

Rhizopus nigricans 에 의한 Progesterone 의 Hydroxylation(I): 반응 조건의 영향

金明熙 · 金末南

詳明女子大學校 生物學科

Progesterone Hydroxylation by *Rhizopus nigricans*(I): The effects of reaction conditions

Myung-Hee Kim and Mal-Nam Kim

Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110, Korea

ABSTRACT: Physicochemical factors influencing the 11 α hydroxylation of progesterone by *Rhizopus nigricans* Ehrenberg were studied. The higher is the concentration of progesterone, the shorter time is need to attain maximum yield in the 11 α -hydroxyprogesterone. High concentration in progesterone was supposed to inhibit the hydroxylation reaction of the 11 α -hydroxyprogesterone. The range of optimum pH and temperature appeared to be rather broad and these conditions were similar to those of optimum growth of the mycelia. Agitation at a higher speed than a certain limit, and the presence of sugars accelerated the 11 α -hydroxylation reaction. Glucose was found to be more effective for the reaction using spores rather than mycelia as enzyme sources. Organic solvents were proved to suppress the enzyme activity, which decreased with increase in the concentration of the organic solvents and in the time for pretreatment with the solvents.

KEYWORDS: *Rhizopus nigricans*, progesterone, 11 α -hydroxyprogesterone

Progesterone 은 soya sterol 속에 풍부히 존재하는 stigmasterol로부터 화학적인 방법으로 용이하게 생산되며, pregnolone 으로부터도 쉽게 전환이 가능하다. 이 progesterone 은 corticoids를 합성하는데 중요한 전구물질로 사용된다. Progesterone 의 11 α -hydroxylation 반응은 조효소의 재생을 필요로 하는 다효소 체계이므로 cytochrome P-450과 NADPH-cytochrome C reductase 가 중요한 구성요소로 되어있으므로(Jayanthi 등, 1982) 화학적인 방법보다는 생존 미생물을 사용하는 방법이 더 효율적이다. 많은 고가의 스테로이드 계통 약물들은 이 11 α -hydroxyprogesterone 으로부터 간단하고 용이하게 합성된다. Progesterone 의 11 α -hydroxylation 에 관여하는 효소인 11 α -hydroxylase 는 유도 효소로 알려져 있으며(Breskvar and Hudnik-Plevnik, 1978 ; Koshchenenko 등, 1983), 이 효소의

유도에는 최적 용존 산소가 존재한다(Hanisch 등, 1980). 배지 조성의 변경과 pH 의 변화는(Sallam 등, 1976) 11 α -hydroxylation 을 비롯한 다른 hydroxylation 에 부분적으로 영향을 줄 수 있다. Progesterone 의 용해를 목적으로 사용하는 유기 용매가 효소 활성 저해제로 작용하므로(Karow 등, 1956) 유기 용매를 사용하지 않고 반응 배지 내에 기질을 직접 주입하는 방법도 연구되었다(Weaver 등, 1962 ; Kloosterman IV 등, 1984).

본 연구에서는 한국의 토양에서 분리해 낸 *Rhizopus nigricans* Ehrenberg 에 의한 progesterone 의 11 α -hydroxylation 반응에서 최대의 11 α -hydroxyprogesterone 수득율을 얻기 위한 반응 조건을 설정하고자 용존 산소 농도는 진탕 속도로서 조절하였고 기질 농도, 반응 온도, pH, 당류의 효과 및 유기 용매의 영향을 조사하였다.

材料 및 方法

사용 균주

실험에 사용한 균주는 한국의 토양에서 분리해 낸 *R. nigricans* 로 고려대학교에서 분리 동정한 것을 분양받았다.

실험 방법

고체 사면 배지는 potato dextrose agar 배지를 사용하였고, 액체 배지는 Hanisch 등(1980)의 방법을 변형하여 제조하였으며, 전환 반응에 따른 그 외의 실험은 Lee(1985)의 방법에 의하여 실시하였다.

