

Rhizopus nigricans 를 이용한 고농도의 Progesterone 으로부터 11 α -hydroxyprogesterone 의 생산

최용복 · 최상기¹ · 김학성* · 박영훈¹

한국과학기술원 생물공학과 ¹한국과학기술연구원 유전공학센터

Biotransformation of Progesterone to 11 α -Hydroxyprogesterone by using *Rhizopus nigricans* at Elevated Concentration of the Substrate

Choi, Yong-Bok, Sang-Ki Choi¹, Hak-Sung Kim* and Young-Hoon Park¹

Department of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of
Science and Technology P.O Box 150, Cheongryang, Seoul 131-650, Korea

¹Biochemical Process Lab. GEC, KIST P.O Box 131, Cheongryang, Seoul 131-650, Korea

A study on 11 α -hydroxylation of progesterone by using *Rhizopus nigricans* was carried out to produce efficiently 11 α -hydroxyprogesterone which is an essential intermediate of corticosteroids synthesis. Firstly, medium was optimized in view of bioconversion yield and cell growth. Glucose and casamino acid were selected as carbon and nitrogen source and the ratio of carbon to nitrogen which maximize bioconversion yield was determined to be 2:1. Secondly, the addition time of progesterone and dispersion method were studied. When progesterone dispersed with 0.01% (v/v) Tween 80 was added at 12-14 hr of cultivation, higher bioconversion yield was obtained. When 20g/l of progesterone was added, the yield reached upto 70% under optimized conditions.

진통소염제로 쓰이는 부신피질호르몬 중 가장 많은 시장성을 갖고 있는 prednisolone 은 식물성 sterol 인 stigmasterol 로부터 화학적, 생물학적 방법에 의해 생산되는데 그 중 생물전환공정으로는 progesterone 의 11 α -hydroxylation 과 hydrocortisone 의 1-dehydrogenation 이 있다(1, 2). 이러한 생물전환공정 중에서 산업적으로 가장 중요한 과정이 11 α -hydroxylation 으로 steroid 핵의 11번 α 위치에 수산화기가 첨가되는 반응이다. 미생물에 의한 progesterone 의 11 α -hydroxylation 은 주로 *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* 와 *Aspergillus ochraceus* 등에 의해 수행되는 것으로 보고되었는데 이 중 *Rhizopus nigricans* 가 산업적으로 이용되고 있다(3, 4).

생물전환에서 중요한 것은 높은 기질농도에서 높은

수율로 산물을 생산하는 것이 경제적인 측면에서 요구된다. 기질인 progesterone 은 물에 거의 녹지 않기 때문에 고농도에서의 효율적인 미생물 전환을 위해서는 기질을 배양액에 잘 분산되도록 하여야 한다. 이를 위해 여러 가지 방법이 개발되었는데, 유기용매를 첨가하는 것, 기질을 미세하게 분쇄시켜서 분말형태로 직접 배양액에 첨가하는 방법과 계면활성제를 이용하여 분산액을 만들어서 첨가시키는 방법 등이 있다(5-8, 14, 15). 그러나 유기용매의 농도가 높을 경우 미생물에 독성을 미치기 때문에 이용에 한계가 있다. 계면활성제를 사용하는 경우 거품이 많이 생겨서 조업상의 문제가 있지만 이를 적당한 농도로 사용하여 문제를 해결할 수 있다.

본 연구에서는 prednisolone 제조의 중요한 중간체인 11 α -hydroxy progesterone 을 *Rhizopus nigricans* 를 이용하여 고농도의 progesterone 으로부터 고수율로 생산하기 위한 연구를 수행하였다.

Key words: *Rhizopus nigricans*, 11 α -hydroxyprogesterone
*Corresponding author

재료 및 방법

재 료

Progesterone 과 11α -hydroxyprogesterone 은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.) 에서 구입하였고, Tween 80 용액도 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. Sabouraud dextrose agar 와 Potato dextrose agar 는 Difco 사 제품이었고, HPLC 의 이동상으로 쓴 isopropanol 과 n-hexane 은 Burdick and Jackson labs (Muskegon, MI, U.S.A.) 에서 구입한 것으로 사용하였다. 이외의 시약은 모두 특급 및 일급시약을 사용하였다.

