

Brevibacterium erythrogenes 에 의한 스테롤로부터 1,4-Androstadiene-3,17-dione 생성

이은아 · 이강만*

이화여자대학교 약학대학

The Production of 1,4-Androstadiene-3,17-Dione from Sterols by *Brevibacterium erythrogenes*

Lee, Eun-A and Kang-Man Lee*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Microbiological conversion of sterols to 17-ketosteroids has been recognized as a source for commercial preparation of steroidal drugs. For the purpose of strain development, we isolated microorganisms through enrichment culture method and identified an isolate strain. The strain was closely related to *Brevibacterium erythrogenes*. The optimal conditions for 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) formation were as follows; pH 7.4, lactose 0.2%, beef extract 0.2%, bentonite 0.5% in the cholesterol fermentation medium. Maximum production was obtained with the addition of α, α' -dipyridyl (1 mM, final conc.) at 17-20 hours after incubation.

스테로이드계 의약품은 피임제, 소염제, 갱년기 장애 조절제, 혈압강하 및 이뇨제 등으로 널리 사용되고 있는 중요한 의약품이다. 스테로이드계 의약품의 제조방법에는 화학적 방법을 이용한 전합성법과 천연의 스테롤로부터의 반합성법 그리고 미생물을 이용한 스테롤의 구조변환 방법이 있다.

전합성법과 반합성법은 스테로이드 분자의 많은 부재 탄소와 낮은 수율로 인해 실제로 사용되지 않으며 미생물을 이용하는 방법이 스테로이드계 의약품의 제조에 주로 사용되고 있다. 미생물을 이용하여 선택적으로 스테롤로부터 17-ketosteroid를 얻는 여러 방법들이 강구되어져 시도되고 있는데 그 중 하나로 스테롤 핵분해효소에 대한 저해제 첨가 방법이 있다(1-5). 이 방법은 미생물에 의한 스테롤 분해가 축쇄분해 뿐만 아니라 핵분해도 동시에 일어나므로 핵분해에 관여하는 효소를 저해하여 17-ketosteroid 생산을 증가시키고자 하는 방법이다. 이것은 Arima 등(1)의 연구를 토대로 널리 사용되고 있는 방법으로 Arima 등은 *Arthrobacter simplex* IAM 1660 이 콜레스테롤로부터 1,4-androstadiene-3,17-dione

(ADD)을 29%의 수율로 생성하였음을 발표하였다.

본 실험에서는 콜레스테롤을 기질로 하여 α, α' -dipyridyl 첨가에 의해 ADD를 생성하는 미생물을 한국 토양으로부터 분리하였고, 분리된 균을 동정하였으며 ADD를 생성할 수 있는 최적 배지조성 및 발효조건을 검토하였다.

재료 및 방법

집적배양을 통한 실험균주의 분리

토양시료를 각각 0.1%의 cholesterol을 함유하는 발효배지 3ml에 넣고 30°C에서 5일간 진탕배양하기를 2회 반복하였고 새로운 배지에 옮겨 20시간 배양한 뒤 일부를 취해 nutrient broth(NB) agar plate에 streaking하였고, 배양액에는 핵분해효소 저해제로 α, α' -dipyridyl을 1mM 농도가 되도록 가하여 그로부터 48시간 배양하였다. 대조균주로 동경대학 응용미생물연구소(IAM)로부터 분양받은 *Brevibacterium lipolyticum*(=*Pimelobacter simplex*) IAM 1398을 사용하여 ADD생성을 비교하였다.

배지 및 시약

key words: *Brevibacterium erythrogenes*, ADD, fermentation.

*Corresponding author

콜레스테롤 발효배지의 조성은 0.1% NH_4NO_3 , 0.025% K_2HPO_4 , 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% yeast extract, 0.1% cholesterol, 0.05% tween 80 으로 pH를 7.0으로 맞추고 멸균하여 사용하였다. 배지조성 및 발효조건의 검토에 사용한 종배양 배지는 cholesterol을 0.01로 줄인 발효배지를 사용하였다. 집적배양에 사용한 cholesterol은 Junsei Chem. Co. 제품을 사용하였고 발효조건의 검토에 사용한 cholesterol 및 다른 기질은 Sigma 제품을, α, α' -dipyridyl은 Hayashi Pure Chem. 제품을 사용하였다.

