

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶

C12N 1/20

(45) 공고일자 1997년01월14일

(11) 공고번호 특1997-0000591

(24) 등록일자 1997년01월14일

(21) 출원번호 특1993-0017589

(65) 공개번호 특1995-0008679

(22) 출원일자 1993년09월03일

(43) 공개일자 1995년04월19일

(73) 특허권자

동국제약주식회사 강재현
서울특별시 강남구 대치 3동 997-8권기법

(72) 발명자

조원태
충청북도 청주시 복대동 857-4
김완섭
서울특별시 종로구 삼청동 27-17
김명국
서울특별시 동대문구 장안 2동 332-15
박진규
서울특별시 강동구 명일동 54번지 한양아파트 4동 206호
김학열
서울특별시 송파구 삼전동 71-18호
이상기
서울특별시 성동구 광장동 극동빌라 가동 101호
동라체바
러시아 모스크바 나가스틴스카야가 3에이 러시아 국립 항생물질 연구소
파니치키나
러시아 모스크바 나가스틴스카야가 3에이 러시아 국립 항생물질 연구소
사브로바
러시아 모스크바 나가스틴스카야가 3에이 러시아 국립 항생물질 연구소
노비코바

(74) 대리인

윤동열
러시아 모스크바 나가스틴스카야가 3에이 러시아 국립 항생물질 연구소
발토체비치
러시아 모스크바 나가스틴스카야가 3에이 러시아 국립 항생물질 연구소심사관 : 정운재 (책자공보 제4783호)

(54) 신균주 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 디케이알에스 및 이를 이용한 아클라시노마이신 에이, 비, 와이 및 아글리콘의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

신균주 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS 및 이를 이용한 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘(Aglycone)의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 스트렙토마이세스(Streptomyces)속에 속하는 신규 미생물 및 이를 이용하여 항암제인 아클라시노마이신(aclacionmycin) A, B, Y 및 아글리콘(Aglycone)를 제조하는 방법에 관한 것이다.

아클라시노마이신은 피롤(pyrrole) 그룹을 갖는 안쓰라싸이클린(anthracycline)계열의 항암물질로 세 개의 데옥시피라노즈(deoxypyranose)잔기로 구성되어 있으며 DNA염기 사이에 인터컬레이션(intercalation)되어 핵산의 합성을 저해함으로서 사이토톡시(cytotoxic)한 작용을 나타낸다. 또한 같은 안쓰라싸이클린 계열의 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin) 그리고 칼미노마이신(carminomycin)등과는 달리 아클라시노마이신은 RNA의 합성을 선택적으로 저해하는 효과를 나타내며 특히

급성 백혈병 및 악성 임파증 등에 효과가 있는 반면에 심장 독성이 낮은 것으로 알려져 있다. 아클라시노마이신은 그 구조에 따라 크게 A, B 및 Y로 나누어지며 이들은 기본적으로 아클라빈으로 불리우는 아글리콘 구조를 갖는다. 이들 중 아클라시노마이신 B는 부작용이 심하고 항종양 활성이 낮기 때문에 실제 임상에 사용하기가 어려우며 A가 B에 비하여 항암 혹은 항종양 활성이 크고 생산성도 높으며 부작용도 적기 때문에 현재 실제 사용되고 있다. 한편 아클라시노마이신 Y는 생산성은 낮으나 아클라시노마이신 A나 B에 비하여 항종양 효과가 매우 높고 부작용이 적을 것으로 예상되기 때문에 이에 대한 연구가 필요하다.

종래에 알려져 있는 미생물 발효에 의한 아클라시노마이신의 제조방법으로는

스트렙토마이세스 갈릴레우스 (*Streptomyces galilaeus*)를 배양하는 방법이 알려져 있다(U.S.Pat. 3,988,315).

