

*Aspergillus phoenicis*를 이용한 Steroid의 변형에 관한 연구

반응 온도와 초음파 처리의 효과

金 末 南 · 李 榮 鍾* · 李 炯 煥*

祥明女子大學 生物學科 · 建國大學校 生物學科*

Steroid Modification with *Aspergillus phoenicis*

Effects of Reaction Temperature and Sonication

Mal-Nam Kim, Young-Jong Lee* and Hyung-Hoan Lee*

Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110 and

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

Abstract: The temperature dependency and the stability of enzyme systems for 11α -hydroxylation of progesterone were investigated using *Aspergillus phoenicis*. Though *A. phoenicis* conserves high enzyme activities for lactose hydrolysis even at high temperatures, the bioconversion reaction of progesterone by this strain was found to be very temperature sensitive. The compositions of reaction mediums of inside and outside of cells were analyzed using sonication technique. At early stage of reaction, the concentration of 11α -hydroxyprogesterone of cell inside was higher than that of outside. But as the reaction proceeded further, the 11α -hydroxyprogesterone existing inside of cells being converted into another products, its concentration was lower within the cells than in the bulk medium. Even in the reaction mediums containing organic solvents, *A. phoenicis* was found to be able to metabolite, so that 11α -hydroxyprogesterone can be produced continuously from fixed bed reactions packed with immobilized *A. phoenicis* in vivo.

Keywords: *Aspergillus phoenicis*, 11α -Hydroxyprogesterone, 6β , 11α -Dihydroxyprogesterone, Progesterone, Temperature effect, Sonication effect.

각종 질병의 치료 효과가 높고 高價인 호르몬 cortisone은 11α -hydroxyprogesterone으로부터 값싸고 간단한 과정을 거쳐서 합성된다.

Progesterone은 주로 화학적인 방법에 의하여 생성되지만, progesterone으로부터 11α -hydroxyprogesterone이 합성되는 반응은 다효소 체계의 반응이며, 조효소의 재생을 필요로 하기 때문에 복잡한 과정들로 인하여 경제성이 낮은 화학적인 방법보다도 효소 체계를 그대로 유지하고 있는 생존 미생물을 사용하는 것이 효과적인 방법이다.

Progesterone의 11α -hydroxylation은 11α -hydroxylase의 작용에 의하여 이루어지며, 이 효소는 유도 효소라고 알려져 있다(Breskvar and Hudnik-Plevnik,

1978, Ghosh and Samanta, 1981). 이 효소는 소포체 막 속에 존재하므로 반응은 반응물이 bulk medium으로부터 세포 내부로 확산된 후 반응되고 나서 다시 생성물이 세포 외부로 확산되는 과정을 거치기 때문에 세포 내외부의 반응액 조성은 다를 것으로 짐작된다.

생존 미생물에 의한 11α -hydroxylation 반응에는 다른 부산물들이 수반된다. 이 중 생성된 11α -hydroxyprogesterone이 6β -hydroxylation에 의하여 6β , 11α -dihydroxyprogesterone으로 dihydroxylation되는 반응이 가장 큰 폭으로 일어난다(Dulany 등, 1955).

Dihydroxylation 반응의 진행 정도는 progesterone의 초기 농도에 의존한다고 보고되어 있다. 즉 progesterone의 농도를 높게 유지하였을 때는 많이 일어나지

않았으나, progesterone의 농도가 낮았을 때는 상당히 많이 진행되었다(Weaver 등, 1960). 이는 반응액에 progesterone이 남아있는 한 11 α -hydroxyprogesterone의 6 β -hydroxylation은 진행되지 않고 progesterone이 우선적으로 monohydroxylation되며 monohydroxylation이 거의 완료된 후 부터 비로소 dihydroxylation 반응이 진행되기 때문인 것으로 판단되고 있다.

*Rhizopus arrhizus*에 의하여 처음으로 생존 미생물을 이용한 11 α -hydroxylation이 시도된 후(Peterson and Murray, 1952) 많은 종류의 균주들이 이 반응의 효소 원으로써 사용되어 왔다.

그러나 *A. phoenicis*에의 11 α -hydroxylase의 존재가 밝혀진 것은 극히 최근의 일이다(Kim 등, 1982).