균주의 동정

Manual of Methods for General Bacteriology (6)을 참조하여 본 균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적, 배양학적 특성을 조사하였으며 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (8)에 준하여 동정하였다. DNA를 분리하여 T_m 을 측정하였으며 (9,10) 세포벽을 추출하여 peptidoglycan amino acid type을 확인하였다 (11, 12).

생성물의 확인 및 정량

최종 배양액을 동량의 ethyl acetate를 가해 추출하고 silica gel 60 GF₂₅₄ TLC plate를 105°C에서 30분간 activation시켜 시료 50 μl 과 ADD와 AD 표준액(1 mg/ml) 10 μl 그리고 cholesterol 표준액(1 mg/ml) 50 μl 을 점적하였다.

이 때 효소저해제인 α, α' -dipyridyl의 전개를 방지하기 위하여 점적부위의 1cm 윗 부분에 ethanol성 AgNO_3 용액을 점적하였다. 전개용매로 chloroform: ethyl ether (10:1 v/v)을 사용하였고 전개 후 UV 아래에서 ADD 및 중간 생성물의 흡수 spot을 확인하였으며, 10% H_2SO_4 를 분무하고 가열하여 발색시켜 cholesterol 및 생성물의 spot을 확인하였다.

생성물인 ADD의 정량은 GC법(13-16)을 사용하였다. Gas chromatograph(Hewlett Packard model HP 5890A)를 사용하여 10 ft 10% OV-101 whp 100/120 1/4" stainless column, FID detector, column temp.: 280°C, injector temp.: 300°C, detector temp.: 320°C, carrier gas: N_2 60 ml/min, sensitivity: range 8 att.2, injection vol.: 3 μl 의 분석조건에서 ethyl acetate로 추출한 발효생성물을 분석하고 동일조건에서 표준품 ADD를 사용하여 작성한 standard curve를 이용하여 그 peak area로부터 ADD의 양을 환산하였다.

배지조성 및 발효조건의 검토

스테롤의 종류에 따른 ADD로의 전환력을 살펴보기 위하여 기질을 바꾸어 실험균주에 대한 기질 특이성을 살펴보았다. 종배양배지에서 24시간 키운 균액을 각종 스테롤 0.1%를 함유하는 발효배지에 각각 0.5%의 농도로 접종하고 20시간 배양한 뒤 α, α' -dipyridyl을 1 mM 농도로 가하고 그로부터 68시간 배양하였다. 배양은 30°C에서 150 rpm의 속도로 진탕배양하였다.

배지조성의 검토를 위하여 발효배지의 유일한 탄소원인 cholesterol 외에 각종 당류를 0.2% 첨가한 배지를 조성하고 상기와 같은 방법으로 배양하여 ADD 생성을 검토하는 한편, 질소원으로 사용되고 있는 yeast extract 외에 각종 질소원을 0.2% 첨가한 배지를 제조하고 이에 대해서도 같은 방법으로 ADD 생성을 검토하였다. 멸균 전의 pH가 ADD 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배지조제의 pH를 조절하여 상기와 같은 방법으로 ADD 생성을 검토하였으며 효소 저해제인 α, α' -dipyridyl의 첨가시기를 변화시켜 ADD 생성에 미치는 영향을 검토하였다. 발효 중 흡착제가 생성물에 미치는 영향을 살펴보기 위해 흡착제를 배지에 첨가하고 멸균하여 상기와 같은 방법으로 배양하고 ADD 생성을 검토하였다.

결과 및 고찰

균의 분리 및 동정

집적배양 후 콜로니선별로 얻은 9개의 콜로니 중 TLC 상에서 가장 크고 선명한 ADD spot을 보이는 콜로니를 선택하여 9-15라 명명하고 실험균주로 사용하였다(Fig. 1). 이 균주는 GC로 정량시 대조로 사용한 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398이 32.76%의 conversion yield를 나타낼 때 21.76%의 ADD로의 conversion yield를 나타내었다.

