

***Aspergillus phoenicis*를 이용한 Steroid의 변형**

金末南 · 李榮鍾*

상명여자대학 생물학과 건국대학교 생물학과*

Steroid modification with *Aspergillus phoenicis*

Kim, Mal-Nam and Young-Jong Lee*

Department of Biology, Sang Myung Women's University

Department of Biology, Kon Kuk University*

The dependence of activities of *Aspergillus phoenicis* on the culture conditions in the progesterone transformation reaction was investigated. In the beginning of the reaction, 6β , 11α -dihydroxyprogesterone was not produced even at high concentration of 11α -hydroxyprogesterone. However, large amount of the product was obtained after the complete exhaustion of progesterone. When spores of *A. phoenicis* replaced mycelia as enzyme source, 11α -hydroxyprogesterone was produced after a considerably long induction period, and its maximum production rate followed the exponential growth phase. The 6β -hydroxylation of 11α -hydroxyprogesterone continued, even after the stationary growth phase. *A. phoenicis* showed high enzyme activity for these reactions when the phosphate buffer solutions were used in place of the ordinary culture medium. The buffer solutions of low pH gave more yield of 11α -hydroxyprogesterone than those of high pH. However, the addition of glucose to the buffer solutions did not activate the transformation reaction. The presence of progesterone seems to be necessary for the induction of enzymes for the 6β -hydroxylation of 11α -hydroxyprogesterone since 6β , 11α -dihydroxyprogesterone is not produced in the reaction medium containing only 11α -hydroxyprogesterone as a substrate.

Steroid를 공업적인 규모로 전환하는 공정은 이 반응의 산물이 질병의 치료 효과가 높은 것으로 확인되면서 부터 많은 관심을 모으고 있다. 이 중에서 progesterone과 Reichstein's substance S의 11α -hydroxylation반응과 1-dehydrogenation 반응은 prednisolone, prednisone 및 triamcinolone등과 같은 좋은 steroid계의 약품을 생산하기 위한 중요한 단계의 반응이다. 일반적으로 progesterone은 화학적인 방법에 의하여 주로 생산된다. 그러나 그 이후의 hydroxylation반응을 화학적으로 진행하기에는 그 과정이 매우 복잡하며 어렵다. 이것을 조효

소 재생 등 다효소 체계를 그대로 유지하고 있는 생존 미생물을 이용한 방법으로 대처할 경우 많은 합성 단계를 단순화할 수 있을 뿐만 아니라, 粗原料를 사용할 수 있어서 제조 원가가 크게 저하된다(Aharonowitz, 1954).

*A. phoenicis*는 비교적 높은 성장속도와 고온 및 산성 pH 반응액에서 좋은 lactose hydrolysis 효소 활성을 나타낸다(Kim, 1983a). 뿐만 아니라 이 균주를 이용한 progesterone의 전환반응 산물들은 11α -hydroxyprogesterone 이외에 11β -, 6β -, 16β -hydroxyprogesterone과 6β , 11α -dihydroxyprogesterone과 같은 유용한 물

질들로 구성되어 있어 (Kim 등, 1982), 흥미로운 효소원이 아닐 수 없다. 11α -hydroxylase는 유도 효소라고 알려져 있으며 (Breskvar and Hudnik, 1978), *A. phoenicis*에 의한 progesterone의 전환 반응은 반응액 속에 당을 첨가할 경우 전환 반응이 더욱 촉진되나, 유기 용매 및 반응 온도의 변화에는 매우 민감하다고 보고되었다 (Kim 등, 1985). 주 생성물인 11α -hydroxyprogesterone과 더불어 비교적 정량 가능할 정도의 양으로 생성된 6β , 11α -dihydroxyprogesterone은 11α -hydroxyprogesterone의 6β -hydroxylation 반응에 의하여 생성된다고 보고되었으며 (Dulaney 등, 1955), 당의 종류 (Vezina 등, 1963), 배양 온도 (Murray, 1976) 등과 같은 배양 조건에 따라 다른 정도로 진행된다.

