

## *Pellicularia filamentosa*로부터 Steroid 11 $\beta$ -hydroxylase 의 유도

김말남 · 김영숙

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Induction of Steroid 11 $\beta$ -hydroxylase in *Pellicularia filamentosa*

Kim, Mal-Nam and Young-Suk Kim

Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT:** Twenty-one strains were tested for 11  $\beta$ -hydroxylation of Reichstein's substance S. Four fungi exhibited ability for the reaction, among which *Pellicularia filamentosa* showed the highest activity. The 11  $\beta$ -hydroxylase of this fungus was proved to be induced by the substrate, cycloheximide reducing significantly the activity of the enzyme. Range of optimum pH for the 11  $\beta$ -hydroxylation was broad and found to be 2.0-8.0. Test of the enzyme activity at different growing stages, from spore to mycelia, showed that the branching stage of hyphae and the mature mycelial stage were the most effective for the Reichstein's substance S transformation. However, 11  $\beta$ -hydroxylase in the intact spore was turned out to be uninducible with the substrate.

**KEY WORDS** □ *Pellicularia filamentosa*, Reichstein's substance S, 11  $\beta$ -hydroxylase, enzyme induction.

미생물에 의한 steroids 의 전환은 효소에 의해 촉매되는 일종의 생화학 반응으로서 광범위한 steroids 를 다양하게 전환시킬 수 있다는 특징 때문에 관심이 높다. 특히 생존미생물의 효소계는 기질에 대한 regiospecificity 와 stereospecificity 를 가지고 있을 뿐 아니라, 조효소의 재생이 용이하므로 steroids 의 전환에 유리하다(Akherm 과 Titou, 1965).

유용한 steroids 의 전환반응으로는 progesterone 의 11 $\alpha$ -hydroxylation(Park 과 Kim, 1989), Reichstein's substance S 의 11 $\beta$ -hydroxylation(Clark 등, 1985), hydrocortisone 의  $\Delta^1$ -dehydrogenation(Park 과 Hoffman, 1989)이 있으며, hydrocortisone, prednisolone, prednisone, triamcinolone 등과 같은 steroids 계 약품과 steroid hormones 의 생산에 이용된다. Reichstein's substance S 의 11 $\beta$ -hydroxylation 은 그

산물이 corticosteroids 자체가 되므로 더욱 유용한 반응이다. 최근에는 steroid 전환반응의 원료 획득을 위한 cholesterol 의 side chain degradation 도 소개되고 있다(Flygare and Larsson, 1987).

전환반응의 효율은 촉매역할을 수행하는 효소의 특성이나 거동에 따라 좌우되므로, 효소특성을 밝히는 일이 선행되어야 함에도 현재까지는 연구가 미비한 상태이다. 1970년 Nguyen-Dang 과 Janet 는 *Rhizopus nigricans* 에 의한 progesterone 의 hydroxylating enzyme 이 유도효소가 아니라고 보고하였으나, 후에 Breskvar 와 Hudnik-Plevnik(1977) 그리고 Koshcheyenko 등(1983)은 *R. nigricans* 의 hydroxylase 가 유도효소라는 사실을 밝혔다. Ghosh 와 Samanta(1981)는 이 효소의 유도는 핵 DNA 에 의해 지배를 받으며, 반응액 내의 용존산소(Hanisch 등,

1980)와 세포내 조효소의 양에 (Sedlaczek 등, 1981) 의하여 영향을 받는다고 보고한 바 있다. Kloosterman IV와 Lilly (1983)는 hydrocortisone 으로부터 prednisolone 을 생성하는 *Arthrobacter simplex* 의  $\Delta^1$ -dehydrogenase 가 유도적 특성을 가지고 있으며, 효소의 유도는 기질과 산물의 농도에 따라 조절되어진다고 하였다. 11 $\beta$ -hydroxylase 효소의 특성에 대해서는 알려진 바가 극히 적다. 1970년 Lin과 Smith가 *Curvularia lunata* 의 다효소체계가 기질인 Reichstein's substance S에 의해 유도된다고 설명한 이후, 이 효소의 특성이나 거동에 대해서 구체적으로 소개한 보편은 없다.