이 9-15 균의 증식은 coccoid cell이 rod로 swelling되어 V 또는 Y자형의 rod를 이루고 이 rod의 fragmentation으로 다시 coccoid cell이 되는 rod-coccoid cycle을 통해 일어남을 볼 수 있었으며(Fig. 2) 이 균주에 대한 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성을 실험한 결과는 Table 1에 나타내었다. Rod-coccoid cycle을 통한 증식은 *Arthrobacter* sp.나 *Brevibacterium* sp.의 특징적인 성질로 9-15 균주 역시 이 두 속 중의 하나일 것으로 추정되었다. Cell wall peptidoglycan diamino acid로 *Arthrobacter* sp.는 lysine을 *Brevibacterium* sp.는 meso-diaminopimelic acid를 가지고 있는 것에 준하여

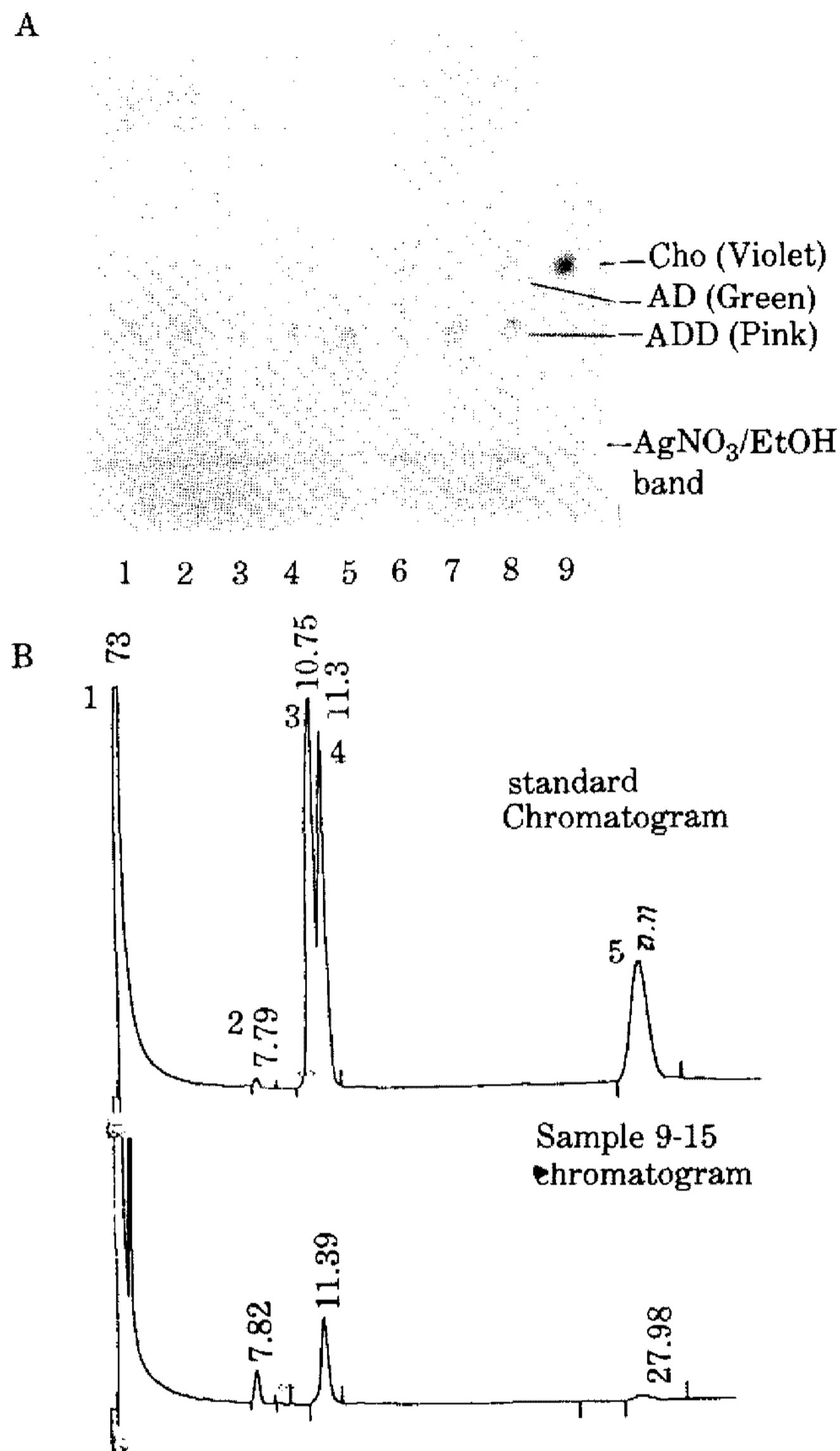


Fig. 1. Analysis of fermentation broth by TLC (A) and GC (B) method.

In figure A, 1:9-8, 2:9-19, 3:9-6, 4:9-18, 5:9-15, 6:9-54 strain, 7: *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398, 8: Standard 4-androstene-3, 17-dione (AD) and 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD), 9: cholesterol. In figure B, 1 & 2: solvent peak, 3: AD, 4: ADD, 5: cholesterol peak.

Table 1. The morphological, cultural and biochemical characteristics of strain 9-15 and *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398 (B. 1398).

