

*Rhizopus nigricans*의 Steroid 전환 반응에 대한 이온의 변화

이정진 · 김말남*

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

Ion Effect on Steroid Bioconversion in *Rhizopus nigricans*

Jung-Jin Lee and Mal-Nam Kim*

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

ABSTRACT: Ion effects on 11 α -hydroxylation of progesterone and 5 α -reduction of 11 α -hydroxyprogesterone by *Rhizopus nigricans* were investigated. Metal ions such as Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ and Na⁺ reduced the 11 α -hydroxylation activity, while K⁺ stimulated the same reaction. Enzyme activity for the 5 α -reduction of 11 α -hydroxyprogesterone was increased in the presence of Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, K⁺ and Na⁺, whereas it was decreased in the presence of Cd²⁺ and Cu²⁺. Potassium ion of 10⁻³ M of concentration was found to be effective for the promotion of 11 α -hydroxylation. On the other hand, cadmium ion of 10⁻⁴ M was proved to suppress the 5 α -reduction reaction. Progesterone is reported to be transformed into 11 α -hydroxyprogesterone which, in turn, is converted further into 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione by *R. nigricans*. From this point of view, the highest yield of 11 α -hydroxyprogesterone could be obtained when potassium ion of 10⁻³ M was given initially followed by addition of cadmium ion of 10⁻⁴ M to limit conversion of 11 α -hydroxyprogesterone into 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione.

KEYWORDS: *Rhizopus nigricans*, progesterone bioconversion, 11 α -hydroxylation, 5 α -reduction, ion effect.

序 論

이온은 미생물 성장에 수반되는 기본적인 물질대사 과정에 영향을 미치며(Marison, 1988), prosthetic group으로서 전전자나 후전자 기작에 효과를 나타내어 효소적 전환 반응을 활성화시키거나(Brynhildsen 등, 1988) 억제 내지 불활성화 시킨다(Vasavada와 Hsieh, 1988). 이온의 기능은 매우 다양하여 Zn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺ 등의 경우 효소원으로 사용된 균주 및 전환 반응의 종류에 따라서 억제 또는 촉진의 상반되는 효과를 나타낸다(Lin 등, 1989). Progesterone의 11 α -hydroxylase system은 cytochrome P-450과 flavoprotein 및 flavoprotein으로 부터 전자를 받아들이는 iron-sulfur protein (rhizoporedo-

xin reductase)으로 구성된다 (Cresnar 등, 1985). Hemoprotein인 cytochrome P-450과 iron-sulfur protein이 progesterone의 11 α -hydroxylase system의 구성 요소라는 사실로부터 Fe³⁺과 Fe²⁺과 같은 이온의 효과를 기대할 수 있다. Zn²⁺은 *Aspergillus ochraceus*에 의한 11 α -hydroxyprogesterone의 6 β -hydroxylation에 필수적이라고 보고된 바 있으며 (Dulaney 등, 1955), Park과 Kim(1989)은 Ca-alginate gel에 고정화한 *Aspergillus phoenicis*를 이용한 progesterone의 11 α -hydroxylation에서 Zn²⁺은 효소원을 재사용함에 따라 감소되었던 11 α -hydroxylase 활성의 재생 및 새로이 합성하는데 작용하였다고 보고하였다. Inano 등(1967)은 steroidogenesis에 관여하는 testicular enzyme에 영향을 미치는 여러 요인에 관한 연구에서 Cd²⁺과 Cu²⁺은 progesterone의 17 α -hydroxylation을 억제한다고 하였다. 이와 같이

*Corresponding author

steroid의 미생물적 전환에 이온이 영향을 미칠 수 있다는 가능성은 명백하나 이온에 의한 생리적 기작을 밝힐 수 있는 정보의 부족과 재현성이 부족한 실험적 특성으로 steroid 전환 반응에 대한 이온의 효과는 연구가 미비한 상태이다.