균주 및 배지

Progesterone 을 11α -hydroxylation 시키는 균주로는 *Rhizopus nigricans* ATCC 6227b 를 사용하였으며, 포자를 얻기 위한 배지로는 Potato dextrose agar 와 Sabourauds dextrose agar 를 4:1 의 비율로 섞어서 사용하였다. 생물전환에 사용한 배지의 성분은 glucose 2.5%, casamino acid 2.0%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001% 이며 2N HCl 로 pH 를 4.5 로 조절하였다. 포도당은 따로 멸균하여 첨가하였다. 이상의 배지를 기본으로 탄소원과 질소원의 양과 비율을 최적화하였다.

Glucose 정량 및 균체량 측정

Glucose 정량은 DNS 방법에 의해 수행하였다(9). 균체량은 일정량의 배지를 취하여 원심분리한 후 침전된 균체와 steroids 를 증류수로 3번 세척한 후에 $105^\circ C$ 에서 24 시간 동안 건조시킨 후에 측정하였다.

Steroids 의 정량분석

일정량의 발효액을 취한 후 methylene chloride 를 첨가하여 기질 및 산물을 추출하였으며, 유기용매층을 여과막 ($0.45 \mu m$, Millipore, U.S.A.) 으로 여과한 후 분석하였다. Steroids 의 정량분석은 HPLC (Hitachi Model 655A-12, Tokyo, Japan) 를 사용하였으며, column ($30 cm \times 4.6 mm$ I.D) 은 silica gel (μ -porasil, Waters Assoc., Milford, U.S.A.) 로 충전된 것을 사용하였다. 이동상은 n-hexane 과 isopropanol 을 80:20 (v/v) 으로 혼합하여 1 ml/min 유속으로 통과시켰으며, 기질 및 산물은 UV 흡광도로 측정하였다.