이에 따르면 스트렙토마이세스 갈릴레우스는 동일한 배양조건에서 A, B 및 Y를 비롯한 약 18개 정도의 구조유사물질을 생산하는 것으로 밝혀졌으며 이들의 생산성은 매우 낮아 주 산물인 아클라시노마이신 A의 경우 46mg/l, B의 경우 23mg/l로 나타났으며 Y를 비롯한 기타 물질들은 매우 낮은 농도로 생산되는 것으로 보고되어있다. 따라서 이 균주를 이용하여 아클라시노마이신을 경제적으로 산업적 규모로 생산하는 것에는 무리가 따르며 생산성이 더욱 증가된 새로운 균주의 개발이 필요하다.

본 발명자들은 발효법에 의한 아클라시노마이신의 공업적 생산을 위하여 연구한 결과, 이미 아클라시노마이신 A와 B를 생산하는 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) 12/3A를 발명한 바 있으며(USSR Patent No. 3459347), 나아가 이 균주를 개량하여 더 많은 양의 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 생산하는 변이주 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS균주를 얻는데 성공하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

따라서 본 발명의 목적은 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 다양으로 생산하는 신균주

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS균주를 이용하여 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명은 또한 상기

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS균주를 배양한 후 배양액을 초산 완충용액 또는 염산을 이용하여 특정 pH로 보정함으로써 아클라시노마이신 A 또는 Y를 선택적으로 제조하는 방법을 제공한다. 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명의 신균주 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS의 친주인

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 12/3A균주는 배양액내 아클라시노마이신 A의 생산성이 60mg /l, B의 생산성은 10mg/l 정도이다. 이 균주를 화학변이 유발제인 N-니트로소메틸비ਊ렛(N-nitrosomethylbiuret;NMB)으로 처리하여 신균주 DKRS균을 수득하였으며 이 균주는 아클라시노마이신 A, B, Y 그리고 아글리콘 생산능력을 나타내며, 특히 타 균주와는 달리 아클라시노마이신 Y를 많이 생산하는 것이 확인되었다.

본 발명에 따른 변이주를 분리하는 방법은, 예를 들면 완전 고체배지에서 30°C에서 6~7일간 배양된 균체에 멀균된 증류수와 유리섬유(glass wool)여과기를 이용하여 포자만을 모은 후 0.05M 트리스-말레이트(Tris-Malate)완충용액(pH 6.5)으로 3회 세척하고 동일 완충용액으로 포자의 농도가 $10^6\sim10^8/\text{ml}$ 로 되도록 회석한 다음 NMB를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종농도로 가하고 30°C에서 20분간 처리하였다. NMB 처리가 완료되면 원심분리나 여과에 의하여 포자만을 회수하고 멀균생리 식염수로 3회 세척한 다음 완전배지에 도말하고 30°C에서 7~10일간 배양하여 변이주를 분리하였다. 이렇게 분리한 본 발명의 균주

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS는 대전시 대덕에 소재하는 한국과학기술연구원에 1993년 8월 26일 자로 KCTC 8539P의 수탁번호로 기탁되어 있다.

본 발명에서 사용한 완전배지의 조성은 다음과 같다. 주1) 완전배지 : 포도당 1.0%, 카제인 가수분해물 0.2%, 육즙 0.1%, 효모 추출물 0.1%, 한천 1.5%, pH 7.0~7.2

본 발명의 균주 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS(KCTC 8539P)는 다음과 같은 특성을 갖는다.

1. 형태학적 특성

고체배지에 배양한 본 발명 균주를 현미경 하에서 관찰한 결과 기질 균사는 분절되어 있지 못하여 포자는 타원형이고 그리 길지 않은 체인 형태를 이룬다. 또한 포자의 표면은 매끄러우며 포자의 크기는 2.3 $\mu\text{m}\times$ 1.4 μm 이며 분절포자를 형성한다.

2. 배양학적 특성

각 고체배지에 접종하여 28°C에서 배양 했을 때 다음과 같은 특성을 나타내었다.

(1) 와克斯만 배지(Waksman's medium)에 배양하면 콜로니는 녹색(green)을 띠며 분홍빛의 갈색(pink-brown)색소를 낸다.

(2) 가우스- I (Gaus-I) 배지에 배양하면 콜로니는 분홍빛 흰색(pink-white), 기질 균사는 붉은 갈색(red-brown)을 띠며 색소는 생성하지 않는다.