본 연구는 steroid의 전환 반응에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되는 K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 을 대상으로 *Rhizopus nigricans*에 의한 progesterone의 11 α -hydroxylation 및 11 α -hydroxyprogesterone의 5 α -reduction에 대한 이온의 효과를 조사하였다.

材料 및 方法

실험에 사용한 균주 *Rhizopus nigricans* Ehrenberg의 배양, Steroids의 전환 반응 및 정량 분석은 Kim과 Kim(1991)의 방법에 따랐다. 이온의 효과를 조사하기 위하여 K^+ (KCl), Na^+ (NaCl), Fe^{2+} ($FeSO_4$), Fe^{3+} ($Fe_2(SO_4)_3$), Mg^{2+} ($MgSO_4$), Mn^{2+} ($MnCl_2$), Co^{2+} ($CoSO_4$), Zn^{2+} ($ZnSO_4$), Cu^{2+} ($CuSO_4$), Cd^{2+} ($CdCl_2$)를 사용하였으며, 실험의 재현성을 높이기 위하여 5회 이상 실험한 결과의 평균치를 제시하였다.

結果 및 考察

Progesterone의 11 α -hydroxylation반응에 대한 이온의 효과 : *R. nigricans*는 progesterone을 11 α -hydroxyprogesterone으로 전환하며, 11 α -hydroxyprogesterone을 다시 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione과 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone으로 전환시킨다(Kim and Kim, 1991).

Fig. 1은 *R. nigricans*의 progesterone 11 α -hydroxylation반응에 대한 여러 이온의 효과를 나타낸 것이다. 반응 개시 후 2 시간 이내에 progesterone이 11 α -hydroxyprogesterone으로 모두 전환되므로 (Kim and Kim, 1991) 이온의 효과를 조사하기 위한 반응 시간을 2 시간으로 하였다. 10^{-3} M Cu^{2+} 과 Cd^{2+} 에서 균사체의 용균현상이 나타나서 Cd^{2+} 과 Cu^{2+} 은 10^{-4} M로 반응에 사용하였다. 반응 30분에서 K^+ 은 11 α -hydroxylase의 활성을 촉진시켰으며, 반응 1시간 이후 부터는 K^+ 을 첨가하지 않았을

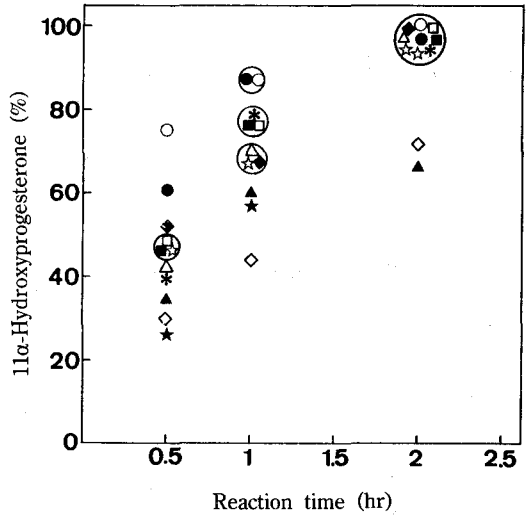


Fig. 1. Ion effects on 11 α -hydroxylation of progesterone. Concentration of Cd^{2+} and Cu^{2+} were kept at 10^{-4} M while the other ions at 10^{-3} M.

- : Reaction in the absence of metallic ions
- : K^+ □ : Na^+ ■ : Mg^{2+} △ : Mn^{2+}
- ▲ : Cu^{2+} ☆ : Co^{2+} ◇ : Cd^{2+}
- * : Zn^{2+} ◆ : Fe^{2+} ★ : Fe^{3+}