본 연구에서는 Reichstein's substance S를 hydrocortisone으로 전환시키는 *Pellicularia*

*fillamentosa* 의 11 $\beta$ -hydroxylase 를 대상으로 하여, 이 효소의 유도적 특성 및 효소합성의 유도에 영향을 미치는 여러 요인들에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

실험에 사용한 균주와 배양조건은 Table 1에 제시하였다.

### 전환반응

*P. fillamentosa* 는 72시간 동안 액체 배양한 후 건중량 0.03g에 해당하는 균사체를 취하여 반응의 효소원으로 사용하였다. 기질인 Reichstein's substance S(cortexolone; 17 $\alpha$ ,21-hydroxypregn-4-en-3,20-dione)의 농도는 0.1g/l로 하였다.

Table 1. Culture conditions and product concentration after transformation reaction with various microorganisms

Strains	Culture media		Culture time (hrs)		Hydrocortisone produced (%)
	Slant	Liquid	Slant	Liquid	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	N.A.	A	24	24	0
<i>Escherichia coli</i>	N.A.	A	24	24	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y.M.	B	24	24	0
<i>Aspergillus phoenicis</i>	M.A.	C	48	48	0
<i>Fusarium cocophilan</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>F. gramineum</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>F. oxysporum v. sp. neyum</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>F. moniliforme</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>F. roseum</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>F. solani</i>	P.D.A.	D	48	48	0
<i>Pellicularia fillamentosa</i>	P.D.A.	E	144	72	51
<i>Penicillium notatum</i>	P.D.A.	F	48	48	20
<i>Rhizopus acetorinus</i>	P.D.A.	F	48	48	11
<i>R. acidus</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. arrhizus</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. chinliquefaciens</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. formoshaensis</i>	P.D.A.	F	48	48	6
<i>R. japonicus</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. nigricans</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. oryzae</i>	P.D.A.	F	48	48	0
<i>R. shaeinsis</i>	P.D.A.	F	48	48	0

Slant media : N.A. ; nutrient agar, Y.M. ; yeast malt agar, M.A. ; malt agar, P.D.A. ; potato dextrose agar. Liquid media : A ; potato dextrose broth, B ; yeast extract 3g, malt extract 3g, pepton 5g, dextrose 10g, distilled water q.s.p. 1l, C ; malt extract 4g, yeast extract 3g, distilled water q.s.p. 1l, D ; dextrose 30g, yeast extract 3g, pepton 10g, distilled water q.s.p. 1l, E ; yeast extract 10g, dextrose 25g, distilled water q.s.p. 1l, F ; yeast extract 20g, dextrose 25g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, distilled water q.s.p. 1l.

반응온도는 *E. coli*의 경우는 37°C, 기타 다른 균주들은 28°C로 하였다. 액체배양 시간은 성장단계 중 지수기에서 정지기로 들어가는 시간으로 정하였다. 반응액의 pH는 7.0(0.02 M 인산완충용액), 반응액은 40 ml, 반응시간은 12시간으로 하였다.

이온의 효과를 조사할 때 사용한 시약은  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$ ),  $Zn^{2+}$  ( $ZnSO_4$ ),  $Cu^{2+}$  ( $CuSO_4$ ),  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ )이었다.

### Steroid의 추출 및 분석

균사체를 분리해낸 반응여액에 1 M HCl과 chloroform을 첨가하여 steroids를 추출하고, H.P.L.C.(Waters Co.)를 이용하여 분석하였다. Nova-pak  $C_{18}$  column에 acetonitril과 water를 3:7의 비율로 0.8 ml/min의 속도로 통과시키면서 steroids 시료를 전개하였다. 각 물질을 254 nm의 U.V. detector로 정량한 결과 기질인 Reichstein's substance S는 4분 후에, 주산물인 hydrocortisone ( $11\beta,17\alpha,21$ -trihydroxypregn-4-en-3,20-dione)은 약 8분 후에 elution peak를 얻을 수 있었다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 선정

Reichstein's substance S의  $11\beta$ -hydroxylation 능력을 가진 균주의 선정에 관한 실험결과를 Table 1에 제시하였다. *P. filamentosa*가 가장 우수하여 차후 실험에 사용하기로 선택하였다.