Flask 에서의 생물전환

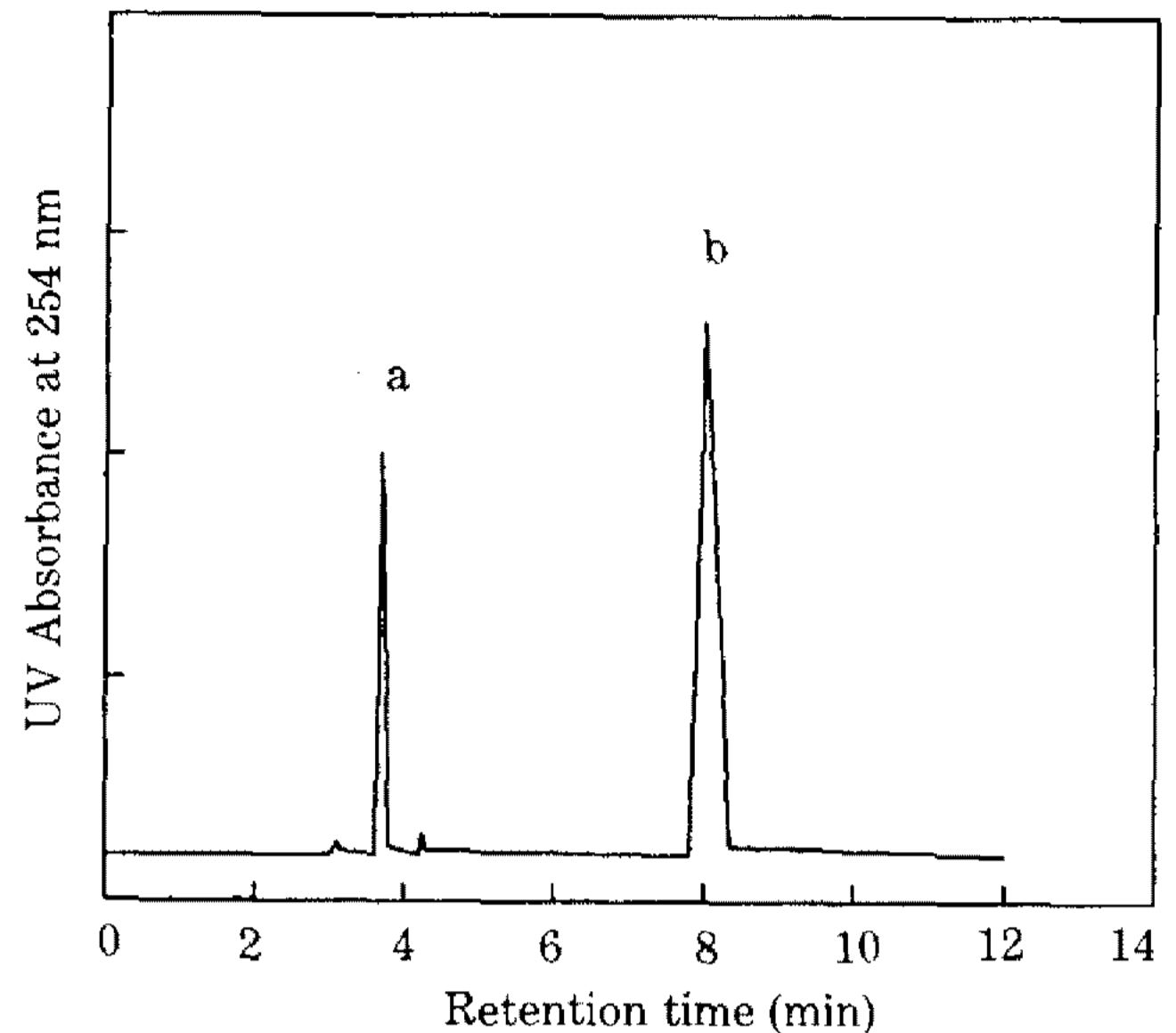


Fig. 1. Chromatogram of progesterone (a) and 11α -hydroxyprogesterone (b)

포자를 접종하여 15 시간 배양한 후 배양액로 새로운 100 ml 생물전환배지에 접종하여 reciprocal shaker (300 strokes per min, 국제과학, 서울) 를 이용하여 $28^\circ C$ 에서 배양하였다. 14 시간 정도 배양 후에 일정량의 progesterone 을 0.01% (v/v) Tween 80 에 분산시켜서 첨가하였다. Progesterone 은 멸균하지 않고 $80^\circ C$ dry oven 에서 5 시간 보관 후에 사용하였다.

발효조에서의 생물전환

생물전환은 2.6 l fermenter (한국발효기주식회사, Seoul, Korea) 에 1.2 l 의 배지를 넣어 수행하였다. 포자 접종 후 14 시간 배양한 것을 8% 접종하였고, progesterone 은 종균배양 후 12 시간 정도 지나서 첨가하였다. Progesterone 은 flask 에서의 생물전환과 같이 0.01% Tween 80 용액에 분산시켜서 첨가하였다. 생물전환조건은 교반속도를 500 rpm, 통기속도를 0.5 vvm 으로 하였다.

결과 및 고찰

기질 및 산물의 정량분석

Fig.1 은 n-hexane 과 isopropanol 을 80:20 (v/v) 의 비로 섞은 유기용매로 용출시켰을 때 progesterone 과 11α -hydroxyprogesterone 이 잘 분리되고 있음을 보여준다. 각각의 체류시간은 3.7 분과 8.0 분이였다. 정량분석을 위해 steroids 농도와 peak area 의 관계를 구한 결과 0.1-1.0 g/l 까지 직선을 나타내었다.

Table 1. Relative bioconversion yield and dry weight at different nitrogen source.

Nitrogen source	Relative bioconversion yield (%)	Dry weight (g/l)
Ammonium chloride	9	6.9
Soybean meal	52	9.7
Bacto peptone	81	9.8
Yeast extract	75	11.2
Casamino acid	100*	10.1

The concentration used was 2% (w/v).

