Journal of the Pharmaceutical Society of Korea
21, 62-69 (1977)

微生物反應을 利用한 生理活性 物質의 合成

李 相 燮

서울大學校 藥學大學

(Received March 27, 1977)

Sang Sup Lee (*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151*): Microbial Synthesis of Physiologically Active Compounds

地球上에서 生合成된 天然物은 緩急의 差異는 있겠으나 窮極的으로는 CO_2, H_2O, NH_3等으로 다시 酸化分解된다. 이 分解過程은 微生物의 酵素反應으로 이루어지며 生物圈의 恒常性도 一次的으로는 微生物의 이 酸化分解作用으로 유지된다고 볼 수 있다.

微生物이 營爲하는 이러한 酵素反應을 生理活性物質의 工業的合成에 利用한 初期의 例로는 副腎皮質호르몬의 合成過程에서 *Rhizopus nigricans*를 使用한 水酸化反應[1]과 ascorbic acid 合成過程에서 *Acetobacter xylinum*을 使用한 脫水反應[2]等이 有名하며 이러한 反應은 아직도 利用되고 있다. 特히 지난 十數年間의 應用微生物學의 發展은 大端한 것이며 여러가지 抗生物質, 糖質, amino 酸, 核酸關聯物質들이 生理活性物質과 함께 醱酵法으로 生産되고 있다. 그러나 이글에서 다루는 微生物反應은 醱酵過程에서 生産되는 微生物自體의 一次的 代謝産物(primary metabolite)이나 二次的代謝産物(secondary metabolite)를 對象으로 한것이 아니며 어디까지나 外部에서 供給되는 化學物質에 對한 菌體의 酵素反應産物을 目的物로 하고있다. 또한 近來 活潑히 利用되는 菌體固定 및 酵素固定法을 利用한 酵素工學的手法[3]도 除外하고 培養過程의 菌體 또는 培養後의 菌體를 利用한 微生物反應에 限定코저 한다.

微生物의 化學反應은 酸化, 還元, 加水分解, acyl化 等으로 大別할 수 있다. 天然物이나 合成物質에 對한 生分解經路에 關한 基礎研究는 生理活性物質의 合成이나 其他 醫藥品合成에 이 微生物反應을 利用할 수 있는 길을 넓혀 주었다. 또한 微生物化學反應 例가 많아지고 多樣해 짐에 따라 漸次 體系化할 수 있게 되고 하나의 獨立된 science로 發展되어가고 있다. 例로서 微生物이 행하는 酸化反應을 有機化學의 酸化反應型으로 分類하면 다음과 같이 나눌 수도 있다[4].

1. Nonactivated carbon hydroxylation, 2. Allylic oxygenation, 3. Olefinic oxygenation, 4. Aromatic ring hydroxylation, 5. Aromatic ring opening, 6. Microbiological Baeyer-Villiger oxidation, 7. β-Oxidation, 8. Alkyl dehydrogenation, 9. Alcohol dehydrogenation, 10. Oxidation of amino to nitro, 11. Oxidation of amino to hydroxyl, 12. Sulfur oxygenation, 13. Other microbiological oxidations 등이다.

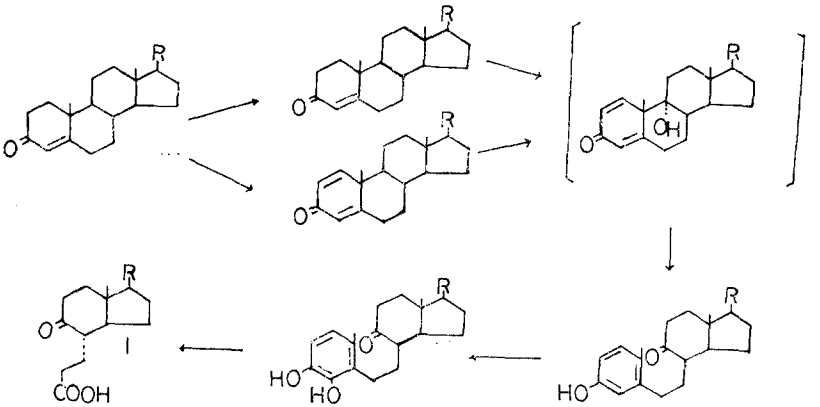
還元反應의 경우에는 特定二重結合에 對한 選擇的 還元, 特定 carbony group의 立體的 特異性이 있는 選擇的 hydroxy化를 들수 있겠고, 選擇的 加水分解와 交換反應等 廣範한 類型이 있다.