특히 이 균주는 높은 온도에서도 lactose hydrolysis와 같은 반응에 대한 높은 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라(Kim, 1983) 이 균주를 이용하여 progesterone의 전환 반응을 진행시킨 결과 주 생성물인 11 α -hydroxyprogesterone 이외에 11 β -, 6 β -, 16 β -hydroxyprogesterone과 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone과 같은 유용한 물질들이 생성되었다.

본 연구에서는 *A. phoenicis*를 이용하여 progesterone 전환 반응에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하였으며, cell 내외부의 반응액 조성을 비교 검토하였다.

材料 및 方法

使用菌株

균주 *A. phoenicis*는 일본의 토양으로부터 분리한 것으로 Laboratoire de Cryptogamie du Muséum de Paris에서 동정한 것이다.

培養 方法

포자 현탁액(1:7) 1 ml를 50 ml의 액체 배양 배지에 넣고 28°C, 180 rpm에서 14시간 동안 전배양하였다. 이 배양액 4 ml를 새 액체 배양 배지 50 ml속에 주입하고 다시 10시간 동안 주배양 하였다. 반응 온도는 25~50°C의 범위로 설정하였다.

基質의 添加

Progesterone 0.5 ml씩을 첨가함으로써 반응을 시작하였다. 이때 progesterone은 이미 ethanol에 용해되어 있는 용액 상태를 사용하였다.

超音波 處理

반응 후 반응기 내의 cells은 초음파 처리하여 원심 분리한 후 상등액만을 취하여 steroid를 정량 분석하였다.

酵素의 安定性 調査

주배양 후 progesterone 용액(기질의 최종 농도 0.1 g/l)을 투입하고 20시간 동안 반응시키고, 원심 분리하여 상등액은 steroid의 정량 분석에 사용하고, 균체는 0.5% saline으로 3회, 액체 배양 배지로써 1회 세척한 후 다시 새 반응액에 넣고 20시간 동안 반응시키며, 이런 방법으로 12회 반복 반응시켰다.

結果 및 考察

Fig. 1은 반응 온도에 따른 11 α -hydroxyprogesterone의 수득율과 progesterone의 전환율을 나타낸다.

11 α -hydroxyprogesterone의 수득율은 반응 온도가 25°C에서 28°C로 상승함에 따라 초기에는 약간 증가하여 극대값을 보이다가 반응 온도가 33°C를 지나 40°C 및 50°C로 될 때 따라 빠른 속도로 감소하고 있으며, progesterone의 degradation도 같은 추세를 보이고 있다.

Progesterone의 11 α -hydroxyprogesterone의 수득율은 *A. phoenicis*의 성장 최적 온도인 28°C에서 반응하였을 때 가장 높았다. 그러나 progesterone의 소멸 속도는 28°C에서 오히려 낮은 값을 나타내고 있으므로 25~33°C의 온도 범위에서는 효소 활성에 큰 차이가 없다고 결론지을 수 있다.

Ohlson 등(1980)은 28~30°C의 온도 범위에서는 *Curvularia lunata* spore 및 그것을 alginate gel속에 고정시킨 것을 효소원으로 하였을 때 11 β -hydroxylation 반응 속도는 거의 같았으나, 37°C에서는 고정화된 것은 80%의 효소 활성을 나타낸 반면, 고정화되지 않은 것은 50% 이하로 효소 활성이 저하되었다고 보고하고 있다.

Vezina 등(1963)은 24~33°C의 범위에서 11 α -hydroxylation 반응 속도는 큰 변화가 없으나 20°C와 37°C에서는 24시간 배양에서 약 10%정도 적은 양의 11 α -hydroxyprogesterone이 생성되었다고 보고하였다.

*A. phoenicis*의 β -galactosidase는 lactose의 가수분해 시 65°C 의 고온에서도 높은 효소 활성을 유지하고 있으나(Kim, 1983) progesterone 전환 반응에서는 조효소의 재생이 성장 최적 온도를 벗어나는 경우 원활하지 못하기 때문에, 반응 온도에 더 민감하다고 판단된다.

