사면배지에 배양된 균을 YMD배지에서 9~10일간 진탕배양한 후 배양액 1ml 취해서 20% glycerol과 섞어 deep freezer에 보관하였다. Deep freezer에 보관된 배양액을 꺼내어 YMD배지 100ml를 포함한 250ml 삼각플라스크에 접종하고 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH를 이용하여 autoclave 전에 pH 7.2로 맞춘 후, 190 rpm, 30°C로 shaking시키면서 배양하였다. Jarfermentor 사용시 종균배양은 YMD배지 150ml를 포함한 500ml 삼각플라스크에서 배양하였다. Doxorubicin 생산을 위한 삼각플라스크 배양의 경우에는 50ml배지(pH 7.2)를 포함한 250ml 삼각플라스크에서 190 rpm, 30°C로 진탕시키면서 6~7일간 배양한 후 균체량과 doxorubicin을 정량하였다. 2.5 l Jar-fermentor(한국발효기)를 이용한 교반식 배양의 경우에는 조업부피 1.5 l에 0.5~1.5 v/v min, 300 rpm 조건으로 배양하였다.

2.3. 분석방법

Doxorubicin 정량을 위해 배양액 5ml에 oxalic acid 0.15g을 첨가하고 30°C에서 진탕시키면서 40분간 방치한 후에 원심분리하여 상등액 1ml를 취하고 이 상등액에 methanol:chloroform을 1:9로 섞어 만든 유기용매를 5ml 첨가한 후 doxorubicin을 추출하여 HPLC (Waters Ltd.)를 이용 정량하였다. 사용결럼은 C_{18} μ -Bondapak(Waters Ltd.), 용매는 acetonitrile 45ml H_2O 55ml(6.5 ml 20% SDS + Phosphoric acid 666 ml)를 이용하였고, 유량은 1.5 ml/min 이었다. UV-detector를 사용하여 254 nm에서 측정하였다. 균체의 건조중량은 발효액을 6500g에서 15분간 세척 여과하여 얻은 균체를 80°C, 24시간 동안 건조하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 탄소원의 영향

Table 1은 doxorubicin의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 보여준다. NDY를 기본 배지로 하여 탄소원을 변화시켜 30°C, 190 rpm으로 배양하였다. 탄소원의 농도는 3%를 이용하였는데 NDY배지를 이용한 doxorubicin의 생산 실험에서 변이주에 대한 최적의 glucose농도인 3%를 그대로 이용하였다.

Dekleva 등[7]은 anthracycline 생산을 위한 daunorubicin 생산 균주를 이용한 합성배지 개발을 위한 실험에서 가장 적합한 탄소원은 glucose였으며 maltose, starch, fructose, lactose 경우도 적합한 탄소원이라고 보고하였다. 그러나 탄소원으로 glucose를 이용할 경우 10번 배양중 3번 정도 anthracycline을 생산하지 않고 pH가 낮아지며 산성물질을 생산하는 경우가 있다고 보고하였다.

실제로 본 실험에서 glucose를 이용하여 배양을 시도하였지만 buffer agent가 배지에 포함되고 균주가 오염되지 않았음에도 불구하고 pH가 낮아지면서 산성물질을 생산하는 경우가 자주 있었다.

Maltose의 경우에 균체량이 5.3g/l로 다른 탄소원에 비해 높았으며 또한 가장 높은 17 mg/l의 doxorubicin을 생산하였다. Lactose는 0.7 mg/l의 낮은 doxorubicin의 생산을 보였고

Table 1. Effect of Different Carbon Sources on the Doxorubicin Production

Carbon source	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
*None	0.09	0.6	6.90
Maltose	5.30	17	7.24
Glucose	3.10	8.0	8.35
Lactose	0.43	0.7	8.68
Sucrose	2.51	0.0	5.04