微生物에 의한 Steroid의 轉換

Steroid 核에 官能基를 導入하거나 立體構造를 變形시킴으로서 生理活性을 强化시키거나 願치 않는 作用을 弱化시킬 目的으로 많은 轉換反應이 硏究되었다. 그 結果 酸化反應(水酸化, 脫水素, 側鎖切斷, 其他), 還元反應(ketone의 alcohol還元, 二重結合의 飽和等), 加水分解, acly化, 異性化, 光學分割等 多彩롭게 그 類型을 알 수 있게 되었다. 이러한 類型의 反應을 觸媒하는 微生物도 廣範하며 이에 對한 여러 綜說이 있다[5,6]. 여기서는 工業的으로 意義가 있는 水酸化反應, 脫水素反應 및 側鎖反應과 이러한 反應을 調節하는데 必要한 基本知識으로 steroid 核과 sterol 側鎖의 酸化分解經路를 아울러 記述한다.

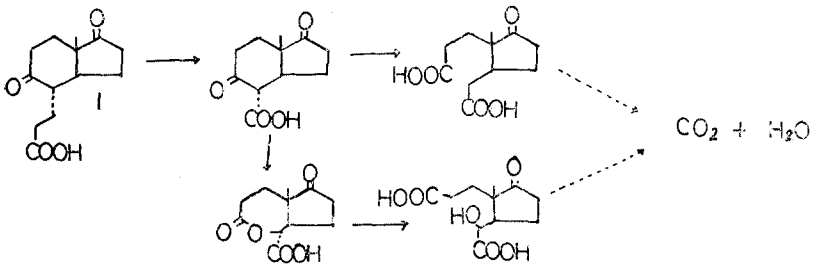
Steroid 核의 酸化——Sterol이 微生物增殖의 energy 源이 될수 있다는 것은 60餘年前 cholesterol를 唯一한 炭素源으로 삼아 增殖하는 土壤菌이 存在한다는 Sohngen의 實驗으로 밝혀져 있으나 그 代謝過程이 具體的으로 밝혀지기 시작한 것은 比較的 近來의 일이다.

Androstane(C_{19})系와 pregnane(C_{21})系 steroid은 *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacterium* 및 *Arthrobacter* 等에 依해 9α-hydroxylation과 Δ^1 脫水素反應으로 steroid A環의 芳香化와 同時 B環의 開環이 이루어지고 A環은 다시 $C_{4,5}$에서 開裂된다(Scheme 1). 酸化分解中



R: O, androstenedione R: CH_3CO, progesterone

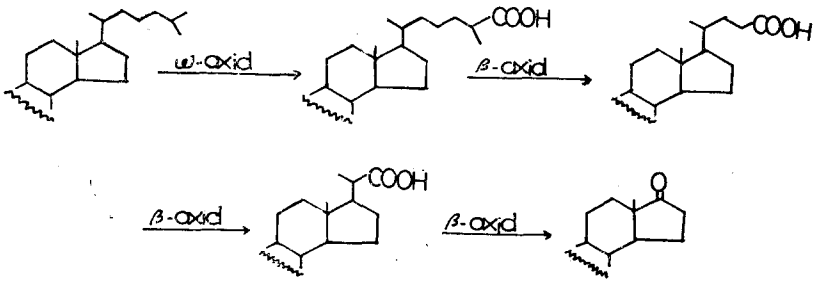
Scheme 1-A degradation pathway of androstenedione and progesterone to indanepropionic acid derivatives.



