

*Rhizopus nigricans*를 이용한 Progesterone의 11 α -Hydroxylation 반응에서의 고정화 재료와 조건의 최적화

김명희 · 이정진 · 김말남 · 민병례
상명여자대학교 생물학과

Optimal Material and Conditions for the Immobilization of *Rhizopus nigricans* in the 11 α -Hydroxylation Reaction of Progesterone

Myung-Hee Kim, Jung-Jin Lee, Mal-Nam Kim and Byung-Re Min

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

ABSTRACT: Hydroxylation in the 11 α -position of progesterone molecules was carried out using *Rhizopus nigricans* spores immobilized within various gel matrices, among which polyacrylamide and agar gel were proved to be the most effective. Reactions with the immobilized cells and intact free cells showed almost identical conversion rate of progesterone, optimal pH and reaction time for attaining maximal yield, from which were confirmed absence of any decay and modification of enzyme activities.

KEYWORDS: *Rhizopus nigricans*, Immobilization, Polyacrylamide gel, Agar gel, Progesterone, 11 α -hydroxyprogesterone.

최근 산업적으로 유용한 물질의 생산에 고정화된 미생물 세포를 사용하는데 대한 관심이 높다. 특히 고정화된 미생물 세포는 고정용 담체속에서 생장이 가능하여(Brodellius와 Vandamme, 1987) 조효소의 재생을 필요로 하는 다효소체계의 반응에서 더욱 유리하다. 그러나 세포를 고정하면 gel matrix로 인하여 free cell에 비하여 물질의 투과력이 약해지고(Ceen 등, 1987), 고정화 과정 중에 효소의 변성이 유발되어 효소 활성이 감소되는 단점이 따른다.

*Rhizopus nigricans*는 높은 progesterone 11 α -hydroxylation 전환율(95% 이상)을 나타내는 균주이다(Kim과 Kim, 1987).

11 α -hydroxyprogesterone은 류마치스성 관절염 등의 질병 치료에 효과가 높은 고가의 corticosteroid hormones의 합성에 전구물질이 된다.

Progesterone의 11 α -hydroxylation은 NADPH의 재생이 필수적으로 요구되므로(Breskvar와 Hudnik-

Plevnik, 1981) 고정화한 생존 세포를 효소원으로 이용하면 유리할 것으로 사료되지만, *R. nigricans*는 군사체의 세포벽이 약하고 고정재료의 독성으로 인하여 성공한 예가 드물다(Maddox 등, 1981).

본 연구는 *R. nigricans*의 생존 포자체를 여러 고정용 담체에 고정화시키고 가장 우수한 gel matrix를 선택하여 최적의 고정화 조건을 찾되자 하였다.

材料 및 方法

고정화

1) Ca²⁺-alginate gel

2%의 alginate 용액 14 ml를 포자현탁액(5.0 \times 10⁶ spores/ml) 1 ml와 혼합한 후 0.05 M CaCl₂ 용액속에서 beads를 만들었다.

2) K-carrageenan gel

2% K-carrageenan 용액 14 ml에 포자현탁액 1 ml를 넣고 잘 섞은 후 0.3 M KCl 용액속에서 beads를 만들었다.

“이 논문은 1988년도 문교부 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.”

3) Polyacrylamide gel

0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 11.78 ml에 1.5g의 acrylamide와 0.12g의 N,N'-methylene, bisacrylamide를 용해시켰다. 여기에 포자현탁액 1 ml를 넣고 촉매제로 10% TEMED 0.3 ml와 5% ammonium persulfate 0.3 ml를 첨가하여 중합시켰다.

4) Agar gel

3% agar 용액 14 ml에 포자현탁액 1 ml를 넣고 섞은 후 hardening chamber에 빠르게 부어 4 $^{\circ}$ C에서 5시간 이상 응고시키고 3% KCl 용액에서 재응고시켰다.

5) Gelatin gel

11 ml의 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0)에 gelatin 0.75g을 넣고 중탕으로 끓인 후 1% glutaraldehyde 3 ml와 포자현탁액 1 ml를 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 4시간 이상 냉동 동결시켰다.