*No carbon source was added

탄소원이 없을때 0.6 mg/l의 doxorubicin을 생산하였다. 그러나 sucrose의 경우는 doxorubicin을 전혀 생산하지 못하였고 다른 탄소원에 비해서 pH는 5.04로 매우 낮았다. Sucrose를 탄소원으로 쓸 경우 균증식은 어느정도 이루어지나 doxorubicin의 생산은 억제받았다고 여겨지며 매우 낮은 pH와 관련이 있을 것이라 생각된다. 이 점은 lactose를 탄소원으로 쓸 경우, 또 탄소원을 첨가하지 않았을 경우에 매우 낮은 균체량에도 불구하고 doxorubicin이 생산되었고 pH도 높거나 중성인 8.68, 6.9이었다는 점에서도 알 수 있다. 이런 결과를 볼때 매우 낮은 pH는 doxorubicin의 생산을 억제한다고 생각된다. Glucose 경우 8.0 mg/l의 doxorubicin을 생산하여 비교적 좋은 결과를 나타냈고, 또한 대사작용의 기본물질이나 앞서 말한바와 같이 doxorubicin을 생산하지 않고 pH가 낮아지며 산성물질을 생산하는 경우가 있는 단점이 있어 합성배지의 원래 취지인 균의 성장과 항생제 생산의 일정성에 부합되지 않는다. 따라서 가장 적합한 탄소원으로 maltose를 택하였다. 본 실험과 비슷한 결과로서 daunorubicin의 생산에 있어서 maltose를 glucose대신에 이용하여 삼각플라스크배양에서 daunorubicin생산을 2배 가량 높은 경우가 보고된 적이 있었다[1].

3.2. Maltose농도의 영향

Maltose농도를 1~5%로 변화시켰을때 doxorubicin의 생산은 maltose농도가 4%일때까지 계속 증가하여 1%에서 4.2 mg/l의 doxorubicin을 생산하였고 4% 농도에서는 16 mg/l를 생산하였다(Fig. 1). 그러나 5% 농도에서는 7.3 mg/l의 doxorubicin을 생산하여 현격하게 감소하였다.

Martin and Demain[11]은 탄소원의 농도에 의해 항생제 생산이 결정되며 탄소원의 고갈이 항생제 생산을 야기한다고 하였다. 본 실험에서도 maltose농도 4% 이상에서는 오히려 doxorubicin의 생산을 억제한 것이라 여겨진다. Maltose 농도 4%일때 최대의 doxorubicin을 생산하였고 가장 적합한 농도이었다.

3.3. 성장곡선

기본배지에 4% maltose를 glucose대신 첨가하여 성장특성을 살펴 보았다(Fig. 2). pH는 6일까지 7.1에서 7.37까지 천천히 증가하다가 6~7일 사이에 급격히 증가하여 계속 높은 증가추세를 보이면서 8.55에 이르렀다. Doxorubicin은 7일째 최대 18 mg/l을 생산하였으며 균체량은 6일째 최대 6.2 g/l을 나타

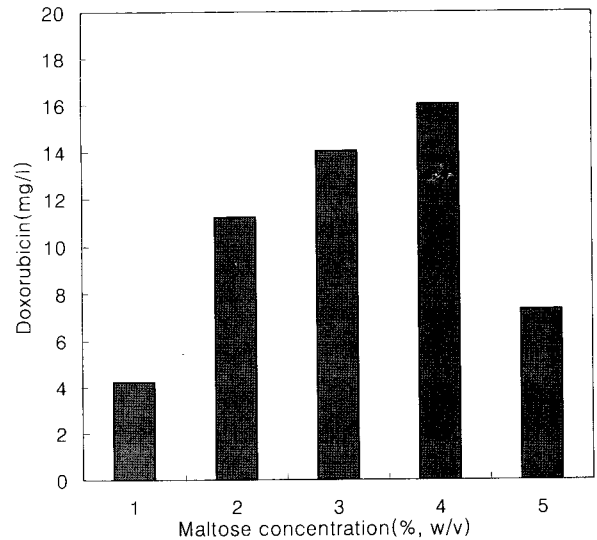


Fig. 1. Effect of maltose concentration on the doxorubicin production.