*Indicate 60% yield when 5g/l of progesterone was added.

생물전환배지의 최적화

생물전환이 잘 일어나는 배지의 선택은 flask에서 수행하였는데 progesterone 농도를 5g/l로 고정한 다음 먼저 탄소원과 질소원을 정하고 다음에 탄소원과 질소원의 비를 결정하였다.

질소원의 결정은 탄소원을 포도당으로 고정한 후 여러 가지 질소원에 대하여 생물전환수율과 균체의 성장을 비교하였다. Table 1에서 보듯이 ammonium chloride에서는 균체의 성장과 생물전환수율이 매우 낮은 반면, bacto peptone, yeast extract, casamino acid와 같은 혼합배지에서 균체성장과 생물전환이 비교적 잘 일어났는데, 그 중에서 casamino acid가 가장 좋았다. 다음으로 탄소원을 정하는 실험을 수행한 결과 Table 2에서 보듯이 corn steep liquor, molasse 등 혼합 탄소원과 glucose, sucrose, fructose 중에서 포도당을 사용하였을 때 생물전환수율과 균체성장이 비교적 높은 것으로 나타났다. 그리하여 본 연구에서는 탄소원과 질소원으로 포도당과 casamino acid를 선정하였다.

위에서 결정한 탄소원과 질소원의 비율은 포도당농도를 2.5, 4.0, 6.0%로 변화시키면서 이에 따라 casamino acid를 여러 가지 비율로 첨가하였다(Table 3). 포도당 2.5%에서는 C:N 비율이 5:4, 2:1로 하였을 때 가장 좋게 나타났고, 포도당 4.0%에서는 2:1, 4:1 비율에서, 포도당 6.0%에서는 2:1, 4:1, 8:1의 비율에서 비교적 생물전환수율이 높았다. 그리하여, 본 연구에서는 포도당농도를 2.5%로 정하고 포도당과 casamino acid의 비율을 2:1로 하여 생물전환배지로 사용하였다.

생물전환조건의 최적화

Table 2. Relative bioconversion yield and dry weight at different carbon source.

Carbon source	Relative bioconversion yield (%)	Dry weight (g/l)
Sucrose	65	10.6
Starch	44	8.0
Corn steep liquor	78	8.1
Molasse	37	10.0
Glucose	100*	12.7
Fructose	67	11.8
Galactose	52	11.6
Glycerol	38	8.5

The concentration used was 2% (w/v).

*Indicate 60% yield when 5g/l of progesterone was added.

Table 3. Effect of C:N ratio at different concentration of glucose on the relative bioconversion yield and dry weight.

Glucose conc. (%)	C : N ratio	Relative bioconversion yield (%)	Dry weight (g/l)
2.5	5 : 4	100*	10.5
	2 : 1	100	9.5
	4 : 1	71	7.9
	8 : 1	61	8.1
4.0	5 : 4	70	10.7
	2 : 1	96	10.7
	4 : 1	80	9.1
	8 : 1	30	6.0
6.0	5 : 4	18	9.6
	2 : 1	96	10.5
	4 : 1	90	9.6
	8 : 1	90	10.1

*Indicate 60% yield when 5g/l of progesterone was added.

생물전환수율에 영향을 미치는 인자로서 progesterone의 첨가시기, 교반속도 및 통기속도 등의 최적조건을 검토하였다. 먼저 progesterone 첨가시기가 생물전환에 미치는 영향을 관찰하였는 바, progesterone을 대수증식기에 첨가하였을 때 높은 수율을 얻었다(Table 4). 11 α -hydroxylase가 유도적이기 때문에 효소 유도체로써 progesterone을 0.5g/l 첨가해서 배

Table 4. Effect of addition time of progesterone on bioconversion yield.

