

## *Rhizopus nigricans*의 Progesterone 전환 반응 산물에 관한 포도당의 효과

김명희 · 김종혜 · 김말남  
상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

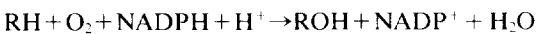
### Effects of Glucose on the Products of Progesterone Transformation by *Rhizopus nigricans*

Kim, Myung-Hee, Jong-Hye Kim and Mal-Nam Kim  
Department of Biology, Sang Myung Women's University,  
Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT:** Rate of  $11\alpha$ -hydroxylation of progesterone with *Rhizopus nigricans* was accelerated by glucose. Glucose seemed to play an important role in the formation of cofactor because its effects on the reaction were almost same as those of electron acceptors such as NADPH and  $\text{NaIO}_4$ . Rate of glucose consumption appeared to increase in proportion as the rate of hydroxylation reaction, which enhanced with increase in the glucose concentration to level off at 0.5 g/l for mycelia and at 20 g/l for spores. However, for mycelia immobilized in polyacrylamide gel, externally added glucose did not affect the reaction rate at all because of the glucose accumulated in the gel during the cultivation period.  $5\alpha$ -Reduction of  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone required much higher concentration of glucose than  $11\alpha$ -hydroxylation of progesterone so that high yield of  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone can be obtained by repressing the activity of  $5\alpha$ -reductase at low concentration of glucose.

**KEY WORDS** □ *Rhizopus nigricans*, progesterone,  $11\alpha$ -hydroxylation,  $5\alpha$ -reduction, glucose.

미생물에 의하여 생성되는 steroid hydroxylase는 포유동물의 간 (Ichihara 등, 1969)과, 부신피질 (Shinzawa 등, 1985) microsomes의 hydroxylase와 같이 cytochrome P-450과 NADPH-cytochrome C reductase를 포함하는 효소계 (Breskvar와 Hudnik-Plevnik, 1977; Ghosh와 Samanta, 1981)로서, 다음과 같이 NADPH와 산소를 필요로 하는 반응 과정을 촉매한다.



한 분자의 기질 (RH)이 hydroxylation 되는 데는 한 분자의  $\text{O}_2$ 와 NADPH 한 분자, 그리고 proton 한개가 필요하므로 반응액 내의  $\text{O}_2$  농도와 세포 내 NADPH의 생성량은 hydroxylation 반응에 영향을 미칠 것으로 판단된다. Hanisch 등(1980)은 *Rhizopus nigricans*에 의한 progesterone의  $11\alpha$ -hydroxylation에서 효소 유도에 필요한 최적의 dissolved oxygen

tension(DOT)은 10%로서 효소에 의한 hydroxylation 반응에는 더 높은 DOT가 요구된다고 하였으며, Clark 등(1982)도 유사한 결과를 보고하였다.

Clark 등(1983)은 Reichstein's substance S의 hydroxylation 반응에서 포도당이 없을 경우 반응이 진행되지 않는 것으로부터 포도당을 hydroxylation 반응의 필수 요소라고 지적하였으며, Maddox 등(1981)과 Arinbasarova 등(1985)도 포도당에 의하여 hydroxylation 반응이 촉진됨을 보고하였다. 포도당은 생물체 내에서 주로 EMP 경로를 거쳐 분해되거나 지방산 또는 steroids를 생합성하는 동물조직의 세포에서는 HMP 경로를 통하여 분해되기도 한다. *Rhizopus*를 비롯한 많은 미생물도 HMP 경로를 이용할 수 있다(Griffin, 1981). 한 분자의 포도당은 HMP 경로를 거쳐 두 분자의 NADPH와 두개의 수소 이온을 생성한다. 따라서 steroid hydroxylation에서 포도당은 hydroxylase 활성화에 직접 영향을 주

기보다는 NADPH의 생성과 세포의 에너지원으로 사용되어 hydroxylation 반응을 촉진하는 것으로 보인다(Akhrem과 Titov, 1970; Morrin과 Ward, 1989).

*Rhizopus nigricans* Ehrenberg는 progesterone으로부터 주산물인 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone과 부반응산물인 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione등을 생성한다(Kim과 Kim, 1991).