Steroid의 전환 반응은 소포체 막 내에서 일어나므로 progesterone의 전환 반응이 진행되는 과정은 기질인 progesterone이 bulk liquid phase에서 세포내로

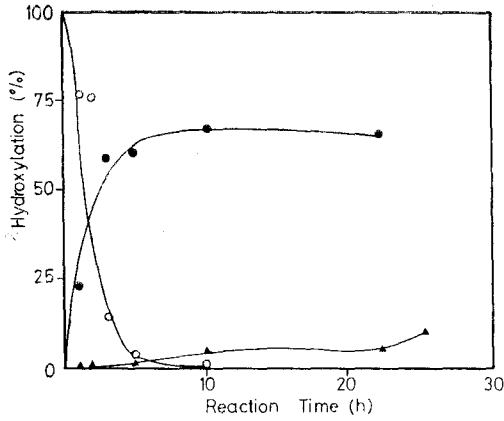


Fig. 1-A. Effect of reaction temperature on the bio-conversion of progesterone.
reaction temperature : 25°C
○ : progesterone
● : 11 α -hydroxyprogesterone
▲ : 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone

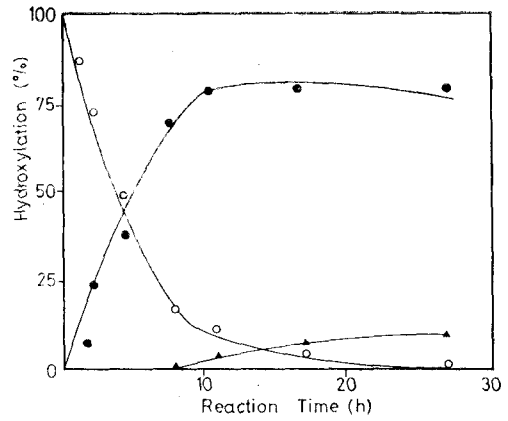


Fig. 1-B. Effect of reaction temperature on the bio-conversion of progesterone.
reaction temperature : 28°C
○ : progesterone
● : 11 α -hydroxyprogesterone
▲ : 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone

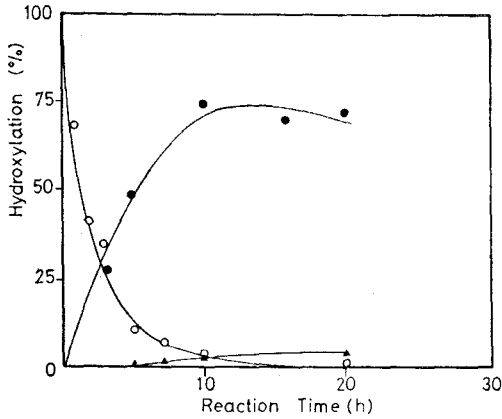


Fig. 1-C. Effect of reaction temperature on the bio-conversion of progesterone.
reaction temperature : 33°C
○ : progesterone
● : 11 α -hydroxyprogesterone
▲ : 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone

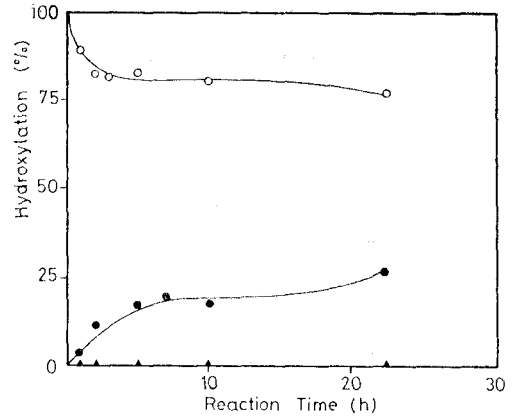


Fig. 1-D. Effect of reaction temperature on the bio-conversion of progesterone.
reaction temperature : 40°C
○ : progesterone
● : 11 α -hydroxyprogesterone
▲ : 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone

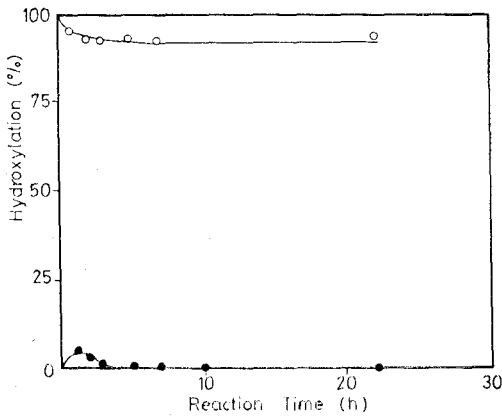


Fig. 1-E. Effect of reaction temperature on the bio-conversion of progesterone.
reaction temperature : 50°C
○ : progesterone
● : 11 α -hydroxyprogesterone

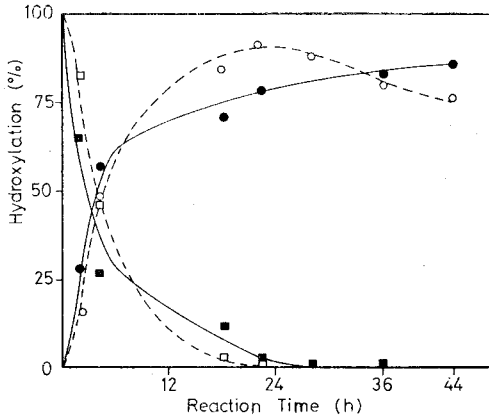


Fig. 2. Comparison of the steroid composition in the reaction medium before and after sonication.
 —●— : 11α-hydroxyprogesterone before sonication
 —■— : progesterone before sonication
 ...○... : 11α-hydroxyprogesterone after sonication
 ...□... : progesterone after sonication

확산된 후 반응에 참여하고, 그 결과 생성된 산물은 세포 외로 확산하는 과정을 거칠 것이다.

따라서 세포 내와 세포 외에서 기질 및 생산물의 조성 및 생성량에 차이가 있을 것으로 추측된다.

Fig. 2는 *A. phoenicis* whole cell로써 progesterone의 전환 반응을 진행시킨 반응액 중의 steroids 조성을 sonication을 실시하기 전 후로 나누어 나타낸 것이다.

Sonication하기 전에는 11α-hydroxyprogesterone의 수득율은 약 40시간에 이를 때 까지 계속 증가하는 추세를 보인다. 이에 반하여 sonication한 것은 약 20시간 부근에서 극대값을 나타낸 후 약간 감소하고 있으며, 20시간 부근에서는 sonication 전보다 약 10% 높은 수득율을 나타내고 있다.

따라서 반응 초기에는 11α-hydroxyprogesterone이 cell 외부보다 cell 내부에 많이 축적되어 있고, 반응이 점차 진행됨에 따라 cell 내부의 11α-hydroxyprogesterone은 cell 외부에서 보다 더 빠른 속도로서 다른 생성물로 전환됨을 알 수 있다.

반응액 중의 cell 내외부의 생성물의 조성을 비교한 보고는 필자의 견해로서는 아직 없는 상태이다.

Sallam 등 (1971)은 *Rhizopus nigricans*을 Servall-omni mixer로써 분쇄한 후 centrifugation을 거친 상등액과 cell debris 침전물을 분리하여 progesterone의 11α-hydroxylation 반응을 수행한 결과, 두 가지에서

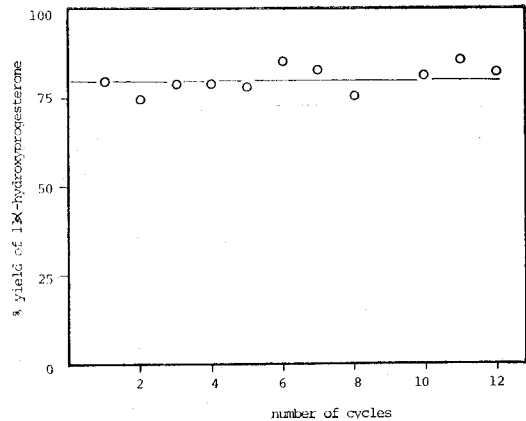


Fig. 3. % yield of 11α-hydroxyprogesterone after each reaction cycle.
 One cycle corresponds to 20 hours of incubation.

모두 progesterone의 전환이 이루어졌으나, 생성물의 종류는 서로 달랐다고 하였으며, 11α-hydroxylase는 cell debris상 속에 존재한다고 보고하였다.