본 연구에서는 *A. phoenicis*의 progesterone 전환 반응 활성을 균주 성장 과정 및 배양 조건의 측면에서 조사하였다.

材料 및 方法

실험에 사용한 균주 *A. phoenicis*는 일본의 토양으로부터 분리된 것으로 Laboratoire de Cryptogamie du Muséum de Paris에서 동정한 것이다. 균체의 배양 및 반응 조건, steroids의 정량은 전보 (Kim, 1983b)와 동일한 방법으로 하였다.

結果 및 考察

Fig. 1은 반응 시간에 따른 반응액중의 pH와 11α -hydroxyprogesterone 및 6β , 11α -dihydroxyprogesterone의 농도를 나타내고 있다. 반응액 중의 progesterone은 20시간 부근에서 거의 소멸되었으나, 11α -hydroxyprogesterone의 농도는 같은 시간에서 계속 상승하는 추세이다. 반응액의 pH는 반응 시간이 100시간에 이를 때까지는 점차 감소하였으나 그 이후 부터는 다시 상승하는 추세이다. 한편 6β , 11α -dihydroxyprogesterone의 생성은 반응액의 pH가 상승함에 따라 빠르게 진행됨을 알 수 있

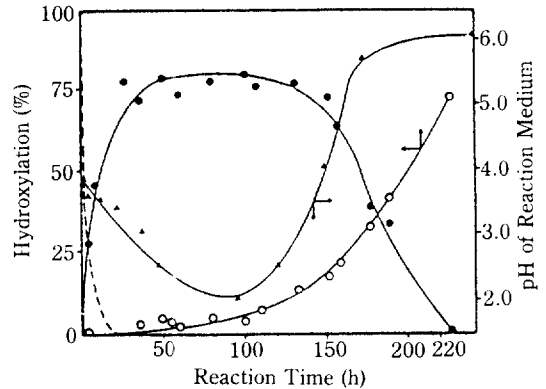


Fig. 1. Variation of pH and the content of steroids in reaction medium.

-----; progesterone
 —●—; 11α -hydroxyprogesterone
 —○—; 6β , 11α -dihydroxyprogesterone
 —▲—; pH of the reaction medium

다. Sallam 등 (1976)은 progesterone의 dihydroxylation은 alkaline pH에서 더 원활히 진행된다고 보고하였으나, *A. phoenicis*는 산성 pH 반응 용액에서 상당히 빠른 속도로 dihydroxylation을 진행시킨다고 볼 수 있다. 한편 6β , 11α -dihydroxyprogesterone은 반응 초기에는 11α -hydroxyprogesterone의 농도가 비록 높아도 많이 생성되지 않은 반면 progesterone이 거의 고갈된 후부터는 팔목하게 생성되는 것으로 보인다.

Maddox 등 (1981)과 Aharonowitz (1954)는 *A. ochraceus*를 이용하여, Sen 등 (1981)은 *Syncephalastrum racemosum*을 이용하여 progesterone의 전환 반응을 연구하였으며, 반응액 중의 progesterone이 완전히 고갈되고 난후부터 11α -hydroxyprogesterone이 dihydroxyprogesterone으로 전환된다는 본 실험과 유사한 결과를 보고하고 있다. 이는 반응액 중에 progesterone이 존재하는 한 cell내의 hydroxylase는 progesterone을 우선적으로 hydroxylation시킨다는 결과 (Weaver 등, 1960)로부터 이해될 수 있다.