Morphological characteristics	9-15	B. 1398
Shape	coccoid	coccoid
Color of colony on NB	light pink	yellow
Motility	negative	negative
Gram staining	positive	positive
Acid fast staining	negative	negative
Spore staining	negative	negative
Growth	rod-coccoid cycle	rod-coccoid cycle
Cultural and biochemical characteristics		
Catalase activity	positive	positive
Nitrate reduction	positive	positive
Acid formation from glucose	negative	negative
Penicillin G resistancy	negative	negative
Pasteurization TM (°C)	98.44* (85**)	99.16* (86.5**)
Peptidoglycan amino acid	m-DAP***	m-DAP***

*The Tm values are measured by following the absorbance at 260 nm as a function of temperature of DNA solution and taking the midpoint of the hyperchromic rise. Solvent was saline-sod. citrate buffer (pH 7.0)

**The Tm values are measured by same method. Solvent was TEN buffer.

***Meso-diaminopimelic acid.

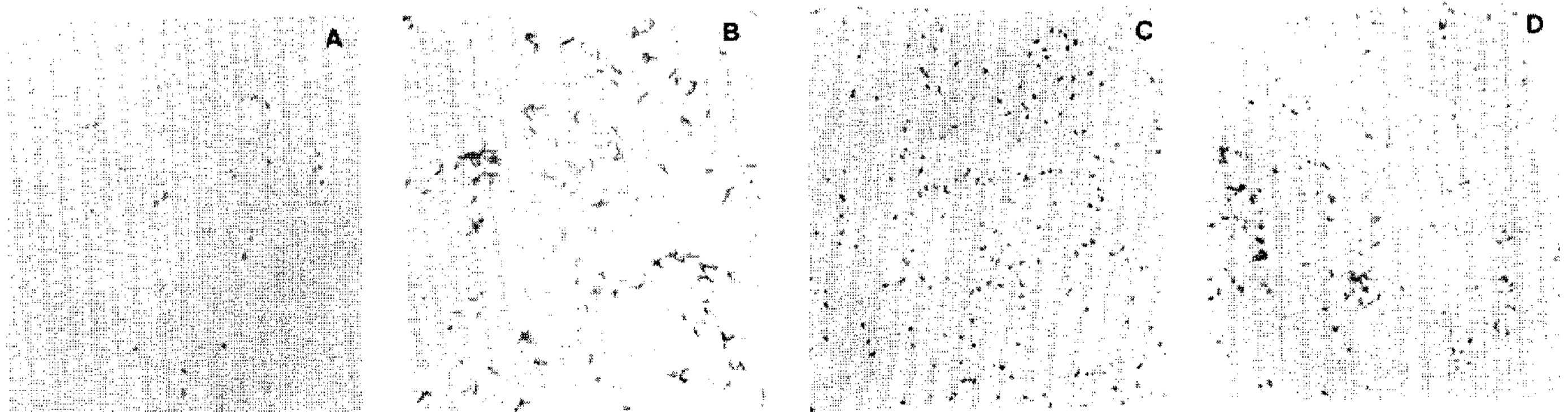


Fig. 2. Rod-coccoid cycle of strain 9-15 when grown in nutrient broth medium at 30°C (400×). A, after 6 h; B, after 9 h; C, after 24 h; D, after 3 days incubation

