

*Arthrobacter simplex*의 Steroid Δ^1 -dehydrogenase의 유도와 유도성 스테로이드의 성질

배 무* · 오영주 · 민태경 · 이미경
이화여자대학교 생물과학과

The Induction of Steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* IAM 1660

Bae, Moo*, Young-Joo Oh, Tai-Gyong Min and Mi-Kyung Lee

Department of Biological Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract — Since steroid Δ^1 -dehydrogenase synthesis has been known to be inducible, the mechanism of the enzyme induction of *Arthrobacter simplex* IAM 1660 was investigated. Among various steroids tested for inducers, hydrocortisone was the most effective inducer when hydrocortisone was used as a substrate for steroid Δ^1 -dehydrogenase. Steroid Δ^1 -dehydrogenase synthesis was effectively induced by progesterone, prednisolone and androstenedione, while the enzyme was less induced by cholesterol and not by phytosterols. The results suggest that the presence of 3-keto group and short side chain of steroids are the favorable factors for the induction of the Δ^1 -dehydrogenase synthesis. The enzyme was induced at the highest level when hydrocortisone was added at early log phase to the concentration of 0.01% of the culture and the culture was grown for 15 hours.

스테로이드 모핵의 Δ^1 -dehydrogenation은 1953년 Fried, Thoma에 의해 몇몇 세균에서 수행됨이 처음으로 보고되었다(1). 그 후 많은 종류의 미생물에서 스테로이드 Δ^1 -dehydrogenase가 생성됨이 알려졌고(2-4), 세포내의 존재 위치는 막결합 효소이며 일부 가용효소로 생각되고 있다(5-7). 스테로이드 모핵의 미생물학적 분해는 Δ^1 -dehydrogenation과 α -hydroxylation이 선행된다는 제안이(9) 있어 그 모핵분해에 본 효소가 중요시 되고 있다.

스테로이드 Δ^1 -dehydrogenase는 prednisolone 등 소염제 제조에 세균 세포상태로 이용되고 있는데 기질인 hydrocortisone을 첨가하여 효소를 유도하는 방법으로 생성시키고 있다(9-12). 일반적으로 이용되고 있는 균주 *Arthrobacter simplex*는 hydrocortisone 등 기질을 완전히 분해시키는 능력을 지니고 있으며,

유도물질의 어떠한 구조적 특성에 의해 효소가 유도되는지는 아직 불분명하다. 1986년 Pousette는 *Pseudomonas testosteroni*에서 Δ^1 -dehydrogenase를 유도하는 스테로이드의 세포수용기를 찾는 연구를 시도하여 methyltrienolone이 유도성이 있음을 제시하였다(13).

본 연구에서는 본 효소유도성이 있는 스테로이드의 종류와 그 구조적 성질에 관하여 연구한 바를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

Arthrobacter simplex IAM 1660을 cholesterol 분해능을 조사한 후 사용하였다.

Δ^1 -dehydrogenase의 유도실험에 사용한 액체배지는 0.1% NH_4NO_3 , 0.025% K_2HPO_4 , 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% yeast extract(pH 7.3)의 조성이었다(17).

Key words: Steroid Δ^1 -dehydrogenase, *Arthrobacter simplex*.

*Corresponding author

30°C에서 10% 농도로 접종하고 일정시간 동안 진탕 배양한 후 각종 유도물질들을 첨가하였다.

스테로이드 분석

반응액을 동량의 ethyl acetate로 두번 추출하여 sodium sulfate anhydrous로 수분을 제거하고 rotary evaporator나 질소 gas로 증발시킨 후 absolute ethanol에 녹여 thin layer chromatography로 기질과 산물을 분석하였다. 각 반응 추출물들을 대조용 표준품과 함께 Kieselgel 60GF 254(Merck) plate에 점적하고 benzene-dioxane(2:1) 혹은 chloroform-diethyl ether(10:1)의 용매계를 사용하여 전개하였다(15). 각 반점의 자외선 흡수, 황산분무 후 가열했을 때의 발색 등을 표준품과 비교하여 각 스테로이드 물질들을 동정하였다.

반응산물의 정량분석

기질로서 hydrocortisone을 사용하였을 경우 반응산물인 prednisolone의 양을 densitometer(DESAGA CD60, Heidelberg)를 사용하여 chromatogram의 peak area로부터 정량 분석하였다

Δ^1 -dehydrogenase 유도의 측정

유도물질을 첨가하고 일정시간 동안 배양한 5 ml의 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer로 2회 세척한 후 균체를 동일한 buffer 5 ml에 현탁하여 유도 측정 효소원으로 사용하였다. 효소 유도의 정도는 기질로서 hydrocortisone을 첨가하였을 때 생성된 prednisolone의 양으로부터 측정하였다.

효소활성의 측정

균체 현탁액 5 ml에 소량의 methanol에 녹인 hydrocortisone을 최종농도 1 mg/ml가 되도록 첨가하고 30°C에서 일정시간 동안 진탕반응시킨 후 추출하여 생성된 prednisolone의 양으로부터(μ mole) 효소활성을 측정하였다.