Addition time (hr)	Bioconversion yield (%)
0	45
7	40
12	52
18	20

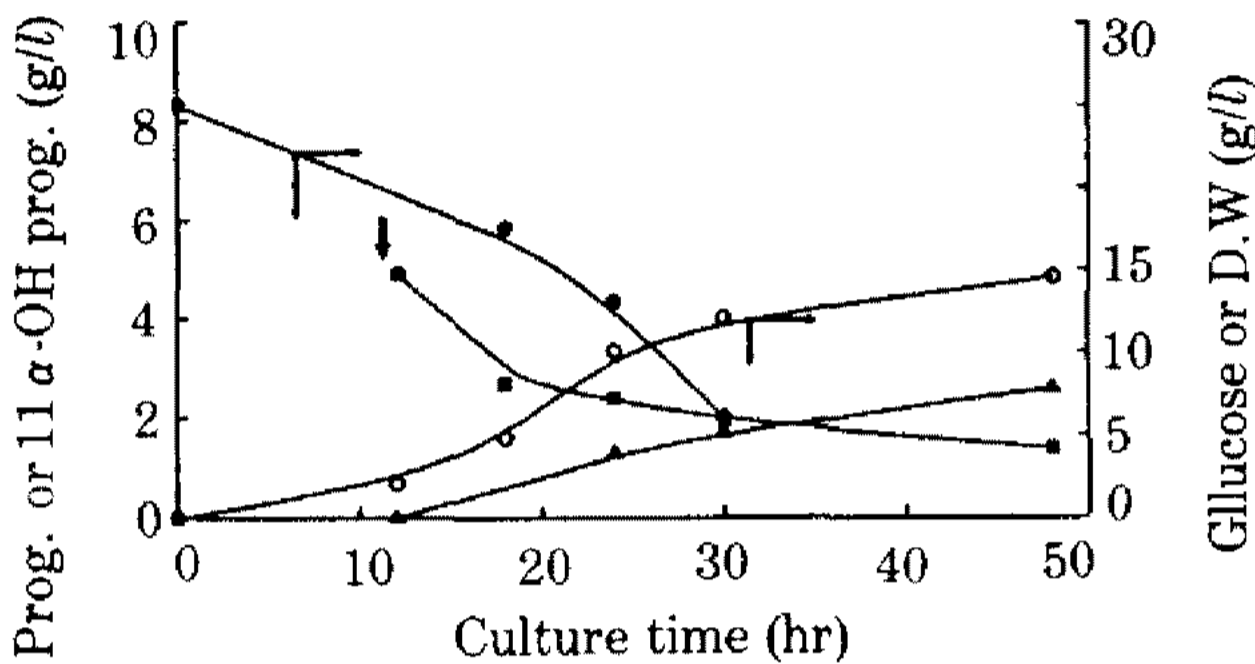


Fig. 2. Time course of 11α-hydroxylation of progesterone.

Progesterone (5g/l) was added at arrow indicated. Symbols: ○; Dry weight, ■; Progesterone, ●; Glucose, ▲; 11α-hydroxyprogesterone

양한 후에 과량의 기질을 첨가했을 때에, 효소 유도체를 넣지 않고서 배양했을 때보다 생물전환이 더 높은 것으로 보고되었기 때문에 (10, 12, 13) 본 연구에서도 같은 방법으로 생물전환을 수행하였다.

생물전환의 기질인 progesterone은 물에 거의 녹지 않기 때문에 계면활성제인 Tween 80으로 분산액을 만들어 발효조 내로 첨가되는데 이 때 교반 및 통기속도가 높을 경우 거품이 많이 생겨서 문제가 된다(10). 반면에 11α-hydroxylation은 외부에서 공급된 산소를 이용하여 이루어지기 때문에 충분한 산소의 공급이 필요하다. 일반적으로 *Rhizopus nigricans*는 균사체끼리 서로 뭉쳐서 성장하는 경향이 강하므로 이를 막기 위해서는 높은 교반속도가 필요하다. 그리하여 본 연구에서는 위에 언급한 점을 고려하여 통기속도를 500 rpm과 0.5 vvm으로 정하였다. 이 조건에서 산소제한 현상은 일어나지 않았다.

