

Streptomyces peucetius subsp. *caesius*와 *S. platensis*사이의 원형질체 융합균주의 발효특성

임미송 · 이강만*

이화여자대학교 약학대학

(Received October 17, 1994)

The Fermentation Characteristics of the Interspecific Protoplast Fusant of *S. peucetius* and *S. platensis*

Mi Song Im and Kang Man Lee*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—An interspecific fusant strain, *Streptomyces* MS1 was obtained by protoplast fusion between *S. peucetius* subsp. *caesius* and *S. platensis*. We studied on the fermentation characteristics of the fusant strain. The fermentation products of the fusant MS1 was identical with *S. peucetius*, but its production of anthracycline was more stable than *S. peucetius* under various fermentation conditions in regard to acidogenesis of fermentation broth. The optimal medium composition for anthracycline production by fusant MS1 as follows: sucrose 2.0%, glucose 1.0%, soytone 0.7%, CaCO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.013%, casamino acids 0.01%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂·6H₂O 1.024%, 5M CaCl₂·5H₂O 0.4%, 1N NaOH 0.7%, 20% L-proline 1.5%. In this condition, the productivity of anthracycline was 80~100 µg/ml.

Keywords □ *S. peucetius*, fusant MS1, acidogenesis, optimal medium composition.

Adriamycin은 anthracycline 계통의 항생물질로 임파계에 발생하는 백혈병, 임파종, 그 이외 유방암, 육종, 위암, 폐암 및 갑상선암 등 현재 광범위하게 사용되는 항암제 중 하나이다.^{1,2)} 강한 축적성 심장독성이 있으며³⁾ 또한 생산 균주가 불안정하여 환경의 영향을 쉽게 받으며^{4,5)} 그 생산 효율이 낮다는⁶⁾ 문제점을 가지고 있다. 독성이 감소되고 항암효과가 증가된 anthracycline계 물질을 찾기위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 균주개량의 목적으로 원형질체 융합^{7,8)}을 anthracycline계 물질을 생산하는 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*와 대상균으로 oxytetracycline을 생산하는 *Streptomyces platensis* 사이에 적용하여 형질이 변화된 융합균주를 얻었는 비⁹⁾ 선별된 균주에 대해 발효 특성을 실험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

균주

실험에 사용한 균주는 *S. peucetius* subsp. *caesius* KCTC 9039와 *S. platensis* KCTC 1088의 원형질체 융합에 의해 얻어진 융합균주 MS1을 사용하였다.

배지

균주 보존에는 sucrose 10.3%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂·6H₂O 1.024%, yeast extract 0.5%, casamino acids 0.01%를 포함하는 배지 90 ml에 5.73% Tes buffer(pH 7.2) 10 ml, trace elements solution 200 µl, agar 2.0 g을 첨가하여 고압 멸균한 용액에 0.5% KH₂PO₄ 1 ml, 5M CaCl₂·2H₂O 1 ml, 20% L-Proline 1.5 ml, 1N NaOH 0.7 ml를 첨가해 R2YE 고체배지를 만들어 사용하였다. Trace elements solution은 증류수 1000 ml에 ZnCl₂ 40 mg, FeCl₃·6H₂O 200 mg, CuCl₂·2H₂O 10 mg, MnCl₂·4H₂O 10 mg, Na₂B₄O₇·10H₂O 10 mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10 mg를 첨가하여 조제하였다. 종배양과 본 배양에는 R2YE 액체 배

지를 사용하였다.

Glucose에 의한 산성화(acidogenesis) 실험에는 NaNO_3 10 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM를 함유한 용액 100 ml에 trace elements solution 200 μl (0.2%)를 첨가한 Nitrogen Defined Medium(NDM)⁴⁾을 사용하였다.

융합균주 MS1과 *S. peucetius*의 비교실험

Total anthracycline정량—R2YE 액체배지 50 ml에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 4일 동안 배양한 배양액에 CHCl_3 : MeOH(9 : 1)을 동량 가한 후 10분 동안 진탕하여 anthracycline을 추출한 후 원심분리하였다(ECONOSPIN, 3000 rpm, 10분). CHCl_3 층만을 취하여 용매를 완전히 건조시키고, 메탄올을 동량 가하여 녹인 후 495 nm에서 정량하였다($E^{1\%} = 220$).