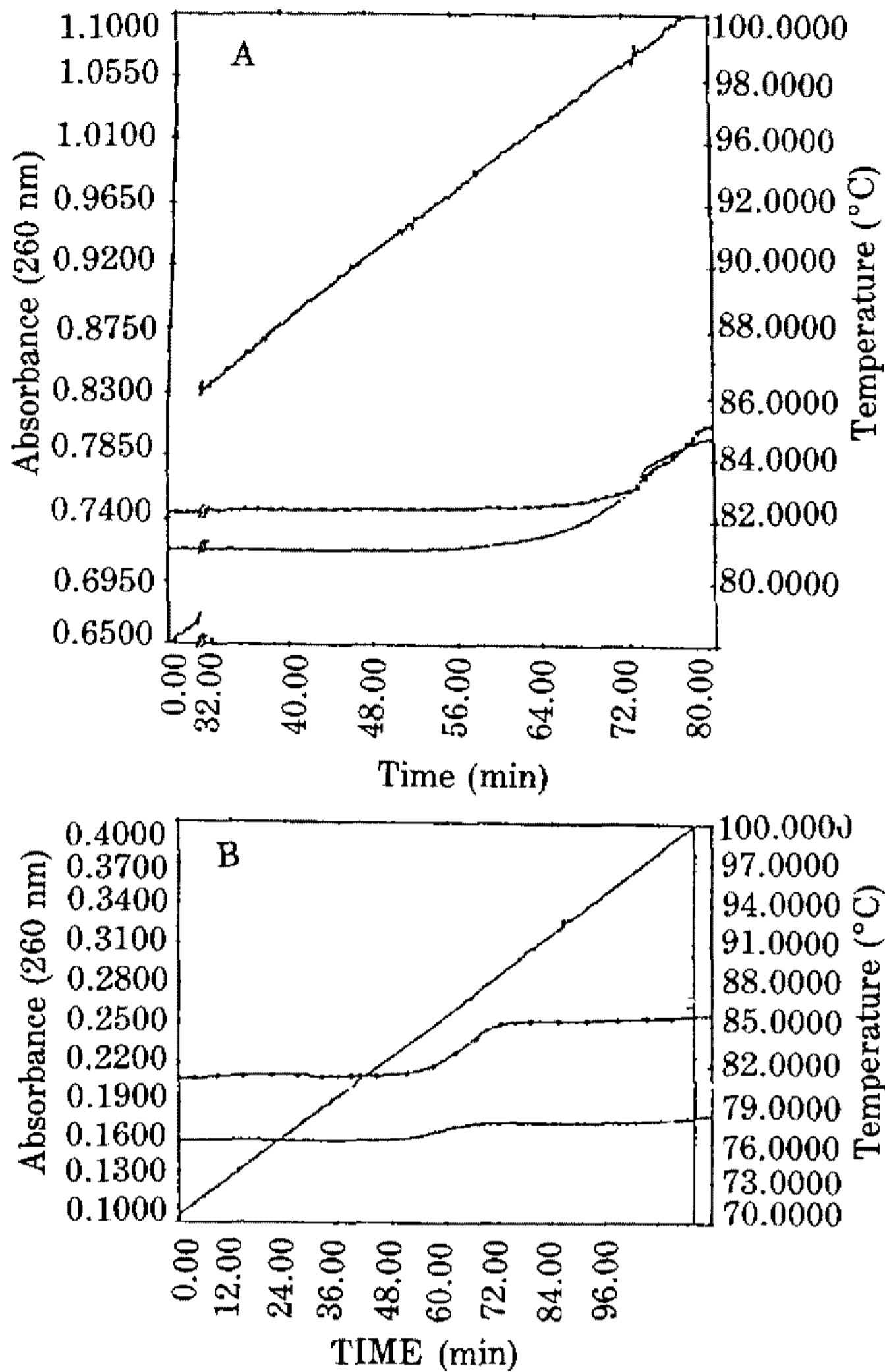


Fig. 3. The melting curve of DNA

—: *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398
 - - - : Strain 9-15

