한국생물공학회지 제7권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 7. No. 3. 161-165(1992)

Microemulsion에서 *Mycobacteria*를 이용한 ADD와 AD의 합성

이강민 · 김영득 · 김희정 · 박충웅
전북대학교 자연과학대학 분자생물학과 효소공학실험실

Synthesis of ADD and AD by *Mycobacteria* sp. in Microemulsions

Kang Min LEE, Young Deuk KIM, Hee Jung KIM and Chung Ung PARK
Laboratory of Enzyme Technology, Department of Molecular Biology,
Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea

ABSTRACT

Water-insoluble sitosterol was biotransformed to AD(4-androstene-3, 17-dione)and ADD(1, 4-androstadiene-3, 17-dione) with crosslinked *Mycobacteria* sp. NRRL B-3683 in microemulsions. The *Mycobacteria* activity depended on the kinds of surfactants and water content. The activity was very high in cationic microemulsion (CTAB-buthanol-cyclohexane-water) and five times higher than that of buffer, but it showed a very low activity in anionic microemulsion. The *Mycobacteria* activity was increased as increasing weter contents and in the microemulsion containing 20% water was doubled in the same microemulsion containing 5% water. We suggest that microemulsion is effective reaction medium for *Mycobacteria* bioconversion.

서 론

최근에 효소와 미생물을 유기합성에 이용하려는 시도는 급속도로 증가하고 있다. 대부분의 기질물질이 소수성이기 때문에 bioconversion을 통한 유용물질의 합성은 한계가 있다(1, 2). 그러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 유기용매에서 bioconversion에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 물에 녹지 않는(waterimmicible) 유기용매에서의 효소에 대한 연구가 여러 방면으로 진행되고 있다. 이상계(two-phase system), anhydrous organic solvent와 역미셀 또는 microemulsion을 steroids, alkaloids, fats등과 같은 소수성 물질의 bioconversion에 이용하고 있다(3, 4, 5, 6, 7). 역미셀에서 단백질과 효소의 연구는 많이 진행되어 왔으며 실제적으로 실험규모로 역미셀에서 cholesterol oxidase, alcohol dehydrogenase와 같은 효소를 이용하여 생성물을 합성할 수 있음이 알려져 있다(8, 9, 10). 최근들어 역미셀에는 효소뿐아니라 미셀 크기보다 훨신 큰 미생물도 용해할 수 있으며 그의 촉매 활성도를 유지할 수 있다(11). 최근에 Fadnavis는 microemulsion에서 baker의 효모세포를 이용하여 acid methyl ester를 enantioselective하게 가수분해 하였다(12).

Mycobacteria sp.(NRRL B-3683)는 기질인 sitosterol로부터 side chain degradation하여 coticosteroid 호르몬 계통 의약품의 중간물질인 ADD(1,4-androstadiene-3,17-dione)와 AD(androsten-3,17-dione)를 만든다. 최근 *Mycobacteria*를 고체 중합체에 고정화하여 soybean oil, glycerol, chlor-

orform과 같은 유기용매에서 반응시키는 연구가 되었으며 PEG, glycerol, dextran의 수성 이상계에서도 안정하며 활성도를 유지함이 알려져있다(13, 14).

본 논문은 microemulsions 에서 *Mycobacteria* sp. (NRRL B-3684)를 안정화 시킨 후 이것을 이용하여 sitosterol로부터 ADD, AD를 합성하는 방법을 연구 하였다.

재료 및 방법

Mycobacteria sp.(NRRL-B-3683)가 이 연구에 사용되었으며, sitosterol, ADD, Triton X-100, SDS등은 Sigma로부터 구입하여 더이상 정제하지 않고 사용하였다. CTAB는 Fluka로 부터 구입하여 absolute ethanol에서 재결정한 후 60℃, 진공 상태에서 24시간 이상 건조한 후 사용하였으며, 이 실험에 사용한 시약은 특급 시약이며 cyclohexane, buthanol등 유기용매는 HPLC용 고순도 용매를 사용하였다. HPLC(Waters 제품)를 사용하여 C-18, reverse-phase column(25 cm Merck)를 사용하여 ADD, AD를 결정 하였다.