때와 동일한 progesterone의 11 α -hydroxylation율을 나타내었다. 반응 2시간에서는 Cu^{2+} 과 Cd^{2+} 을 제외한 모든 이온에서 이온이 첨가되지 않은 반응액과 동일한 전환율을 보였다. Moe등 (1985)은 효소에 의한 pyrophosphatase생성 반응에 Cu^{2+} 과 Cd^{2+} 이 효소 활성을 현저히 억제시킨다고 보고한 바 있으며, Chen과 Lee(1989)도 *Arthrobacter simplex*에 의한 20 β -hydroxyprednisolone생성 반응에서 Fig. 1에 제시한 결과와 유사한 Cu^{2+} 과 Cd^{2+} 의 효소 활성 억제 효과를 지적하였다. Fe^{3+} 이 반응 30분과 1시간에서 반응 억제 효과를 보인 것은 세포내의 산화·환원 기작에 의해 active form인 Fe^{2+} 으로 전환되기 위한 유도 시간이 필요했던 것으로 판단되며, 반응 2시간에서는 이온을 첨가하지 않은 경우와 동일한 전환율로 활성이 회복된 결과로부터 이를 이해할 수 있다.

11 α -Hydroxyprogesterone의 5 β -reduction반응에 대한 이온의 효과 : 11 α -Hydroxyprogesterone의 5 β -reduction과 6 β -hydroxylation은 기질 첨가 후 12 시간 이후부터 30시간경까지 진행되므로 (Kim and Kim, 1991) 11 α -hydroxyprogesterone의 전환 반응

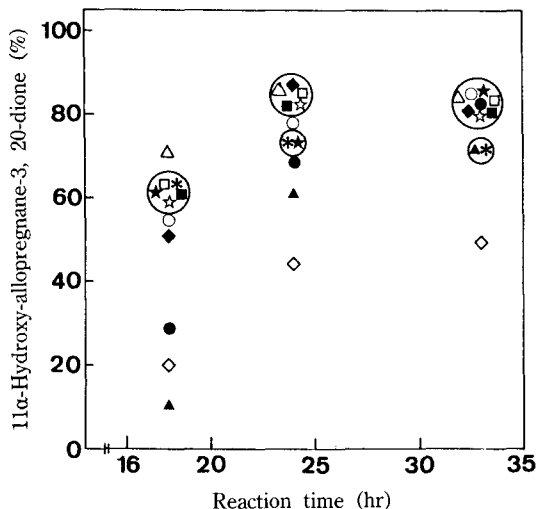


Fig. 2. Effects of the presence of ions in the reaction media on the 11 α -hydroxylation of progesterone. Concentration of Cd^{2+} and Cu^{2+} were kept at 10^{-4} M while the other ions at 10^{-3} M.

● : Reaction in the absence of metallic ions
 ○ : K^+ □ : Na^+ ■ : Mg^{2+} △ : Mn^{2+}
 ▲ : Cu^{2+} ☆ : Co^{2+} ◇ : Cd^{2+}
 * : Zn^{2+} ◆ : Fe^{2+} ★ : Fe^{3+}

에 대한 이온의 효과를 반응 33시간까지 조사하여 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 11 α -Hydroxyprogesterone의 5 α -reduction에서는 반응 18시간에서 Cu^{2+} 과 Cu^{2+} 을 제외한 타 이온을 첨가한 경우 모두에서 반응의 촉진 효과가 나타났다. 한편 본 균주는 워낙 극미량의(5% 수준) 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone을 생성하므로(Kim and Kim, 1991) 이에 대한 이온의 효과는 조사하지 못하였다. Dulaney 등(1955)은 *A. ochraceus*가 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone을 생성하는데에 Zn^{2+} 이 필수적으로 요구되었다고 보고한 바 있다.

Progesterone 전환 반응에 대한 K^+ 과 Cd^{2+} 의 농도에 따른 효과 : Progesterone 전환 반응 전반에 걸쳐 K^+ 의 농도에 따른 효과를 조사한 결과(Fig. 3) progesterone의 11 α -hydroxylation에서는 반응시간에 따라 다소 차이는 있었으나 10^{-3} M K^+ 을 사용한 초기 반응 시간에서 K^+ 의 반응 촉진 효과가 현저하게 나타났다.