Fig. 2는 *A. phoenicis* spore가 반응액 속에서 성장하면서 progesterone의 전환 반응을 진행시킨 결과를 나타내고 있다. 사상의 균체를 사용하였을 때와는 달리, 포자의 경우에는 반응 유도기가 존재하여 11α -hydroxyproges-

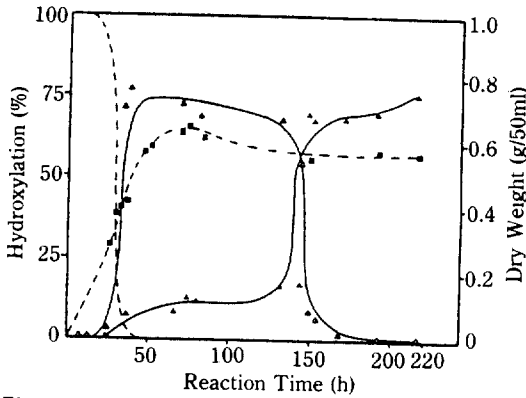


Fig. 2. The bioconversion of progesterone along with the growth of *A. phoenicis*.
 - - - - -; progesterone
 —△—; 11 α -hydroxyprogesterone
 —▲—; 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone
 - - ■ - -; growth curve of *A. phoenicis*

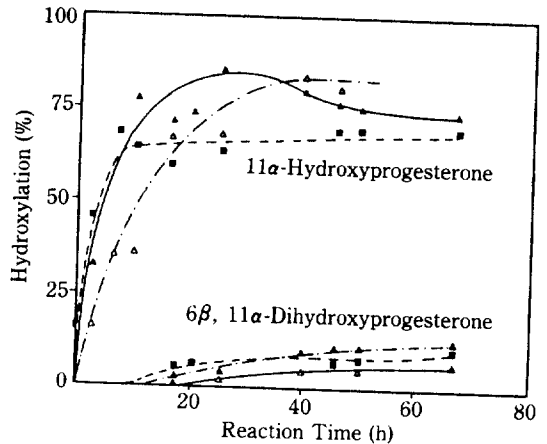


Fig. 3. 11 α -hydroxylation enzyme activity in 20 mM phosphate buffer solution of different pH.
 —△—; growth medium
 —▲—; phosphate buffer (pH 4.9)
 - - ■ - -; phosphate buffer (pH 9.0)

terone의 농도 곡선이 sigmoid한 형태가 되며, 균체 성장의 대수기에 11 α -hydroxyprogesterone이 급격하게 생성되고 있다. 이는 성장 대수기에 균체 내의 물질 대사가 원활할 것으로 판단되며, 아울러 균체 수의 증가로 효소의 농도가 증가한 것도 11 α -hydroxylation 반응을 촉진시킨 요소로 작용한 것으로 보인다. Vezina 등 (1963)도 *A. ochraceus*의 포자로서 progesterone의 11 α -hydroxylation을 행한 결과 반응 시간에 따라 sigmoid한 11 α -hydroxyprogesterone 농도 곡선을 얻었다. 11 α -hydroxyprogesterone의 농도가 plateau를 유지하는 시간은 사상의 균체보다 포자의 경우가 더 짧으며, 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone은 후자의 경우에 더 빨리 생성된다. 균체의 성장이 정지된 후에도 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone의 농도는 약간 증가하는 추세를 나타낸다.

Fig. 3은 *A. phoenicis*가 growth medium 및 원충 용액에서 나타내는 11 α -hydroxylation 활성을 상호 비교한 것이다. 원충 용액에서는 pH 4.9일 때가 9.0일 때보다 11 α -hydroxyprogesterone의 수득율은 더 높았다. Sallam 등 (1976)의 결과와는 달리, *A. phoenicis*의 dihydroxylation은 높은 pH일 때보다 오히려 낮은 pH 반응 용액에서 더 많이 진행되었다.