6) Bovine Serum Albumin gel

0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 7 ml, 20% B.S.A. 4 ml, 1.5% glutaraldehyde 3 ml와 포자현탁액 1 ml를 혼합하여 잘 섞었다. -20 $^{\circ}$ C에서 10시간 이상 냉동 동결에 의하여 중합시켰다.

고정화된 포자는 액체배지에서 24시간 동안 발아시킨 후 전환반응에 효소원으로 사용하였다.

고정화 재료의 특성에 따라 완충액의 종류를 다음과 같이 하여 반응액으로 사용하였다.

Free Cell : 0.05 M Phosphate buffer(pH 6.0)

Polyacrylamide : 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)

Ca²⁺-alginate : 0.1 M Succinate buffer(pH 4.5)

K-carrageenan, agar, gelatin, B.S.A. : 0.02 M Phosphate buffer(pH 7.0)

고정화하여 준비한 효소원을 50 ml의 반응액에 넣고 여기에 기질인 progesterone(0.05 g/l 최종농도, methanol 1%)을 투입하여 28 $^{\circ}$ C, 180 rpm의 Rotary Shaker에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 chloroform을 이용하여 반응액 속의 steroids를 추출하여 정량 분석하였다.

Steroids의 정량분석

HPLC(Waters Co.)를 사용하여 반응이 끝난 여액속의 미반응물과 생성물을 정량분석 하였다. Column은 Nova-Pack C18, 용매로는 acetonitrile과 물을 95 : 5의 비율로 하고 flow rate는 0.8 ml/min으로 하여 UV detector(214 nm)로 분석하였다.

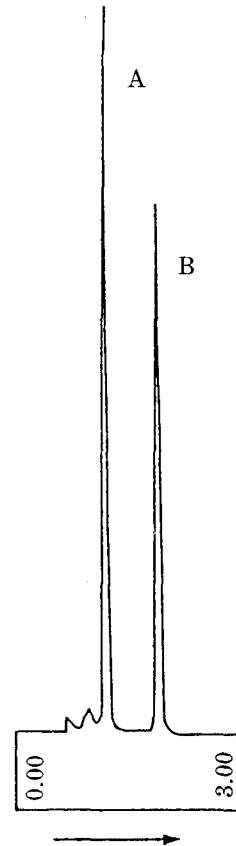


Fig. 1. The liquid chromatography elution curve of 11 α -hydroxyprogesterone (A) and progesterone (B).

Fig. 1은 progesterone과 11 α -hydroxyprogesterone의 HPLC chromatogram이다. 각각의 체류시간은 11 α -hydroxyprogesterone이 1.6분, progesterone이 2.5분이었다.

結果 및 考察

고정화 재료

Table I은 여러 종류의 gel matrix에 고정화시킨 효소원에 대한 progesterone 11 α -hydroxylation 반응 결과를 나타낸 것이다. Gel matrix에 균사체를 직접 고정화시킨 것보다는 포자체를 고정용 담체에 고정시킨 후 발아 성장시켜 균사체로 만들어서 사용하는 방법과 polyacrylamide와 agar를 고정화 재료로 할 때 11 α -hydroxylase 효소 활성이 가장 높

Table I. 11 α -hydroxylation of progesterone by *Rhizopus nigricans* immobilized in various gel matrices. Reaction time: 24 hr.

Matrix	Conversion of progesterone to 11 α -hydroxyprogesterone (%)	
	Spores	Mycelia
Ca ²⁺ -alginate	0	0
K-carrageenan	20	0
Gelatin	40	0
Bovine Serum Albumin	40	0
Polyacrylamide	95	45
Agar	95	0

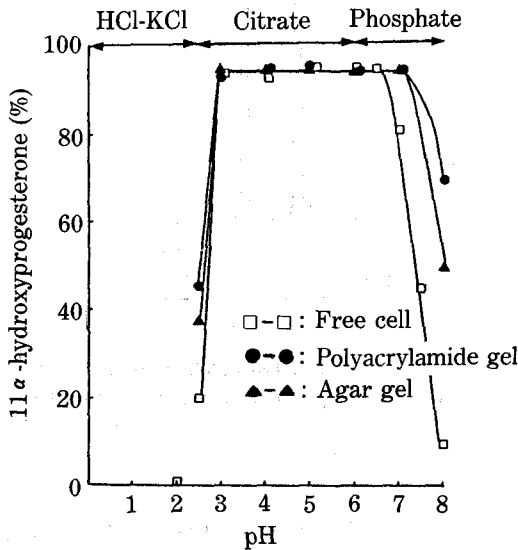


Fig. 2. Dependence of 11 α -hydroxylation on pH of the reaction medium. Reaction time: 5 hr.