Scheme 2-A plausible degradation pathway of 7 aβ-methyl-1,5-dioxo-3aα-hexahydro-4-indanepropionic acid (1) to CO_2 and H_2O.

間體인 indanepropionic acid 誘導體(1)는 다시 β酸化를 거쳐 궁극적으로는 CO_2와 H_2O로 完全分解되는 것으로 믿어진다[7~10](Scheme 2).

Steroid A環의 芳香化過程은 微生物特有의 것으로 새로히 밝혀진 哺乳動物에서 A環芳香化와는 全혀 다른 過程을 밟고있다[11].



Scheme 3-β-Oxidation of cholesterol side chain.

R: various alkyl chains

Scheme 4-Accumulation of indane propionic acid derivatives.

한편 sterol 側鎖分解經路는 cholesterol의 경우 *Nocardia restrictus*에 依해 ω-oxidation이 먼저 일어나고 다음 連續的인 β-酸化로 17-ketosteroid까지 分解된다[12](Scheme 3). 한편 steroid 核分解系와 sterol의 側鎖分解系는 別個의 것으로 獨立的으로 作用할 수 있다는 것이 證明되었다[13](Scheme 4).

水酸化反應——Steroid 骨格에 水酸基를 導入하는 微生物은 곰팡이, 放線菌, 細菌等 廣範圍하며 6α位置를 除外한 모든 飽和炭素原에 水酸基를 導入할 수 있다. 많은 微生物은 特定水酸化反應 뿐만 아니라 여러가지 反應生産物을 同時에 낼수도 있다. 例를 들면 *Corticum sasakii*는 cortexolone의 11β, 11α, 19位置를 水酸化하여 各各 對應하는 1水酸化物를 生成한다[14].

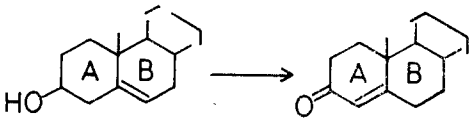
한편 *Calonectria decora*는 progesterone을 基質로하여 12β,15α-dihydroxyprogesterone을 높은 收率로 生成하나 12β 또는 15α等 어느 한쪽만의 1水酸化物를 만들지는 못한다[15]. 따라서 微生物反應으로 特定位置를 水酸化시키고저 할 경우 目的하는 單一反應을 높은 收率로 觸媒하는 菌株를 選擇하는 것이 必要하다.

오늘날 醫藥品工業에서 水酸化反應이 利用되는것은 *Rhizopus*나 *Asperfillns*屬 곰팡이를 利用하는 progesterone의 11α-水酸化[16], *Curvularia lundata* 또는 *Cunninghamella blackeslecana*를 利用하는 cortexolone의 11β-水酸化[17,18], 放線菌을 利用하여 16α-水酸化反應으로 triamcinolone[19](强力한 合成副腎皮質 호르몬)을 製造하는 方法等이 있다. 또한 Kondo等은 *Coryne-spora Casiicola*의 18位置 水酸化反應을 利用하여 corticosterone으로부터 aldosterone(鹽類代謝를 調整하는 副腎皮質호르몬)을 좋은 收率로 合成하고 있다[20].

微生物에 依한 水酸化反應 메카니즘은 不明한 點이 많았다. 이것은 水酸化反應에 關與하는 酸素添加酵素, oxygenase가 膜에 붙에 있고 매우 不安全하여 微生物 菌體에서 抽出, 精製가 困難하기 때문이다. 現在까지의 實驗結果에 따르면 哺乳動物 臟器中의 oxygenase (mixed function oxidase)와 마찬가지로 NADPH를 Co-enzyme[20]으로 하여 空氣中의 分子狀態의 酸素를 直接 steroid 分子中에 導入하는 酸素添加酵素인 것이 밝혀지고[22] 酸素의 直接傳達物質은 cyto-

chrome 系 物質인 P_{450}이며 詳細한 메카니즘이 報告되고 있다[23].