Δ^1 -dehydrogenase의 기질특이성

*A. simplex*의 종배양액을 새로운 액체배지에 10%의 농도로 접종하여 4시간 진탕배양한 후 hydrocortisone을 0.01% 농도로 첨가하고 15시간 동안 진탕배

양하였다. 균체를 회수하고 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer에 현탁하여 효소액으로 하였고 기질로서 cholesterol, cholestenone, testosterone, progesterone을 각각 0.1%의 농도로 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 진탕하며 반응시킨 후 ethyl acetate를 가하여 2회 추출하여 TLC로 정량 분석하였다.

결과 및 고찰

***Arthrobacter simplex* 균체의 증식과 Δ^1 -dehydrogenase의 유도**

유도물질로서 hydrocortisone을 포함한 배지에 접종하여 30°C에서 진탕배양하였을 때의 균체의 증식과 효소의 유도를 일정시간 간격으로 조사하였다(Fig. 1). 효소의 유도는 균체의 증식과 거의 동시에 시작되고 계속 증가하여 대수증식기 말기나 정지기 초반에 최대치를 나타내었다.

각종 스테로이드 유도효과

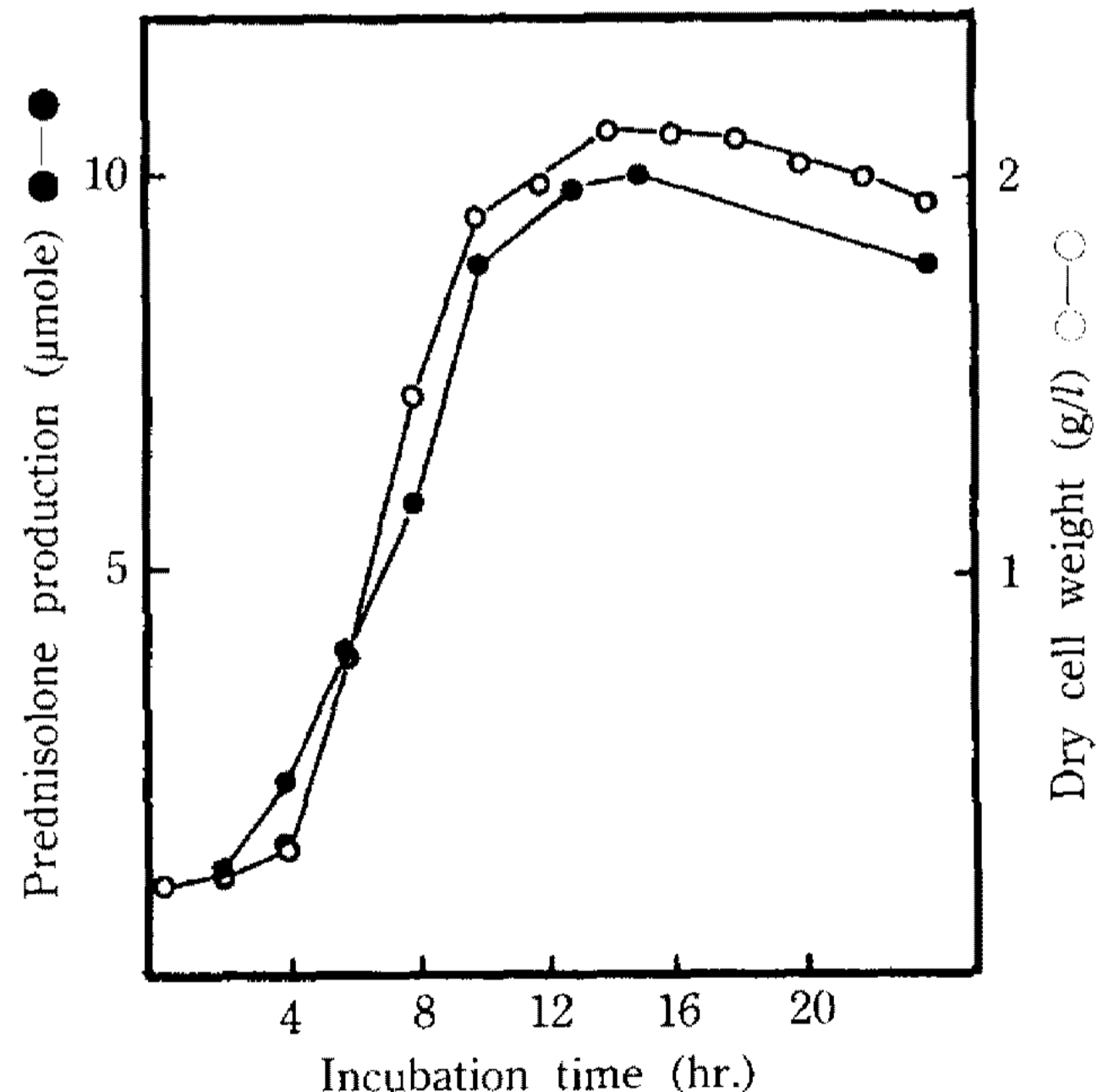


Fig. 1. Dependence of the total Δ^1 -dehydrogenase induction from *A. simplex* on the length of the culture. *A. simplex* IAM 1660 was grown in 0.1% NH_4NO_3 , 0.025% K_2HPO_4 , 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% yeast extract (pH 7.3) at 30°C. Hydrocortisone was added to the concentration of 0.05% before inoculation. The induction of the enzyme was determined by the production of prednisolone from hydrocortisone. The amount of prednisolone was analysed on thin layer plate using densitometer (DESAGA CD60, Heidelberg)