Fig. 4는 progesterone 전환 반응 전반에 대한 Cd^{2+} 의 농도에 따른 효과를 나타낸다. 초기 반응 시간

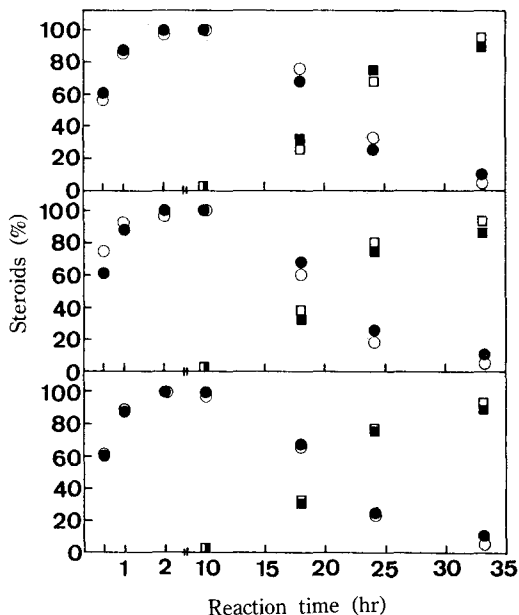


Fig. 3. Effects of K^+ concentration on the transformation reaction of progesterone. A, B and C correspond respectively to 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} M of K^+ concentration. Closed symbol and open symbol were respectively referred to the results obtained in the absence and presence of K^+ .

○, ● : 11 α -hydroxyprogesterone
 □, ■ : 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione

에서는 Cd^{2+} 의 억제 효과가 각 농도에서 유사하게 나타났으나 반응 시간이 연장됨에 따라 10^{-3} 과 10^{-4} M의 Cd^{2+} 에 의한 억제 효과가 10^{-5} M의 경우보다 더 현저하였다. Roukas와 Kotzekidou(1987)는 *Aspergillusniger*에 의한 구연산의 생성에 요구되는 이온의 농도가 이온의 종류에 따라 다르며 적정 농도로 첨가해 주었을 때 그 효과는 최고치에 달할 수 있다고 보고하였다.

Progesterone 전환 반응 중에 K^+ 과 Cd^{2+} 의 첨가 시간에 따른 효과 : Progesterone의 전환 반응에서 11 α -hydroxyprogesterone의 생성을 촉진시키는 K^+ 과 이것의 생성을 억제하면서 11 α -hydroxyprogesterone이 5 α -reduction되는 반응을 동시에 억제하는 Cd^{2+} 을 첨가함으로써 11 α -hydroxyprogesterone의 수득률을 높이는 반면 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione의 생성을 최소화하기 위한 방법을 검토하였다. Fig. 5는 반응액에 K^+ (10^{-3} M)과 Cd^{2+} (10^{-4} M)

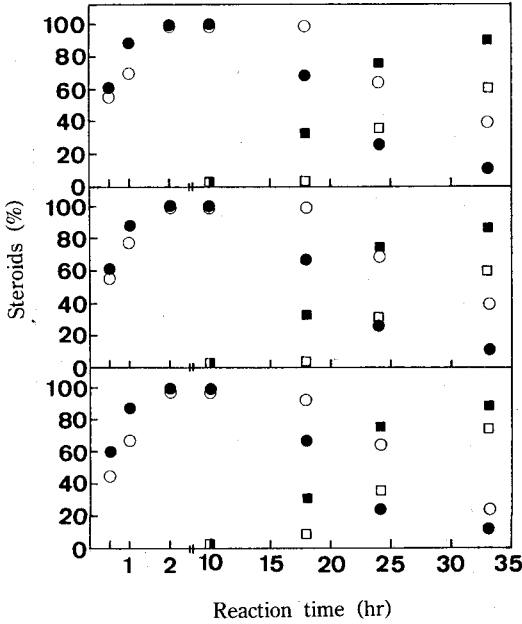


Fig. 4. Effects of Cd^{2+} concentration on the transformation reaction of progesterone. A, B and C correspond respectively to 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} M of Cd^{2+} concentration. Closed symbol and open symbol were respectively referred to the results obtained in the absence and presence of K^+ .
 ○, ● : 11α -hydroxyprogesterone
 □, ■ : 11α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione

을 첨가하는 시간을 각기 달리하여 실험한 결과로서 Fig. 5-A는 반응 개시 때 K^+ 과 Cd^{2+} 을 동시에 첨가한 것이다. Fig. 5-B는 K^+ 은 반응 개시 때에 첨가하고 progesterone의 95%이상이 11α -hydroxyprogesterone으로 전환된 반응 2시간에 Cd^{2+} 을 첨가함으로써 Cd^{2+} 에 의한 11α -hydroxyprogesterone 생성 저해를 반응 2시간 이후로 지연시키하고자 하였다. Fig. 5-C는 반응 개시 12시간 경부터 진행되는 11α -hydroxyprogesterone의 5α -reduction반응을 최대한으로 억제시켜서 부가치가 높은 11α -hydroxyprogesterone을 고수득하고자 K^+ 은 반응 개시 때 주입하고 Cd^{2+} 은 반응 12시간에 첨가한 결과이다. 11α -hydroxyprogesterone의 최고 수득률을 유지시키기 위하여는 Fig. 5-B와 같이 반응 개시 때 K^+ 을 주입하고 반응 개시 2시간 후에 Cd^{2+} 을 주입하는 방법이 가장 적절하다고 판단된다. Brynhildsen과 Rosswall(1989)은 미생물 체내의 구성 단백질과 이온

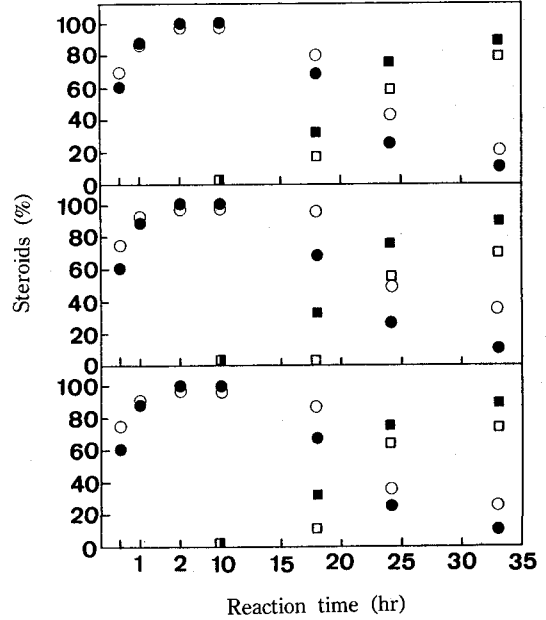


Fig. 5. Variation of steroids production with addition of Cd^{2+} at different period of the transformation reaction. Cd^{2+} added simultaneously with K^+ (A), Cd^{2+} added 2 hours after inangulation of the reaction (B), Cd^{2+} added 12 hours after inangulation of the reaction (C). Closed symbol and open symbol were respectively referred to the results obtained in the absence and presence metallic ions.
 ○, ● : 11α -hydroxyprogesterone
 □, ■ : 11α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione

간의 친화력 및 효소 분자와 이온간의 친화력에 따라 이온에 의한 효소의 활성화 및 비활성화의 정도가 결정된다고 보고하였는데 본 실험에서 K^+ 과 Cd^{2+} 이 반응액에 공존하였음에도 K^+ 의 11α -hydroxylation 반응의 촉진 효과가 Cd^{2+} 에 의해 상실되지 않은 것은 *R. nigricans*의 구성 단백질이 K^+ 과 더 큰 친화력을 가지고 있기 때문인 것으로 보인다.

Fig. 4에 제시된 Cd^{2+} 만 첨가하였을 때의 효과를 K^+ 과 Cd^{2+} 을 동시에 첨가한 Fig. 5의 결과와 비교해 볼 때 Cd^{2+} 이 독립적으로 존재할 때 더 큰 억제 효과를 보이는 것은 이온에 대한 미생물체의 선택적 투과에 의해 가장 큰 친화력을 갖는 이온이 우선적으로 생체 내에 축적되므로(Nakajima and Sakaguchi, 1986) 여러 이온의 혼합적 첨가는 이온 개개의 효과를 상쇄시킬 수 있음을 나타낸다고 할 수

있다.