結果 및 考察

Progesterone 농도의 효과

Fig.1은 progesterone의 각 농도에 따른 hydroxylation을 나타낸 결과이다. 기질의 농도가 $1 \times 10^{-1} \text{ g/l}$ 까지는 5 시간 이내에 11α -hydroxylation이 완결되어 11α -hydroxyprogesterone의 수득률이 최고에 달하였으나 그 이상의 기질 농도에서는 11α -hydroxylation은 더 천천히 완성되었다. 실험에 사용한 기질의 농도중에서 가장 낮은 $5 \times 10^{-3} \text{ g/l}$ 의 경우에 11α -hydroxyprogesterone의 최대 수득

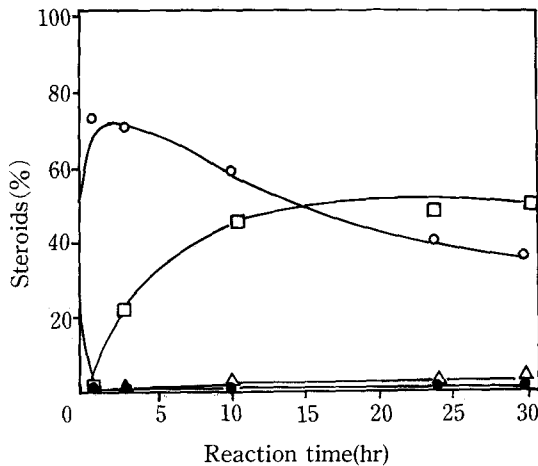


Fig.1-A. The effect of progesterone concentration on the transformation reaction of 11α -hydroxyprogesterone.

Progesterone concentration: $5 \times 10^{-3} \text{ g/l}$, Reaction temperature: 28°C , pH: 4.5

- : progesterone
- : 11α -hydroxyprogesterone
- △—△ : 6β , 11α -dihydroxyprogesterone
- : unidentified product

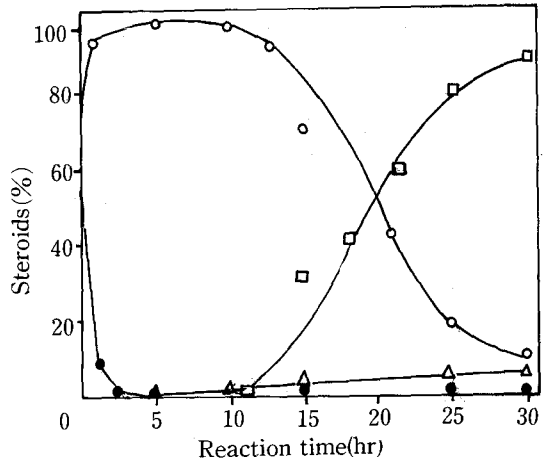


Fig.1-B. The effect of progesterone concentration on the transformation reaction of 11α -hydroxylation.

Progesterone concentration: $5 \times 10^{-1} \text{ g/l}$, Reaction temperature: 28°C , pH: 4.5

- : progesterone
- : 11α -hydroxyprogesterone
- △—△ : 6β , 11α -dihydroxyprogesterone
- : unidentified product

율이 현저히 저하되어 나타난 현상은 progesterone 으로부터 생성된 11α -hydroxyprogesterone이 생성 후 즉시 또 다른 hydroxylation 반응에 의하여

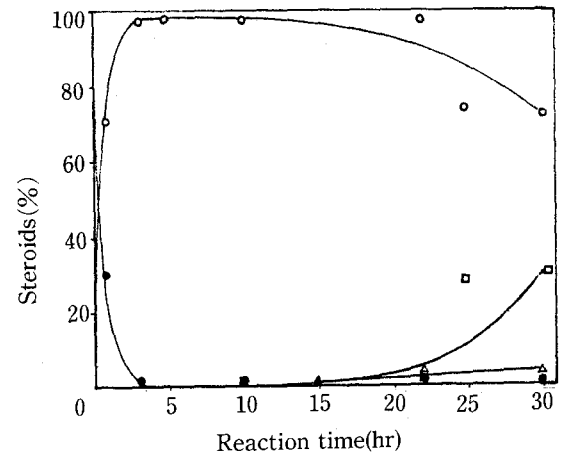


Fig.1-C. The effect of progesterone concentration on the transformation reaction of 11α -hydroxyprogesterone.