***S. peucetius*와 융합균주 MS1의 성장곡선**—R2YE 액체배지 50 ml에 각각의 균을 접종하여 30°C, 200 rpm에서 배양하였다. 배양액 1 ml씩 24시간 마다 sampling하여 미리 항량으로 건조시킨 무게를 측정하여 eppendorf tube에 넣고 원심분리(MICROSPIN 12S, 10000 rpm, 1분)하여 균체만 모았다. 모아진 균체를 90°C oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 건조 균체량을 측정하였다.

접종시기의 영향—R2YE 액체배지 50 ml에 두 균을 24시간, 48시간, 96시간, 144시간까지 30°C, 200 rpm에서 종배양한 후 각각을 동일배지 50 ml에 10% 접종하여 본 배양하였을 때 anthracycline계 물질 생성을 비교하였다.

탄소원의 영향—R2YE 액체배지 50 ml에 두 균을 30°C, 200 rpm에서 48시간 종배양 후 동일배지에 10.3% sucrose 대신 같은 비율로 starch, maltose, glucose, fructose, glucose와 fructose 등이 각각 첨가되어 있는 배지에 종배양액을 10% 접종하여 anthracycline계 물질생성을 비교하였다.

완충액의 영향—R2YE 액체배지 50 ml에 30°C, 200 rpm에서 48시간 두 균을 종배양한 후 0.025M Tris, Hepes, Pipes와 0.2% CaCO_3 가 각각 pH완충제로 첨가 되어 있는 동일배지(pH 7.2)에 10% 접종하여 anthracycline계 물질의 생성을 비교하였다.

Phosphate 농도의 영향—R2YE 액체배지 50 ml에 30°C, 200 rpm에서 48시간 두 균을 종배양한 후 KH_2PO_4 농도를 0 mM, 1 mM, 10 mM, 15 mM로 변

화시킨 동일배지에 접종하여 최종 anthracycline계 물질 생성을 비교하였고, CHCl_3 추출액을 TLC에 점적하여 분리시킨 후 농도별로 분리된 spot들을 densitometer로 정량하였다.

Glucose에 의한 산성화(acidogenesis)—Starch, fructose, sucrose, glucose를 따로 멸균하고 maltose는 여과 멸균하여 NDM에 최종농도가 125 mM이 되도록 가했다. R2YE 액체배지에 30°C, 200 rpm에서 48시간 종배양한 균액을 10%씩 접종하여 30°C, 200 rpm으로 4일 배양 후 pH와 anthracycline을 정량하였다.

융합균주 MS1의 최적 발효조건

R2YE 액체배지 50 ml에 30°C, 200 rpm에서 48시간 종배양한 후 다음의 배지에 종배양액을 10%씩 접종하여 배양하고, 건조 균체량과 total anthracycline을 정량하였다.

탄소원—Sucrose와 fructose 농도를 0~15%까지 변화시키면서 R2YE 액체배지에 첨가한 후 anthracycline생성량을 비교하였다.

질소원— NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3 , asparagine, yeast extract, malt extract, soytone, peptone, tryptone, NZ amine을 각각 0.5%씩 R2YE 액체배지의 질소원으로 첨가했고, soytone, KNO_3 , yeast extract에 대해서는 농도를 0.3~2%로 변화시키면서 anthracycline 생성량을 비교하였다.

pH완충제—pH완충제로 CaCO_3 를 0~1.0%까지 변화시키면서 R2YE 액체배지에 첨가하여 anthracycline 생성량을 비교하였다.

결과 및 고찰

융합균주 MS1과 *S. peucetius* 비교실험

Total anthracycline 정량—4일 배양 후 정량한 총 anthracycline 생성량은 두 균 모두 40~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 이상의 결과로 MS1의 anthracycline 생성량은 *S. peucetius*와 차이가 없었다.