발효조에서의 생물전환

최적화된 배지 및 조업조건하에서 progesterone 농도에 따른 전환수율 및 생산성을 조사하였다. 먼저 progesterone의 농도가 5g/l인 경우 11α-hydroxylation되는 과정과 포도당 소비 및 균체성장곡선 등이

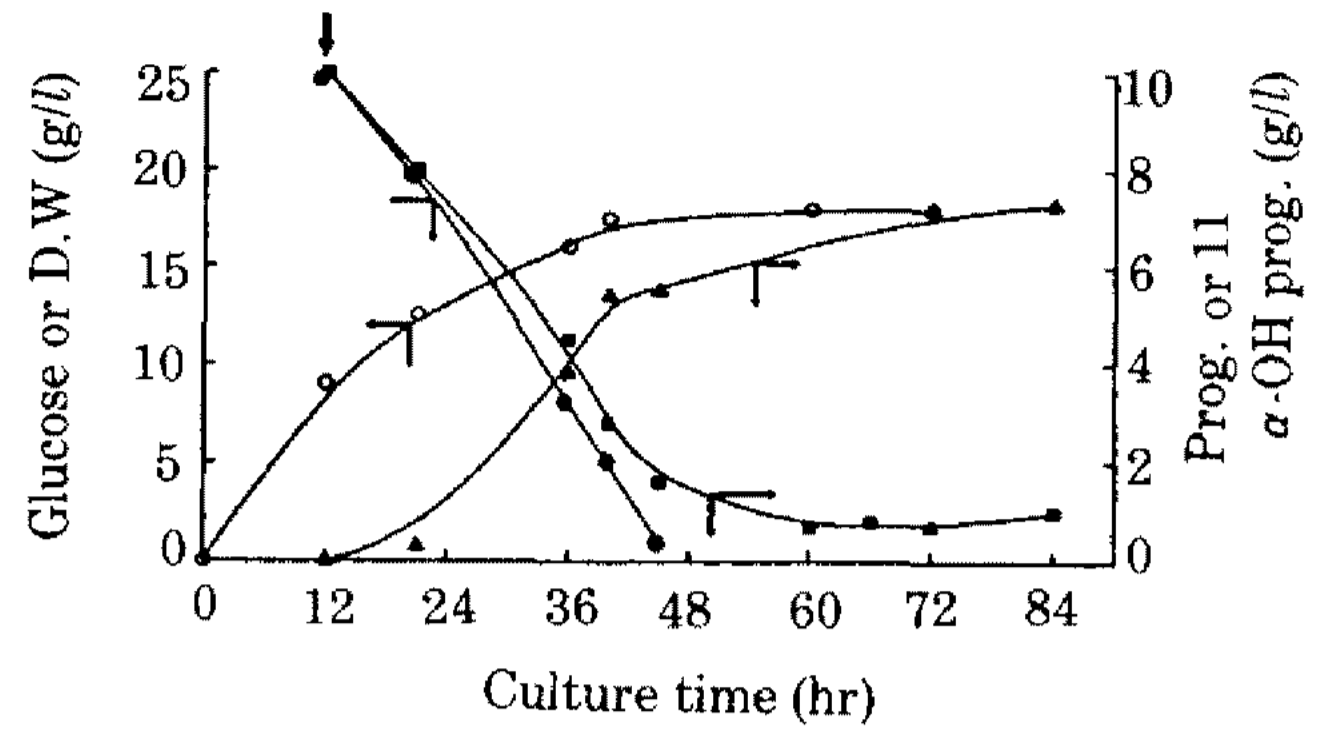


Fig. 3. Time course of 11α-hydroxylation of progesterone.

Progesterone (10g/l) was added at arrow indicated. Symbols: ○; Dry weight, ■; Progesterone, ●; Glucose, ▲; 11α-hydroxyprogesterone

Fig.2에 나타나 있다. 여기서 dry weight는 건조균체량과 중간에 첨가된 progesterone을 합한 것인데, 이는 progesterone의 농도가 높아지는 경우에 이를 제거하는 것이 어렵기 때문에 dry weight로부터 대강의 균체성장을 예측하였다. 배양 30 시간 정도에서 포도당이 거의 소모되었고 그 이후에는 생물전환속도가 현저히 낮아졌다. 11α-hydroxy progesterone의 생산은 2.6 g/l로 전환수율은 52%이었으며 최대생산성은 0.061 g/l/hr였다.