Progesterone concentration: $1 \times 10^{-1} \text{ g/l}$, Reaction temperature: 28°C , pH: 4.5

- : progesterone
- : 11α -hydroxyprogesterone
- △—△ : 6β , 11α -dihydroxyprogesterone
- : unidentified product

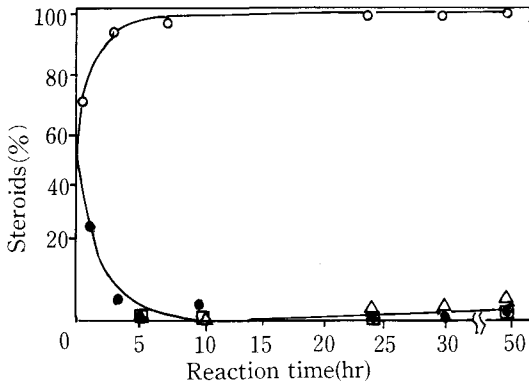


Fig.1-D. The effect of progesterone concentration on the transformation reaction of 11α-hydroxyprogesterone.

Progesterone concentration: 5×10^{-1} g/l, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5

- : progesterone
- : 11α-hydroxyprogesterone
- △-△ : 6β, 11α-dihydroxyprogesterone
- : unidentified product

다른 부산물로 전환되기 때문으로 생각된다. 또한 11α-hydroxyprogesterone 이 다른 부산물들로 전환되는 hydroxylation 반응은 progesterone 의 농도가 높아질수록 더 천천히 시작되는 것을 알 수 있으며 이는 progesterone 이 6β-hydroxylase 를 비롯한 11α-hydroxylprogesterone 의 hydroxylation 에 관계되는 여러 효소들의 합성을 억제시키거나,

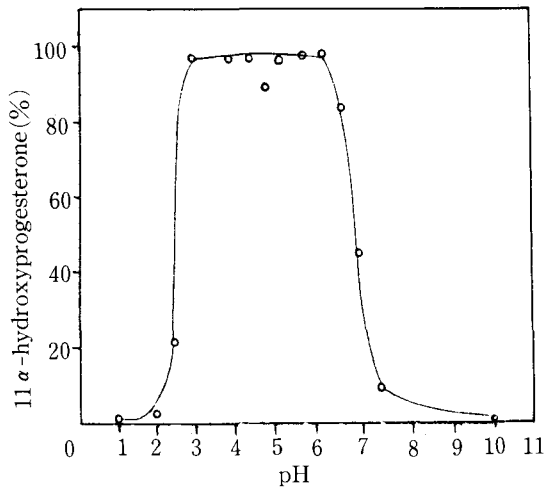


Fig.2. Effect of pH of the reaction medium on the hydroxylation of progesterone.

Reaction time: 10 hrs. Progesterone concentration: 0.05 g/l, Reaction temperature: 28°C

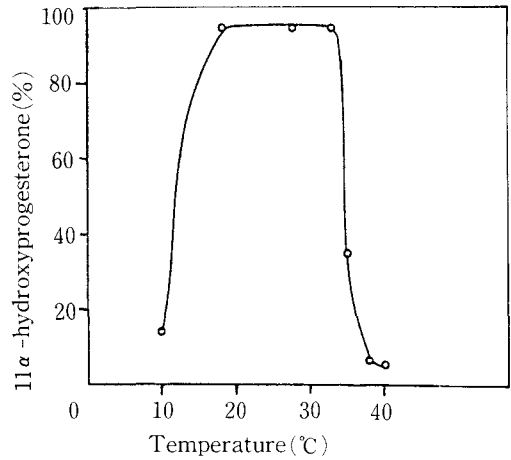


Fig.3. Effect of temperature on the hydroxylation of progesterone.