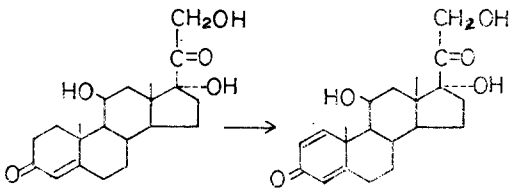
脫水素反應——(1) Alcohol 脫水素 : 미생물 중에는 steroid 化合物의 2級 alcohol을 酸化(또는 脫水素)하여 ketone을 生成하는 反應을 觸媒한다. 特히 化學的으로는 Oppenauer 酸化라고 불리우는 Δ^5-3β-hydroxy 化合物에서 ketone 生成을 촉매하는 反應은 오래전부터 알려져 있고 *Corynebacterium* 屬 細菌과 放線菌을 利用하고 있다(Scheme 5).



Scheme 5-Microbial Oppenauer oxidation

한편 酵素反應이기는 하나 *Brevibacterium sterolicum*에는 强力한 이 酵素가 存在하며 培養液에서 分離한 이 酵素[24]는 flavin adenin dinucleotide(FAD)를 含有하는 flavoprotein인 것이 알려지고 血淸中 cholesterol 定量에도 利用될 수 있다.

(2) 2重結合의 導入 : 미생물은 steroid 骨格의 脫水素反應을 촉매한다. 特히 A環의 1,2-脫水素反應은 多數의 細菌에 依해 이루어 질 수 있다. Cortisone이나 hydrocortisone의 脫水素反應으로 生기는 誘導體인 prednisone이나 prednisolone은 호르몬效果가 母化合物보다 數倍씩 强化됨으로 重要한 反應이다. 特히 關心을 끄는 것은 hydrocortisone에서 prednisolone을 生産하는데 pseudo-crystallofermentation이 있다(Scheme 6)[25]. 이 方法에서는 *Arthrobacter simplex*를 使用하여 脫水素反應을 進行시키는데 基質인 hydrocortisone의 濃度를 50 g/100 ml까지 添加하고도 90%에 가까운 收率로 prednisolone을 얻고 있다. Steroid는 難溶性이고 위와 같은 條件에서는 基質의 大部分은 溶解하지 않고 固體로 存在하나 이와 平衡狀態로 存在하는 小量의 溶解된 基質이 脫水素反應을 받아 生成物로 轉換된다. 反應이 進行됨에 따라 生成物의 濃度는 增加하여 結晶으로 析出된다. 따라서 反應은 基質의 無晶形固體에서 生成物의 結晶形으로 進行하는데 이것을 pseudo-crystallofermentation이라 부르고 있다.

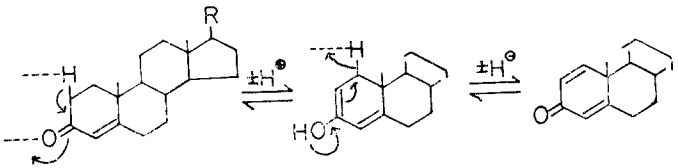


hydrocortisone prednisolone

Scheme 6.

미생물의 脫水素反應 메카니즘은 *Pseudomonas* 屬 細菌[26]이나 *Bacillus* 屬 細菌[27]의 酵素를 써서 硏究되고 있다. 現在 Δ^4-3-ketosteroid의 脫水素反應 메카니즘은 비타민 K_2存在下 3-carbonyl에 對한 2位置의 enol化 後에, 1α-水素原子의 H^-ion 離脫로 說明한다(Scheme 7). 어느 段階에서나 axial의 水素原子가 反應에 關與하며 *trans*-diaxial elimination[14]으로 보고 있다.