摘 要

*Rhizopus nigricans*에 의한 progesterone의 11 α -hydroxylation과 5 α -reduction반응에 미치는 이온의 효과를 조사하였다. Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ 및 Na⁺은 11 α -hydroxylation 반응의 활성을 저하시켰으나 K⁺은 이 반응을 촉진시켰다. 11 α -hydroxyprogesterone을 5 α -reduction시키는 효소는 Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, K⁺, Na⁺에 의하여 그 활성이 증가되었고 Cd²⁺과 Cu²⁺은 이 반응을 억제하였다. 11 α -hydroxylation 반응을 촉진하는데는 10⁻³ M의 K⁺이 효과적이었으며 5 α -reduction반응을 억제하기 위하여는 10⁻⁴ M의 Cd²⁺이 적합하였다. *R. nigricans*는 세포내의 다효소체계에 의하여 progesterone이 11 α -hydroxyprogesterone으로 전환된 후 11 α -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione으로 5 α -reduction되므로 10⁻³ M의 K⁺을 먼저 첨가하여 2시간 동안 progesterone 전환 반응을 실시한 후에 10⁻⁴ M의 Cd²⁺을 첨가하였을 때 가장 높은 11 α -hydroxyprogesterone의 수득률을 얻을 수 있었다.

参考文献

Brynhildsen, L., B. V. Lundgren, B. Allard and T. Rosswall, 1988. Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp.. *Appl. Environ. Microb.* **54**, 1689-1693.

Brynhildsen, L. and T. Rosswall, 1989. Effects of cadmium, copper, magnesium and zinc on the decomposition of citrate by a *Klebsiella* sp.. *Appl. Environ. Microb.* **55**, 1375-1379.

Chen, K. C. and F. C. Lee, 1989. Enzymic reaction of prednisolone to 20 β -hydroxyprednisolone with *Arthrobacter simplex*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 116-120.

Cresnar, B., K. Breskvar and T. Hudnik-Plevnik, 1985. Resolution and reconstruction of the NADPH-cytochrome C(P-450) reductase induced by progesterone in *Rhizopus nigricans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 1057-1063.

Dulaney, E. L., E. O. Strey and C. Hlavac, 1955. Hydroxylation of steroids. Principally progesterone by a strain of *Aspergillus ochraceus*. *Mycologia.* **47**, 464-476.

Inano, H., H. Nakano, M. Shikita and B.-T. Tamaoki, 1967. The influence of various factors upon testicular enzymes related to steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **137**, 540-548.

Kim, M. H. and M. N. Kim, 1991. Transformation pathway of the progesterone by *Rhizopus nigricans*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 111-116.

Lin, D. G., N. Nishio, T. K. Mazumder and S. Nagai, 1989. Influence of Co²⁺, Ni²⁺ and Fe²⁺ on the production of tetrapyrroles by *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 196-200.

Marison, I. W., 1988. Enzyme Kinetics. pp. 96-99. In *Biotechnology for engineers*. (ed. Scragg, A.) Ellis Horwood Inc.

Moe, O. A., J. Si-Pham, B. Selinsky and T. Dang, 1985. A Kinetic study of the effect of Co²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ on yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* **827**, 207-214.

Nakajima, A. and T. Sakaguchi, 1986. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microb. Biotechnol.* **24**, 59-64.

Park, H. E. and M. N. Kim, 1989. Bioconversion of progesterone by immobilized *Aspergillus phoenicis*. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 70-76.

Roucas, T. and P. Kotzekidou, 1987. Influence of some trace metals and stimulates on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 291-294.

Vasavada, A. B. and D. P. H. Hsieh, 1988. Effects of metals on 3 cetyldeoxynivalenol production by *Fusarium gramineum* in submerged cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1063-1065.

Accepted January 20, 1993