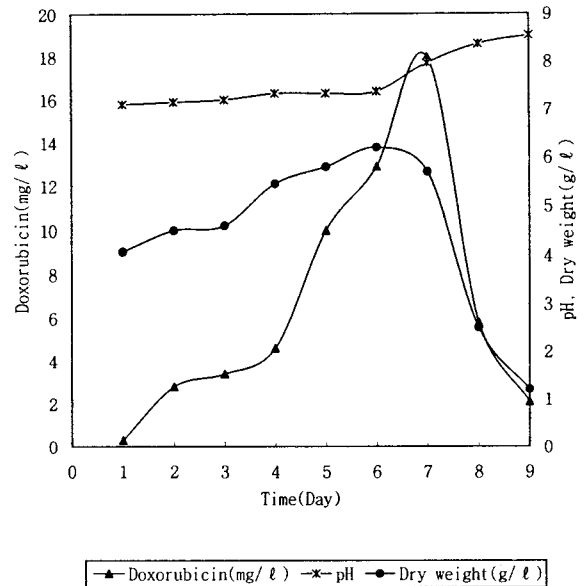


Fig. 2. The course of doxorubicin production in NMY medium.

내었다. Doxorubicin의 생산은 4~7일 사이에 급격하게 증가되었는데 이 시기에 균체량의 증가가 둔화되었다. 이것은 균이 처음에 영양분을 이용하여 주로 증식을 위한 목적으로 대사활동을 하다가 4일째 부터는 주된 대사활동이 doxorubicin을 생산하기 위한 대사활동으로의 전환을 나타낸 것이라고 여겨진다. Doxorubicin과 균체량은 7일째 이후 급격히 감소되었다. 이 시기가 균의 성장에 있어서 영양분 고갈에 따른 사멸기이며 doxorubicin의 생산도 더이상 이루어지지 않았고 또한 안정성이 없어서 급격히 분해된 때문이라 여겨진다. 실제로 Vandamme[1]은 doxorubicin의 안정성이 매우 떨어져 쉽게 다른 물질로 변한다고 보고하였다.

3.4. 종균배양 시기와 접종량의 영향

Chater[12]은 방선균의 분화와 항생제 생산에 공시성이 있다고 보고하였다. 또한 Bulock and Kristiansen[13]은 본 배양에서의 최적의 생산조건을 유지하기 위한 대사상태로의 정확한 시기에서의 전이를 확보하기 위해 종균배양에서의 균의 성장에 대한 주의 깊은 관찰이 필요하다고 하였다. 종균배양에서의 본 배양으로의 접종시기는 많은 경우에 대수기 동안에 이루어지나 항상 그런 것은 아니며 균주의 종류와 공정에 따라 틀리다고 보고하였다. 또한 적합한 종균 접종량은 0.1~20%라고 보고하였는데 접종시기와 더불어 접종량은 본 배양에서의 항생제 생산에 큰 영향을 미치는 요소라고 하였다. 그래서 종균 배양시기와 접종량은 doxorubicin의 생산공정 최적화에 있어서도 중요한 요소라고 생각되기때문에 최적의 종균 배양시기와 접종량을 파악하기 위한 실험을 행하였다.

Table 2는 종균 배양 시간에 따른 doxorubicin의 생산량 변화를 본 것이다. 24~96시간의 종균 배양액을 취하여 생산배지에 10% 농도로 접종하였다. 72시간 배양하여 본 배지에 접종하였을때 17.6 mg/ℓ의 doxorubicin 생산량을 보였고 48, 96시간 배양 후 본 배지에 접종하였을때도 각각 16.8, 15.6 mg/ℓ의 비교적 높은 doxorubicin을 생산하였다.

72시간 종균배양 후 5~15%(v/v) 농도로 접종량을 변화시켜 doxorubicin의 생산을 조사하였다(Table 3). 접종량은 10%(v/v) 농도로 본 배지에 접종할 경우 17.1 mg/ℓ로 가장 높은 doxorubicin을 생산하였다. 15%(v/v)의 경우도 높은 16.4 mg/ℓ의 doxorubicin의 생산량을 보였으나, 20%(v/v)일때에는 오히려 doxorubicin의 생산이 10% (v/v) 접종량에 비해 약 36% 감소한 것을 알 수 있었다.

Table 2와 3으로부터 가장 적합한 종균 배양시기와 접종량은 72시간 배양후 10%(v/v) 농도였다. 종균배양의 경우 72시간 이후 부터 정체기에 이르는 데 이것은 종균배양시 균이 어느 정도 증식이 이루어져 충분한 균체확보와 분화가 필요하고

Table 2. Effect of Inocula Time of Seed Culture on the Doxorubicin Production

Time (hr)	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)
24	2.10	14.1
48	3.50	16.8
72	3.20	17.6
96	3.10	15.6

Table 3. Effect of Different Inoculum Size on the Doxorubicin Production

Inoculum size (%v/v)	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
5	4.27	14.5	7.44
10	5.13	17.1	7.46
15	7.43	16.4	7.43
20	7.52	12.6	7.52

이런 점이 doxorubicin의 생산에 영향을 미친다고 여겨진다.