Table 1. Induction of steroid Δ^1 -dehydrogenase by various steroids by *Arthrobacter simplex*

Inducer	Conversion ratio(%)
None	0
Androstadienedione	51
Androstendione	63
Androsterone	51
Cholestenone	17
Cholesterol	37
Cholesterol acetate	4
Ergosterol	0
β -esteradiol	0
Ethisterone	44
Hydrocortisone	73
Hydrocortisone acetate	42
17 α -hydroxyprogesterone	59
Norethynodrone	35
Prednisolone	67
Prednisone	67
Pregnenolone	53
Progesterone	69
β -sitosterol	0
Stanolone	59
Stigmasterol	0
Testosterone	60

substrate; hydrocortisone

각 스테로이드 0.05%를 포함한 액체배지에 종배양을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하여 충분히 효소를 유도시킨 후 효소반응의 기질로서 hydrocortisone을 사용하여 유도효과를 조사하였다(Table 1). 유도의 정도는 기질량을 100%로 하였을 때 생성된 prednisolone의 양을 백분율로 나타내어 전환율(conversion rate)로서 표시하였다.

유도효과는 hydrocortisone이 가장 좋았고 progesterone, prednisolone, prednisone, androstenone 등도 비교적 높은 효과를 보였으나, ergosterol, β -sitosterol, stigmasterol 등의 스테롤류는 전혀 유도효과가 없었고 estradiol도 유도효과가 없었다.

이러한 결과로부터 스테로이드 Δ^1 -dehydrogenase의 유도물질은 공통적으로 스테롤 측쇄가 없거나 간단한 측쇄를 가지며, 스테로이드 C-3에 ketone group이 존재하거나 cholesterol과 같은 경우는 3-hydroxysteroid oxidase에 의해 3-hydroxy group이 산

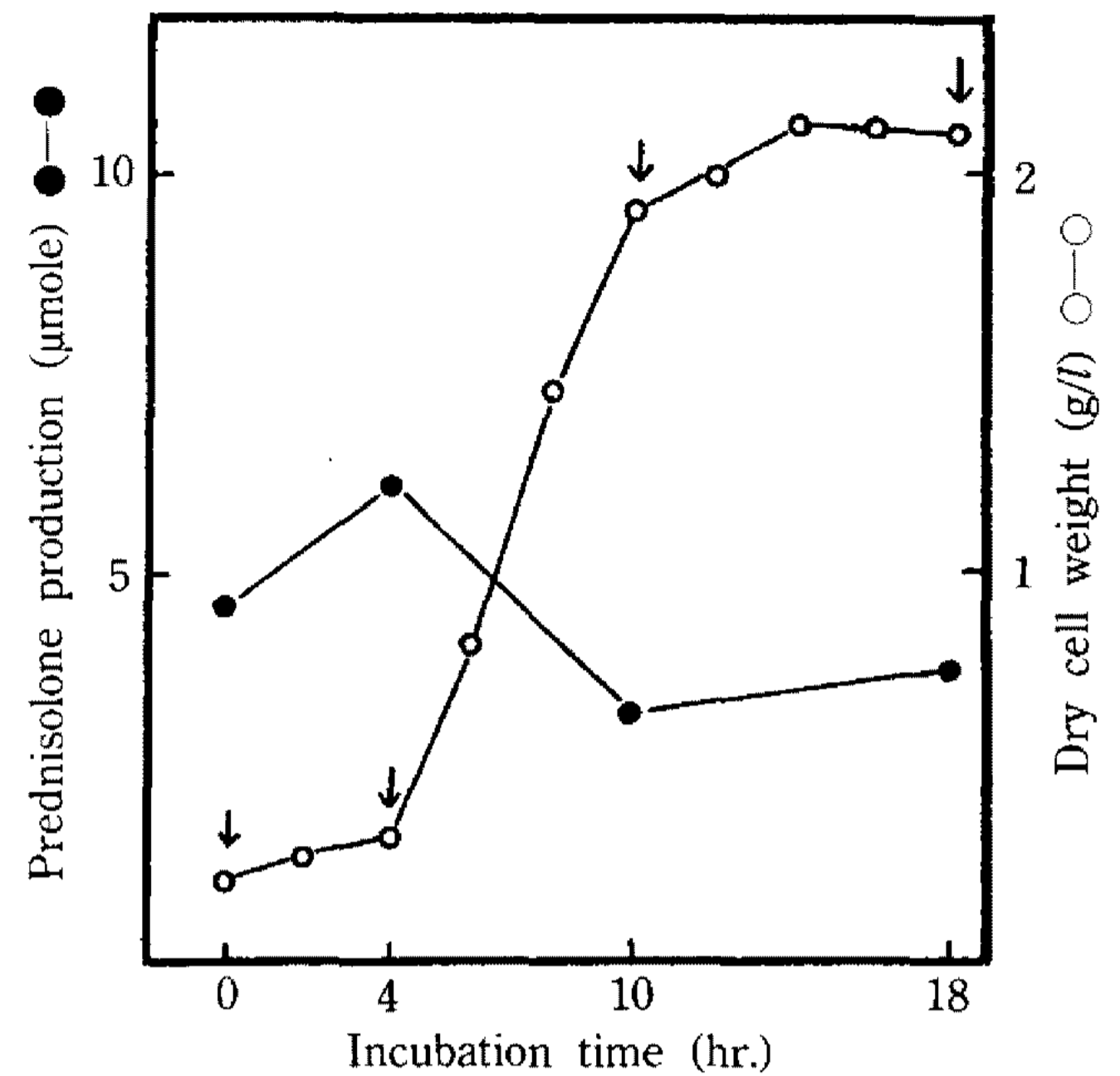


Fig. 2. Optimum addition time of inducer on Δ^1 -dehydrogenase induction.