***S. peucetius*와 융합균주 MS1의 성장곡선**—초기 성장속도는 MS1이 *S. peucetius*에 비해 느렸으나 성장곡선 후반부의 균체량 감소가 *S. peucetius*는 급격한 반면 MS1은 완만했다(Fig. 1).

접종시기의 영향—*S. peucetius*는 24시간, MS1은

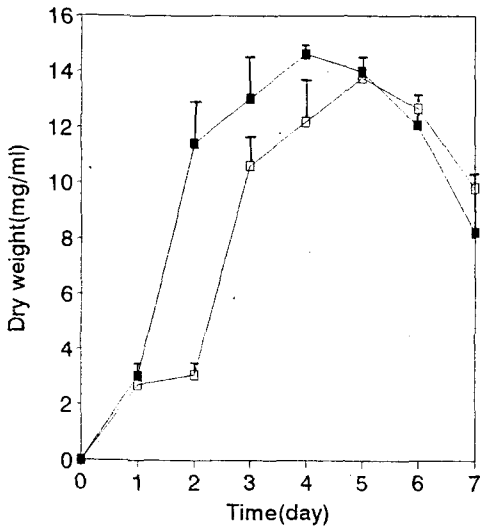


Fig. 1—Growth curves of *S. peuceitius*(—■—) and the fusant MS1(—□—). Values represent the average of duplicate runs.

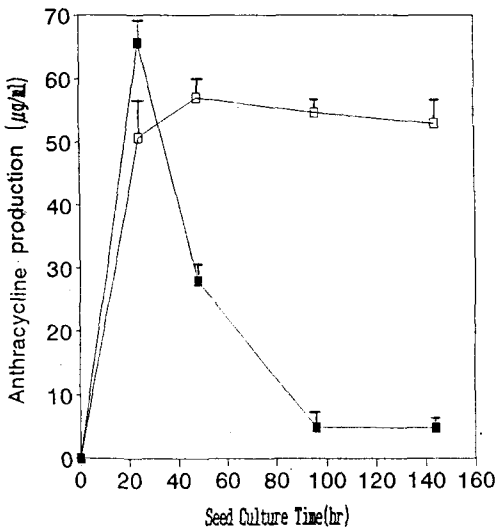


Fig. 2—The effect of growth phase of seed culture on anthracycline production by *S. peuceitius*(—■—) and MS1(—□—). Growth for 4 days after inoculation.

48시간 배양한 대수기 초기시기인 균액의 색이 노란색일 때 본배양 배지에 접종한 경우 anthracycline의 생성량이 가장 많았으며, *S. peuceitius*는 접종시기에 따른 anthracycline 생성변화가 큰 반면 융합균주 MS1은 변화가 적었다(Fig. 2).

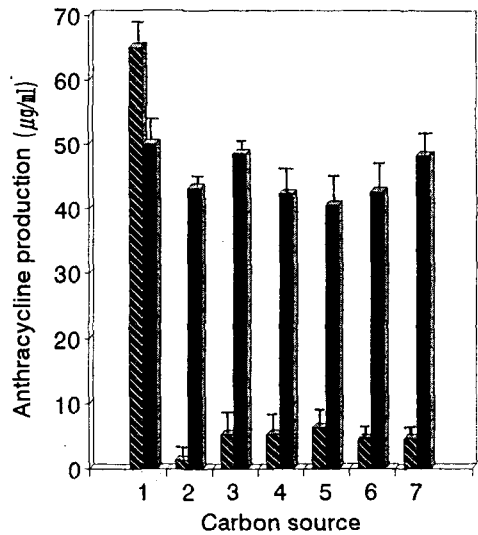


Fig. 3—Effect of various carbon sources on anthracycline production by *S. peuceitius*(▨) and MS1(■).

1: Sucrose, 2: Maltose, 3: Fructose, 4: Glucose, 5: Lactose, 6: Starch, 7: Glucose & Fructose. Cultures containing each carbon source were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking

탄소원의 영향—*S. peuceitius*은 탄소원으로 sucrose를 배지에 첨가하였을 때 anthracycline 생성량이 가장 많았으며 다른 탄소원을 사용한 경우 현저하게 생성량이 감소되었다. MS1은 sucrose, fructose, sucrose와 fructose를 함께 첨가한 경우 생성량이 많았으며 여러 탄소원에 있어서 생성량 차이가 적었다(Fig. 3).

