

발효액중의 1, 4-Androstadiene-3, 17-Dione의 정량법

이 강 만 · 배 무*

이화여자대학교 약학대학 · *자연대학

(Received October 2, 1987)

Quantitative Analysis of 1, 4-Androstadiene-3, 17-Dione in Fermentation Broth

Kang Man Lee and Moo Bae*

College of Pharmacy and *College of Natural Science, Ewha Womens University, Seoul 120, Korea

Abstract—Fermentation processes have been employed to produce 17-ketosteroids from sterol with chelator of Fe^{2+} such as α, α' -dipyridyl. To analyze the products of sterol fermentation, we developed a simple TLC method without interference of the chelator α, α' -dipyridyl, using Ag^+ band on TLC plate.

Sterol의 측색을 절단하는 미생물을 발견한 이래^{1,2)}, 이러한 미생물의 성질을 이용하여 스테로이드 약물의 중간체를 얻기 위한 공정개발이 연구되어왔다.^{3,4,5)} 측색절단 능력이 있는 미생물의 경우 스테롤 핵을 분해하는 능력도 동시에 가지고 있어 17-ketosteroids를 얻기 위하여는 스테롤핵을 분해하지 못하도록 발효중 저해제를 첨가하든지⁶⁾, 핵을 분해하는 효소를 만들지 못하는 변이주를 이용하는 방법이 있다.⁷⁾ 미생물을 이용한 측색절단 발효액으로부터 생성물을 정량하는데 gas chromatography를 사용할 수 있으나, 이러한 고가의 기구를 사용하지 않고 TLC 방법을 이용하여 스테롤핵분해 저해제인 α, α' -dipyridyl의 영향을 제거하면서, 17-ketosteroids를 정량할 수 있는 방법을 발견한 바 보고 하고자 한다.

실 험 방 법

균주—*Arthrobacter simplex* NCIB8729을 사용하였다. 이균주는 cholesterol (0.1%)이 함유된 배지(NH_4NO_3 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, K_2HPO_4 0.025%, yeast extract 0.5%, pH 7.0)에서 성장하며, cholesterol을 분해하는 능력을 가지고 있다.⁴⁾

발효—위에서 언급한 배지에 nutrient agar

slant에 보관 중이던 균을 1백금이 접종하여 30°C에서 진탕 배양하였으며, 배양 시작후 13~18시간에 Fe^{2+} chelator로 α, α' -dipyridyl(최종농도 0.5~1mM)을 첨가하였다.

발효 생성물의 추출 정량— α, α' -dipyridyl을 첨가 후 일정시간에 발효액을 취하여 동량의 ethylacetate를 넣고, 잘 진탕 후 방치, ethylacetate 층을 취하여 발효 생성물인 1, 4-androstadiene-3, 17-dione 또는 4-androstene-3, 17-dione을 정량하였다. 정량을 위하여 TLC 방법을 사용하였으며 그 방법은 다음과 같다. TLC plate 조제에는 silica gel G nach Stahl을 사용하였으며, 시료를 TLC plate에 점적하였다. 점적된 시료 바로 위(0.5cm)에 $AgNO_3$ 포화 ethanol용액을 일직선으로 점적하였다. 이렇게 시료와 Ag^+ 가 점적된 TLC plate를 $CHCl_3$: ethylether (10 : 1) 용매계에서 전개시켰다. 발효산물인 17-ketosteroids의 위치를 UV로 확인하였으며 발효산물을 포함하는 위치의 silica gel을 긁어내어 ethanol (3ml)로 추출, 235nm에서 UV 흡수정도를 측정하여 정량하였다.

실 험 결 과 및 고 찰

Fe^{2+} chelator로 첨가하는 α, α' -dipyridyl은 발

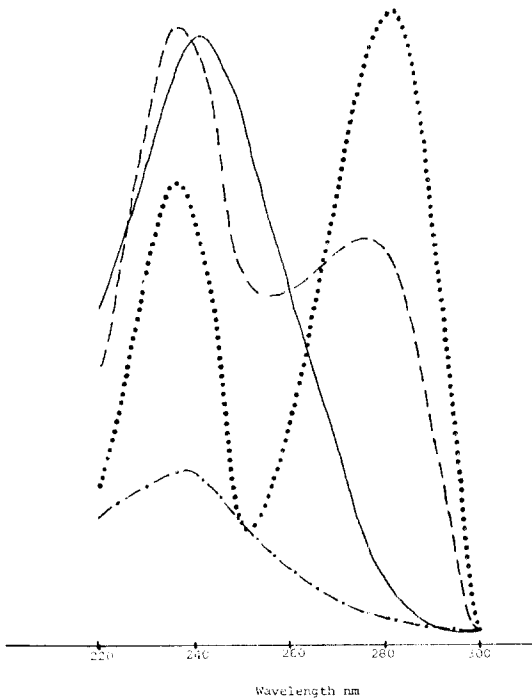


Fig. 1—UV spectrum patterns of 1,4-androstadiene-3,17-dione with or without α, α' -dipyridyl. 1,4-androstadiene-3,17-dione only (— · —), α, α' -dipyridyl (·····), 1,4-androstadiene-3,17-dione spot of fermentation broth with Ag^+ band application on TLC plate (—) and 1,4-androstadiene-3,17-dione spot of fermentation broth without Ag^+ band application (----).