(3) 오트밀(Oatmeal)배지에 배양하면 콜로니는 희색, 기질 균사는 붉은 갈색(red brown)을 띠며 색소는 생성하지 않는다.

(4) 옥수수(corn)배지에 배양하면 콜로니는 짙은 갈색을 띠며 기질 균사도 마찬가지로 짙은 갈색을 띤다.

- (5) 가우스-II (Gaus-II) 배지에 배양하면 콜로니는 녹갈색(green-brown), 기질 균사는 진한 갈색(dark-brown)을 띠며 진한 갈색의 색소를 생성한다.
- (6) 대두(Soybean)배지에 배양하면 콜로니는 연녹색(light-green), 기질 균사는 갈색을 띤 녹색(brown-green)을 띠며 붉은 갈색(red-brown)의 색소를 생성 한다.
- (7) 리스트릭 배지(Riestrick's medium)에 배양하면 콜로니는 갈색을 띠며 진 갈색의 색소를 생성 한다.
- (8) 짜페독스 배지(Czapek-Docks.s medium)에 배양하면 콜로니는 흰분홍(white-pink), 기질 균사는 붉은 갈색(red-brown)을 띠며 색소는 생성하지 않는다.
- (9) 벤네트 배지(Bennet's medium)에 배양하면 코로니는 연한 모랫빛(light-sandy)을 띠며 색소는 생성하지 않는다.
- (10) 미트-펩톤 배지(Meet-Peptone agar)에 콜로니는 연한 모랫빛(light-sandy)을 띠며 갈색의 색소를 생성 한다.
- (11) 포도당-아스파라진 배지(Glucose-Asparagine medium)에 배양하면 콜로니는 녹색(green)을 띠며 색소는 생성하지 않는다.

3. 생리적 특성

본 발명 균주는 호기성 균주이며 최적 생육 온도는 28°C이다. 콘밀(corn meal)이 함유된 발효배지에 배양하면 붉은 오렌지색을 띠며 펩톤 분해능과 전분 가수분해능, 그리고 젤라틴 액화능을 갖고 있다. 탄소원으로 맥아당과 유당을 사용했을 경우에는 생육이 매우 잘 진행되고 람노즈, 크실로즈, 아라비아노즈, 갈락토즈를 사용했을 때는 미약하나마 생육이 일어나지만 자당, 만니톨, 솔비톨 배지에서는 전혀 생육하지 못하였다.

본 발명의 균주 스트렙토마이세스 라베도풀리아 DKRS(KCTC 8539P)와 친주 12/3A의 형태적 특성과 생리적 특성을 비교한 결과는 다음 표 1과 같다.

[표 1]

형태 및 생리적 특성 비교

	생 육 도	
	발명 균주 DKRS	친주 12/3A
I. 형태적 특성		
· 포자낭병 (Sporangiophores)	기초균사에 대하여 수직형태이며 단순 나사형이다. 길이는 8.8~32 μm	기초균사에 대하여 수직형태이며 단순 나사형이다. 길이는 10~12 μm
· 포자 (Spore)	직사각형 형태의 타원형 길이는 2.3×1.4 μm	약간의 타원형 길이는 0.7×1.4 μm
포자화 정도	++	+++
핵 모양 (Nucleoid)	등근 형태 또는 약간의 타원형	구형 또는 약간의 타원형
표면 (Surface)	매끄러움 (Smooth)	매끄러움 (Smooth)
· 분절포자 (Oidia)	기질균사 또는 기충균사의 분절체 재빨리 발아진행 크기는 다양	없음
핵 모양 (Nucleoid)	매우크며 세포 전체에 채워져 있음	
II. 생리적 특성		
· 펩톤 분해능	+	+
· 전분 가수분해능	+	+
· 젤라틴 액화능	+	+
· 탄소원 이용성 ^a		
액아당	+++	ND
유당	+++	ND
립노즈	+	+
포도당	+	+++
과당	ND	+++
크실로즈	+	+++
아라비노즈	+	+++
갈락토즈	+	+++
자당	-	-
이노지톨	ND	+++
만니톨	-	-
솔비톨	-	ND

a+++; 매우 우수, +; 보통, -; 못자람, ND; no detection

본 발명의 미생물을 이용하여 아클라시노마이신을 제조하는 방법은 통상의 발효에 사용되는 탄소원, 질소원, 무기물, 기타 영양물질을 함유하는 배지에서 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS(KCTC 8539P)를 배양하여 균체내 및 배양액에 아클라시노마이신을 축적하고 축적된 아클라시노마이신을 회수하는 공정을 포함한다.