3.5. Buffer agent의 영향

Doxorubicin의 생산에 있어서 가장 적합한 buffer agent를 찾기위한 실험을 하였다. 기본배지에서 buffer agent를 빼거나 HEPES대신에 CaCO₃, 또는 종균배지와 같은 buffer agent인 MOPS를 이용하여 배양하였다(Table 4).

Buffer agent를 첨가하지 않은 경우에 매우 낮은 농도의 doxorubicin을 생산하였고 HEPES를 사용할 경우가 15.6 mg/ℓ로 가장 많은 doxorubicin을 생산하였다. 각각 0.1, 0.3, 0.5, 0.8%의 농도로 CaCO₃를 첨가한 경우 0.5% 농도에서 가장 높은 14.1 mg/ℓ의 doxorubicin을 생산하였다. 또한 0.3%에서 가장 높은 9.0 g/ℓ의 균체량을 보였는데 이것은 HEPES, MOPS의 경우에 비해 각각 약 2, 1.5배 높은 양이다. 이런 결과를 통해서 HEPES의 경우가 doxorubicin의 생산에 있어서 가장 적합하였으나, 값이 비싸기 때문에 값싼 CaCO₃ 이용을 고려해 볼만하다고 여겨진다. 실제로 daunorubicin 생산을 위한 최적화 배지에 CaCO₃가 첨가되어 있고[9, 14], 이것은 CaCO₃의 완충 작용이 daunorubicin의 생산에 도움을 주기 때문이라 여겨진다.

3.6. K₂HPO₄의 영향

인산은 균체의 증식에는 도움을 주지만 항생제 생산은 억제하는 것으로 알려져 있다. Dekleva 등[7]은 인산이 anthracycline의 생산을 지연시킨다고 보고하였고, Lebrhi와 Germain [15]은 cephamycin과 clavulanic acid생산이 인산에 의해 저해 받는다고 하였다. 이같이 인산의 최적 농도결정은 항생제 생산에 있어서 중요하다.

Fig. 3은 doxorubicin의 생산에 있어서 인산의 영향을 나타낸 것이다. Doxorubicin생산을 위한 최적의 인산 농도는 0.01~0.02%이었고 0.03, 0.04%에서는 0.01~0.02%에서 생산된 doxorubicin의 약 42% 정도를 생산하여 0.03% 이상의 농도에서는 doxorubicin의 생산이 억제받는 것을 알 수 있었다.

3.7. MgSO₄의 영향

미량의 금속이온은 항생제 생산에 영향을 미친다고 알려져 있다. Daunorubicin에서 doxorubicin으로의 변환에 관여하는 효소도 마그네슘이온에 영향을 받는다는 것이 보고되었다[6].

Doxorubicin 생산에 있어서 마그네슘이온의 영향을 알아보기 위해 MgSO₄를 각각 0.005~0.05% 농도로 변화시키면서 doxorubicin의 생산을 조사하였다(Fig. 4). 가장 적합한 MgSO₄ 농도는 0.005~0.01%의 농도였으며 이때 각각 16.2, 15 mg/ℓ의 doxorubicin을 생산하였다. MgSO₄를 첨가하지 않았을 때는 최대 생산된 doxorubicin의 생산의 약 17%만 생산하였으며, 0.015% 이상의 농도에서 doxorubicin의 생산이 약 50% 감소하였다. 이런 점들을 미루어 볼 때 MgSO₄의 적정농도는 doxorubicin의 양을 증가시키나 너무 높을 경우는 오히려 억제하는 것을 알 수 있었다. 앞의 결과들로 부터 *S. peucetius* subsp. *caesius* SK에 대한 doxorubicin의 생산의 최적 합성배지조건을 정리해 보면 Table 5와 같다. 따라서 가장 적합한 탄소원은 4% maltose, 종균배양 접종시기와 접종량은 72시간 배양 후 10% (v/v) 농도로 접종, K₂HPO₄와 MgSO₄의 최적 농도는 각