Ohlson 등 (1980)은 서로 다른 pH의 growth medium 속에서 고정화된 *Curvularia lunata*

의 포자를 이용하여 cortexolone을 cortisol로 전환하는 반응을 연구한 결과 pH-enzyme activity 곡선이 매우 broad하며 최적 pH는 6.0 부근으로 보고하고 있다. Vezina 등 (1973)은 *A. ochraceus*로서는 progesterone의 hydroxylation이 pH 4.0~8.5 범위에서는 크게 영향받지 않는다고 보고하였다. Casas-Campillo와 Bantista (1965)는 *Fusarium moniliforme*로서 estrogen의 15 α -hydroxylation을 시도한 결과

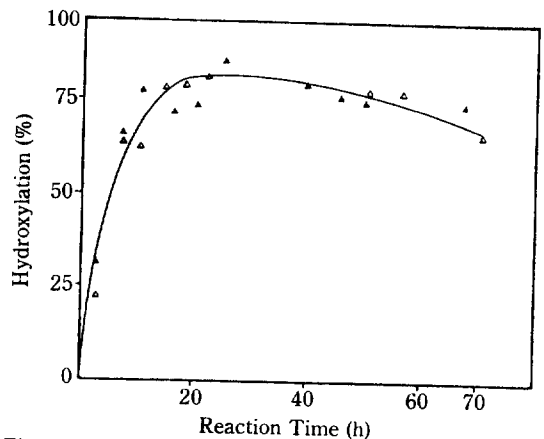


Fig. 4. Comparison of 11 α -hydroxylation enzyme activity between 20 mM phosphate buffer solution and the same buffer solution added by 1 g/l of glucose as reaction media.
 ▲; phosphate buffer (pH 4.9)
 △; phosphate buffer added by 1 g/l of glucose (pH 4.9)

증류수 및 sugar solution 속에서는 전혀 반응이 일어나지 않았으나, 1% phosphate buffer 용액에서는 많은 양의 15 α -hydroxyprogesterone을 생성시켰다고 보고하였다. 한편 이들은 1% phosphate 용액 속에 1%의 glucose를 첨가하여도 효소 활성에 큰 변화가 없다는 결론을 얻었다.

Fig. 4는 *A. phoenicis*가 pH 4.9의 완충 용액 및 같은 완충 용액에 glucose 농도를 1g/l로 한 용액 속에서 11 α -hydroxylation 반응을 진행한 결과를 보여주고 있으며, 이로부터 반응이 완충 용액 속에서 진행될 때에는 glucose의 첨가가 반응에 큰 영향을 미치지 않음을 알

수 있다.

기질로서 11 α -hydroxyprogesterone만을 포함한 액체 배양 배지(pH 4.9), 인산 완충 용액(pH 7.0), 탄산 완충 용액(pH 11.0)의 세 종류의 반응액 속에서 기질의 6 β -hydroxylation 진행 여부를 조사한 결과 60시간의 반응시간 후에도 11 α -hydroxyprogesterone의 전환은 관찰되지 않았다. 이 결과로서 progesterone이 유도 물질로 작용하면 11 α -hydroxylase와 dihydroxylase 등이 동시에 전사되었다가 progesterone이 우선적으로 hydroxylate된 후 dihydroxyprogesterone을 생성하는 것으로 판단된다.

摘 要

*A. phoenicis*의 progesterone 전환 반응 활성을 균주 성장 과정 및 배양 조건의 측면에서 조사하였다. 6 β , 11 α -dihydroxyprogesterone을 반응 초기에는 반응액 속의 11 α -hydroxyprogesterone 농도가 높을 때에도 많이 생성되지 않았으나, progesterone이 거의 소멸되고 난 후부터 활발하게 생성되었다. 균주의 포자를 효소원으로 하였을 경우, 11 α -hydroxyprogesterone은 반응 유도기를 가진 후 비로소 생성되기 시작하였으며, 균체의 성장 대수기에 가장 빠른 속도로 생성되었다. 11 α -hydroxyprogesterone의 6 β -hydroxylation 반응은 균체의 성장이 정지된 후에도 계속되었다. 반응액을 액체 배양 배지로 부터 같은 pH의 인산 완충 용액으로 대체하였을 때 *A. phoenicis*는 더 높은 11 α -hydroxylation 반응 활성을 나타내었으며, 높은 pH에서 보다 낮은 pH의 완충 용액에서 더 높은 수율의 11 α -hydroxyprogesterone이 얻어졌다. 그러나 완충 용액속에 glucose를 첨가하였을 때 반응 촉진 활성은 관찰되지 않았다. 기질로서 11 α -hydroxyprogesterone만을 투입한 경우, dihydroxyprogesterone의 생성은 전혀 진행되지 않아 11 α -hydroxyprogesterone의 6 β -hydroxylation 반응에 대하여도 progesterone이 유도 물질로서 작용하는 것으로 보인다.