완충액의 영향—*S. peuceitius*의 anthracycline 생성은 배지의 pH에 따라 크게 변화하므로 발효하는 동안 배지의 액성을 조절하기 위하여 첨가하는 완충제의 역할이 중요하다. 여러 종류의 완충제를 배지에 첨가하면서 anthracycline 생성량을 조사한 결과 융합균주 MS1은 0.2% CaCO₃에서 anthracycline 생성이 가장 많았다(Fig. 4).

Phosphate농도의 영향—Phosphate농도변화에 두 균주 모두 민감하게 반응하였다. 1 mM에서 두 균주 모두 anthracycline 생성량이 가장 높았으며 30 mM 이상에서는 전혀 anthracycline을 생산하지 못했다(Fig. 5). 특이한 현상은 phosphate 농도가 0 mM에서

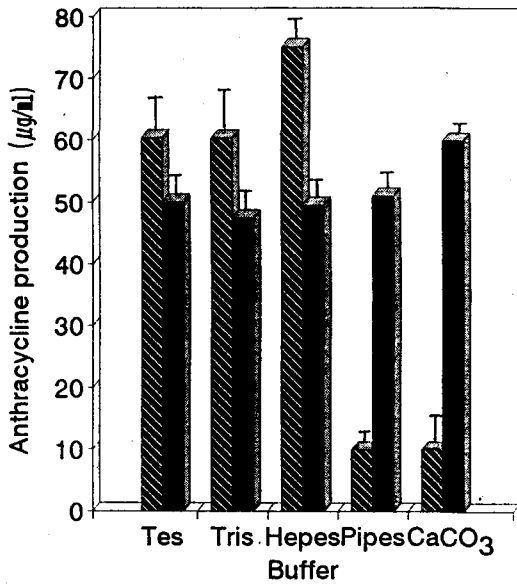


Fig. 4—The effect of various buffers on anthracycline production by *S. peucetius*(▨) and MS1(■). Cultures containing each buffer were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking.

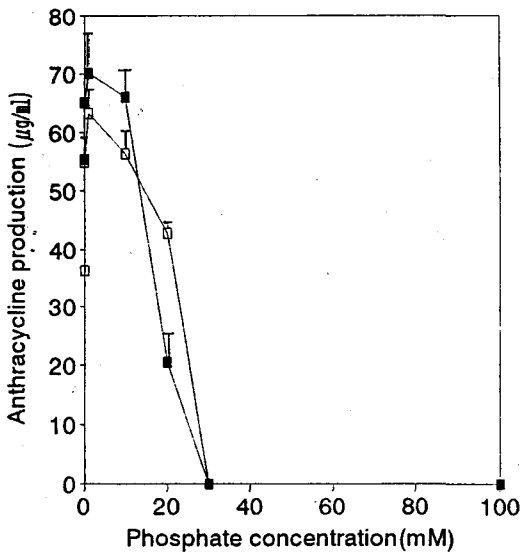
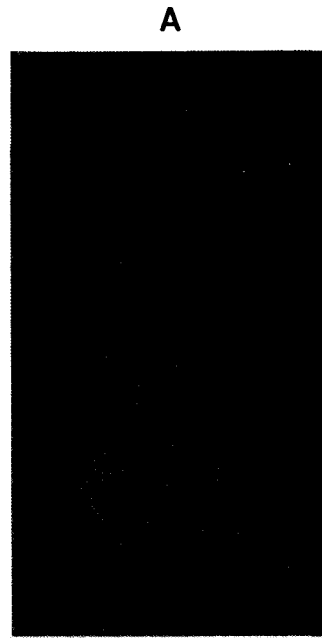


Fig. 5—The effect of phosphate concentrations on anthracycline production by *S. peucetius*(—■—) and MS1(—□—). Cultures containing each phosphate concentration were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking.