본 연구에서는 효소원에 따른 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 생성과 포도당 소모와의 상호관계를 밝히고, 11 $\alpha$ -hydroxylation과 5 $\alpha$ -reduction에 필요한 포도당의 농도를 조사하여 포도당 양을 조절함으로써 불필요한 부반응산물의 생성을 억제할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

포자체와 균사체의 준비 및 progesterone 전환 반응과 steroids의 분석은 Kim과 Kim (1991), 고정화 방법은 Kim 등 (1990)이 보고한 방법과 동일하게 하였다. 포자체를 효소원으로 사용한 경우의 포자 농도는 5 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml로 하였다. 포자체와 균사체는 20 mM 인산 완충용액 (pH 6.0), 고정화된 균사체는 50 mM Tris 완충용액 (pH 7.0)속에서 반응하였으며, progesterone과 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone은 0.05 g/l의 농도(최종 농도)로 메탄올에 용해하여 반응액에 투입하였다.

Gel속의 포도당 농도를 알기 위하여 반응후에 5% NaCl 용액으로 세척한 gel 17 g (습중량)을 유발에서 마쇄한 후 원심분리하여 상등액을 취하였으며 포도당 농도의 측정은 Sigma사 Procedure 510의 방법에 따랐다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 포자체와 균사체 및 고정화된 균사체를 효소원으로 하였을때 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation에 대한 경시 변화를 나타낸다. 반응액은 25 g/l의 포도당이 함유된 완충용액을 사용하였다. 포자체는 균사체나 고정화한 균사체에 비하여 효소 유도

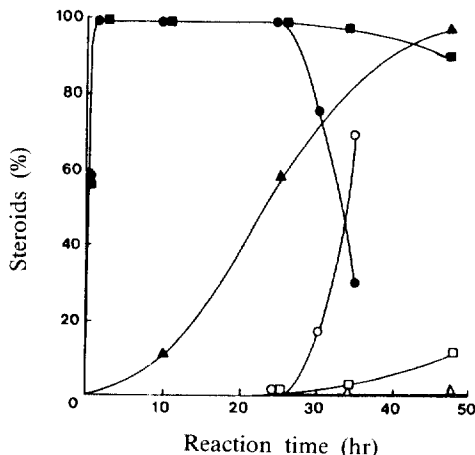


Fig. 1. Comparison of the activity of free spores, mycelia and immobilized mycelia of *Rhizopus nigricans* on 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone. Closed symbols and opened symbols represent respectively 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione.

●—● ○—○ : free mycelia  
 ▲—▲ △—△ : free spores  
 ■—■ □—□ : immobilized mycelia

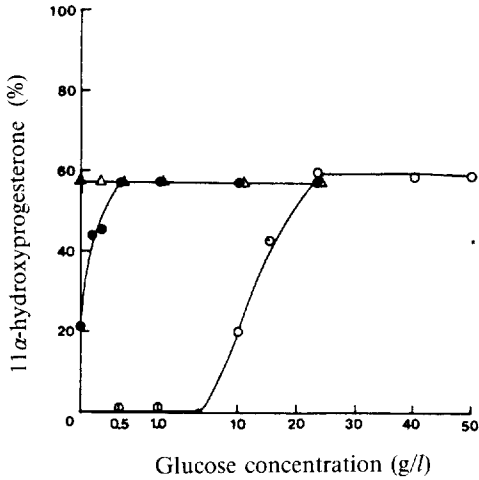
기간이 길었으며 이는 포자체의 경우 균사체에 비하여 물질대사가 활발하지 못하므로 hydroxylation에 필요한 효소의 합성이 비교적 늦게 이루어지며 세포벽이 두꺼워 기질과 산소 및 영양분의 투과성이 낮기 때문으로 생각된다 (Plourde와 Hafez-Zedan, 1973). 한편 포자체와 고정화한 균사체에 의한 반응에서는 부산물인 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione의 생성이 억제됨을 알 수 있다. *Septomyxa affinis* (Singh와 Rakhit, 1967) 및 *Aspergillus ochraceus* (Bihari 등, 1984)의 포자체에 의한 hydroxylation 반응에서도 부산물의 생성이 억제되는 현상이 보고된 바 있다.

포도당을 비롯한 여러 당류들은 생존 미생물의 에너지원으로서 조효소의 생성과 재생을 원활하게 하며 (Petrovic 등, 1990), progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxy-

Table 1. Effect of electron acceptors on the 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone.

	Electron acceptors				Glucose	Control
	NADPH	NaIO <sub>4</sub>	DMS	Menadiene		
Conversion to 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (%)	60	58	19	19	58	20

Reaction were carried out in a 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) with 0.05 g/l of progesterone as a substrate in the presence of various electron acceptors. Concentration of glucose and other electron acceptors were adjusted to be 0.5 g/l and 1 mM respectively. Control refers to the results of the reaction without any of electron acceptors nor glucose. Conversion to 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone were attained after 1 hour of reaction with free mycelia as an enzyme source.