고농도의 progesterone에서 생물전환을 수행하기 위해 농도를 20g/l까지 높여서 실험하였다. 먼저 progesterone 농도가 10g/l인 경우 균체의 성장속도가 빠를수록 생물전환속도도 높았으며 균체의 성장이 최대에 도달한 후부터 생물전환속도는 매우 낮았다. 또한 이것은 탄소원의 소모와도 관계가 있어 포도당이 모두 소모된 이후의 생물전환속도는 매우 낮았다(Fig.3). Progesterone 농도가 10g/l에서의 전환수율은 약 76% 정도였고 최대생산성은 0.138g/l/hr였다. Progesterone 농도를 20g/l로 증대시켰을 때의 전환수율과 최대생산성은 각각 70%, 0.169g/l/hr로 나타났다(Fig.4).

Table 5에서는 progesterone 농도에 따른 11α-hydroxyprogesterone의 최대생산성을 계산하였는데 progesterone의 농도가 증가함에 따라 최대생산성이 증가하는 결과를 나타냈다. 이 경우 11α-hydroxylase의 역가를 갖는 균체량이 일정하다고 가정한다면 progesterone의 농도가 증가함에 따라 progesterone이 배양액으로 dissolution되는 속도가 증가함으로써 생산성이 증가한 것으로 생각할 수 있다. 즉, 물에 녹지않는 progesterone의 dissolution이 전체 생물전환공정