Fig. 3은 20시간의 간격으로 hydroxylation 반응을 수행한 mycelium이 새 반응액 속에서 20시간 동안 생성시킨 11α-hydroxyprogesterone의 수득율을 보이고 있다. 20시간의 cycle을 12회 반복한 후에도 *A. phoenicis*는 본래의 효소 활성을 그대로 간직하고 있음을 알 수 있다.

이는 mycelium이 1% ethanol 반응액 속에서는 새로운 반응액이 연속적으로 공급될 경우, 물질대사를 계속 진행시킬 수 있음을 나타낸다.

또한 new cells의 성장과 수적 증가로 인하여 old cells과 대체됨으로써 전체적인 효소 활성을 나타내는 데는 매회 균등한 결과를 나타내는 것으로 사료된다.

摘 要

*A. phoenicis*는 고온에서도 높은 lactose hydrolysis에 대한 효소 반응 활성을 가지고 있으나, 이 균주에 의한 progesterone의 전환 반응은 반응 온도에 매우 민감한 것으로 나타났다.

균체 내외부의 반응액 조성을 sonication 방법을 이용하여 조사한 결과 반응 초기에 균체의 내부에는 외부에 비하여 11α-hydroxyprogesterone이 더 높은 농도로 존재하였으나 반응이 진행됨에 따라 균체 내부의 11α-hydroxyprogesterone이 다른 생성물로 전환되어 오히려 더 낮은 농도의 11α-hydroxyprogesterone이 존

재하였다.

A. *phoenicis* mycelium은 유기용매가 존재하는 반응액내에서도 새로운 액체 배지가 연속적으로 공급될 경우 물질대사를 계속 진행시킬 수 있으며, mycelium의 성장을 저해하지 않는 방법으로 고정된 cell을 이용하여 고정층 반응기에서 연속적으로 11 α -hydroxyprogesterone을 생산할 수 있다고 판단된다.

감사의 말씀

본 연구의 재정적 지원을 해 준 한국과학재단과 실험기기 사용을 흔쾌히 허락하여 주신 아주대학교 당국에 감사드립니다.

文 獻

Breskvar, K. and Hudnik-Plevnik, T. (1978): Inducibility of progesterone hydroxylating enzymes in *Rhizopus nigricans*. *J. Steroid Biochem.* 9:131-134.
Dulany, E.L., Stapley, E.O. and Hlavac, C. (1955): Hydroxylation of steroids, principally progesterone, by a strain of *Aspergillus ochraceus*. *Mycologia*. 47: 464-474.
Ghosh, D. and Samanta, T.B. (1981): 11 α -hydroxylation of progesterone by cell free preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.* 14: 1063-1067.
Kim, M.N., Ergon, F., Dhulster, P., Atrat, P., Gelf, G. and Thomas, D. (1982): Steroid modification

with immobilized mycelium of *Aspergillus phoenicis*. *Biotechnology Letters.* 4:233-238.
Kim, M.N. (1983): Studies on the β -galactosidase activity of whole cell *Aspergillus phoenicis*. *Korean J. of Mycology.* 11:109-114.
Ohlson, S., Flygare, S., Larsson, P.O. and Mosbach, K. (1980): Steroid hydroxylation using immobilized spores of *Curvularia lunata* germinated in situ. *European J. of Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10: 1-9.
Peterson, D.H. and Murray, H.C. (1952): Microbial oxygenation of steroids of carbon-11. *J. Am. Chem. Soc.* 74:1871-1872.
Sallam, L.A.R., El-Refai, A.H. and El-Kady, I.A. (1971): The in vitro transformation of progesterone by *Rhizopus nigricans* REF 129. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie.* 11:325-330.
Vezina, C., Sehgal, S.N. and Singh, K. (1963): Transformation of steroids by spores of microorganisms. I. Hydroxylation of progesterone by conidia of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.* 11:50-57.
Weaver, E.A., Kenney, H.E. and Wall, M.E. (1960): Effect of concentration on the microbiological hydroxylation of progesterone. *Appl. Microbiol.* 18: 345-348.
<Received February 20, 1985;

Accepted April 28, 1985>