10 mM까지 변할 때 TLC spot pattern에 있어 Rf치가 낮은 물질이 점점 진해졌다가 15 mM 이상에서는 진



B

	MS1			<i>S. peucetius</i>		
	1 mM	10 mM	15 mM	1 mM	10 mM	15 mM
1	1.0	2.8	1.0	2.6	4.1	1.4
2	1.0	3.3	1.5	1.5	3.0	1.1
3	2.0	2.3	1.0	1.7	1.4	0.6
4	4.6	4.6	2.9	1.6	1.6	0.9
5	2.0	3.7	0.9	1.0	1.2	0.6
6	1.2	0.9	0.2	2.6	1.1	0.2

Fig. 6—TLC analysis pattern(A) and densitometer analysis(B) of CHCl₃ extracts of culture broths containing various concentrations of phosphate. 1: Adriamycin, 2: Daunomycin, 6: Daunomycinon, 3: 4: 5: Unknown metabolite, The TLC plate was developed in the solvent system CHCl₃ : MeOH : Formic acid(80 : 20 : 2).

체적인 생산량이 줄어들었다(Fig. 6A). 0 mM spot을 기준으로 한 density의 상대적 비율은 Fig. 6B에서 요약한 바와 같았다.

Table I—Growth and acidogenesis by *S. peucetius*(*S. peu.*) and fusant MS1 on simple defined carbohydrate medium
* NDM base containing 125 mM simple sugars or 2.25% complex carbohydrate

Type of medium	Parameters							
	Mycelial dry weight(mg/ml)		Extracellular anthracycline(μg/ml)		Final pH of		Acidogenesis number/ Total experiment number	
	MS1	<i>S. peu.</i>	MS1	<i>S. peu.</i>	MS1	<i>S. peu.</i>	MS1	<i>S. peu.</i>
DEFINED*								
STARCH	5.9	3.8	18	19.5	7.2	7.3	0/10	0/10
LACTOSE	5.5	4.4	27	12	7.0	7.1	0/10	0/10
MALTOSE	2.3	2.0	22	0	7.2	5.0	0/10	10/10
FRUCTOSE	3.2	5.7	27	18	7.0	7.6	0/10	
		2.2		0		5.0		9/10
SUCROSE	5.1	8.3	18	29	6.6	7.6	0/10	
		2.3		0		5.0		6/10
GLUCOSE	2.2	3.7	7	9	6.0	8.0	0/10	
		1.8		0		5.0		7/10

Glucose에 의한 산성화—*S. peucetius*를 발효시 배지에 첨가하는 glucose에 의해 많은 경우 anthracycline 대신 pyruvate와 2-oxoglutarate와 같은 산성 물질을 생성한다는 보고⁴⁾를 바탕으로 MS1에서도 이러한 현상이 나타나는가를 실험하였다. *S. peucetius*의 경우에는 배지에 첨가하는 당의 종류에 따라 total anthracycline 생성량과 최종 배양액의 pH에 있어 큰 차이를 보인 반면 MS1은 여러 종류의 당을 첨가한 defined medium에 있어 acidogenesis 현상 없이 안정된 발효 경향을 나타내었다(Table I).

Fusant MS1의 최적 발효조건

R2YE 배지에 탄소원으로 sucrose나 fructose를, 질소원으로 yeast extract나 soytone, KNO₃를(Fig. 7), pH완충제로 CaCO₃를 사용하였을 때 anthracycline 생성량이 많았으므로 sucrose, fructose, soytone, yeast extract, KNO₃, CaCO₃의 농도를 각각 변화시키면서 anthracycline 생성량을 측정하고 결과 탄소원으로 2% sucrose를 첨가시 10.3%를 사용했을 때 보다 건조 균체량은 23 mg/ml에서 19.8 mg/ml로 감소하였으나 생성량은 49.5 μg/ml에서 60.9 μg/ml로 증가하였고(Fig. 8), 질소원으로 0.7% soytone을 첨가시 0.5% yeast extract 첨가시 보다 균체량은 23 mg/ml에서 25.8 mg/ml로, 생성량은 49.5 μg/ml에서 100 μg/ml로 증가한 반면 0.7% KNO₃ 첨가시는 생성량은 98 μg/ml로 증가하였으나 건조 균체량은 8.1 mg/ml