Table 4. Effect of Various Buffer Agents on the Doxorubicin Production

Buffer agent	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
^a None	1.05	0.50	8.20
^b HEPES	3.21	15.60	7.40
^c MOPS	4.92	14.00	7.44
0.1%(w/v)CaCO ₃	9.00	9.60	8.23
0.3%CaCO ₃	6.03	12.10	8.03
0.5%CaCO ₃	5.38	14.10	8.00
0.8%CaCO ₃	4.80	8.20	8.50

^a No buffer agent

^b N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid

^c 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid

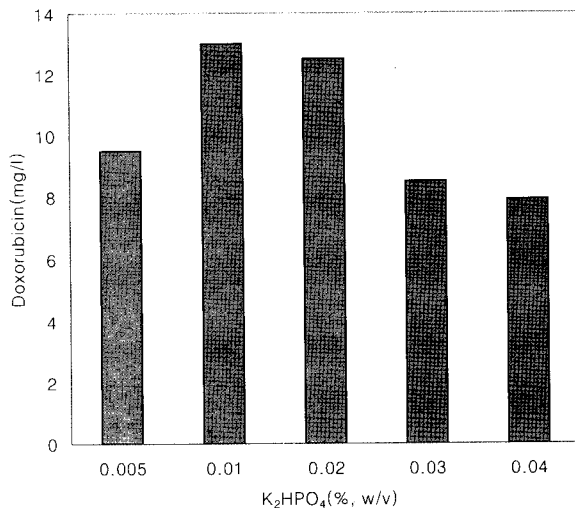


Fig. 3. Effect of phosphate concentration on the doxorubicin production.

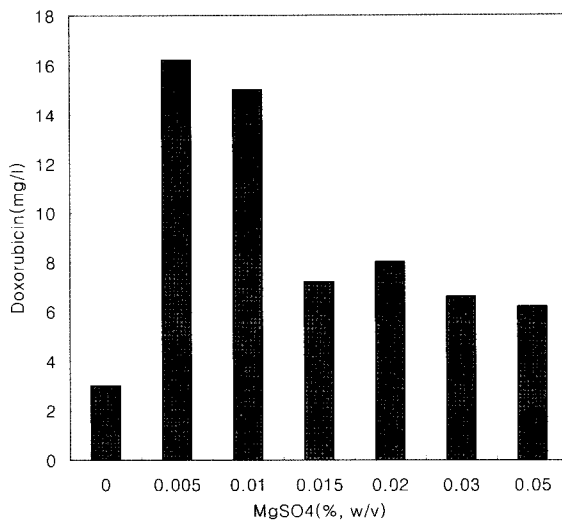


Fig. 4. Effect of magnesium concentration on the doxorubicin production.

각 0.01~0.02%, 0.015~0.01%였다. Doxorubicin생산의 경우 K₂HPO₄는 0.01%, MgSO₄는 0.015%에서 가장 높았지만 균체량과 doxorubicin의 생산을 모두 고려할 경우 K₂HPO₄와 MgSO₄의 최적농도는 0.02%, 0.01%였다. K₂HPO₄와 MgSO₄의 농도 및 buffer agent는 기본배지의 최적 조건과 거의 일치하게 나타났다. 이후의 실험에서는 Table 5에서 보여주는 최적 조건을 이용하였다.

3.8. Soybean oil의 영향

Soybean oil을 0.1~0.5%농도로 첨가하여 doxorubicin의 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다(Table 6). 전반적으로 soybean oil을 첨가하지 않는 경우에 비해 첨가할 경우 doxorubicin의 생산이 감소하였는데, 0.1, 0.2%를 첨가했을 때 약 44%가 감소하였고, 0.4~0.5%를 첨가했을 때 약 70%가 감소되었다. 그러나 0.3%를 첨가할 경우 16.1 mg/l의 doxorubicin을 생산하여 control에 가장 근접한 생산량을 나타내었다. Control 경우는 18 mg/l의 doxorubicin의 생산하였다.