미생물 배양조건

배지는 NH_4NO_3 1.0g, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.5g, K_2HO_4 0.5g, citric acid 2.0g, ferric ammonium citrate 0.05g, glycerol 2.0ml를 증류수 1.0L에 녹인 후 40% KOH로 pH 7.7로 맞추었다. 이 배지를 120℃에서 20분 멸균한 후 *Mycobacteria* sp. NRRL-B-3805를 넣어 30℃에서 200rpm으로 7일 동안 배양한 후 사용하였다. 배양 후 centrifuge하여 미생물을 분리한 후 0.1M phosphate buffer pH 7.5로 두 세번 세척한 후 glutaldehyde로 교차 결합(cell cross-linking)하였다.

미생물의 crosslinking 고정화

Microemulsion이 세포로부터 단백질을 추출 하는 것을 최소화하기 위하여 다음과 같이 세포를 고정화 하였다. 배양한 *Mycobacteria* sp.를 원심분리 한 후 phosphate buffer로 세척한 후, 10g 세포를 100ml, 0.1M phosphat buffer에 suspend시켰다. Glutaldehyde를 0.5%가 되게 현탁액에 넣어 실온에서 5시간동안 교차 결합하였다. Crosslinked cell을 다시 phosphate buffer로 2~3번 세척 하여 반응하지 않은 glutaldehyde는 모두 제거하였다.

Microemulsion 제조

이 실험에 사용한 microemulsion은 3가지의 다른 계면활성제(양이온, 음이온, 비이온)와 물의 양을 변화시켜 제조 하였다. 각 성분을 Table 1에서 처럼 무게 %(% weight)에 따라서 실온에서 제조하였다. 각 성분을 혼합한 후 잘 stirring하여 만들었다. 사용 하기 전에 여과하여 사용하였다.

Table 1. Composition of the microemulsions used.
The composition of the microemulsion is given by weight %. The microemulsions were prepared at room temperature by adding the various constituents with constant stirring. Buffer was 0.1M phosphate pH 7.5

TYPE	SUFACTANT	COSURFACTANT	ORGANIC SOLVENT	WATER
	CTAB	n-BUTANOL	CYCLO-HEXANE	BUFFER
C-1	14	14	67	5
C-2	14	14	62	10
C-3	14	14	57	15
C-4	14	14	52	20
	SDS			
A-1	14	14	62	10
	TRITON X-100			
N-1	14	14	62	10

Microemulsion에서 *Mycobacteria* 활성도 측정

*Mycobacteria*는 stiosterol로부터 AD와 ADD를 만든다. 그의 bioconversion활성도는 생성물인 AD, ADD를 HPLC와 TLC로 분리하여 그들의 양을 합하여 결정하였다. HPLC는 reverse phase칼럼을 사용하여 250mm에서 결정하였다. Mobile phase는 n-hexane : isopropanol(8 : 2)혼합물이며 flow rate는 2ml/min이였다.

TLC는 toluene : ethanol(85 : 15)혼합물을 전개용매로써 사용하여 분리한 후 AD와 ADD를 분리하여 benzene에 녹여서 250mm에서 결정하였다.

활성도에 미치는 계면활성제의 영향

Crosslinked cell 5g을 각각의 microemulsion 100ml에 섞은 다음 기질 물질인 sitosterol 3g을 녹였다. 용액은 500rpm으로 stirring하여 반응시킨 후 임의의 시간(6~48시간) 후 반응물의 일부를 취한 후 회전 증발기(rotary evaporator)를 이용하여 액체를 완전히 건조한 후 생성물을 diethyl ether로 추

출한 다음 silica gel을 통과시켜 계면활성제를 제거한 후 TLC와 HPLC로 AD, ADD를 분리하여 두 생성물의 합으로 활성도를 결정하였다(9).

Mycobacteria 활성도 에 미치는 물의 양의 영향

양이온 microemulsion (CTAB-buthanol-cyclohexane-buffer)에서 물의 양을 5-20%까지 변화시키면서 물의 양이 활성도에 미치는 영향을 보았다. 위와 같은 방법으로 microemulsion에 crosslinked cell을 녹인 다음 sitosterol로부터 AD와 ADD를 얻어 위와 같은 방법으로 *Mycobacteria* 활성도를 결정하였다. 물에서의 활성도와 비교하기 위하여 1g sitosterol을 Tween 80(1g/L)을 포함한 100ml의 0.1M phosphare buffer pH 7.5에 녹여 같은 방법으로 활성도를 결정하였다.