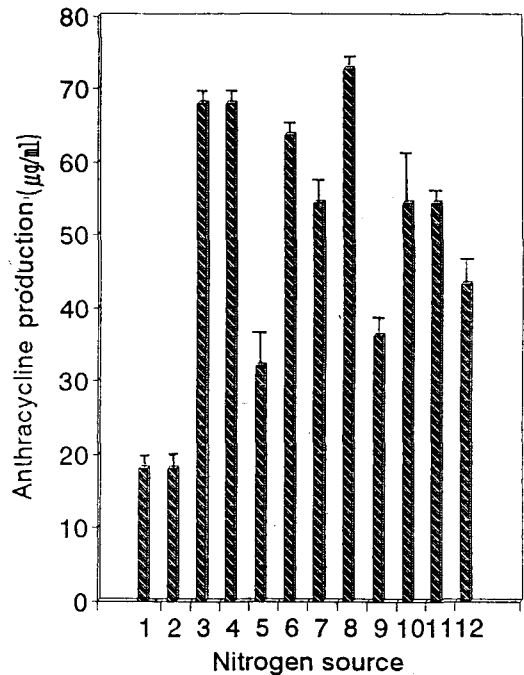


Fig. 7—Effect of various nitrogen sources on anthracycline production by MS1. 1: NH₄Cl, 2: (NH₄)₂SO₄, 3: KNO₃, 4: NaNO₃, 5: Aspartic acid, 6: Yeast extract, 7: Malt extract, 8: Soytone, 9: Peptone, 10: Tryptone, 11: NZ amine, 12: No nitrogen. 0.5% of each nitrogen source was added to R2YE basal medium.

로 감소하였다(Fig. 9). pH 완충제로 0.2% CaCO₃

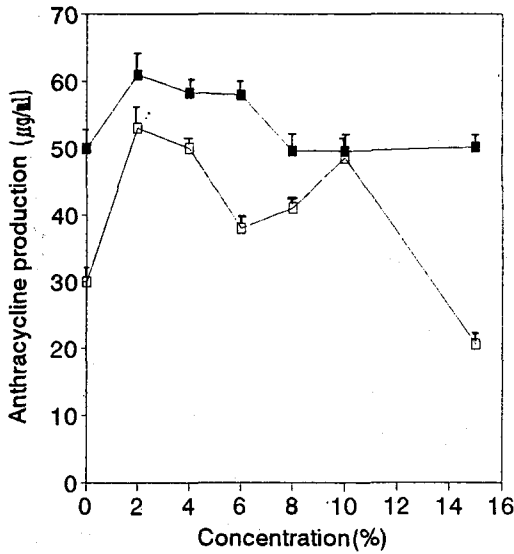


Fig. 8—The effect of sucrose(—■—) and fructose(—□—) concentrations on anthracycline production by MS1. Cultures containing each concentration were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking.

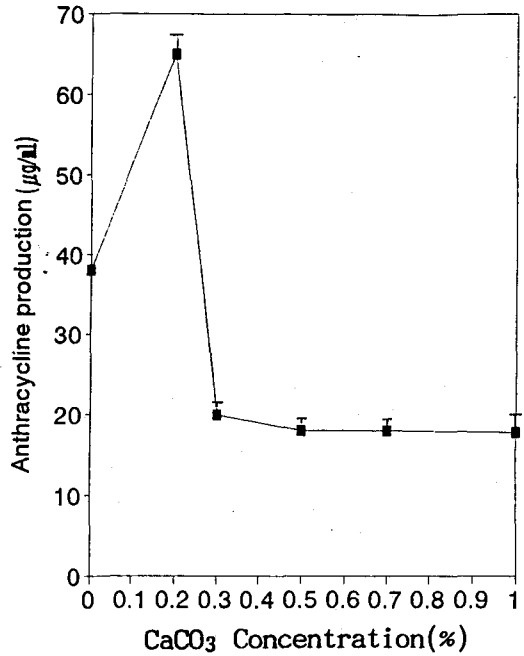


Fig. 10—The effect of CaCO₃ concentrations on anthracycline production by MS1. Cultures containing each concentration were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking.