본 발명에서 사용하는 주요 탄소원으로는 전분, 대두밀 등이 포함되며 질소원으로는 대두밀 외에 황산암모늄 등이 포함된다. 무기질로는 탄산칼슘, 황산마그네슘, 황산아연, 염화나트륨 등을 사용한다. 배양은 통상의 초기적 조건하에서 배양온도 28~30°C, pH 6.8~7.5에서 4~5일간 배양하며 배양중의 pH 조절은 유기 또는 무기 알칼리성 물질, 암모니아수, 탄산칼슘 등을 사용하여 행한다. 균주에 의해 생성된 산물은 주로 균체내에 축적되지만 일부는 균체외로 분비되어 배양액 중에 축적된다. 배양후 아클라시노마이신을 회수하는 방법으로 아세톤과 클로로포름, 또는 톨루엔과 이소프로파놀의 혼합 용매를 사용한 추출과 실시신산을 이용한 컬럼 크로마토그래피 등을 이용한 통상의 저분자량 물질의 분리방법을 사용할 수 있다.

본 발명에서 균체내에 존재하는 아클라시노마이신은 메타놀과 클로로포름을 20:1로 섞어 산물의 추출을 시도한 후 HPLC를 사용하여 분석할 수 있다. HPLC의 고정상으로는 실리카(Sillica)컬럼을 사용할 수 있고, 유동상으로는 클로로포름 : 메타놀 : 초산 : 물 : 트리에칠아민을 68 : 20 : 10 : 2 : 0.01(v/v)의 비율로 혼합 사용하여 1.0ml/min의 유속으로 흘려 보내면서 432nm에서의 흡광도를 측정한다. 별도로 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘 표준품을 사용하여 얻은 흡광 지체 시간과 시료의 흡장 지체 시간을 비교하여 균체내의 아클라시노마이신의 농도를 산출한다.

본 발명의 아클라시노마이신은 분리정제 조건에 따라 A가 Y로 또는 Y가 A로 전환되는 과정을 확인할 수 있는데 이것은 단순히 분리정제 방법에만 의한 것이 아니라 산물 생성 균주 자체의 어떤 효소적인 역할에 의해 일어나는 것으로 생각되어 진다. 즉, 배양완료 후 배양액을 초산 완충액을 이용하여 pH 4.4로 조정하면 배양액내의 대부분의 아클라시노마이신 A가 Y로 전환되는 것이 관찰되는 한편 염산을 이용하여 pH 4.6으로 조절하면 아클라시노마이신 Y가 A로 전환되는 것이 관찰된다. 따라서, 원하는 최종 목적물의 종류에 따라 배양액으로부터 산물을 회수하는 조건을 달리할 수 있다.

순수분리된 본 발명의 산물들을 가지고 동물의 대장암에 대한 항암활성을 조사한 결과 아클라시노마이신 Y는 A나 B보다 항암효과가 우수하며 투여량을 증가시켜도 A나 B에 비하여 독성 효과가 매우 낮은 것으로 확인되었다. 이하 실시예를 들어 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[실시예1]

아크라시노마이신 생산을 위해 먼저 후술하는 사면배치(pH7.2)에 본 발명의 균주

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 DKRS(KCTC 8539P)를 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 다음 이를 후술하는 종 배양 배지에 접종하였다. 종배양 배지는 pH를 7.8로 조절한 후 500mℓ용량의 삼각 플라스크에 50mℓ를 분주하여 121°C에서 15분간 살균하여 준비하였으며 균을 접종하여 회전식 진탕배양기에서 250rpm으로 2일간 배양하였다. 산물의 생산을 위한 발효배지는 pH 7.5로 조절한 다음 종 배양액을 10%되도록 접종하여 통기량 2.0vvm, 교반속도 500rpm, 배양온도 28°C의 조건하에서 4일간 배양하였다. 본 발명에서 사용한 배지의 조성은 각각 다음과 같다.