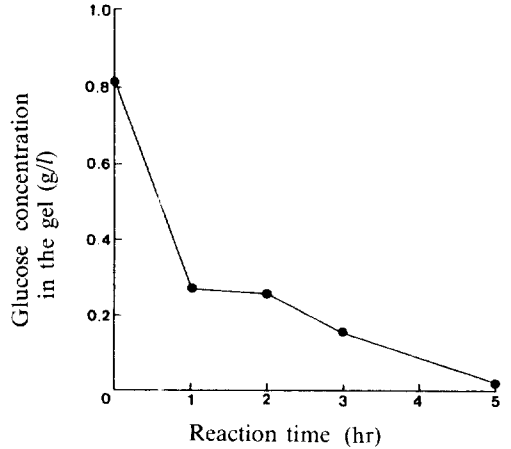


**Fig. 2.** Effect of glucose concentration on the 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone by three enzyme sources. Reaction time for free mycelia and immobilized mycelia was 1 hour while that for spores was 24 hours due to the initial induction period.

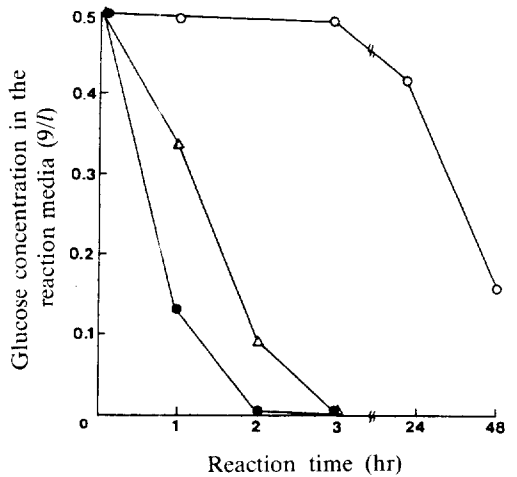
- : free mycelia
- : free spores
- △—△ : immobilized mycelia

lation 반응을 촉진한다 (Kim과 Kim, 1987). Table 1은 NADPH를 비롯한 여러 전자 수용체와 포도당을 반응액에 주입하여 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 생성에 미치는 효과를 조사한 결과이다. NADPH와 NaIO<sub>4</sub>의 첨가는 반응을 크게 활성화시켰으며 포도당만을 첨가한 경우도 유사한 수준의 반응 활성이 나타남을 알 수 있다. Fig. 2는 효소원에 따라 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation에 대하여 최대 활성에 필요한 포도당의 농도를 나타내고 있다. 대수기의 균사체는 0.5 g/l, 포자는 20 g/l 이상의 포도당을 필요로 하는 반면 고정화한 균사체는 포도당의 농도와 무관함을 알 수 있다. 포자를 고정화하여 액체 배지에서 발아시키는 동안 배지 속의 영양분이 gel 내에 축적될 수 있기 때문에 (Sonomoto 등, 1982), gel속의 포도당 존재 여부를 조사하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 반응 개시전의 gel내에 함유되어 있는 포도당의 농도가 균사체에서 필요로 하는 0.5 g/l 보다 높은 농도로 존재함을 알 수 있으며, 따라서 외부로부터 주입된 포도당은 효과가 없었다고 판단된다.

Morrin과 Ward (1989)는 균사체의 성장시기에 따른 포도당의 대사와 hydroxylation을 조사한 결과 포도당 대사가 활발한 시기에 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 생성량도 증가하였다고 보고하였다. Fig. 4는 반응 시간에 따른 용액속의 포도당 농도 변화를 나타낸다. 이를 Fig. 1의 hydroxylation반응 속도에 대한 결과와 상호 비교하면 hydroxylation 반응 속도와 포도당 소비율과는 비례 관계가 있으며



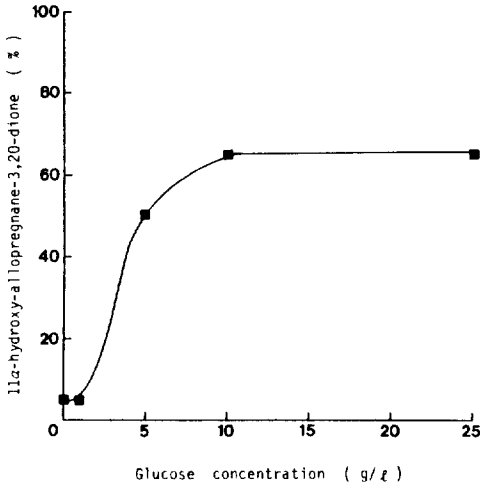
**Fig. 3.** Glucose consumption by immobilized mycelia in the gel during the progesterone transformation reaction. Glucose was not added additionally