↓ indicates addition of hydrocortisone

화될 수 있는 구조를 가지는 것으로 나타났다. *Pseudomonas*에서 유도물질로 밝혀진 methyltrienolone도 역시 3-keto group과 짧은 측쇄의 조건을 가지고 있다(13).

유도물질 첨가시기의 영향

가장 유도효과가 높았던 hydrocortisone의 첨가시기에 따른 유도효과를 검토하였다(Fig. 2). 배양개시 전, 배양개시 4시간 후, 10시간 후, 18시간 후에 각각 0.05%의 농도로 첨가하고 24시간 동안 효소를 유도시킨 결과 대수증식기 초기인 4시간 후에 첨가하는 것이 가장 높은 유도효과를 나타내었다. β -hydroxysteroid oxidase도 배양 초기에 유도물질을 첨가하는 것이 효과적임을 보고되었다(15).

유도시간의 영향

배양초기에 0.05%의 hydrocortisone을 첨가하고 각각 6, 12, 15, 24, 48, 72시간 동안 유도시켰을 때 유도효과를 검토한 결과 유도시간을 15시간으로 하였을 때 가장 높은 유도를 나타내었고 24시간 이후부터는 효과가 감소하였다(Fig. 3).

유도물질 농도의 영향

배양액에 첨가하는 유도물질의 농도는 inducible

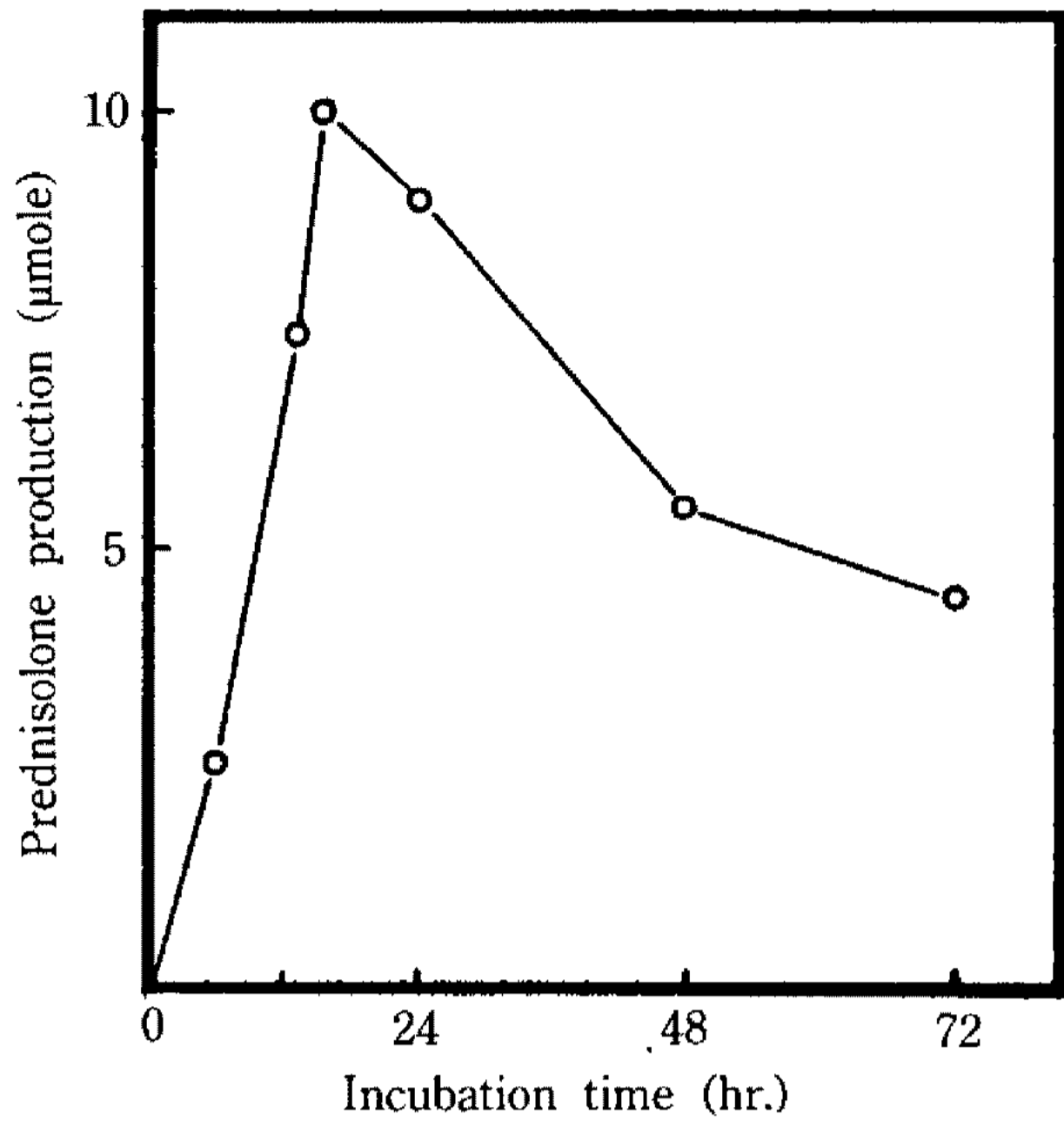


Fig. 3. Optimum induction period of Δ^1 -dehydrogenase by hydrocortisone in the culture of *A. simplex*.