결과 및 고찰

효소와 미생물을 입체특이성이나 자리특이성이 요구되는 의약품 합성반응에 이용하려는 시도가 최근 많이 행해지고 있다. 그러나 대부분의 기질인 steroids, prostanoids, alkanoids, fats는 물에 녹지 않으므로, 물에서 비교적 안정한 효소와 미생물을 이용하여 필요한 생성물을 얻는 데에는 얼마의 문제가 있다. 위의 문제점을 극복하기 위한 한 방법으로 최근 역미셀(reversed micelle)또는 microemulsion에서 효소반응을 시도하고 있다. Microemulsion은 계면활성제-보조계면활성제-유기용매-물로 이루어져 있으며, 유기용매에서 계면활성제와 보조 계면활성제로 이루어진 막으로 둘러싸인 작은 물방울(water pool)로 되어있다. 그러므로 작은 물방울 안에 있는 효소는 유기용매에 의하여 비활성 되는 것을 피할 수 있다. 최근들어 작은 물방울(waterpool)은 자신의 크기(<500Å)보다 훨씬 큰 oligomeric enzymes, mitochondria, kidney lysosome, plant cell, yeast등도 용해할 수 있으며 이것들은 microemulsion에서 그의 본래 형태(native conformation)를 유지할 수 있다(11, 12, 16, 17).

Luisi는 *Rumex obtusifiolus*로부터 plant cell을 분리하여 AOT-isooctane-water(20% water content) 역미셀에 녹였다. 녹은 식물세포는 광합성 활성도(photosynthetic activity)를 갖을 수 있음이 알려졌다(11). Fadnavis는 CTAB-isooctane-chloroform-water(20% 역미셀)에 효모 세포를 녹여, 이것을 이용하여 racemic N-acetyl-ammino acid의 methyl ester를 enantioselective하게 가수분해 하였다(12). 이와같이 효소 뿐 아니라 세포 역시 역미셀에 용해 될 수 있으며 활성도를 갖는다.

Mycobacteria 는 여러가지 microemulsion에서 활성도를 가질 수 있다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 양이온 microemulsion에서 *Mycobacteria* 활성도는 물의 양에 따라서 달라 진다. 물의 양이 달라지면 물방울의 크기가 더 커지므로 세포와 유기용매의 상호작용을 감소시킬 수 있다. 이와 같이 활성도가 물의 양에 의존하는 현상은 alcohol dehydrogenase, cholesterol oxidase, chymotrypsin, peroxidase등과 같은 많은 효소 반응에서도 나타난다(10, 18, 19, 20, 21). C-4 microemulsion(20% water content)에서 2일 후 sitosterol의 24%(0.71g)가 생성물로 되었다. 이것은 buffer에서 보다 5배 이상 많은 양이다. 이것은 microemulsion과 물에서 기질 물질인 sitosterol의 용해도 차이에 관계 있다. Microemulsion은 steroid와 같은 소수성 기질의 용해도를 증가시킬 수 있다. Cholesterol은 물에는 거의 녹지 않으나 microemulsion에서는 400mg/ml까지 녹을 수 있다(15). Hesselink에 의하면 hydrophobic cavity를 가지고 소수성 기질물질의 용해도를 증가시키는 cyclodextrin은 *Mycobacteria* 가 sitosterol로부터 AD, ADD를 만든 것을 촉매하나 cyclodextrin은 세포 성장에는 영향이 없다고 보고

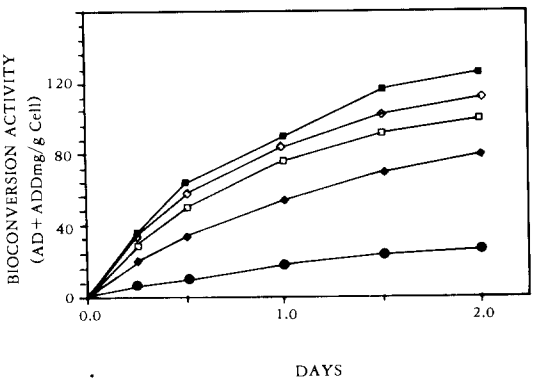

Fig. 1. Effect of water contents in cationic microemulsions on the bioconversion of sitosterol by crosslinked *Mycobacteria* sp NRRL B-3805. The activity was determined by total of its products, AD and ADD. NRRL B-3805. Containing waters in the microemulsion were 5%(C-1 microemulsion : ◆), 10%(C-2 microemulsion : □), 15%(C-3 microemulsion : ◇), 20%(C-4 microemulsion : ■) and buffer (●)for standard.

하였다(22). 그러므로 microemulsion에서 *Mycobacteria* 의 활성도의 증가는 소수성 기질의 용해도 증가에 의한것 일 수 있다.