Progesterone concentration: 0.1 g/l, Reaction time: 5 hrs, pH: 4.5

이런 효소들의 활성을 저해하는 효과를 주는 것으로 생각된다.

반응 pH 와 온도의 최적화

Progesterone 의 11α-hydroxylation 에 대한 최적 pH 는 3.0~6.5(Fig.2), 반응 최적 온도는 20~32°C 사이의 범위로 나타났으며 이 온도는 범위는 균사체 성장의 최적 온도 범위와 일치하였다(Fig.3). Hanisch 등(1980)도 *R. nigricans* ATCC 6227의 균사체 성장과 progesterone 의 hydroxylation 반응은 pH 4.0~6.0에서 특별한 영향을 나타내지 않는다고 보고하였으며, 최적 온도 범위도 Sallam 등(1976)이 *A. niger* 를 이용하여 11α-hydroxylation 하였을 때의 최적 온도 범위와 유사하였다.

진탕 속도의 효과

Progesterone 의 11α-hydroxylation 은 기질의 11α 위치에 hydroxyl group 을 도입하는 일이 필요하므로 진탕 효과는 aeration 에 의한 hydroxylation 율의 증진, 기질의 확산 속도의 향상 및 균체 성장의 촉진 역할 등을 할 것으로 기대되어 여러 진탕 속도에서의 hydroxylation 율을 조사하였다. Fig.4의 결과에서 진탕 속도가 100 rpm.으로 증가됨에 따라 11α-hydroxyprogesterone 의 수득율이 증가하며, 그 이상의 진탕 속도는 전환율에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 따라서 100 rpm. 이상의 진탕 속도는 무용하며 더구나 300 rpm. 이상에서는 거품의 발생으로 인하여 반응 진행에 부적절하였다.

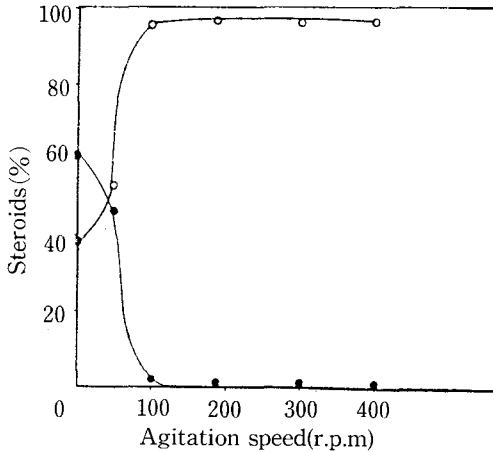


Fig. 4. Effect of agitation speed on the hydroxylation of progesterone.

Progesterone concentration: 0.05 g/l, Reaction time: 5 hrs, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5

●—● : progesterone
○—○ : 11α-hydroxyprogesterone

당류의 효과

실험에 사용한 모든 당류가 progesterone의 11α-hydroxylation을 촉진하였다(Fig.5-A). 이 결과는 11α-hydroxylase system에 필수 조효소인 NADPH의 재생을 위하여 glucose metabolism이 필요

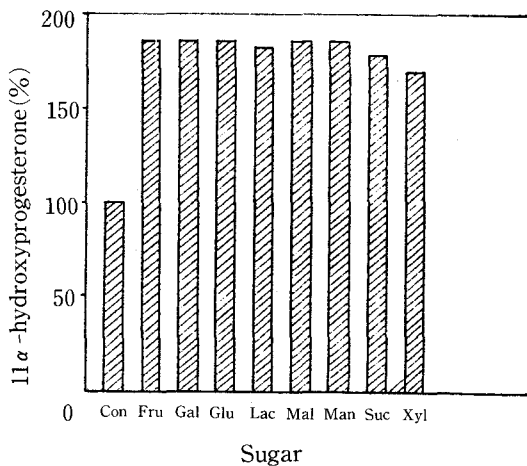


Fig. 5-A. Sugar as activator for the 11α-hydroxylation of progesterone.