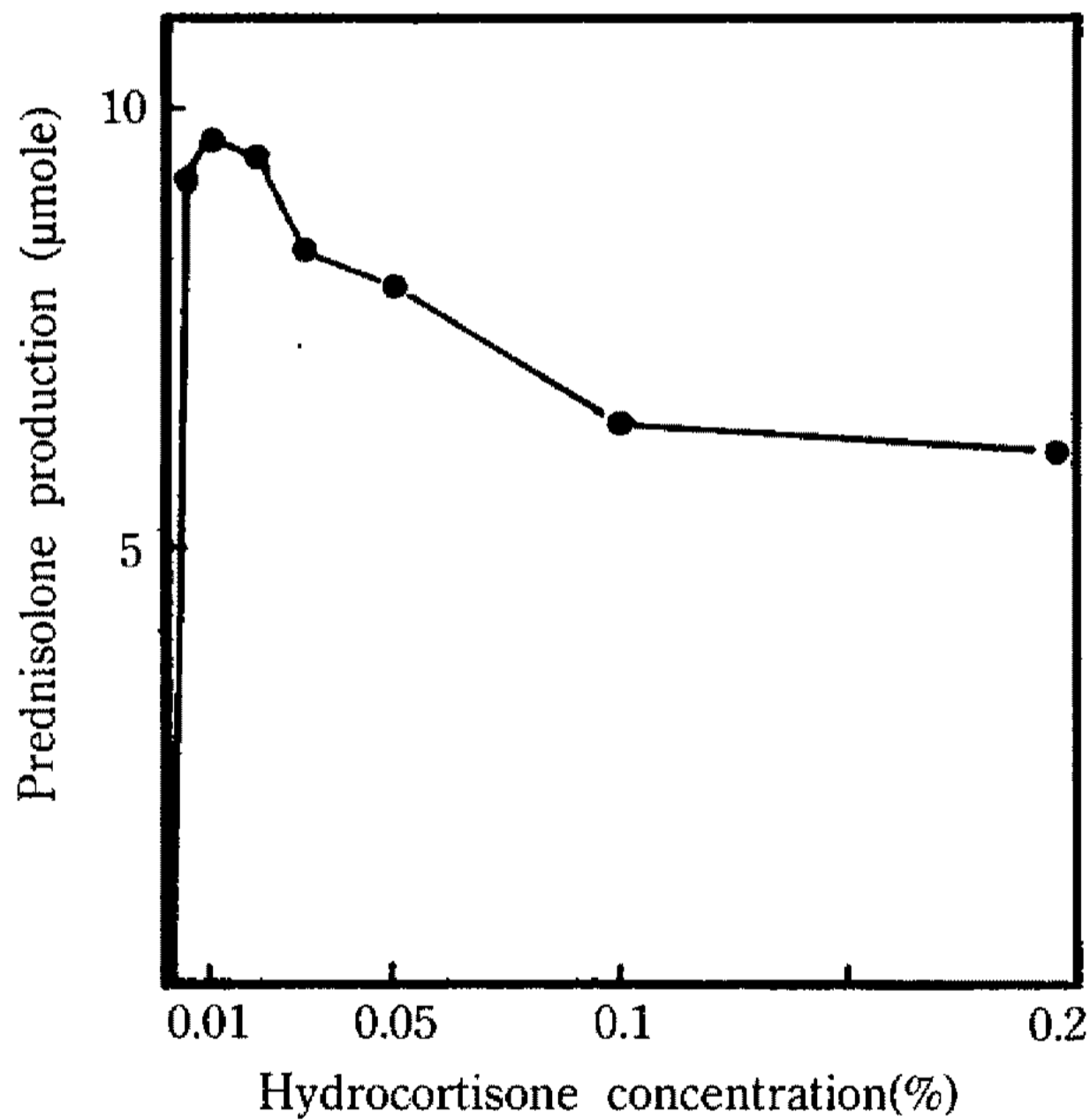


Fig. 4. Effect of hydrocortisone concentration on the induction of Δ^1 -dehydrogenase. From the results of preceding experiments hydrocortisone was added to the culture 4 hour after inoculation and the culture was induced for 15 hours.

steroid-transforming enzyme의 생성에 영향을 미치기 때문에(16) hydrocortisone 농도에 따른 유도효과를 검토하였다(Fig. 4). 배양 개시 4시간 후에 hydrocortisone의 농도를 각각 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2%로 첨가하고 15시간 동안 유도시킨 후 효과를 측정하였을 때 0.01%의 농도가 가장 높은

Table 2. Effect of surfactants on Δ^1 -dehydrogenase induction in culture of *A. simplex*

Surfactants		Relative conversion ratio(%)
Tween 40	0.05%	96
	0.1%	121
	Control*	100
Tween 80	0.05%	107
	0.1%	125
	Control*	100

* Without addition of surfactant

유도효과를 나타내었고 농도가 높아짐에 따라 오히려 효과가 감소하였다.