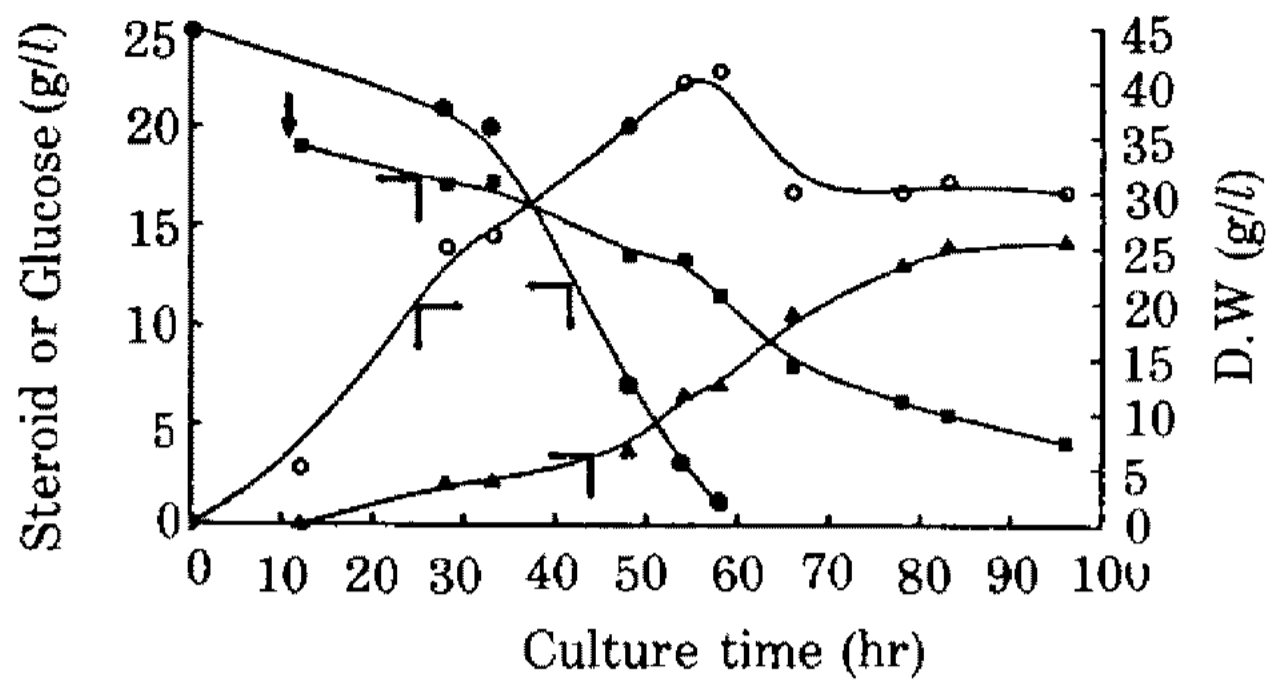


Fig. 4. Time course of 11α -hydroxylation of progesterone.

Progesterone (20g/l) was added at arrow indicated.
 Symbols: ○; Dry weight, ■; Progesterone, ●; Glucose, ▲; 11α -hydroxyprogesterone

Table 5. Effect of progesterone concentration on maximum productivity.

Progesterone (g/l)	Maximum productivity (g/l/hr)
2	0.027
5	0.061
10	0.138
20	0.169

의 limiting step이라고 생각할 수 있다. Progesterone의 dissolution 속도는 progesterone의 표면적에 비례하고 표면적은 progesterone의 농도에 비례하기 때문에 농도가 증가하면 dissolution 속도가 증가하여 생물전환속도가 증가하는 것으로 생각된다(11).

본 연구결과 생물전환속도와 균체의 성장과는 밀접한 관계가 있으며, 물에 거의 녹지않는 progesterone의 dissolution 속도를 증가시키는 것이 중요하므로 앞으로 이에 대한 연구를 수행할 계획이다.

요 약

부신피질호르몬 제조의 중요한 전구체인 11α -hydroxyprogesterone을 *Rhizopus nigricans*를 이용하

여 고농도의 progesterone 으로부터 고수율로 생산하기 위한 연구를 수행하였다. 생물전환수율을 최대로 하는 배지조성은 포도당과 casamino acid의 비율이 2:1인 것으로 관찰되었다. Progesterone은 Tween 80 용액에 분산시켜서 종균배양 후 12시간 정도 지나서 첨가하였을 때 전환수율이 높았다. Progesterone의 농도가 증가함에 따라 생산성이 증가하였고 progesterone이 20g/l일 경우 전환수율은 약 70% 정도였다.

참고문헌

- Peterson, D.H., H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weitraub, P.D. Meister and H.M. Leigh: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5933 (1952).
- Murray, H.C. and D.H. Peterson: *U.S. Patent* 2,602,769 (1952).
- Murray, H.C.: In *Industrial Microbiology* (B.M. Miller and W. Litsky, eds.), 79-105, McGraw-Hill, New York (1976).
- Dulaney, E.L., E.O. Stapley, and C. Hlavac: *Mycologia*, **47**, 464 (1955).
- Hanson, F.R. and W.D. Maxon: *U.S. Patent* 3,201,324 (1965).
- Weaver, E.A., H.E. Kinney and M.E. Wall: *Appl. Microbiol.*, **8**, 345 (1960).
- Miller, T.L.: In *Comprehensive Biotechnology* (Moo Young, M. ed.), Pergamon Press, Oxford, Vol. 3, 297-318 (1985).
- Weaver, E.A.: *U.S. Patent* 3,019,170 (1962).
- Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
- Hanisch, W.H., P. Dunnill and M.D. Lilly: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 555 (1980).
- Maxon, W.D., J.W. Chen and F.R. Hanson: *IEC Process Design Deveop.*, **5**, 285 (1966).
- Breskvar, K.: *J. Steroid Biochem.*, **18**, 51 (1983).
- Breskvar, K.: *J. Steroid Biochem.*, **14**, 395 (1981).
- Udvardy Nagy nee Cserey Pechany et al.: *U.S. Patent* 4,528,271 (1985).
- Bar, R.: *Trends Biotechnol.*, **7**, 164 (1989).

(Received January 19, 1990)