### 유도효소의 확인

Fig.1은 *P. filamentosa*가 생성하는  $11\beta$ -hydroxylase가 유도효소인가를 밝혀보고자, 균체의 배양이 끝나기 6시간 전에 배양액 속에 기질을 첨가하여 처리시킨 균사체와 기질없이 배양된 균사체로 전환반응을 행한 실험의 결과를 비교한 것이다. 반응초기 시간에는 배양과정에서 기질로 미리 처리한 균사체가 처리하지 않은 균사체보다 더 높은  $11\beta$ -hydroxylase 활성을 나타내었다. 반응 24시간 이후에는 두 경우의 균사체가 동일한 기질전환력을 보였다. 가장 효과적인 유도시간을 알아보고자, 기질을 배양액에 첨가하여 기질처리 시간에 변화를 주면서 12시간 동안 전환반응을 시켰을 때, 유도시간이 효소활성에 미치는 영향을 Fig.2에 나타내었다. 효소합성의 유도시간이 길어짐에 따라 효소의 활성이 점차 상승함을 알 수 있

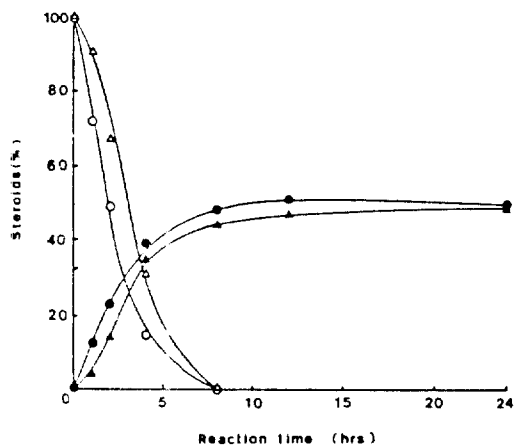


Fig. 1. Induction of  $11\beta$ -hydroxylase by Reichstein's substance S.

- : Reichstein's substance S with treated mycelia.
- △-△: Reichstein's substance S with untreated mycelia.
- : hydrocortisone with treated mycelia.
- ▲-▲: hydrocortisone with untreated mycelia.

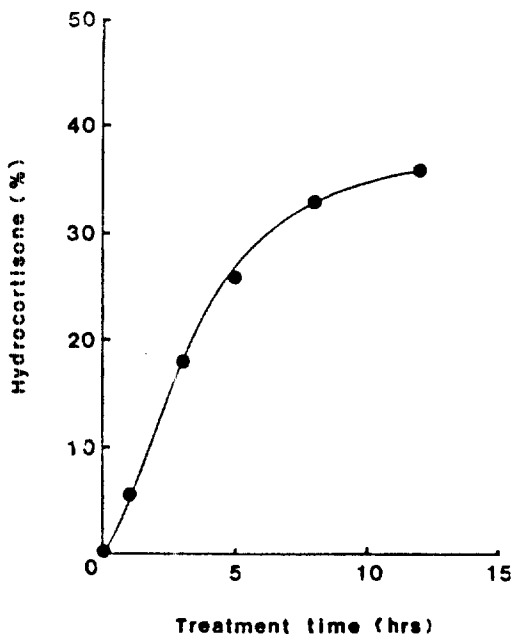


Fig. 2. Effect of treatment time on the induction with substrate before transformation.

었다. Zuidweg (1968), Chang과 Sih (1964)와 Hafez-Zedan과 Plourde (1973)는 steroids의 hydroxylation에 cell-free extracts를 이용한 결과, 균주에 따라서 다소의 차이는 있지만 효소

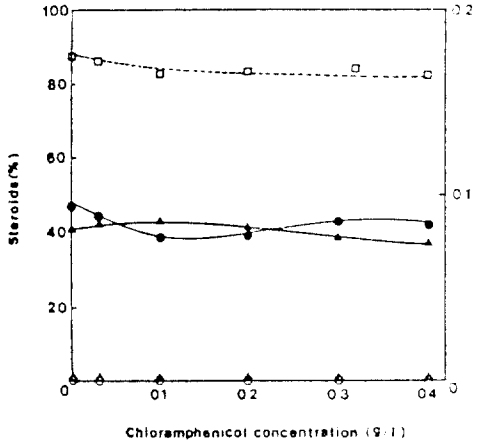


Fig. 3. Effect of chloramphenicol on the induction of 11 $\beta$ -hydroxylase.

- : Reichstein's substance S with treated mycelia.
- △—△: Reichstein's substance S with untreated mycelia.
- : hydrocortisone with treated mycelia.
- ▲—▲: hydrocortisone with untreated mycelia.
- : dry weight of mycelia.