계면활성제의 첨가효과

물에 잘 녹지 않는 hydrocortisone이 배지 중에서 균일한 상태를 유지하면서 균체와의 접촉을 원활하게 할 목적으로 계면활성제의 효과를 조사하였다. 배양액에 0.01%의 hydrocortisone과 Tween 40, Tween 80을 각각 0.05%, 0.1%의 농도로 첨가하고 15시간 동안 효소를 유도시킨 후 유도효과를 측정하였다(Table 2). 첨가된 계면활성제로 효과가 가장 좋았던 것은 Tween 80 0.1%로 첨가하지 않았을 때보다 25%의 증진을 보였다.

효소 유도시 온도와 pH의 영향

Δ^1 -dehydrogenase 유도에 대한 초기 pH의 영향을 검토하였다(Fig. 5). 배지의 pH는 10 mM의 phosphate buffer를 사용하여 각각 pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0로 맞추었고 유도물질은 배양개시 4시간 후에 0.01%의 농도로 첨가하여 15시간 동안 유도시켰다. 최적 pH는 6.5로 나타났고 pH 7.0에서 8.0까지도 비교적 효과적이었으며 pH 6.0 미만에서는 급격히 유도효과가 감소하였다.

배양온도를 각각 25, 30, 35, 40°C로 하여 4시간 동안 배양하고 hydrocortisone 0.01%를 첨가하여 15시간 동안 유도시킨 후 각 온도에서의 증식을 비교하였고 효소의 유도를 측정하였다. 균체의 최적 증식온도와 최적 유도온도는 모두 30°C였으며 증식은 35°C보다 25°C가 좋았던 반면 효소의 유도는 25°C보다 35°C가 더욱 높은 효과를 나타내었다. 온도가 40°C로 상승하