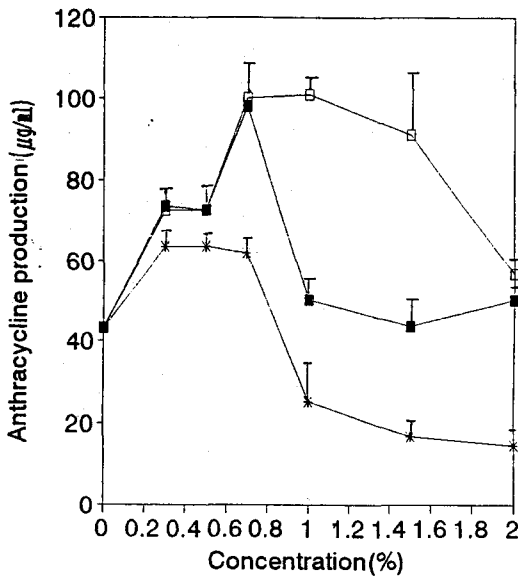


Fig. 9—The effect of KNO₃(—■—), soytone(—□—), yeast extract(—×—) concentrations on anthracycline production by MS1. Cultures containing each concentration were incubated for 4 days at 30°C with rotary shaking.

(Fig. 10)를 첨가시 0.573% Tes를 첨가했을 때 보다 생성량만 65 µg/ml로 증가하였다. 이상의 결과를 종합하여 융합균주 MS1을 sucrose 10.3% 대신 sucrose 2%와 CaCO₃ 0.2%로, phosphate농도를 0.037 mM 대신 1 mM로 변형한 R2YE에 배양하였을 때 기존의 R2YE에서 40~60 µg/ml의 생성량이 80~100 µg/ml로 증가하였으며, 건조균체량은 20~30 mg/ml로 유사하였다.

결 론

융합균주 MS1의 발효특성을 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 융합균주 MS1은 발효 생성물 생성양상은 *S. peucetius*와 동일한 반면 *S. peucetius*에 비해 배지의 접종시기 변화, 탄소원 변화, 완충제의 변화에 따른 anthracycline 생산변동의 폭이 적은 안정한 균주였다.
2. 융합균주 MS1은 glucose에 의한 산성화(acido-

genesis)가 *S. peucetius*와는 달리 일어나지 않았다.

3. 융합균주 MS1은 R2YE 액체배지 성분 중 탄소원을 sucrose 2.0%로, 질소원을 soytone 0.7%로, pH 완충제를 CaCO₃ 0.2%로, phosphate농도를 1 mM로 변형하였을 때 anthracycline을 80~100 µg/ml 농도로 생성하였다.

감사의 말씀

본 논문은 이화여자대학교 약학연구소와 연세대학교 생물산업소재연구센터로부터 연구비지원을 받아 수행하였습니다.

문 헌

- 1) Chung, R. Y. and Chuang, L. F.: Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase activity by adriamycin. *Biochem.* **18**, 2069 (1979).
- 2) Goodman, M. F. and Bessaman, M. F.: Adriamycin and daunorubicin inhibition of T₄ DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 1193 (1974).
- 3) Rajagopalan, S., Politi, P. M., Sinja, B. K. and Myers, C. E.: Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: Implications for cardiotoxicity. *Cancer Research*, **48**, 4766 (1988).
- 4) Dekleva, M. L. and Strohl, W. R.: Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1129 (1988).
- 5) Gibb, G. D. and Strohl, W. R.: Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **34**, 187 (1988).
- 6) Otten, S. L., Stutzman-Engwall, K. J. and Hutchinson, C. R.: Cloning and expression of daunomycin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3427 (1990).
- 7) Baltz, R. H. and Matsushima, P.: Protoplast fusion in *Streptomyces*: Condition for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. General Microbiol.* **127**, 137 (1981).
- 8) Okanish, M., Suzuki, K. and Umezawa, H.: Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: Cultural condition and morphological study. *J. General Microbiol.* **80**, 389 (1974).
- 9) Preceding paper in this issue