의 유도를 위해서는 2-20시간이 요구된다고 보고 하였다.

Fig.3과 Fig.4는 반응액에 chloramphenicol과 cycloheximide가 존재하는 조건에서, 배양과정 동안 기질로서 미리 효소합성을 유도한 균사체와 처리하지 않은 균사체를 사용하였을 때 hydrocortisone의 생성 정도와 균사의 성장상태를 조사한 것이다. Fig.3에서 chloramphenicol은 균사체의 성장과 11 $\beta$ -hydroxylase 합성에 저해효과를 나타내지 않았다. Antibacterial antibiotics로 알려진 (Hafez-Zedan과 Plourde, 1973) chloramphenicol이 *Neurospora crassa* (Howell 등, 1971), *Candida pasillosis* (Kellerman 등, 1969) 등의 진균에도 단백질합성 저해제로 작용하였다는 보고와는 달리 본 균주에는 영향을 미치지 않았다. 반면, cycloheximide (Fig.4)는 균사체의 성장을 심하게 저해하였을 뿐 아니라, 배양과정 중에 미리 효소를 유도하지 않은 균사체는 cycloheximide가 반응액에 1mg만 존재하여도 11 $\beta$ -hydroxylase의 효소합성은 완전하게 억제되었다. 그러나 미리 효소합성을 유도한 균사체는 cycloheximide의 존재 하에서도 11 $\beta$ -hydroxylase를 생성하였다. 위의 실험결과들로부터 *P. filamentosa*의 11 $\beta$ -hydroxylase는 기질로부터

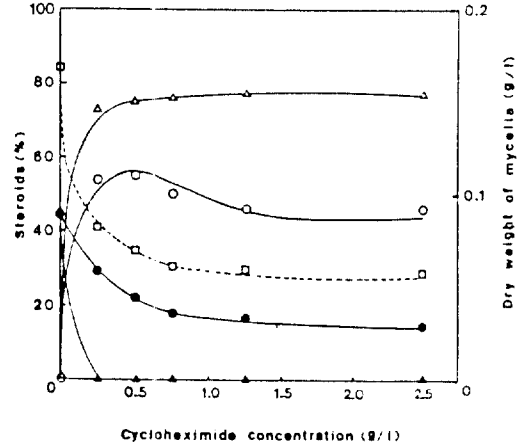


Fig. 4. Effect of cycloheximide on the induction of 11 $\beta$ -hydroxylase.

- : Reichstein's substance S with treated mycelia.
- △—△: Reichstein's substance S with untreated mycelia.
- : hydrocortisone with treated mycelia.
- ▲—▲: hydrocortisone with untreated mycelia.
- : dry weight of mycelia.

유도되는 효소로 그 특성이 확인되었다.

11 $\beta$ -hydroxylase의 유도에 영향을 주는 요인

Photo 1은 *P. filamentosa*의 성장상태를 Jaworski 등(1984)의 방법에 따라 4단계로 구분하여 각 성장단계에 따른 효소의 유도정도를 비교 조사한 것이다. 본 논문에 그 결과를 나타내지는 않았지만 포자시기에는 기질이 전혀 전환되지 않았으며, 포자의 발아시기에는 기질의 15%가 전환되었다. *Aspergillus ochraceus*를 이용한 16-hydroxycortisol의 hydroxylation 반응에서 포자의 효소활성이 균사체보다 빨리 최대활성에도달했다고 보고한 Lee 등(1971)이나 *Cunninghamella elegans*의 경우 발아관 형성시기에 hydroxylation이 가장 좋았음을 밝힌 Jaworski 등(1984) 및 포자가 발아하거나 균사체로 성장하기 이전에 *A. ochraceus*가 포자 자체만으로도 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation 전환능력이 있었다고 보고한 Vezina 등(1962)의 결과에 비하여, 본 실험에서는 포자의 경우에 11 $\beta$ -hydroxylase의 합성이 유지되지 않았다. 균사의 분지시기와 완전하게 성숙한 균사체 시기에는 기질이 모두 소멸되어 hydrocortisone의 수득률은 50% 수준이었고, 나머지는 기질로부터 부산물 steroids가 생성되었다. 특히 70시간 이상 배양된 성숙한