Solvent: A: Saline-sod. citrate buffer (pH 7.0)

B: TEN buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7.6)

Instrument: UV-Vis microprocessor-controlled spectrophotometer system 2600 (Gilford)

Temperature increasing rate: 0.25°C/min.

9-15 균주를 *Brevibacterium* sp. 일 것으로 추정하였으며 light pink의 콜로니 색깔을 고려하여 *Brevibacterium erythrogenes*로 동정하였다(7). SSC buffer에 DNA를 녹여 T_m 을 측정하고 GC content를 측정한 결과 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398은 72.8%, 9-15 균주는 71.6%를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

기질 특이성의 검토

탄소원으로 쓰이는 기질의 선택에 따라 스테롤의 미생물학적 전환이 큰 영향을 받으므로 기질을 각각 β -sitosterol, stigmasterol, progesterone, pregnenolone,

Table 2. The conversion yield from sterols by strain 9-15.

Sterols (0.1%)	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
Cholesterol	0.172	23.39
β -Sitosterol	0.059	8.63
Stigmasterol	0.032	4.35
Progesterone	0.33	36.96
Pregnenolone	0.27	29.97
Lithocholic acid	0.026	3.43

Table 3. Effect of additional carbon source on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

Carbon source (0.2%)	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
Glucose	0.071	9.66
Fructose	0.142	19.31
Sucrose	0.156	21.22
Galactose	0.516	21.22
Maltose	0.150	20.40
Lactose	0.158	21.49
Xylose	0.116	15.78
Mannitol	0.155	21.08
*Control	0.146	19.86

*No sugar addition

lithocholic acid로 바꾸어 주어 ADD 생성을 검토하였다. Table 2와 같이 천연의 스테롤 중에는 콜레스테롤이 가장 ADD 생성이 높으며 그외에 progesterone, pregnenolone도 각각 측쇄가 제거되어 ADD를 ~37%, ~30%의 수율로 생성하였다.

배지조성의 검토

콜레스테롤 외에 각종 당류를 0.2% 첨가한 배지를 사용하였을 때 Table 3에서 보는 바와 같이 lactose의 첨가가 ADD 생성의 증가를 가져왔으며 각종 질소원을 0.2% 더 첨가하였을 때는 beef extract의 첨가가 26.93%의 conversion yield를 나타내어 가장 첨가효과가 높음을 Table 4에서 볼 수 있었다.

발효조건의 검토

멸균 전에 조제하는 배지의 pH를 6.0에서 7.8까지 변화시켜 배지를 조제하여 멸균하고 배양 후 ADD 생성

Table 4. Effect of additional nitrogen source on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

Nitrogen source (0.2%)	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
Malt extract	0.158	21.49
polypeptone	0.190	25.84
Beef extract	0.198	26.93
Corn steep liquor	0.184	5.02
Tryptone	0.186	25.31
Molasses	0.185	25.16
Bacto soytone	0.183	24.89
Control	0.146	19.86

Table 5. Effect of the initial pH of the medium on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

pH	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
6.0	0.094	12.78
6.2	0.097	13.17
6.4	0.106	14.42
6.6	0.120	16.32
6.8	0.116	15.78
7.0	0.148	20.13
7.2	0.169	22.98
7.4	0.174	23.66
7.6	0.162	22.03
7.8	0.169	22.98