효액으로 부터 생성물을 추출할 때 사용하는 ethylacetate 용매에 추출 이입됨으로써 235nm에서 흡수 정도로 발효 생성물을 정량하고자 할 때 영향을 미치게 된다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 220~250nm에서 α, α' -dipyridyl은 흡수대를 나타내고 있어 235nm에서 1,4-androstadiene-3,17-dione 또는 4-androstene-3,17-dione을 정량할 때, α, α' -dipyridyl의 혼입 정도에 따라 흡수정도가 영향을 받게 된다. 이러한 영향은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 sample을 점적한 TLC plate 위에 Ag^+ band를 형성시키므로써 α, α' -dipyridyl이 1,4-androstadiene-3,17-dione 또는 4-androstene-3,17-dione spot에 혼입 되는 것을 효과적

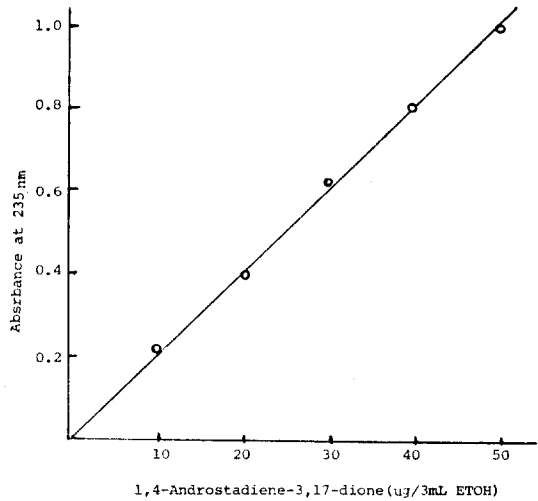


Fig. 2—The standard curve of 1,4-androstadiene-3,17-dione from TLC plate method.

으로 제거할 수 있어 250~300nm에서 α, α' -dipyridyl에 의한 흡수대를 볼 수 없었다. 즉 Ag^+ band에 의해 시료 중에 혼재하던 α, α' -dipyridyl이 TLC 상에서 전개되는 것이 차단되어 keto-steroid spot으로의 오염을 방지했음에 기인하는 것이라 생각할 수 있다. 이러한 현상은 α, α' -dipyridyl을 Ag^+ band가 형성되어 있는 부분과 Ag^+ band가 형성되지 않는 부분에 점적, 전개 후 Fe^{2+} 용액을 분무하여 Ag^+ band에 의한 α, α' -dipyridyl의 비전개를 확인함으로써 알 수 있었다. 즉 Ag^+ band가 없는 경우 α, α' -dipyridyl은 전개용매에 의하여 전 plate상에 전개되어 Fe^{2+} 용액에 의하여 붉은 색을 나타내었다.

이상의 실험적 관찰을 1,4-androstadiene-3,17-dione 정량에 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 표준품 1,4-androstadiene-3,17-dione을 일정량씩 TLC plate에 점적, 전개 후 1,4-androstadiene-3,17-dione spot을 긁어내어 ethanol로 추출하여 235nm에서 UV 흡수정도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다(Fig. 2). Fig. 3에서는 발효 중의 생성산물의 축적을 TLC-UV absorbance을 이용하여 얻은 결과를 보여주고 있다.

위의 실험적 결과로부터 Fe^{2+} chelator agent가 첨가된 sterol 발효액으로 부터 생성산물의

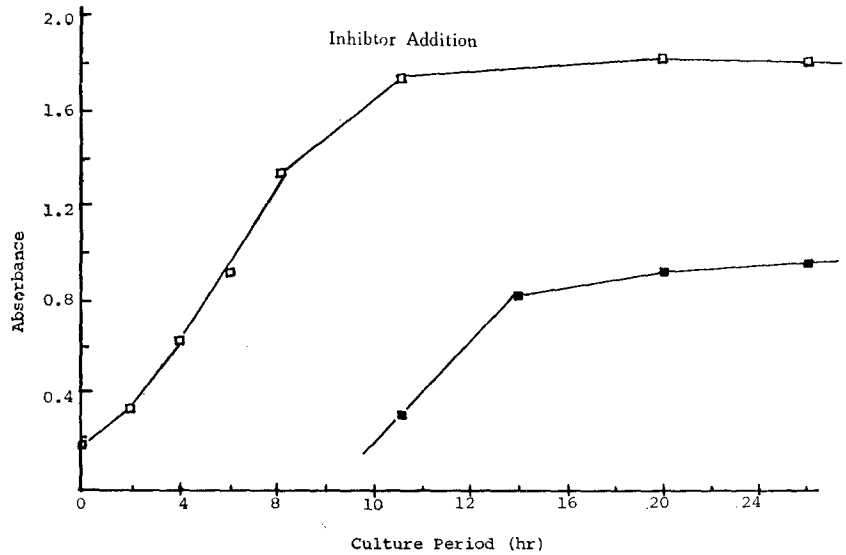


Fig. 3—Cell growth and 1,4-androstadiene-3,17-dione formation in fermentation broth of *Arthrobacter simplex*. Cell growth (A660) : □-□ and 1,4-androstadiene-3,17-dione (A235) : ■-■.

정량을 gas chromatography 방법을 사용하지 않고도 TLC 방법을 이용하여 분리 정량할 수 있음을 확인할 수 있었다.

문헌

- 1) Nagasawa, M., Bae, M., Tamura, G. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.* **33**, 1644 (1969).
- 2) Arima, K., Nagasawa, M., Bae, M. and Tamura, G.: *Agr. Biol. Chem.* **33**, 1636 (1969).

- 3) 今田幸男, 스테로이드 醫藥品の 生産, 應用分子遺傳學(木住雅彦·堀内忠郎), 講談社, p. 194, 1986.
- 4) 배무, 이강만, 강경희 KIST보고서 BSEO4632a, b (1979, 1980).
- 5) Christoph, K. and Martin, A.: *Adv. Appl. Microbiol.* **22**, 29 (1977).
- 6) Nagasawa, M., Watanabe, N., Hashiba, H., Tamura, G. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.* **34**, 789 (1970).
- 7) 今田幸男, 日本特開昭 55, 85396 (1980).