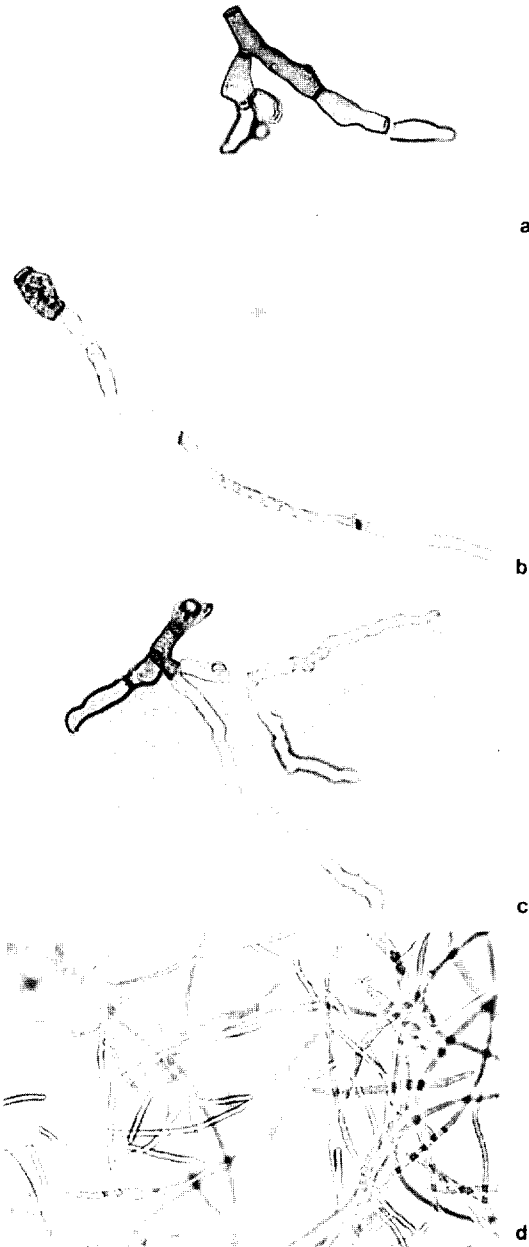


Photo 1. *P. filamentosa* at different growing stages.

- a: spore
- b: germinated spore (20 hours in culture)
- c: branching stage of hyphae (50 hours in culture)
- d: mature mycelia (70 hours in culture)

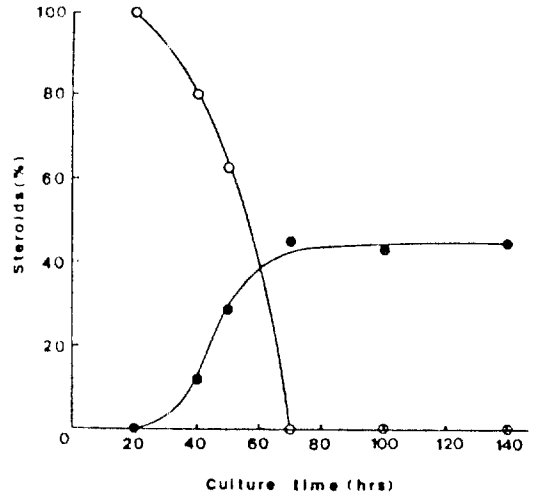


Fig. 5.  $11\beta$ -hydroxylation of Reichstein's substance S at different time of culture.

- : Reichstein's substance S
- : hydrocortisone

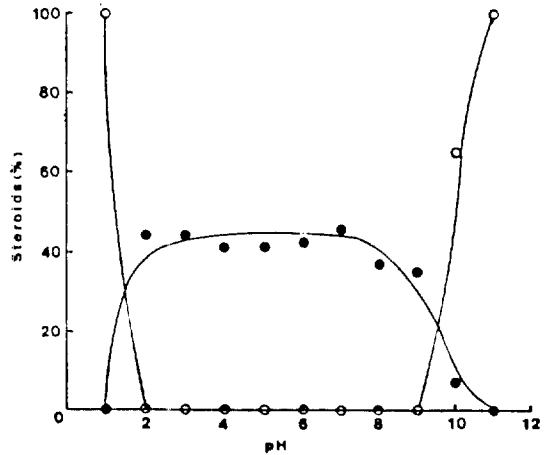


Fig. 6. The effect of pH of the reaction medium.