側鎖切斷反應——Steroid 骨格을 分解하는 酵素群과 sterol의 側鎖를 分解하는 酵素群은 共存

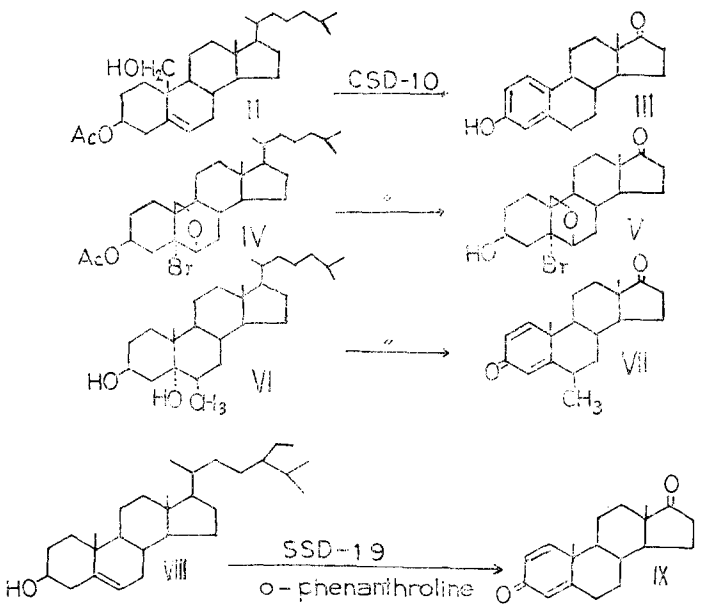


Scheme 7-1,2-Dehydrogenation.

하고 있다. 骨格分解酵素를 選擇的으로 阻害만 할 수 있으면 經濟性이 없는 sterol로 부터 steroid 호르몬을 生産할 수 있게 됨으로 最近活潑한 硏究가 進行되고 있다. 筆者들은 cholesterol acetate에서 3段階 化學反應으로 19-hydroxycholesterol acetate (**II**)를 合成하여 *Nocardia* sp. CSD-10(ATCC 19170) 培養液中에 添加하여 72% 收率로 estrone (**III**)을 얻었으며 美國에서 工業化되고 있다[28].

이와같이 높은 收率로 estrone을 얻을 수 있는 것은 A環이 芳香化하고 나면 9α-hydroxylase가 作用을 못하는데 基因한다.

또한 cholesterol acetate에서 2段階化學反應으로 얻어지는 5α-bromo-6, 19-oxidocholestanol acetate(**IV**)에서는 5α-bromo-6, 19-oxidoisoandrostrone(**V**)이 얻어지는데[29] 이것은 强力한 合成黃體호르몬 또는 蛋白質同化호르몬의 原料가 된다. Steroid 骨格에 6, 19-oxido 環을 導入하면 1, 2-脫水素酵素의 機能이 效果的으로 抑制됨으로 骨格의 分解는 일어날 수가 없다. 또한 2段階化學反應으로 얻어지는 5α-hydroxy-6β-methylcholestanol(**VI**)을 基礎로 使用하면 6β-methyl-androsta-1, 4-diene-3, 17-dione(**VII**)이 蓄積된다[30]. 6β-methyl 基의 存在는 9α-hydroxylase를 阻害한다.



Scheme 8-Microbial side chain degradation of sterols to hormonal steroids.

한편 sterol의 骨格의 構造變形으로 分解酵素作用을 막는 試圖와는 달리 酵素阻害劑를 使用하여 steroid를 얻고 있다. Arima 等[31]은 chlosterol을 α,α′-dipyridil 같은 鐵의 chelate劑 存在下 *Arthrobacter simplex*로 分解하여 60% 以上의 收率로 androsta-1, 4-diene-3, 17-dione을 얻고 있다. 이 物質은 pyrolysis에 依해 estrone으로 轉換시킬 수 있으며 日本에서 工業化되고 있다.