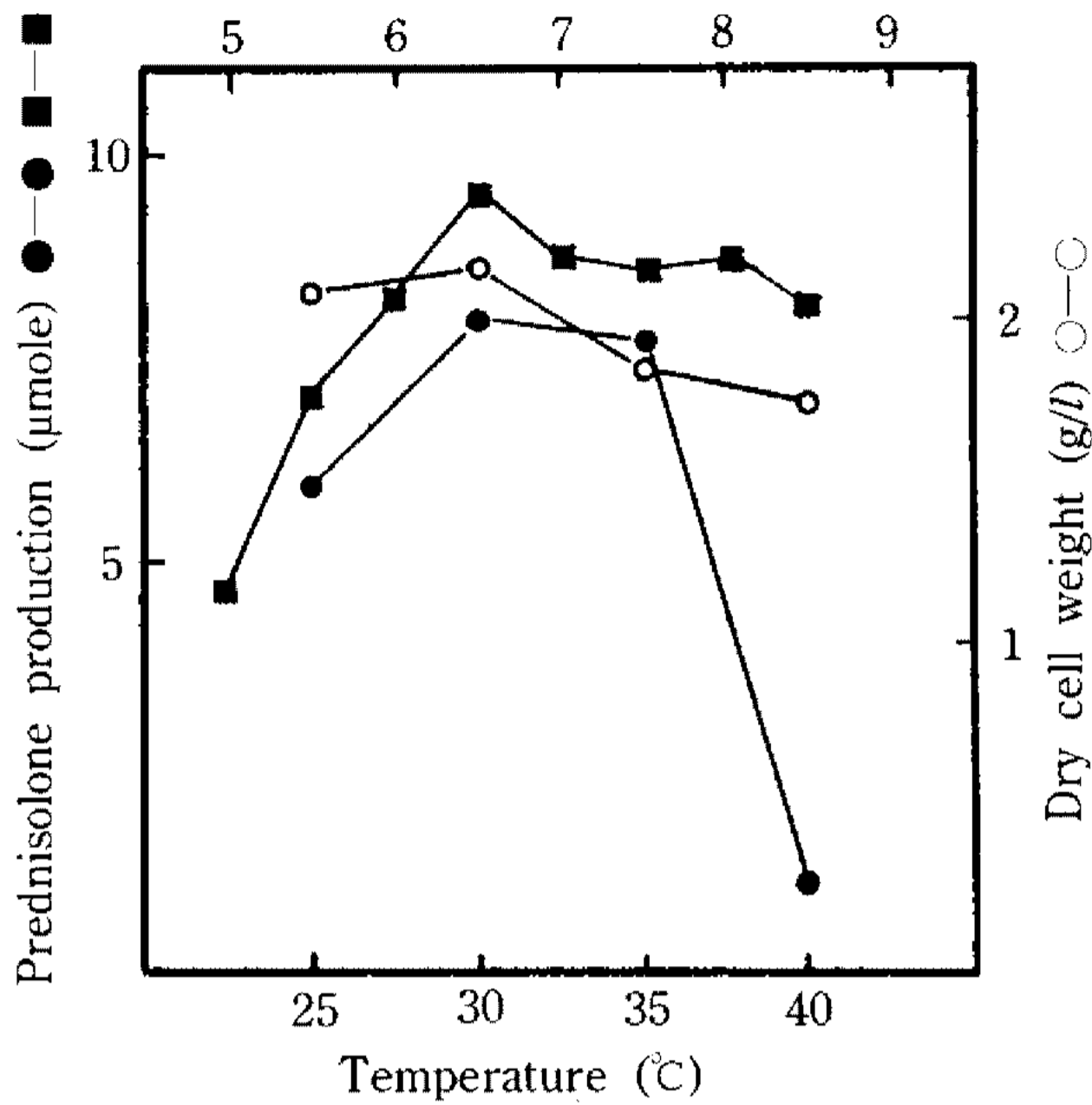


Fig. 5. Effect of temperature and initial pH on induction of Δ^1 -dehydrogenase (●—●, ■—■) and cell growth (○—○).

면서 매우 급격히 유도효과가 떨어졌다.

스테로이드 Δ^1 -dehydrogenase의 기질특이성

Hydrocortisone에 의해 Δ^1 -dehydrogenase가 유도된 *A. simplex*의 현탁액에 기질로서 각종 스테로이드를 0.1% 농도로 첨가하여 반응시켰을 때 생성된 산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 6). 그 결과 cholestenone, progesterone, testosterone 등은 Δ^1 -dehydrogenase에 의해 각각의 해당하는 Δ^1 -dehydrogenated product로 전환됨으로써 hydrocortisone에 의해 유도된 효소가 여러 스테로이드에 공통적으로 작용할 수 있는 효소임이 밝혀졌다. 전환의 농도는 탄소 8개의 긴 측쇄를 가진 cholestenone보다 측쇄가 없는 testosterone이나 탄소 8개의 짧은 측쇄를 가진 progesterone이 훨씬 많은 양의 산물로 전환되었다. C-3에 hydroxyl를 지닌 cholesterol은 Δ^1 -dehydrogenation이 일어나기 전에 cholestenone이 먼저 생성되는 것으로 밝혀졌다.

*A. simplex*는 cholesterol을 분해하는 능력이 있으며 α, α' -dipyridyl 같은 철 chelating agent의 존재하에서 측쇄가 절단되어 Δ^1 -dehydrogenation된 산물인 1,4-androstadiene-3,17-dione을 생성한다(17). 이 때 cholesterol이 cholestenone으로 전환되는 것이 최초의 단계인데 hydrocortisone으로 유도시킨 균체에는