**Fig. 4.** Glucose consumption by the cell as a function of reaction time.

- : free mycelia
- : free spores
- △—△ : immobilized mycelia

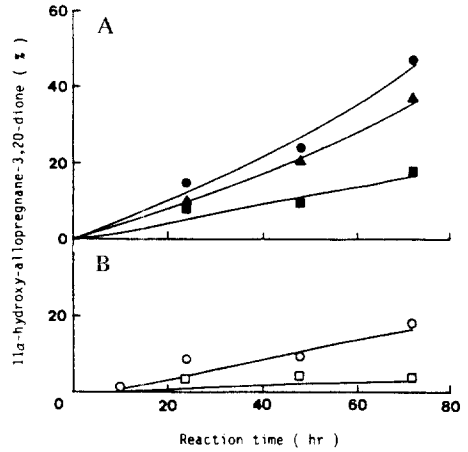
포도당 소비율이 높을수록 11 $\alpha$ -hydroxylation도 빠르게 진행됨을 알 수 있었다. *Arthrobacter globiformis*에 의한 hydrocortisone과 prednisolone의 전환 반응에서  $\Delta^1$ -dehydrogenation에는 포도당이 전혀 효과를 나타내지 않은 반면 20 $\beta$ -hydroxylation에는 1% 포도당에 의해 2~2.5 배의 효소 활성 증진 효과를 나타내어 같은 균주에서도 반응의 종류에 따라 포도당 효과가 다르게 나타나는 것으로 보고되어 있다 (Arinbasarova 등, 1985). *R. nigricans*에 의한 progesterone hydroxylation 반응의 주산물인 11 $\alpha$ -



**Fig. 5.** Effect of glucose concentration on the 5 $\alpha$ -reduction of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone using free mycelia as an enzyme source. Reaction time was 48 hours.

hydroxyprogesterone은 5 $\alpha$ -reductase에 의하여 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 전환된다. 11 $\alpha$ -Hydroxylation과 5 $\alpha$ -reduction은 필요로 하는 포도당 농도가 서로 다를 것으로 예상된다.

Fig. 5는 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone을 기질로 한 균사체의 5 $\alpha$ -reduction 반응에 대한 포도당 농도의 효과를 나타낸다. 11 $\alpha$ -Hydroxylation에는 0.5 g/l의 포도당이 필요한 (Fig. 2) 반면, 5 $\alpha$ -reduction이 최대로 진행되기 위하여는 10 g/l의 포도당이 요구됨을 알 수 있다. 따라서 포도당 함량을 조절함으로써 불필요한 부반응인 5 $\alpha$ -reduction을 억제할 수 있을 것으로 보인다. Fig. 6의 결과를 보면 polyacrylamide gel속에 균사체를 고정화시킨 경우에도 고정화하지 않은 균사체와 같이 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 5 $\alpha$ -



**Fig. 6.** Glucose effect on the 5 $\alpha$ -reduction of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone by immobilized *R. nigricans* in polyacrylamide gel.

- A: Effect of glucose concentration in the reaction solution
- : reaction media with 10 g/l of glucose
  - ▲—▲ : reaction media with 5 g/l of glucose
  - : reaction media without glucose
- B: Effect of glucose remaining in the gel
- : gel containing glucose
  - : gel free from glucose

reduction 반응을 위하여 10 g/l의 포도당이 필요함을 알 수 있다. 따라서 고정화한 균사체로써 progesterone을 전환시킬 때는 반응 개시전 gel내에 함유되어 있는 포도당을 소모시킨 후 progesterone을 투입하는 방법을 사용함으로써 5 $\alpha$ -reductase의 활성을 억제하여 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득률을 높힐 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

*Rhizopus nigricans*에 의한 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation 반응은 포도당에 의하여 촉진되었으며, 그 효과가 전자 수용체인 NADPH와 NaIO<sub>4</sub>를 투입하였을 때의 효과와 유사한 것으로 부터 포도당은 이 반응에 필요한 보조요소의 생성에 기여하며 hydroxylation 반응을 촉진한다고 생각되었다. 포도당의 소모량은 hydroxylation 반응 속도가 빠를수록 크게 나타났으며 포도당의 농도가 증가함에 따라 반응 속도는 점차 증가하다가 균사체는 0.5 g/l, 포자체는 20 g/l에서 거의 일정해지는 경향을 나타내었다. 그러나 polyacrylamide gel에 고정화한 균사체의 경우 배양 기간 동안 gel내에 축적되어 있는 포도당 만으로도 반응이 충분히 촉진되었다. 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone의 5 $\alpha$ -reduction 반응은 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation 반응에 비하여 훨씬 더 높은 포도당 농도가 필요하므로 포도당의 농도를 낮게 유지시킴으로써 5 $\alpha$ -reduction 반응을 억제하여 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득률을 높힐 수 있을 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 한국 과학 재단 연구비 지원 (891-0407-029-2)에 의하여 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Akhrem, A.A. and Yu. A. Titov, 1970. Steroids and Microorganisms. Nauka, Moscow.