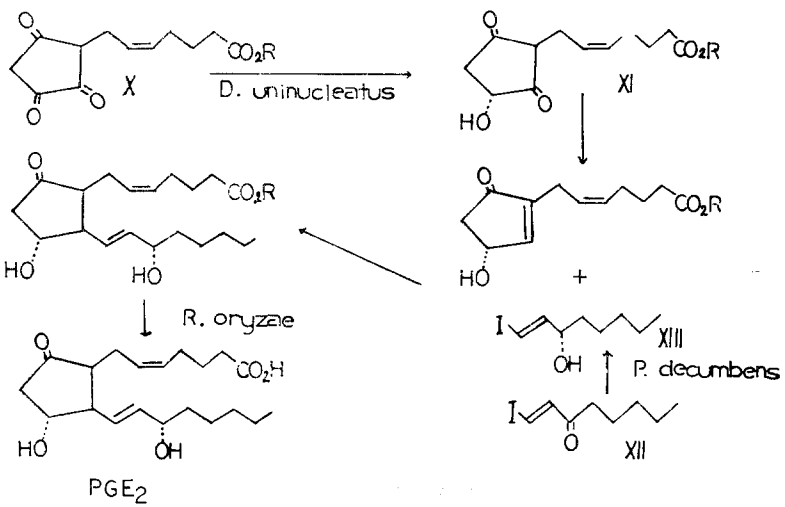
α,α′-Dipyridyl이나 *o*-phenanthroline 같은 金屬chelate劑는 sterol의 側鎖分解에는 影響을 주지 않고 骨格分解에 關與하는 9α-hydroxylase를 選擇的으로 阻害하는 것으로 믿어진다. 한편 우리들도 南韓 各地에서 採集한 土壤中에서 SSD-19 菌株를 分離하고 이것이 α,α′-dipyridyl 또는

o-phenanthroline 存在下에 β-sitosterol(**VIII**) (β-sitosterol과 campesterol 混合物)을 酸化하여 androstenedione과 androstadienedione(**IX**)을 生成하는 것을 發見하였다[32].

非 Steroid 性 生理活性物質의 微生物合成

Prostaglandin——지난 數 三年 사이 prostaglandin에 關한 硏究는 놀라울 정도로 活潑하다. 1974年 한해 동안에 發表된 報文이 1,000餘編을 넘어서는 事實만 보드래도 그 硏究 부움은 가히 짐작할 수 있다.

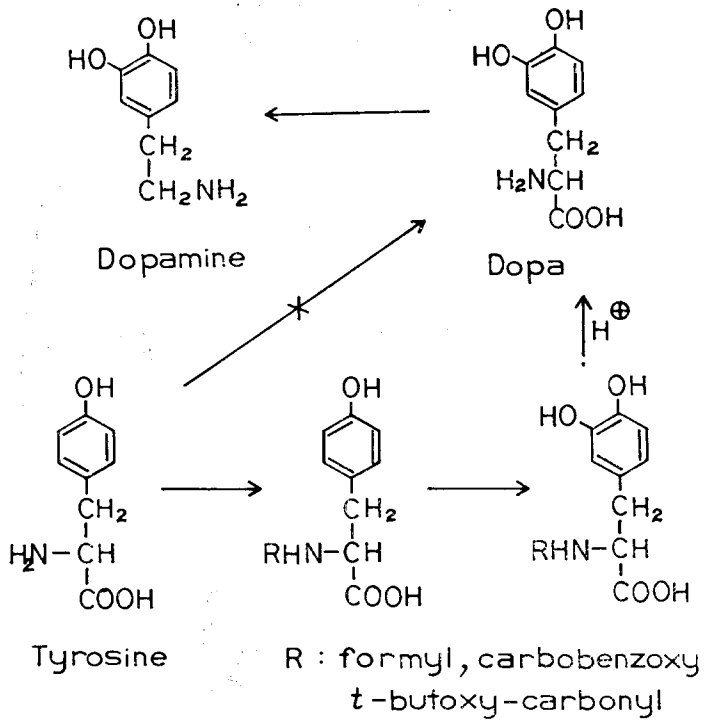
Prostaglandin系 物質의 合成法은 여러가지가 있으나 現時點에서 PGE_1 및 PGE_2의 合成法으로는 微生物反應을 加味한 全合成法이 가장 優秀한 것으로 믿어지며 그 槪要는 Scheme 9와 같다[33]. 이 方法의 核心은 triketo化合物(**X**)을 *Dipodascus uninucleatus* 라는 酵母培養液中에 添加하여 立體的特異性이 있는 化合物(**XI**)로 還元시키는데 있다. 培地로서는 soy bean dextrose media를 쓰며 基質의 濃度는 3 mg/ml 以上 올릴 수 있고 收率도 아주 좋다. 또한 iodoketone (**XII**)을 iodoalcohol (**XIII**)로 立體的特異性 있게 還元하는것도 borate buffer 중에서 *Penicillum decumbens*의 菌體를 현탁시켜줌으로서 可能하다. 特히 prostaglandin E系의 物質처럼 酸이나 알칼리에 不安全한 物質의 ester 結合의 加水分解는 곰팡이의 菌糸를 利用한 酵素反應이 適當하며 收率도 거의 定量的이다. Triketo化合物(**X**)의 立體的 特異性이 있는 還元 메카니즘이나 iodoketone(**XII**)의 還元 메카니즘도 化學的으로 充分히 說明할 수 있다.