Microemulsion에서 *Mycobacteria* 의 bioconversion활성도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 계면활성제의 종류에 따라 달라진다. *Mycobacteria* 활성도는 CTAB, Trition X-100과 같은 양이온 또는 비이온 microemulsion에서는 비교적 안정하나 SDS의 음이온 microemulsion에서는 쉽게 비활성화 된다. 효소의 경우에도 효소의 안정도는 계면활성제의 종류에 따라서 달라진다. SDS나 AOT와 같은 양이온 계면활성제는 단백질과 강한 상호작용으로 단백질을 쉽게 비활성화 시킨다. 반면 양이온 계면활성제인 CTAB는 단백질과 적당한 상호작용으로 효소를 안정화 시킬 수 있다. Triton, Tween, Brij등 비이온 계면활성제는 많은 효소를 안정화시키고 활성화 시킨다(23, 24, 25, 26).

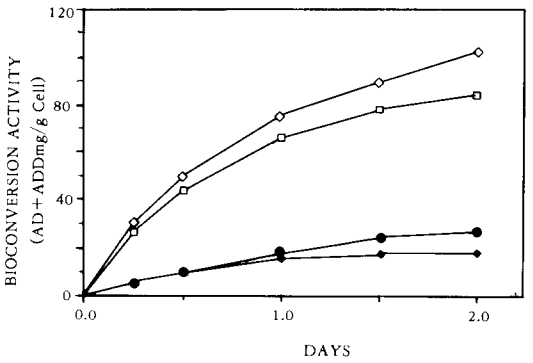

Fig. 2. Effect of surfactants of microemulsions on the bioconversion of sitosterol by crosslinked *Mycobacteria* sp NRRL B-3805. The activity was determined by total of its products, AD and ADD. A kind of surfactants and used was CTAB 5%(C-2 microemulsion : ◇), SDS(A-1 microemulsion : ■), Triton X-100(N-1 microemulsion : □) and buffer (●)for standard.

Mycobacteria 가 microemulsion에서 활성도가 증가하는 것은 계면활성제가 기질 물질의 세포벽 침투력을 증가시키기 때문일 수 있다(27). 비이온 계면활성제인 Pluronic F-80은 eukaryotic 세포 배양에 많이 이용되는데 이것은 mechanical damage로부터의 보호는 물론 Triton X-100, steroidal glycoside, digitonin처럼 효모세포의 침투력을 증가시킬 수 있기 때문 이다(27, 28,29). 마찬가지로 CTAB 역시 기질 물질의 세포투과력을 증가시키므로 활성도를 증가시킬 수 있다(30). 많은 효소는 양이온 microemulsion(CTAB)에서 안정하여 반응 후 소수성 생성물은 이온계면활성제와 쉽게 분리 할 수 있기 때문에 bioconversion의 반응 매질로 자주 쓰인다(31). SDS는 세포와 강한 상호작용을 하여 세포벽을 쉽게 파괴한다. SDS는 세포벽으로 부터 단백질 추출을 잘하지만 추출된 단백질은 쉽게 비활성화 된다. Squalene epoxide cyclase와 steroid dehydrogenase는 세포로 부터 SDS 미셀에 의하여 잘 추출되지만 이것은 미셀에서 쉽게 비활성화 된다(32, 33). 이와같이 SDS microemulsion에서 낮은 활성도를 나타내는 것은 세포가 SDS에 의해서 파괴되기 때문일 수 있다. 위와 같이 microemulsion은 효소 반응의 매질로써 뿐 아니라 *Mycobacteria* 를 이용하여 sitosterol로부터 AD, ADD를 얻는데 이용할 수 있는 이상적인 매질이다.

요 약

Microemulsion에 교차결합(crosslinking)고정화한 *Mycobacteria* sp(NRRL B-3683)를 이용하여 소수성 기질인 sitosterol로부터 AD, ADD를 합성하였다. *Mycobacteria* bioconversion활성도는 계면활성제의 종류와 물의 양에 의존한다. *Mycobacteria* 는 양이온 microemulsion(CTAB-buthanol-cyclohexane-water)에서 가장 높은 활성도를 갖으며, 이것은 buffer에서보다 5배 이상 효율을 갖음을 나타낸다. 음이온 microemulsion에서는 활성도가 매우 낮다. 양이온 microemulsion에서 활성도는 물의 양에 따라서 변하며 물의 양이 증가함에 따라서 증가한다. 20%의 물을 포함한 microemulsion에서는 5%의 물을 포함한 microemulsion에서보다 약 배의 효율을 갖는다. 이와같이 microemulsion은 미생물을 이용한 bioconversion반응의 매질로써 효과적일 수 있다.