았다. 고정화에 의하여 효소 활성이 감소되는 것이 일반적이나(Koshcheyenko 등, 1983) 본 실험에서 polyacrylamide와 agar gel에 고정화시킨 결과는 free cell과 동일한 매우 높은 11 α -hydroxylation율을 나타내었다.

반응액의 pH와 반응시간

고정화시킨 세포에서는 효소의 활성 뿐만 아니라 담체의 견고성도 반응액의 pH와 반응액의 종류에 의하여 영향을 받을 수 있다(Dainty 등, 1986). Polyacrylamide gel과 agar gel에 고정화된 *R. nigricans*

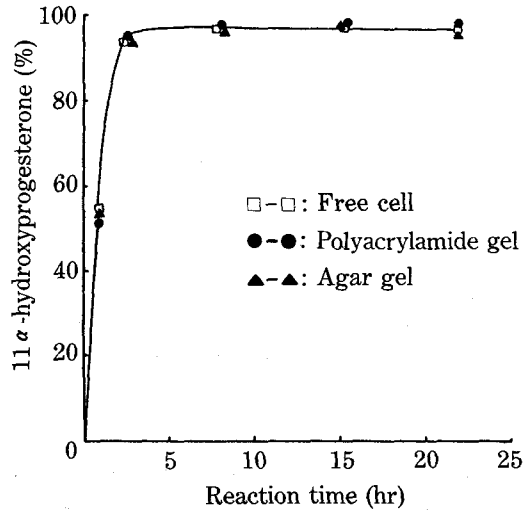


Fig. 3. Time course experiment of 11 α -hydroxylation.

균체는 pH 3~7 사이에서 높은 효소 활성을 나타내었으며(Fig. 2) 고정화에 의하여 효소결합부위에서 proton이 교환되기 때문에 최적 pH가 변한다는 보고(Leonowicz 등, 1988)와는 달리 free cell과 유사한 최적 pH를 나타내었다. 산성의 pH에서는 gel matrix의 견고성이 감소되었다. 고정용 담체가 확산 저항을 유발하여(Duff와 Murray, 1988) 생성물을 최고 수준으로 만드는데 반응 시간이 더 필요한 것으로 예상되었으나 polyacrylamide와 agar gel은 고정화시키지 않은 free cell의 경우와 같은 실험 결과를 나타내었다(Fig. 3).

포자 농도와 발아시간

Gel matrix에 고정하는 포자의 농도를 달리하여 최적의 포자 농도를 선정하여 보았다. Fig. 4에서와 같이 5.0 \times 10⁶ spores/ml 이상의 농도에서는 더 이상의 효소 활성 증가가 없었다. 이것은 포자를 담체에 고정하고 성장 배지에서 발아시켰을 때 성장이 gel 표면쪽에서 대부분 진행되고 gel내 세포의 함량이 증가되지 않기 때문인 것으로 사료된다. 미생물에 의한 전환 반응 효소 활성은 미생물의 종류에 따라 포자체 시기(Lee 등, 1971), spore swelling 시기, 발아관 형성 시기(Jaworski 등, 1984) 또는 완전한 균사체 시기(Kim과 Kim, 1989)에서 가장 높다고 보고되었다. 또한 고정화된 세포에 의한 반응에서 효소 활성은 고정화된 세포의 양보다는 세포 성장

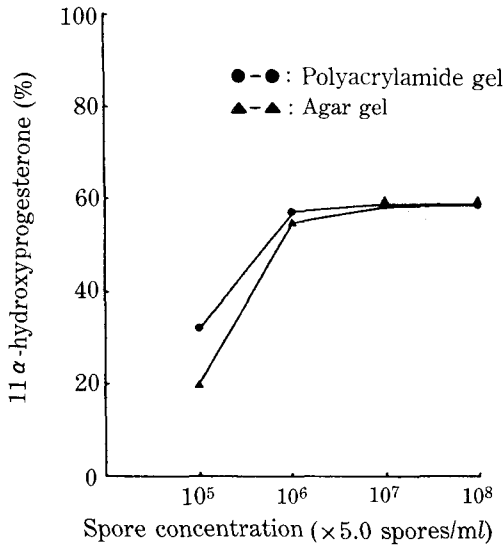


Fig. 4. 11 α -hydroxylation of progesterone as a function of spore concentration. Reaction time: 1 hr.