감사의 말씀

본 연구의 재정적 지원을 해 준 한국 과학재단과 실험실 및 실험기기 사용을 흔쾌히 허락하여 주신 아주대학교와 건국대학교 이형환 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Aharonowitz, Y. and G. Cohen, 1954. The microbiological production of pharmaceuticals. *Scientific American*. sep., 106-118.
- Breskvar, K. and T. Hudnik, 1978. Inducibility of progesterone hydroxylating enzymes in *Rhizopus nigricans*. *J. Steroid Biochem.* **9**, 131-134.
- Casas-Campillo, C. and M. Bautista, 1965. Microbiological aspects in the hydroxylation of estrogen by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Microbiol.* **13**(6) 977-984.
- Dulaney, E. L., E. O. Stapley and C. Hlavac, 1955. Hydroxylation of steroids, principally progesterone, by a strain of *Aspergillus ochraceus*. *Mycologia.* **47**(4), 464-474.
- Kim, M.N., F. Ergon, P. Dhulster, P. Atrat, G. Gelf and D. Thomas, 1982. Steroid modification with immobilized mycelium of *Aspergillus phoenicis*. *Biotechnology Letters.* **4**(4), 233-238.
- Kim, M. N., 1983a. Studies on the β -galactosidase activity of whole cell *Aspergillus phoenicis*. *Korean J. of Mycology.* **11**(3), 109-114.
- Kim, M N., 1983b. Steroid modification with

- Aspergillus phoenicis*. Effects of solvents and glucose. *Korean J. of Mycology*. **11**(3), 115-119.
8. Kim, M. N., Y. J. Lee and H. H. Lee, 1985. Steroid modification with *Aspergillus phoenicis*: Effects of reaction temperature and sonication. *Korean J. of Mycology*. **13**(2), 83-87.
 9. Maddox, I. S., P. Dunnill and M. D. Lilly, 1981. Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11 α -hydroxylation of progesterone. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 345-354.
 10. Murray, H.C., 1976. "Microbiology of steroids in Industrial Microbiology." ed. B.M. Miller and W. Litsky. McGraw-Hill.
 11. Ohlson, S., S. Flygare, P. O. Larsson and K. Mosbach, 1980. Steroid hydroxylation using immobilized spores of *Curvularia lunata* germinated in situ. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 1-9.
 12. Sallam, L., N. Naim, N. Zeinel, A. Badr and A. M. Refai, 1976. Some factors influencing the enzymatic conversion of progesterone by *Aspergillus niger*. *Revista. A. B. A.* **12**, 221-227.
 13. Sen, R. and T. B. Samata, 1981. Influence of the substituents at C₁₁ on hydroxylation at C₆ of C₂₁-steroids by *Syncephalastrum racemosum*. *J. Steroid Biochem.* **14**, 307-309.
 14. Singh, K., S. N. Sehgal and C. Vezina, 1968. Large scale transformation of steroids by fungal spores. *Appl. Microbiol.* **16**(2), 393-400.
 15. Vezina, C., S. N. Sehgal and K. Singh, 1963. Transformation of steroids by spores of microorganisms *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.* **11**, 50-57.
 16. Weaver, E. A., H. E. Kenney and M. E. Wall, 1960. Effect of concentration on the microbiological hydroxylation of progesterone. *Appl. Microbiol.* **18**, 345-348.

(Received Sept. 19, 1985)