(주2) 사면배지 : 전분 2%, 인산수소칼륨 0.05%, 질산칼륨 0.1%, 식염 0.05%, 황산제이철 0.001%, 한천 1.5~2%(pH7.2)

(주3) 종배양 배지 : 포도당 2%, 전분 1.5%, 대두분 1%, 효모 추출물 1%, 탄산칼슘 0.3%, 황산마그네슘 0.2%, 염화나트륨 0.3%(pH7.8)

(주4) 발효배지 : 포도당 3%, 전분 3.5%, 대두밀 1%, 탄산칼슘 0.5%, 황산마그네슘 0.2%, 황산제1철 0.001%, 황산아연 0.001%(pH7.5)

상기와 동일한 방법으로 친주와 본 발명 균주를 배양하여 각 배양액으로부터 아클라시노마이신 A, B 및 Y의 생성량을 조사한 결과는 표 2와 같다.

[표 2]

친주와 본 발명균주의 생산성 비교

사용 균주	아클라시노마이신 (mg/l)		
	A	B	Y
모 주	60	10	-
본 발명균주	60	70	90

상기의 표 2에서와 같이 본 발명의 균주는 아클라시노마이신 Y의 생산능을 가지면서, B의 생산성도 친주에 비하여 훨씬 많이 증가한 것으로 보아 본 발명의 균주는 이차 대사산물인 아클라시노마이신 생합성 경로의 일부가 변화된 균으로 생각 된다.

[실시예2]

본 발명의 균주 **스트렙토마이세스 라벤도폴리아** DKRS(KCTC-8539P)의 배양에 의해 생산된 아클라시노마이신을 분리정제하기 위해 실시예 1에서 얻은 배양액 700mℓ를 취한 후 pH를 염산을 이용하여 4.5로 맞춘후 여과하여 균사체만 모으고 균사체 1g당 2mℓ의 클로로포름을 가하고 1시간 동안 잘 섞은 후 여과하였다(2회 반복). 클로로포름 추출액 120mℓ를 모은후 진공 감압 농축기를 이용하여 농축시킨 후 잔여물에 부틸 아세테이트와 아세톤을 4:1로 섞은 용액 15mℓ를 가하여 완전히 녹인후 pH 3.4의 초산 완충용액을 이용하여 산물을 추출하고 다시 클로로포름으로 재추출을 시도하였다. 클로로포름을 증발, 농축시킨 뒤 n-헥산이나 석유 에테르로 산물의 침전을 유도하였다. 그 결과 최종적으로 아클라시노마이신 A는 27mg, B는 35mg, Y는 41mg를 각각 회수 하였다.

[실시예 3]

실시예 1에서 얻은 배양액 700mℓ를 취한 후 염산으로 pH를 4.6으로 맞추고 28°C에서 3시간 동안 잘 섞은 후 실시예 2와 같은 방법으로 분리 정제하여 아클라시노마이신 A는 50mg, B는 20mg, Y는 13mg를 각각 회수하였다.

[실시예 4]

실시예 1에서 얻은 배양액 700mℓ를 취한 후 초산 완충용액을 이용하여 pH 4.4로 맞춘 후 28°C에서 2시간 동안 잘 섞은 후 실시예 2와 같은 방법으로 분리 정제한 결과 아클라시노마이신 A는 3mg, B는 40mg, Y는 50mg를 각각 회수하였다.