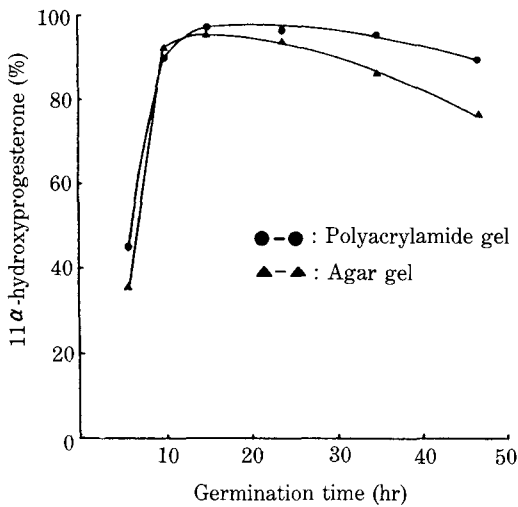


Fig. 5. Effect of spore germination time on the 11 α -hydroxylation of the progesterone. Reaction time: 10 hr.

단계에 의하여 영향을 받으며(Ogaki 등, 1986) gel에서 세포의 과다 성장이 일어날 때 효소 활성이 저하되었다는 설명도 있다(Sonomoto 등, 1982; Mazumder 등, 1985).

Fig. 5는 고정화된 포자의 발아 시간이 15~24 시간일 때 가장 높은 전환 반응 효소 활성을 나타내었으며 이 시기는 완전한 균사체를 이룬 시기에 해

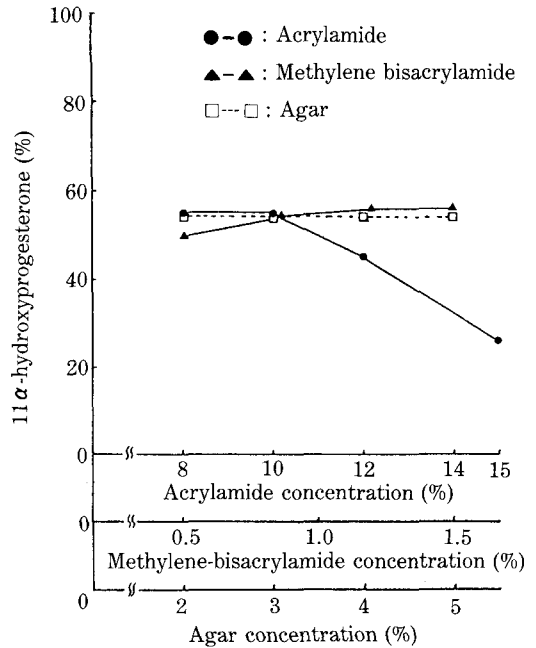


Fig. 6. Effect of gel matrix composition on the 11 α -hydroxylation of progesterone. Reaction time: 1 hr.

당한다. Agar gel에서는 생성된 11 α -hydroxyprogesterone이 더 빨리 소멸되었다.

Matrix 조성

Maddox 등(1981)이 *R. nigricans*의 균사체를 polyacrylamide gel에 고정하였을 때 효소 활성이 전혀 없었던 것은 acrylamide의 독성 때문으로 설명하였다. Fig. 6에 polyacrylamide gel의 acrylamide와 methylene bisacrylamide의 함량과 agar gel에서 agar의 농도가 11 α -hydroxyprogesterone 생성물에 미치는 영향을 나타내었다. Acrylamide의 농도는 8%와 10%에서 가장 좋았다. 포자의 발아율은 8%에서 더 높았으나 gel의 물리적 견고성이 약하여 전환반응도중에 균사체의 유출물이 발견되어 acrylamide의 농도는 10%가 가장 적합하다고 판단하였다. Acrylamide의 농도를 10%로 고정하고 methylene bisacrylamide의 농도를 변화시켰을 때 세포의 성장과 생성물의 양은 변화가 없었다. Methylene bisacrylamide 농도가 높을 때 세포 유출이 초래되었다. 0.5%의 methylene bisacrylamide 농도에서는 gel이 파손되는 mechanical damage가 발생하여 gel의 물리적 강도 및 효소 활성면에서 가장 우수한 0.8%를 최적

농도로 선택하였다. Agar gel에서 agar의 농도는 포자 발아와 progesterone의 11 α -hydroxylation에 아무런 영향을 미치지 않았다. 3% 이상의 농도에서 gel의 견고성은 모두 유사하였다.