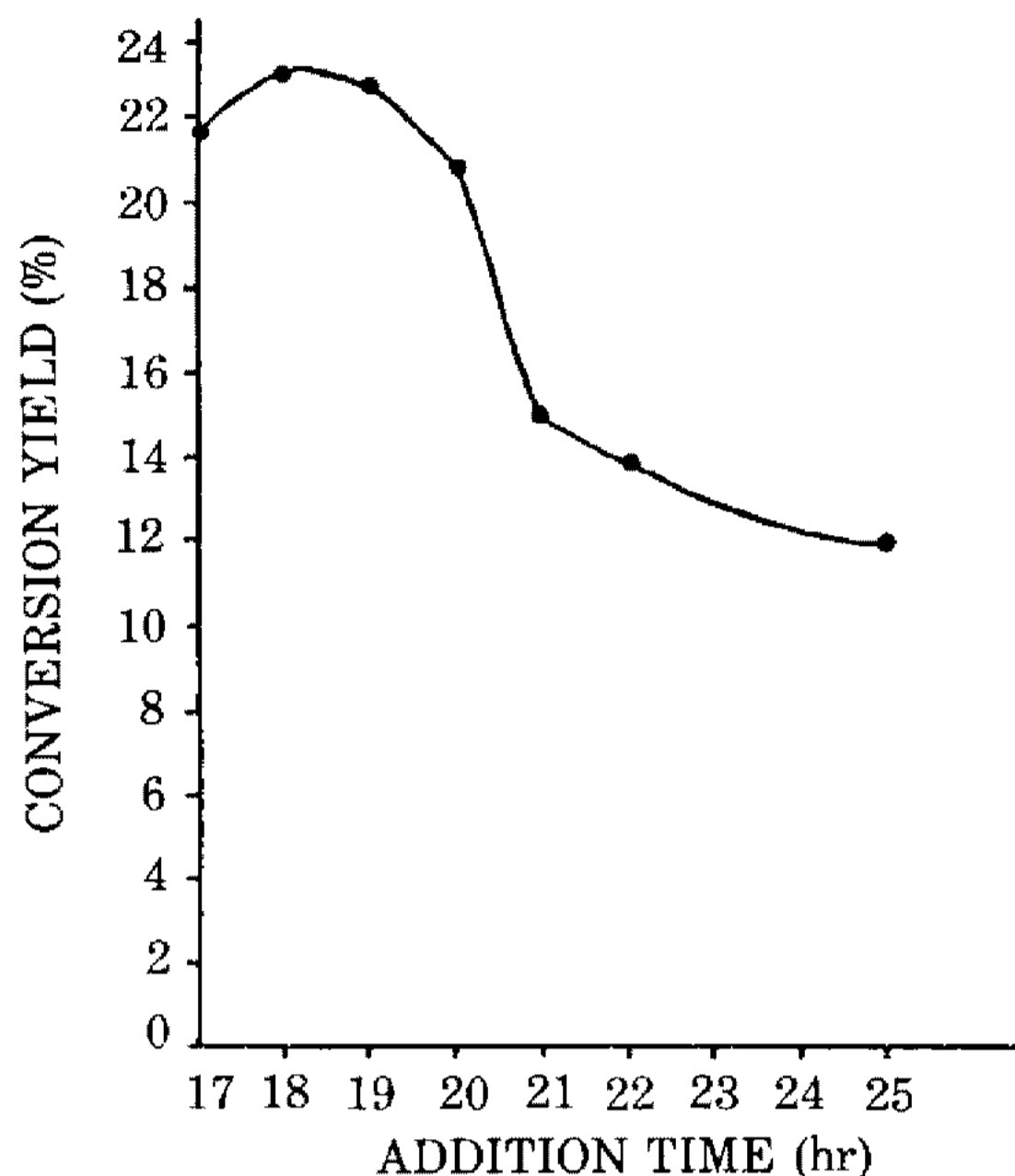


Fig. 4. Effect of α, α' -dipyridyl addition time on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

Table 6. Effect of adsorbent addition on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

Material	added (%)	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
Alumina	0.5	0.114	19.58
	0.1	0.54	20.94
MgO	0.5	0	0
	0.1	0	0
Silica gel	0.5	0.081	11.02
	0.1	0.105	14.28
Control		0.142	19.31

Table 7 Effect of bentonite addition on 1, 4-androstadiene-3, 17-dione (ADD) production.