2. Arinbasarova, A.Y., A.G. Medentsev, V.K. Akimenko, K.A. Koshcheyenko and G.K. Skryabih, 1985. Redox reactions in hydrocortisone transformation by *Arthrobacter globiformis* cells. *J. Steroid Biochem.* **23**, 307-312.
3. Bihari, V., P.R. Goswami, S.H.M. Rizoi, A.W. Khan, S.K. Basu, and V.C. Vora, 1984. Studies in immobilized fungal spores for microbial transformations of steroids: 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone with immobilized spores of *Aspergillus ochraceus* G8 on polyacrylamide gel and other matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1403-1408.
4. 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.
5. Clark, T.A., R. Chong and I.S. Maddix, 1982. The effect of dissolved oxygen tension on 11 $\beta$ - and 19- hydroxylation of Reichstein's substance S by *Pellicularia filamentosa*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 131-136.
6. Clark, T.A., I.S. Maddox and R. Chong, 1983. The effect of glucose on 11 $\beta$ - and 19-hydroxylation of Reichstein's Substance S by *Pellicularia filamentosa*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 211-215.
7. Ghosh, D. and T.B. Samanta, 1981. 11 $\alpha$ -Hydroxylation of progesterone by cell free preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.* **14**, 1063-1067.
8. Griffin, D.H., 1981. Fungal Physiology. John Wiley and Sons.
9. Hanisch, W.H., P. Dunnill and M.D. Lilly, 1980. Optimisation of the production of progesterone 11 $\alpha$ -hydroxylase by *Rhizopus nigricans*. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 555-570.
10. Ichihara, K., E. Kuanose and M. Kusunose, 1969. Microsomal hydroxylation of decune. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**, 713-719.
11. Kim M.H. and M.N. Kim, 1987. Progesterone hydroxylation by *Rhizopus nigricans* (I): The effects of reaction conditions. *Kor. J. Mycol.* **15**, 23-28.
12. Kim M.H., J.J. Lee, M.N. Kim and B.R. Min, 1990. Optimal material and conditions for the immobilization of *Rhizopus nigricans* in the 11 $\alpha$ -hydroxylation reaction of progesterone. *Kor. J. Mycol.* **18**, 84-88.
13. Kim, M.H. and M.N. Kim, 1991. Transformation pathway of the progesterone by *Rhizopus nigricans*. *Kor. J. Microbiol.* **29**(2), 111-116.
14. Maddox, I.S., P. Dunnill and M.D. Lilly, 1981. Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 345-354.
15. Morrin, M. and D.P. Ward, 1989. Biotransformation of progesterone to 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone by different morphological forms of *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Lett.* **5** 319-324.
16. Petrovic, S.E., M. Skinjar, A. Becarevic, I.F. Vujicic and L. Banka, 1990. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* **12**(4), 299-304.
17. Plourde, R. and H. Hafez-Zedan, 1973. Distribution of steroid 1-dehydrogenation and side-chain degradation enzymes in the spores of *Fusarium solani*: Causes of metabolic lag and carbohydrate independence. *Appl. Microbiol.* **25**, 650-658.
18. Shinzawa, K., S. Kominami and S. Takemori, 1985. Studies on cytochrome P-450 (P-450<sub>17 $\alpha$</sub> ) from guinea pig adrenal microsomes. Dual function of a single enzyme and effect of cytochrome b5. *Biochim. Biophys. Acta.* **833**, 151-160.
19. Singh, K. and S. Rakhit, 1967. Mechanism of side-chain degradation of C<sub>21</sub> steroids by spores of *Septomyxa affinis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **114**, 139-144.
20. Sonomoto, K., K. Nomura, A. Tanaka and S. Fukui, 1982. 11 $\alpha$ -Hydroxylation of progesterone by gel-entrapped living *Rhizopus stolonifer* mycelia. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 57-62.

(Received July 8, 1991)

(Accepted August 3, 1991)