- : Reichstein's substance S
- : hydrocortisone

균사체 시기에서는  $11\beta$ -hydroxylase의 유도가 높았다(Fig.5).

$11\beta$ -hydroxylase 활성의 최적 pH 범위는 2.0-8.0으로서 광범위하였다(Fig.6). Fig.7에 나타난 바와 같이 Reichstein's substance S로부터 1차생성된 hydrocortisone의 양이 반응 100시간까지도 일정하게 유지되는 것으로부터, 반응 중에 hydrocortisone은 2차적인 전환반응의 기질로 이

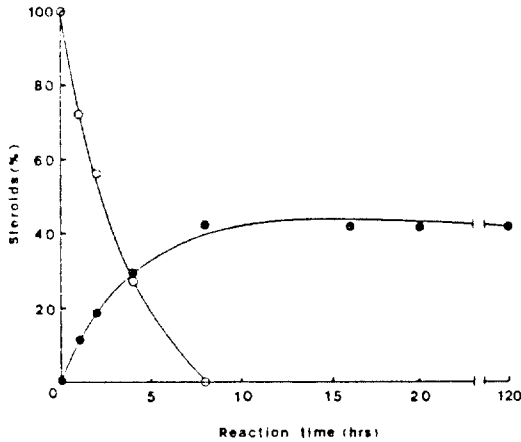


Fig. 7. Hydrocortisone production at different time of reaction.

○—○: Reichstein's substance S  
●—●: hydrocortisone

Table 2. Effect of metal ions on the 11β-hydroxylation of Reichstein's substance S.

Metal ions	concentration(M)	Steroids(%)	
		unconverted Reichstein's substance S	hydrocortisone produced
control	0	0	50
Zn <sup>2+</sup>	10 <sup>-1</sup>	98	0
	10 <sup>-3</sup>	0	47
Cu <sup>2+</sup>	10 <sup>-1</sup>	98	0
	10 <sup>-3</sup>	0	45
Mn <sup>2+</sup>	10 <sup>-1</sup>	0	51
	10 <sup>-3</sup>	0	51
Mg <sup>2+</sup>	10 <sup>-1</sup>	33	33
	10 <sup>-3</sup>	0	49
Fe <sup>2+</sup>	10 <sup>-1</sup>	0	50
	10 <sup>-3</sup>	0	50

용되지 않음을 알 수 있었다.

11β-hydroxylase의 유도에 대한 이온의 영향을 조사한 결과 (Table 2) 10<sup>-1</sup> M Zn<sup>2+</sup>, 10<sup>-1</sup> M Cu<sup>2+</sup>, 10<sup>-1</sup> M Mg<sup>2+</sup>는 11β-hydroxylase의 활성

을 억제하였으며, 실험에 사용한 양이온 중에서 11β-hydroxylase 효소합성의 활성화에 기여한 양이온은 없는 것으로 나타났다.

적 요

Reichstein's substance S의 11β-hydroxylation 활성이 있는 균주를 선택하고자 21 균주를 실험한 결과 4균주에서 11β-hydroxylase의 활성이 발견되었으며, 그 중 *Pellicularia fillamentosa*가 가장 높은 효소활성을 보였다. 이 균주의 11β-hydroxylase는 유도효소로 그 특성이 밝혀졌으며, cycloheximide는 11β-hydroxylase의 합성을 강력하게 저해하였다. 11β-hydroxylation의 최적 pH 범위는 2.0-8.0으로 광범위하였다. 성장단계 중 균사체 분지시기와 완전히 성숙한 균사체 시기에 효소합성의 유도가 가장 활발하였으며, 70시간 배양된 균사체가 가장 좋았다. 반면, 포자에는 기질에 의한 11β-hydroxylase의 유도현상이 없는 것으로 판정되었다.