[실시예 5]

최종 산물의 생산을 위해 10 ℥ 발효조에 5 ℥ 발효배지를 준비하여 pH 7.5로 조절한 다음 종 배양액을 10%되

도록 접종하여 통기량 1.0vvm, 교반속도 350rpm, 배양온도 28°C의 조건하에서 4일간 배양하였다. 이때 사용한 종 배양배지는 실시예 1과 같으며 발효배지는 다음과 같은조성으로 준비하여 사용하였다.

(주5) 발효배지 : 포도당 3%, 전분 5.5%, 대두밀 1.5%, 탄산칼슘 0.9%, 황산마그네슘 0.25%, 황산 아연 0.002%, 황산 철 0.002%

배양액 3.5ℓ를 취하여 아클라시노마이신의 양을 측정한 결과 A는 70mg/l, B는 90mg/l, Y는 160mg/l이 생산된 것으로 확인되었다. 이 용액을 염산은 이용하여 pH 4.6으로 보정한 후 원심분리하고 분리한 균사체에 1.5ℓ의 클로로포름을 가하고 1.5시간 동안 잘 섞어주었다(2회 반복). 한편 여액에는 60ml의 클로로포름을 가하여 잘 섞은 후 산물을 추출하였다. 클로로포름 추출물을 모아 감압 진공농축을 실시하여 침전물을 모운후 여기에 부틸 아세테이트와 아세톤을 4:1의 부피비로 섞은 용액에 녹인후 여기에 황산 나트륨을 가하여 섞은 후 여과하고 농축하였다. 마지막 단계로 n-헥산으로 침전을 유도하고 증발시켜 1.5g의 복합된 아클라시노마이신을 수득하였다.

[실시예 6]

실시예 5의 복합 아클라시노마이신 1.5g을 툴루엔과 클로로포름의 혼합용매 (8:2부피비)최소량에 녹인 후 실리실산으로 준비된 컬럼에 넣고 크로마토그라프를 실시하였다. 이때 산물의 용출을 위한 용매로는 툴루엔을 사용하였다. 그 결과 아글리콘 분획이 가장 먼저 용출되었으며 그 다음 툴루엔과 이 소프로파놀의 혼합용매(35:1부피비)로 용출하여 아클라시노마이신 B를 수득하고 두 용매의 비율을 30:1부피비로 하여 아클라시노마이신 Y분획을 얻고 마지막으로 아클라시노마이신 A분획을 수득하였다. 각 산물을 n-헥산이나 석유 에테르를 이용하여 침전시킨 후 건조하여 노란색 분말 상태의 산물을 각각 10mg(아글리콘), 154mg(B), 182mg(Y) 및 75mg(A)회수 하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘의 생산능을 갖는

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) DKRS(KCTC 8539P).

청구항 2

제1항에 있어서, 배양후 배양액을 초산 완충액으로 pH4.4로 보정하면 아클라시노마이신 A를 Y로 전환시키고, 배양액을 염산으로 pH4.6으로 보정하면 아클라시노마이신 Y를 A로 전환시키는 능력을 가짐을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) DKRS (KCTC 8539P).

청구항 3

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) DKRS (KCTC 8539P)를 배지에 배양하여 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 균체내 및 배양액에 축적한 후 균체 및 배양액으로부터 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 회수하여 정제함을 특징으로 하는 발효법에 의한 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 배양은 28~30°C, pH6.8~7.5범위의 초기적 조건에서 4~5일간 실시함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 툴루엔과 이소프로파놀의 30:1~35:1부피비의 혼합 용매를 이용하여 아클라시노마이신 A, B, Y 및 아글리콘을 회수 및 정제함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) DKRS (KCTC 8539P)를 배지에 배양하고, 배양액을 초산 완충용액으로 pH4.4로 보정한 후 균체와 배양액으로부터 아클라시노마이신 Y를 분리함을 특징으로 하는 아클라신노마이신 Y의 제조방법.

청구항 7

스트렙토마이세스 라벤도폴리아 (*Streptomyces lavendofoliae*) DKRS (KCTC 8539P)를 배지에 배양하고, 배양액을 염산으로 pH4.6으로 보정한 후 균체와 배양액으로부터 아클라시노마이신 A를 분리함을 특징으로 하는 아클라시노마이신 A의 제조방법.