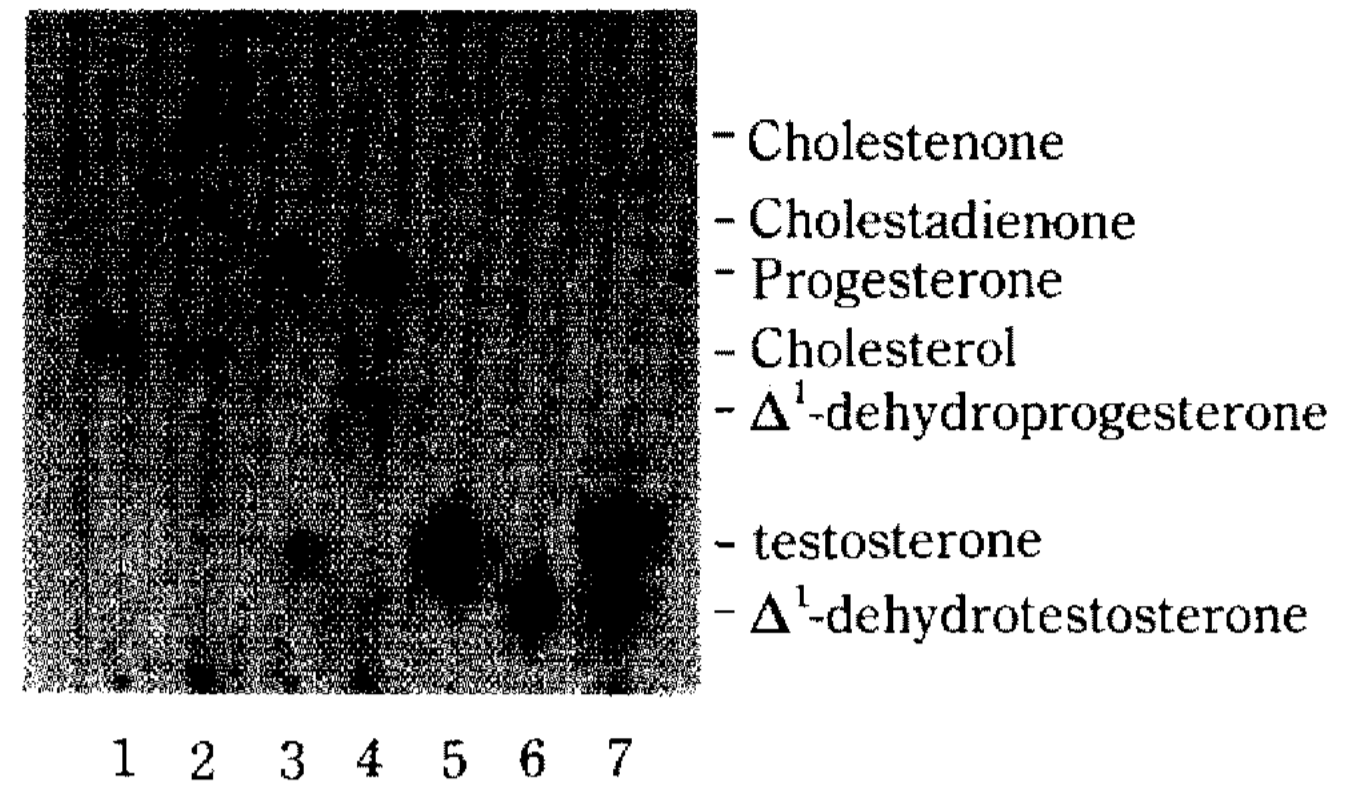


Fig. 6. TLC plate showing various steroid substrates and Δ^1 -dehydrogenated products extracted from hydrocortisone induced *A. simplex* culture.

lane 1: cholesterol; lane 2: cholestenone and cholestadienone; lane 3: progesterone; lane 4: progesterone and Δ^1 -dehydroprogesterone; lane 5: testosterone; lane 6: Δ^1 -dehydrotestosterone; lane 7: testosterone and Δ^1 -dehydrotestosterone; lane 1, 3, 5, 6: authentic samples; lane 2, 4, 7: extracted from *A. simplex* culture. Solvent system; chloroform-ethyl ether (10:1)

cholesterol oxidase가 결여되어 있어 cholestenone이 거의 생성되지 않았기 때문에 효소가 작용할 수 없었던 것으로 생각된다. 따라서 hydrocortisone에 의해 유도된 Δ^1 -dehydrogenase는 3-ketosteroid에 특이성이 있고 C-17의 측쇄길이에 따라 기질 친화도가 달라지는 성질을 가지는 것으로 판단된다.

요 약

Arthrobacter simplex IAM 1660의 스테로이드 Δ^1 -dehydrogenase에 대한 각종 steroid의 유도조건과 효과를 검토하였다. 그 결과 시험한 스테로이드 중 hydrocortisone이 가장 큰 효과를 나타냈고 progesterone, prednisolone, prednisone, androstendione의 순으로 유도효과를 보였고, 스테롤에 의해서는 유도효과가 낮았다. 유도 스테로이드의 특성으로는 스테로이드 모핵 C-3위가 수산기인 것보다 케톤기이며 C-4위에 이중결합이 존재하고 스테로이드 D고리의 측쇄가 짧은 것이 유도효과가 높았다. 유도물질의 첨가 시기는 대수증식기 초기가 최적이었으며 농도는 hydrocortisone의 경우 0.1%가 좋았으며 효소의 유도 시간은 15시간이 최적이었다. 효소유도시 배양온도는 30°C가 가장 좋았고 초기 배양액의 pH는 6.5에서 8.0까지 큰 차이가 없었지만 pH 6.5일 때 비교적 높은

효과를 나타내었다.

Hydrocortisone에 의해 유도된 균체효소의 Δ^1 -탈 수소반응의 기질특이성을 검토한 결과 progesterone, testosterone, cholestenone이 Δ^1 -탈수소 반응산물로 전환되었다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 목적기초 연구비에 의해 수행되었으며 동재단에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Fried, J., R.W. Thoma and A. Klingsberg: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5763 (1953)
2. Levy, H.R. and P. Talalay: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2009 (1959)
3. Sih, C.S. and R.E. Bennett: *Biochem. Biophys. Acta*, **56**, 584 (1982)
4. Jerussi, R. and H.J. Ringold: *Biochem.*, **4**, 2113 (1965)
5. Wovcha, M.G., L.E. Brooks and L.A. Kominek: *Biochem. Biophys Acta*, **547**, 471 (1979)
6. Watanabe, M., D. Lefebvre, Y. Lefebvre and L. Po SY: *J. Steroid Biochem.*, **13**, 821 (1980)
7. Medentsev, A.G., A.Y. Arinbasarova, K.T. Koshcheyenko and V.K. Akimenko: *J. Steroid Biochem.*, **23**, 356 (1985)
8. Martin, C.K.A.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 29 (1977)
9. Mosbach, K. and P.O. Larsson: *Biotech. Bioeng.*, **12**, 19 (1970)
10. Ohlson, S., P.O. Larsson and K. Mosbach: *Biotech. Bioeng.*, **20**, 1267 (1978)
11. Chen, K.C., C.F. Chiu and C.C. Chang: *J. Chin. Agr. Chem. Soc.*, **23**, 8 (1985)
12. Chen, K.C. and K.R. Hwang: *J. Chin. Agr. Chem. Soc.*, **24**, 8 (1986)
13. Pousette, A. and K. Carlstrom: *Acta Chemica Scandinavia B.*, **40**, 515 (1986)
14. Touchstone, J.C.: *Handbook of Chromatography Steroids*, (Zweig, G. and J. Sherma, ed.) CRC Press, Florida, 193 (1986)
15. Marcus, P.I. and P. Talalay: *J. Biol. Chem.*, **218**, 661 (1956)
16. Kloosterman, IV J. and M.D. Lilly: *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 113 (1984)
17. Nagasawa, M., M. Bae, G. Tamura and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1644 (1969)

(Received April 17, 1991)