Concentration (%)	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
0.5	0.188	25.57
1.0	0.158	21.49
1.5	0.125	17.41
2	0.122	16.59
4	0.095	12.92
Control	0.154	20.94

을 살펴본 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 최적 pH는 7.4임을 볼 수 있었다. 그리고 pH7 이상에서 ADD 생성이 비교적 안정적이었으며 pH7 이하로 점차 감소함에 따라 ADD 생성이 현저하게 감소함을 볼 수 있었다. 효소저해제로 첨가하는 α, α' -dipyridyl(1 mM)의 첨가시기를 20 시간에서 각각 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 25 시간으로 변화시켜 ADD 생성을 살펴본 결과(Fig. 4) α, α' -dipyridyl의 첨가시기는 17 시간에서 20 시간 사이가 적합함을 볼 수 있었다. 흡착제가 배지 중의 기질이나 생성물을 적당히 흡착함으로써 ADD 생성에 어떤 증가효과를 가져올 것을 기대하여 배지에 alumina, MgO, silica gel G, bentonite를 각각 농도별로 첨가하여 평균하고 배양한 결과 Table 6, 7과 같은 결과를 얻었다. Bentonite 0.5%의 첨가에서

25.57%의 conversion yield를 얻어 대조실험에 비해 ADD 생성의 증가를 볼 수 있었다.

요 약

한국의 토양으로부터 17-ketosteroid인 ADD를 생성하는 미생물을 분리하여 동정하고 배지조성 및 발효조건을 검토하였다.

집적배양법을 통하여 효소저해제 첨가법에 의해 ADD를 생성할 수 있는 미생물을 분리, 선별하여 9-15 라 명명하였다. 이 균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성 및 DNA의 T_m 을 측정된 결과 *Brevibacterium erythrogenes*로 동정하였다.

ADD 생성의 최적 배지조건 및 발효조건을 검토한 결과 0.1% 콜레스테롤을 함유하는 발효배지에 lactose 0.2%, beef extract 0.2%, bentonite 0.5%를 첨가하고 pH를 7.4로 맞추어 멸균하여 배양 후 18시간에 효소저해제인 α, α' -dipyridyl(1 mM)을 첨가하고 발효시키는 것이 최적 조건임이 검토되었다. 이 조건에 따라 ADD 생성을 검토한 결과 27.3%의 전환수율을 얻었으며, 한편 대조실험인 pH7의 0.1% cholesterol 발효배지를 사용하고 배양 후 20시간에 α, α' -dipyridyl을 가하는 배지 및 발효조건으로 배양한 경우는 18.5%의 전환수율을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 수행되었음을 감사드립니다.

참고문헌

1. Nagasawa, M., M. Bae, G. Tamura and K. Arima:

- Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1644 (1969).
2. Nagasawa, M., N. Watanabe, H. Hashiba, G. Tamura and K. Arima: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 798 (1970).
3. Martin, C.K.A. and F. Wagner: *Eur. J. Appl. Microbiol.* **2**(4), 243 (1976).
4. Martin, C.K.A.: *Adv. Appl. Microbiol.* **22**, 29 (1977).
5. Martin, C.K.A. and U. Schoemer: *Biotechnol. Bioeng.* **22** suppl 1, 11 (1980).
6. *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology (1981).
7. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Wilkins Co. (1974) pp 490-503.
8. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore. (1986) p.128 & pp.1301-1307.
9. Rodriguez, R.L. and R.C. Trait: *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*: Massachusetts, Addison-Wesely Publishing Co., 162 (1983).
10. Marmur, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, **5**, 109 (1962).
11. Schleifer K.H. and O. Kandler: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407 (1972).
12. Harper J.J. and G.H.G. Davis: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 56 (1979).
13. Prome, D., C. Lacave, B. Monsarrat, H. David and J. Caude: *Biochim. Biophys. Acta.*, **753**, 60 (1983).
14. 배 무, 이강만, 강경희: KIST 보고서 BSE 4632 a, b (1979, 1980).
15. 이강만, 배 무: *Yakhak Haeji* **31**, 402 (1987).
16. 최인화, 이강만: *Yakhak Haeji* **33**, 345 (1989).

(Received May 18, 1990)