Scheme 9-Bioorganic synthesis of prostaglandin E_2.

Dopa의 微生物合成——Parkinson氏 病은 dopamine의 不足에 基因한다. 이 dopamine의 前驅物質인 *L*-dopa(3, 4-dihydroxyphenyl alanine)은 dopamine과는 달리 細胞膜通過가 容易함으로 Parkinson氏 病에 治療效果가 있다[34]. 또한 *L*-dopa의 長期投與가 生殖能力과 長壽와 關係됨이 動物實驗으로 밝혀져 dopaminergic drug로 注目되고 있다[35].

Dopa의 構造는 보기에는 簡單하나 catechol 誘導體라는데 合成의 難點이 있다. benzene 核을 깨트리는 微生物反應은 開環反應에서 catechol intermediate를 거치는 것임으로 一般 아미노酸인



Scheme 10-Microbial hydroxylation of tyrosine to dopa.

tyrosin 을 微生物酸化反應으로 水酸化시켜 直接 dopa 를 合成하는 것이 可能할 것 같으나 實驗結果에 따르면 酸化的脫아민反應이 먼저 일어나서 dopa 의 蓄積은 期待할 수가 없다. 酸化的脫아민反應을 抑制하는 手段으로 *N*-formyl, *N*-carbobenzoxy(*N*-CBZ), *N*-*t*-butoxy-carbonyl(*t*-BOC) 基를 導入하여 아미노기를 보호한 것을 여러가지 곰팡이배양액중에 첨가하여 *L*-dopa 를 얻고 있다(Scheme 10). 例를 들면 *N*-CBZ 화한 *L*-tyrosine 을 *Aspergillus ochraceus* 배양액에 첨가하여 얻은 反應産物을 酸處理하여 保護基를 除去하고 나면 30% 收率로 *L*-dopa 를 얻고있다[36].

한편 *E. coli* 에서 分離되는 β-tyrosinase 는 알려져 있는 分解反應以外 置換反應, 合成反應도 촉매하는 多機能酵素임이 밝혀졌다[37].

이 多機能酵素를 活用하는 경우에는 β-tyrosinase 의 誘導(induction) 生成條件을 設定하여 酵素活性을 높인 菌體를 調製하고 4.0 g 의 pyruvate 와 catechol 를 作用시켜 合成反應으로 6 g 의 *L*-dopa 를 얻고 있다. Serine 과 catechol 을 使用한 置換反應으로도 *L*-dopa 는 얻어지며 現時點에서는 가장 經濟的인 合成法으로 工業化되고 있다.