Progesterone concentration: 0.1 g/l, Sugar concentration: 10 g/l, Reaction time: 5 hrs, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5

Con: standard without sugar
Fru: fructose
Gal: galactose
Glu: glucose
Lac: lactose
Mal: maltose
Man: mannose
Suc: sucrose
Xyl: xylose

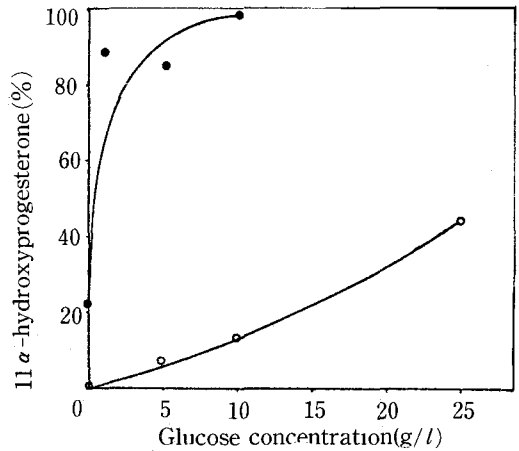


Fig. 5-B. Effect of glucose concentration on the 11α-hydroxylation.

Progesterone concentration: 0.05 g/l, Reaction time: 48 hrs, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5

○—○ : spores of *R. nigricans*
●—● : mycelia of *R. nigricans*

하므로 이런 각종 당류가 세포 성장의 에너지원으로 작용하여 간접적으로 효소 활성을 증진시킨 효과를 보인 것으로 생각된다(Clark 등, 1983; Maddox 등, 1981). Fig. 5-B는 *R. nigricans*의 포자와 균사체를 각각 효소원으로 하여 glucose의 효과를 고

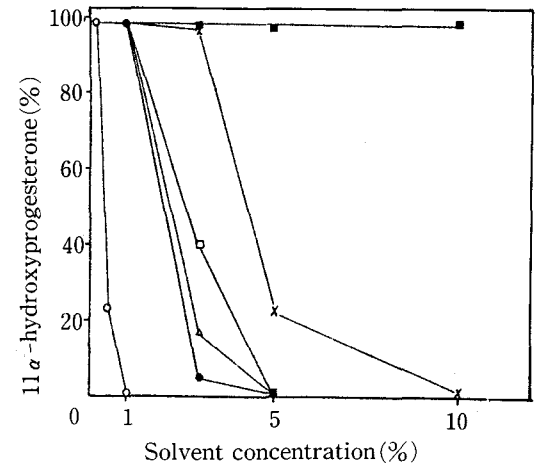


Fig. 6-A. Effect of various solvents on the hydroxylation of progesterone when the mycelia were pretreated with the solvents for 10 hours.

Progesterone concentration: 0.05 g/l, Reaction time: 10 hrs, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5

○—○ : tetrahydrofuran
●—● : acetone
△—△ : ethanol
□—□ : methanol
×—× : propylene glycol
■—■ : glycerol

찰한 것인데 포자를 사용한 경우에 glucose의 농도가 증가할수록 glucose의 효과는 계속 상승하는 추세를 보이는 것으로부터 포자인 경우가 균사체를 사용했을 때보다 11 α -hydroxylation을 위한 glucose 요구량이 더 큼을 알 수 있다. 이는 포자의 발아 과정에 에너지원으로써 glucose를 다량 필요로 하는 점과 포자는 균사체보다 물질대사 효율이 낮아서 더 많은 양의 glucose를 조효소 재생에 필요로 하기 때문인 것으로 생각된다.