이것은 soybean oil이 다른 antifoam과 마찬가지로 foam의 형성을 억제하며 그 속에 포함된 여러 미량의 성분들이 항생제 생산에 도움을 주기 때문이라 여겨진다. 그러나 본 실험에서는 soybean oil을 첨가 배양할 경우 doxorubicin의 생산에 도움을 주지는 않았다. 하지만 0.3% 농도로 antifoam대신 넣을 경우를 고려할 만 하다고 여겨진다. 실제로 반응기를 이용해 배양할 경우 배지에 0.3%의 soybean oil을 첨가하였다.

3.9. 소포제의 영향

반응기에서 배양할 경우 antifoam대신 soybean oil를 0.3% 첨가하여 배양을 하였는데 교반식 반응기에서 통기량이 1.0 v/v min까지는 문제점이 없었으나 1.5 v/v min 인 조건에서 심한 foam 생성으로 인해 적당한 소포제의 선택과 첨가가 요구되었다.

Pinnert와 Preud Homme[16]는 daunorubicin 생산배양시에 소포제의 첨가없이 soybean oil을 사용하였고 McGuire등[9]은 소포제로 Prochem #51을, Umezawa 등[14]의 특허에 의하면 필요할 경우 silicone계열을 사용한 것으로 보고하였다.

K는 아테카놀 계열, G는 silicone계열이다. KG는 K와G를 10% 농도로 만들어 섞은 것이다. A는 AZ-20이라는 상품명으로 생산되는 소포제이다. Table 7은 소포제 첨가 배양의 경우에 doxorubicin의 생산을 조사한 것으로 모두 0.01% 농도가 되게 첨가하여 30°C, 190 rpm으로 7일간 배양하였다. KG의 첨가 경우가 가장 많은 doxorubicin을 생산하였으며 control과 비교해서 보면 약 10% 증가된 20.4 mg/l의 doxorubicin의 생산을 나타내었다. 이는 KG가 가장 적합한 소포제임을 나타낸다. G, A, K를 첨가할 경우 doxorubicin의 생산이 각각 20, 21, 23%가 감소하였다.

Table 8은 적당한 소포제인 KG의 최적 농도를 결정하기 위한 실험이다. 소포제 KG를 0.01~0.05% (v/v)농도로 배지에 첨가하여 doxorubicin의 생산에 있어서의 영향을 관찰하였다. 일반적으로 소포제의 첨가는 배양중 물질전달을 방해하여 생산물질의 생산을 방해하는 것으로 알려져 있으나, KG의 농도가 0.01%일때에는 오히려 doxorubicin의 생산을 증가시키는

Table 5. Optimal Culture Condition for the Doxorubicin Production by *S. peucetius* subsp. *caesius* SK

Inocula time	72 hour
Inoculum size	10% (v/v)
Carbon source	4% maltose
Buffer	0.5% HEPES
K ₂ HPO ₄	0.02% (w/v)
MgSO ₄	0.01% (w/v)

Table 6. Effect of Soybean Oil on the Doxorubicin Production

Soybean oil (%v/v)	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
None	3.07	18.0	7.64
0.1	1.46	10.1	8.09
0.2	2.49	8.1	8.04
0.3	3.32	16.1	7.78
0.4	4.05	5.6	8.12
0.5	2.26	5.4	7.75

Table 7. Effect of Various Antifoam Agents on the Doxorubicin Production

Antifoam agent (0.01%, v/v)	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
^a Control	3.07	18.1	7.64
^b G	2.05	13.5	7.90
^c KG	4.65	20.4	7.77
AZ-20	1.85	14.2	7.59
^d K	3.06	13.8	7.20

^a No antifoam agents were added.

^b Adekanol serial type

^c 10% Adekanol + 10% Silicone

^d Silicone serial type

Table 8. Effect of Antifoam Agent(KG) Concentration on the Doxorubicin Production

Concentration of KG (% v/v)	Dry weight (g/l)	Doxorubicin (mg/l)	pH
Control	5.00	12.0	7.56
0.01	4.44	15.2	7.45
0.02	2.52	7.7	7.55
0.03	3.21	7.4	7.56
0.05	5.39	8.1	7.57

것을 알 수 있었고, 0.02% 이상 첨가시에 모두 control에 비해

약 40% 감소된 doxorubicin을 생산함을 나타내었다. 이런 결과로 미루어 가장 적합한 소포제는 KG였으며 첨가농도는 0.01%였다.