文 獻

1. D.H. Peterson and H.C. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1871 (1952).
2. M. Kulhánek, *Adv. Appl. Microbiol.*, **12**, 11 (1970).
3. E. Kendall Pye (organizer), *Enzyme Technology Grantees-users Conference at the University of Pennsylvania*, May 27-30, **1975**, (NSF/RA-760032).

4. G.S. Fonken and R.A. Johnson, "*Chemical Oxidations with Microganisms*", Marcel Derker, Inc., New York, **1972.**
5. H. Iizuka and A. Naito, "*Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids*", Univ. of Tokyo Press, **1967.**
6. A. Axpen, Yu. A. Titob 原著, 伊藤 譯 "steroid와 微生物", 廣川書店, **1973.**
7. R.M. Dodson and R.D. Muir, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4627 (1961).
8. K. Schubert, R.H. Bönome and C. Horbold, *Z. Physiol. Chim.*, **325**, 260 (1961).
9. C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong and K.C. Wang, *J. Biol. Chem.*, **24**, 540 (1966).
10. S.S. Lee and C.J. Sih, *Biochem.*, **6**, 1395 (1967).
11. Goto and J. Fishman, *Science*, **195**, 80 (1977).
12. C.J. Sih, H.H. Tai, Y.Y. Tsong, S.S. Lee and G. Coombe, *Biochem.*, **7**, 808 (1968).
13. S.S. Lee, *Seoul Univ. Journal* (C), **18**, 94 (1967).
14. T. Hasegawa, T. Takahashi, M. Nishikawa and H. Hagiwara, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 390 (1957).
15. A. Schubert, G. Langbein and R. Siebert, *Ber.*, **90**, 2576 (1957).
16. E. Weisz, G. Wix and M. Bodánszky, *Naturwiss.*, **43**, 39 (1956).
17. G.M. Shull and D.A. Kita, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 763 (1955).
18. K.M. Mann, F.R. Hanson, P.W. O'connell, H.V. Anderson, M.P. Brunner and J.N. Karnemaat, *Appl. Microbiol.*, **3**, 14 (1955).
19. R.W. Thoma, J. Fried, S. Bonanno and P. Grabowich, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4818 (1957).
20. O.K. Sebek and D. Perlman, *Adv. Appl. Microbiol.*, **14**, 123 (1971).
21. M. Hayano, A. Saito, D. Stone and R.I. Dorfman, *Biochem. Biophys. Acta*, **21**, 38 (1956).
22. M.H.J. Zuidweg, W.F. van der Waard and J. de Flines, *ibid.*, **58**, 131 (1962).
23. C.J. Sih, Y.Y. Tsong and B. Stein, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5300 (1968).
24. T. Uwajima, H. Yagi and O. Terade, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1149 (1974).
25. E. Kondo and E. Masno, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 113 (1961).
26. H.R. Levy and P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2014 (1959).
27. P.H. Gale, A.C. Page, T.H. Stoudt and K. Folkers, *Biochem.*, **1**, 788 (1962).
28. C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong, K.C. Wang and F.N. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2765 (1965).
29. 이상섭, 한국생화학회지, **4**, 135 (1971).
30. S.S. Lee, *Korean Biochem.*, **7**, 53 (1974).
31. M. Nagasawa, M. Bae and K. Arima *et al.*, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 838 (1970).
32. 이상섭, 박시원, 서울대학교 약학논문집, **1**, 57 (1976).
33. C.J. Sih, J.B. Heather, R. Sood, P. Price, G. Peruzzotti, L.F. Lee and S.S. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 865 (1975).
34. G.C. Cotzias, P.S. Papavasiliou and R. Gellene, *New Engl. J. Med.*, **280**, 337 (1969).
35. G. Cotzias, S. Miller, L. Tang and P. Papavasiliou, *Science*, **196**, 549 (1977).
36. C.J. Sih and J. Rosazza *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6204 (1969).
37. 山田秀明, 有機合成化學, **32**, 259 (1974).