유기 용매의 영향

실험에 사용한 유기 용매중 glycerol을 제외한 모든 유기 용매가 효소 활성의 저해 작용을 나타내었고, 유기 용매의 농도가 높을수록, 용매에 전처리한 시간이 길어질수록 더욱 큰 저해 작용을 받는 것으로 나타났다(Fig.6-A와 6-B). Ohlson 등(1978)도 유기 용매의 농도와 효소 저해 작용의 관계를 보고하였으며, Singh 등(1968)은 *A. ochraceus* 포자를 2~10%의 acetone에 처리한 결과 반응 초기에는 저해 작용이 나타났다가 acetone이 증발된 후는 억제되었던 효소 활성이 회복되어 progesterone의 전환 반응이 정상적으로 진행되었다고 보고하였다. 본 실험에서 가장 적은 저해 작용을 보인 유기 용매는

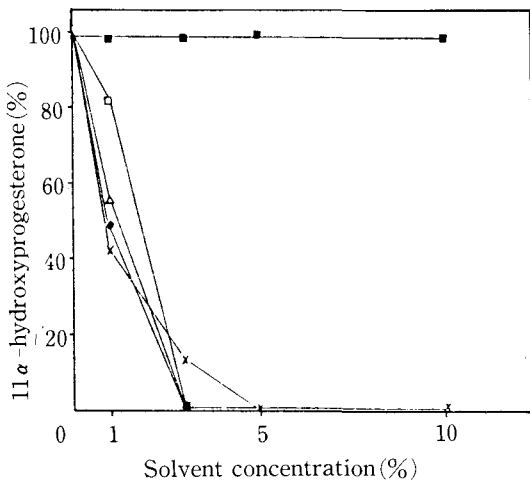


Fig.6-B. Effect of various solvents on the hydroxylation of progesterone when the mycelia were pretreated with the solvents for 20 hours. Progesterone concentration: 0.05 g/l, Reaction time: 10 hours, Reaction temperature: 28°C, pH: 4.5
 ●—● : acetone
 △—△ : ethanol
 □—□ : methanol
 ×—× : propylene glycol
 ■—■ : glycerol

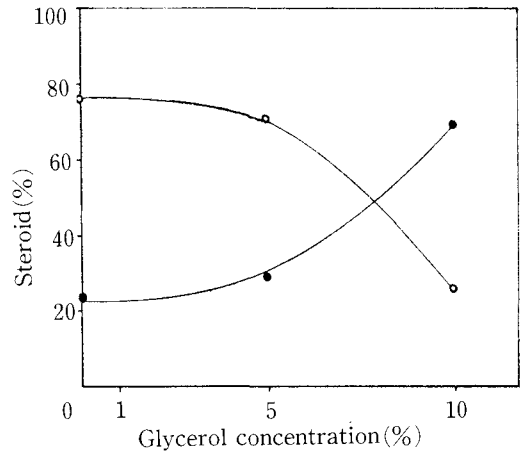


Fig.6-C. Glycerol as an activator for the 11 α -hydroxylation of progesterone with intact mycelia. Progesterone concentration: 0.1 g/l, Reaction time: 5 hrs, Reaction temperature: 28°C, pH: 6.0
 ○—○ : progesterone
 ●—● : 11 α -hydroxyprogesterone

glycerol, propylene glycol, methanol, ethanol, acetone, tetrahydrofuran의 순으로 나타났다.

Fig.6-C는 glycerol의 농도 별로 전처리 과정없이 반응 용액에 직접 첨가시켜 조사한 결과이다. glycerol의 농도가 높을수록 전환율이 증가하였는데 glycerol은 균체의 에너지원으로 사용될 수 있어서 (Inui 등, 1965) Fig.5의 당류의 효소 활성 증진율에 비하면 매우 낮은 정도이기는 하지만 분명한 반응 촉진 효과를 나타내었다고 볼 수 있다. 그러나 glycerol은 점성을 가지고 있으므로 반응액 내에 기질을 균일하게 분산시키기 어려운 점이 있다.