3.10. 교반식 반응기에서 doxorubicin의 생산

교반식 반응기에서는 통기량을 0.5, 1.0, 1.5 v/v min로 변화시켜 doxorubicin의 생산에 미치는 영향을 살펴보았다.

1.0 v/v min 조건으로 배양할 경우에 doxorubicin은 9일째 최대 23 mg/L를 생산하였고 6일째부터 정체기를 이루었으며 용존 산소농도는 세포가 활발히 증식하는 대수기에서 거의 0으로 떨어지다가 정체기에 이르러 다시 증가하였다. 또한 doxorubicin의 생산도 대수기에서 급격히 증가하였다(Fig. 5).

1.5 v/v min 경우는 균체의 성장이 1.0 v/v min 조건보다 빨라서 5일째 최대 균체량을 나타냈고, doxorubicin은 최대 29 mg/l 생산하였으며 심한 foam 형성도 보였다(Fig. 6). 이같은 결과로 부터 doxorubicin의 생산에 있어서 산소가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 0.5 v/v min 경우 균체의 증식이 가장 좋지 않았으며 doxorubicin도 아주 적은 양을 생산하였다(Fig. 7).

방산균에 의한 항생제 생산의 경우에 자주 문제가 되는 것 중 하나가 균사체의 증식에 따른 점도증가이다. 점도증가는 대부분의 항생제 생산에 있어서 중요한 산소전달을 방해한다는 점에서 균사형태의 조절방법을 통해 점도를 감소시키고 산소전달율을 높이는 방안이 다양하게 연구되고 있다. 이런 점에서 항생제 생산에 있어서 지속적인 균의 형태관찰을 통해 발효중의 균의 성장형태의 특성을 파악하는 것이 중요하다고 생각된다.

균체의 성장이 대수기에 접어드는 시점인 3일에는 포자가 발아하여 균사를 이루지만 균사의 길이가 아직 짧은 것이 관찰된다. 그러나 계속 시간이 지나면서 균사는 길어지고 서로 엉키는 현상을 나타낸다. 또한 정체기인 6~9일에 이르러서는 많은 균사들이 밀집되어 뭉쳐 있는 것이 관찰되었다.

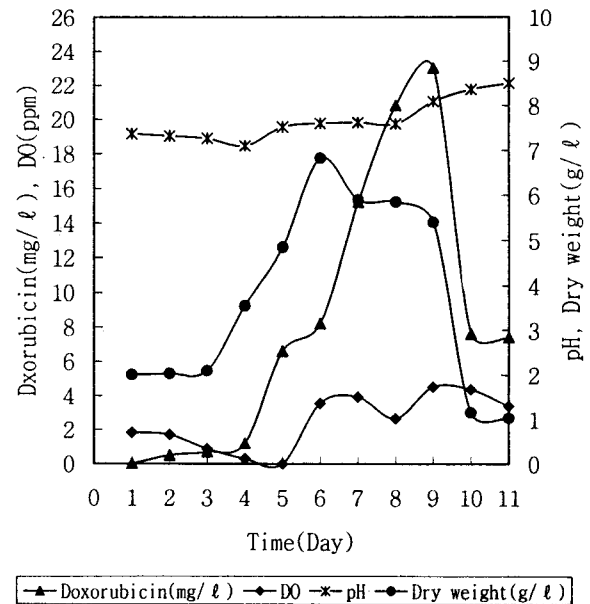


Fig. 5. The course of doxorubicin production in the 2.5L stirred-tank reactor(aeration rate 1.0 v/v min).

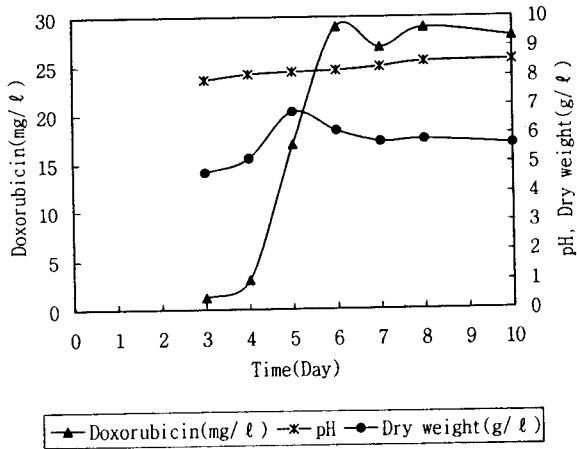


Fig. 6. The course of doxorubicin fermentation in the 2.5L stirred-tank reactor(aeration rate 1.5 v/v min).