REFERENCES

1. Akherm, A.A. and Y.A. Titou, 1965. Microbiological transformation of steroid. Nauka Press.
2. Breskvar, K. and T. Hudnik-Plevnik, 1977. A possible role of cytochrome P-450 in hydroxylation of progesterone by *Rhizopus nigricans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74(3), 1192-1198.
3. Chang, E.N. and C.J. Sih, 1964. Mechanism of steroid oxidation by microorganisms. VIII. Properties of the 9α-hydroxylase. *Biochemistry*, 3(10), 1551-1557.
4. Clark, T.A., R. Chong and I.S. Maddox, 1985. An investigation into the 19-hydroxylation of androstenedione, cortexolone and progesterone by selected fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 132-134.
5. Flygare, S. and P.O. Larsson, 1987. Steroid transformation using magnetically immobilized *Mycobacterium* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 494-499.
6. Ghosh, D. and T.B. Samanta, 1981. 11α-hydroxylation of progesterone by cell-free preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.* 14, 1063-1067.
7. Hafez-Zedan, H. and R. Plourde, 1973. Steroid Δ<sup>1</sup>-dehydrogenation and side-chain degradation enzymes in the life cycle of *Fusarium solani*. *Biochem. Biophys. Acta.* 326, 103-115.
8. Hanisch, W.H., P. Dunnill and M.D. Lilly, 1980. Optimization of the production of progesterone 11α-hydroxylase by *Rhizopus nigricans*. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 557-570.
9. Howel, N., C.A. Zuiches and K.D. Munkres, 1971. Mitochondrial biogenesis in *Neurospora crassa*. I. An

- ultrastructural and biochemical investigation of the effect of anaerobiosis and chloramphenicol inhibition. *J. Cell. Biol.* **50**, 721-236.
10. **Jaworski, A., L. Sedlacek and J. Dlugonski**, 1984. Transformation of steroids by fungal spores. III. Activity of the 11  $\alpha$ -hydroxylase at various times during germination and vegetative growth of *Cunninghamella elegans* sporangiospores. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 313-317.
  11. **Kellerman, G.M., D.R. Bigg and A.W. Linnane**, 1969. Biogenesis of mitochondria. XI. A comparison of the effects of growth-limiting oxygen tension intercalating agents and antibiotics on the obligate aerobic *Candida parapsilosis*. *J. Cell Biol.* **42**, 378-391.
  12. **Kloosterman IV, G.M. and M.D. Lilly**, 1983. Effect of supersaturated aqueous hydrocortisone concentrations on the  $\Delta^1$ -dehydrogenase activity of free and immobilized *Arthrobacter simplex*. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 113-116.
  13. **Koshcheyenko, K.A., M.W. Tyrkina and G.K. Skrybin**, 1983. Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformation. *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 14-21.
  14. **Lee, B.K., W.E. Brown, D.Y. Ryu and R.W. Thoma**, 1971. Sequential 11  $\alpha$ -hydroxylation and  $\Delta^1$ -dehydrogenation of 16  $\alpha$ -hydroxycortisol. *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 503-515.
  15. **Lin, Y.Y. and L.L. Smith**, 1970. Microbial hydroxylation. VII. Kinetic studies on the hydroxylation of 19-norsteroids by *Curvularia lunata*. *Biochim. Biophys. Acta.* **218**, 515-525.
  16. **Nguyen-Dang, M.T. and M.M. Janet**, 1970. Hydroxylation de la progesterone par le *Rhizopus nigricans* en presence de chloramphenicol. *C.R. Acad. Sci. Paris.* **270**, 2035-2037.
  17. **Park, H.E. and M.N. Kim**, 1989. Bioconversion of progesterone by immobilized *Aspergillus phoenicis*. *Kor. J. Microbiol.*, **27**(1), 70-76.
  18. **Park, T.G. and A.S. Hoffman**, 1989. Immobilization of *Arthrobacter simplex* cell in thermally reversible hydrogels: Comparative effects of organic solvent and polymeric surfactant on steroid conversion. *Biotechnology Letters.* **11**(1), 17-22.
  19. **Sedlacek, L., A. Jaworski and D. Wilmanska**, 1981. Transformation of steroids by fungal spores. I. Chemical changes of *Cunninghamella elegans* spore and mycelia during cortisol hydroxylation. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **13**, 155-160.
  20. **Vezina, C., S.N. Sehgal and K. Singh**, 1962. Transformation of steroids by spores of microorganisms. I. Hydroxylation of progesterone by conidia of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 50-57.
  21. **Zuidweg, M.H.J.**, 1968. Hydroxylation of Reichstein's substance S with cell-free preparation from *Curvularia lunata*. *Biochim. Biophys. Acta.* **152**, 144-158.

(Received October 22, 1989)