摘 要

R. nigricans Ehrenberg에 의한 progesterone의 11 α -hydroxylation에 영향을 미치는 여러 물리 화학적 요인에 대하여 조사하였다. Progesterone의 농도가 낮을수록 11 α -hydroxyprogesterone이 최고의 수득율에 도달하는데 소요되는 시간이 짧았으며, 높은 기질 농도에서의 progesterone은 11 α -hydroxyprogesterone의 hydroxylation을 저해하였다. 이 반응에 대한 최적 pH와 온도 범위는 비교적 넓은 범위로 나타났으며, 균사체의 성장 최적 조건과 유사하였다. 일정 속도 이상의 진탕 속도와 당류들은 11 α -hydroxylation 반응을 촉진시키는 효과

를 보였으며, 균사체에서 보다 포자를 효소원으로 사용하였을 때 glucose의 효과는 더 크게 나타났다. 유기 용매는 효소 활성 저해제로 작용하였으며, 저해 정도는 유기 용매 농도가 높을수록, 용매에 처리한 시간이 길어질수록 높게 나타났다.

參考文獻

- Breskvar, K. and Hudnik-Plevnik, T.(1978) : Inducibility of progesterone hydroxylating enzymes in *Rhizopus nigricans*. *J. Steroid Biochem.* **9** : 131-134.
- Clark, T.A., Maddox, I.S. and Chong, R.(1983) : The effect of glucose on 11 β -and 19-hydroxylation of Reichstein's substance S by *Pellicularia filamentosa*. *J. Appl. Microbial Biotechnol.* **17** : 211-215.
- Hanisch, W.H., Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1980) : Optimization of the production of progesterone 11 α -hydroxylase by *Rhizopus nigricans*. *Biotechnol. Bioeng.* **22** : 557-570.
- Inui, T. and Takeda, Y.(1965) : Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol. Suppl.* **11** : 1-121.
- Jayanthi, C.R., Madyatha, P. and Madyastha, K. M.(1982) : Microbial 11 α -hydroxylation of progesterone in *Aspergillus ochraceus* Part 1 : Characterization of the hydroxylase system. *Bioche. Biophys. Res. Commu.* **106** : 1262-1268.
- Karow, E.O. and Petsiavas, D.W.(1956) : Effect of physical variables on microbiological transformation of steroids. *Industrial and Engineering Chemistry* **48** : 2213-2217.
- Kloosterman IV, J. and Lilly, M.D.(1984) : Effect of supersaturated aqueous hydrocortisone concentrations on the Δ^1 -dehydrogenase activity of free and immobilized *Arthrobacter simplex*. *Enzyme Microb. Technol.* **6** : 113-116.
- Koshcheyenko, K.A., Turkian, M.N. and Skarhabin G.K.(1983) : Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformations. *Enzyme Microb. Technol.* **5** : 14-21.
- Lee, Y.J.(1985) : Bioconversion of progesterone with *Aspergillus phoenicis*. MS thesis of the Konkuk University.
- Maddox, I.S., Dunnill, P. and Lilly, M.D.(1981) : Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11 α -hydroxylation of progesterone. *Biotechnol. Bioeng.* **23** : 345-354.
- Ohlson, S., Larsson, P.O. and Mosbach, K. (1978) : Steroid transformation by activated living immobilized *Arthrobacter simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **20** : 1267-1248.
- Sallam, L., Laim, N., Zeinel, A., Badr, A. and El-Refai, A.M.(1976) : Some factors influencing the enzymatic conversion of progesterone by *Aspergillus niger* 171. *Revista A.B.A.* **12**(227) : 221-227.
- Singh, K., Sehgal, N. and Vezina, C.(1968) : Large-scale transformation of steroids by fungal spores. *Appl. Microbiol.* **16** : 393-400.
- Weaver, E.A.(1962) : Improvements in and relating to the hydroxylation of steroids. *Patent Specification*. London.

Accepted for Publication 13 January 1987