摘 要

Rhizopus nigricans 생존포자체를 여러 종류의 고정용 담체에 고정화시켜 progesterone의 11 α -hydroxylation 효소 활성을 조사한 결과 polyacrylamide와 agar gel이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이때 고정화는 free cell이 나타내는 progesterone의 전환율과 최적 pH, 생성물이 최고 수득률에 도달하는 반응시간에 변화를 유발하지 않았으므로 고정화 과정에서 효소 활성의 감소와 변성이 없었음을 확인할 수 있었다.

參考文獻

- Breskvar, K. and Hudnik-Plevnik, T. (1981): Inducibility of cytochrome P-450 and of NADPH-cytochrome C reductase in progesterone treated filamentous fungi *Rhizopus nigricans* and *R. arrhizus*. *J. Steroid Biochem.* **14**: 393-399.
- Brodelius, P. and Vandamne, E.J. (1987): Immobilized cell systems. *Biotechnology Vol.7*. VCH Verlagsgesellschaft: 405-464.
- Ceen, E.G., Herrmann, J.P.R. and Dunnill, P. (1987): Solvent damage during immobilized cell catalysis and its avoidance: studies of 11 α -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 491-494.
- Dainty, A.L., Goulding, K.H., Robinson, P.K., Simpkins, I. and Trevan, M.D. (1986): Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 210-216.
- Duff, S.J.B. and Murray, D. (1988): Comparison of free and immobilized *Pichia pastoris* cells for conversion of ethanol to acetaldehyde. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 790-795.
- Jaworski, A., Sedlaczak, L. and Dlugonski, J. (1984): Transformation of steroids by fungal spores. III. Activity of the 11 α -hydroxylase at various times during germination and vegetative growth of *Cunninghamella elegans* spore. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 313-317.
- Kim, M.H. and Kim, M.N. (1987): Progesterone hydroxylation by *Rhizopus nigricans*. (I): The effects of reaction conditions. *Kor. J. Mycol.* **15**(1): 23-28.
- Kim, M.N. and Kim, Y.S. (1989): Induction of steroid 11 β -hydroxylase in *Pellicularia fillamentosa*. *Kor. J. Microbiol.* **27**(4): 366-372.
- Koshcheyenko, K.A., Turkina, M.V. and Skryabin, G.K. (1983): Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformations. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 14-21.
- Lee, B.K., Brown, W.E., Ruy, D.Y. and Thoma, R.W. (1971): Sequential 11 β -hydroxylation and 1-dehydrogenation of 16 α -hydroxycortisol. *Biotechnol. Bioeng.* **13**: 503-515.
- Leonowicz, A., Sarkar, J.M. and Bollag, J.M. (1988): Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 129-135.
- 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.
- Mazumder, T.K., Sonomoto, K., Tanaka, A. and Fukui, S. (1985): Sequential conversion of cortisone to prednisolone by immobilized mycelia of *Curvularia lunata* and immobilized cells of *Arthrobacter simplex*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 154-161.
- Ogaki, M., Sonomoto, K., Nakajima, H. and Tanaka, A. (1986): Continuous production of oxytetracycline by immobilized growing *Streptomyces rimosus* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 6-11.
- Sonomoto, K., Hoq, M.M. Tanaka, A. and Fukui, S. (1981): Growth of *Curvularia lunata* spores into mycelial form within various gels and steroid 11 β -hydroxylation by the entrapped mycelia. *J. Ferment. Technol.* **59**: 465-469.
- Sonomoto, K., Nomura, K., Tanaka, A. and Fukui, S. (1982): 11 α -hydroxylation of progesterone by gel-entrapped living *Rhizopus stolonifer* mycelia. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 57-62.

Accepted for Publication 16 June 1990