감 사

본 연구는 한국 과학 재단의 지원에 의하여 이루어 진 것입니다. 이에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. G. M. Whiteside and C. H. Wong(1985), Angew. Chem. Int. Ed. Eng., **24**, 617.
2. A. M. Klivanov(1986), Chem Tech., 354
3. P. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara and E. Antonini(1974). Eur. J. Biochem., **44**, 401
4. E. Antonini, G. Carrea and P. Cremonesi (1981), Enyme Micro. Tech., **3**, 291
5. P. L. Luisi(1985), Angew. Chem. Int, Ed. Eng., **24**, 439
6. K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmelniski, N. C. Klyachko and I. V. Berezin (1982), Science, 218, 889.
7. K. Martinek, I. V. Bereezin, Y. L. Khmelniski, N. L. Klyachko and A. V. Levashov(1987), Coll, Cze, Chem. Comm., **53**, 2589
8. J. P. Samama, K. M. Lee and J. F. Biellmann (1987), Eur. J. Biochem., **163**, 609.
9. K. M. Lee and J. F. F Biellmann(1987), New J. Chem., **11**, 775
10. K. M. Lee and J. F. Biellmann(1986), Bioorganic Chem.,**14**, 262
11. A. Hochkoeppler and P. L. Luisi(1991), Biotech. Bioeng., **37**, 918
12. N. W. Fadnavis, N. P. Reddy and U. T. Bhalerao(1989), J. Org. Chem, **54**, 3218.
13. H. J. Steinert, K. D. Vorlop and J. Klein (1987), Biocatalysis in Organic Media, (C. Lanne, J. Tramper and M. D. Lilly, eds), **51**, Elsevier Science Publishers
14. S. Flygar and P. O. Larsson(1989), Enzyme Microb. Technol. **11**, 752
15. W. E. Workman and D. F. Day(1984), Biotech. Bioeng. **26**, 905.
16. V. A. Kabanov. S. Namekin, N. Klyachko and A. V. Levashva(1991), FEBS Lett., **278**, 143.
17. A. V. Pshzetsky, O. A. Buneeva, G. Y. Wiederschain(1989), FEBS Lett., **287**, 219
18. S. Barbaric and P. L. Luisis(1981), J. Am. Chem. Soc., **103**, 4239.
19. P. D. I. Fletcher, R. B. Freedman, J. Mead, C. Oldfield and B. H. Robinson(1984), Colloids Surf., **10**, 193.
20. K. M. Larsson, C. Oldfield and R. B. Freedmann(1989), Eur. J. Biochem., **183**, 357
21. N. L. Klyachko., A. N. Levashov and K. Martinek(1984), Mol. Biol., **18**, 1059.
22. P. G. M. Hesselink, S. V. Vliet, H. O. Vries and B. Witholt(1989) Enzyme Microb. Technol., **11**, 398.
23. A. Helenius and K. Simons(1975), Biochim. Biophys. Acta, **415**, 29.
24. C. Tanford and J. Reynolds (1973), J. Biol, Chem., **248**, 4925.
25. J. A. Reynolds and C. Tanford(1970), J. Biol. Chem., **245**, 5101.
26. A. Sanchez-Ferrer, R. Bru and F. Garcia-Carmona(1988), FEBS Lett., **233**, 363.
27. L. R. Gowda and W. E. Workmann(1984), Biotech. Bioeng. **13**, 154.
28. D. Vlach and D. F. Day(1984), J. Mol. Catal. **26**, 173.
29. M. S. Joshi, I. R. Gowda, L. C. Katwa nad S. G. Bhat(1989), Enzyme Microb. Technol., **11** , 439.
30. A. T. King, M. R. Daver, I. R. Mellor, B. J. Mulligan and K. C. Lowe(1991), Enzyme Moicrob. Technol., **13**, 148.
31. S. Clark (1981) Biochem. Biophys. Acta, **670** , 195.
32. K. M. Lee, A. Duriatti, F. Schuber and J. F. Biellmann(1989), FEBS Leet., **224**, 347.
33. K. M. Lee and J. f. Biellmann(1990), Biochimie, **72**, 285.

Abbreviation

CTAB : Hexadecyl trimethyl ammonium bromide
SDS : Sodium dodecyl sulfate
ADD : 1,4-Androstadiene-3,17-dione
AD : 4-Androsten-3,17-dione
PEG : Polyethylene glycol