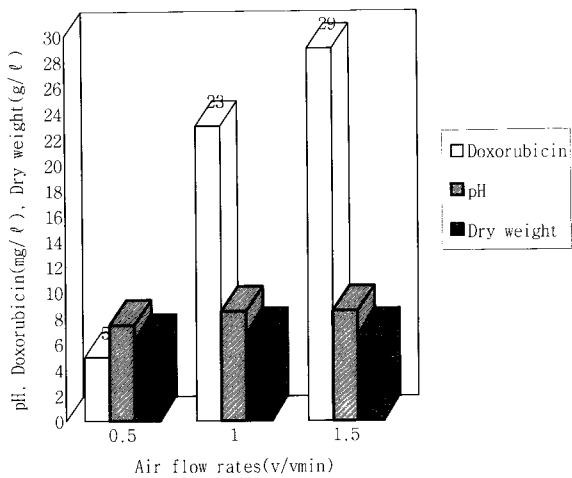


Fig. 7. Effect of different air flow rates on the doxorubicin production.

4. 결 론

1) NDY배지를 기본배지로 하여 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* SK(변이주)에 의한 doxorubicin 생산의 최적조건과 배지조성을 연구한 결과 doxorubicin 생산을 위한 최적의 배지조성은 4% maltose, 0.5% HEPES, 0.02% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄이었고 가장 적합한 종균점종량과 시기는 10%, 72시간이었다.

2) Doxorubicin생산에 적합한 소포제를 찾기 위해 여러 종류의 소포제를 배지에 첨가한 결과 가장 적합한 소포제는 KG (10% Adekanol + 10% Silicone)이었으며 최적농도는 0.01%이었다.

3) 교반식배양기에서 배양할 경우 적합한 통기량은 1.5 v/v min로 최대 29 mg/l의 doxorubicin을 생산하였고, 1.0 v/v min의 경우도 플라스크 배양보다 15% 증가된 23 mg/l의 doxorubicin을 생산하였다.

감 사

본 연구는 교육부의 학술연구 조성비(생물화학공학분야; 관리번호 95-D-04)와 생물공정연구센터의 학위논문 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. J. Vandamme, *In Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Ch. 19(1984).
2. H. J. Rhem and G. Reed, *In Biotechnology*, 4, 512 (1986).
3. F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Frantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Paland C. Spall, *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1101 (1969).
4. N. R. Bachur, F. Yu, R. Johnson, R. Wickey, Y. Wu, and L. Markas, *Mol. Pharmacol.*, 41, 993(1992).
5. A. Yoshimoto, T. Oki, and H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 33, 1199(1980).
6. T. Oki, Y. Takatsuki, H. Tobe, A. Yoshimoto, T. Takeuchi, and H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 34, 1229(1981).
7. M. L. Dekleva, J. A. Titus, and W. R. Strohl, *Can. J. Microbiol.*, 31, 287(1985).
8. M. L. Dekleva and W. R. Strohl, *J. Can. Microbiol.*, 33, 1129(1987).
9. J. C. McGuire, B. K. Hamilton, and R. J. White, *Process Biochem.*, 14, 2(1979).
10. F. Arcamone, *In Medical Series*. Academic press, 1(1981).
11. J. F. Martin and A. L. Demain, *Microbiol. Reviews*, 44, 230(1988).
12. K. F. Chater, *Cold Spring Harbour Laboratory*, New York, 89(1984).
13. J. Bullock and B. Kristiansen, *In Basic biotechnology*, Ch. 16, 421(1987).
14. H. Umezawa, K. Kouno, T. Ishihara, A. Yoshimoto, Y. Takatsuki, and H. Tobe., *U.S. patent No. 4,592,999*(1986).
15. A. Lebrihi, and P. Germain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 130(1989).
16. S. Pinnert and J. Preud' Homme, *U.S. patent No. 3997662*(1976).