

***Rhizopus nigricans*에 의한 Progesterone 전환 반응의 경로**

김명희 · 김말남

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

**Transformation Pathway of the Progesterone by *Rhizopus nigricans***

Kim, Myung-Hee and Mal-Nam Kim

Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT:** *Rhizopus nigricans* produces 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone with a unidentified byproduct, which is hardly separated. Results of chromatography, IR and NMR spectroscopy identified the byproduct to be 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione. *R. nigricans* was found to transform progesterone into a monoform intermediate, 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, from which 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione and 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone were formed respectively by 5 $\alpha$ -reduction and 6 $\beta$ -hydroxylation.

**KEY WORDS** □ *Rhizopus nigricans*, progesterone, 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione, 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone

Progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation은 corticosteroid hormones의 합성에 중요한 반응으로 (Fieser와 Fieser, 1959), Aspergilli와 Rhizopi의 사상균류에서 높은 효소 활성을 나타낸다 (Kieslich, 1980; Bihari등, 1984).

Progesterone의 미생물적 전환 반응에서 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이외의 여러 종류의 부 반응 산물이 생성되는데 생성물의 종류와 농도는 미생물의 종류와 반응 조건에 따라서 달라진다. *Aspergillus ochraceus* Wehmer와 *Rhizopus nigricans* YSF 128은 부 반응 산물로 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone만을 생성하고 (Monem등, 1969), *Cladosporium cladosporioides*와 *Aspergillus niger* 171에 의하여 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이 (El-Refai등, 1970; Sallam등 1976), *Epicocum purpurascens*, *A. niger* 100과 *R. nigricans* REF 129 등은 21-hydroxyprogesterone을 부 반응 산물로 생성한다 (Monem등, 1969; Sallam등, 1971). 또한 14 $\alpha$ -hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione (Njar등, 1985), testosterone (Sallam등, 1973), androstenedione (El-Refai등, 1973) 및 testolactone (Sebek등, 1962)의 생성도 보고 되었다.

*Rhizopus nigricans* Ehrenberg는 progesterone을 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone으로 전환시키는데 높은 효소 활성을 나타내는 균주로 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone과 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone 이외에도 그 구조가 동정되지 않은 미확인 steroid를 생성한

다 (Kim과 Kim, 1987). 이 전환 반응의 주요 생성물은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이며 의약품의 원료로 사용되기 때문에 그 순도가 매우 높아야 한다. Steroids의 분리는 일반적으로 까다롭고 비 경제적이다.

본 연구에서 그 생성량이 많은 미확인 steroid는 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone으로부터의 분리가 특히 어려우므로 이 물질의 생성은 가능한 억제되어야 한다. 이를 위하여는 progesterone 전환 반응의 경로를 규명하여야 하며 따라서 미확인 steroid의 동정이 필히 요구된다.

본 연구에서는 *R. nigricans*에 의하여 progesterone으로부터 생성된 미확인 steroid를 chromatography, IR 및 <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy를 이용하여 동정 하였으며, progesterone의 전환에 따른 각 산물의 생성 경로를 밝혔다.

**재료 및 방법****Progesterone 전환 반응**

PDA 고체 배지에서 배양된 *Rhizopus nigricans*의 포자 현탁액 1 ml (5.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml)를 50 ml의 액체 배지 (Hanisch등, 1980)에 접종하고 28 $^{\circ}$ C, 180 rpm의 rotary shaker (Lab-Line 3579)에서 14시간 배양하여 균사체를 준비하였다. 이 균사체 0.5 g (습중량)을 50 ml의 반응액 (액체 배지)에 넣고 동시에 progesterone (최종농도 0.05 g/l)을 투입하여 반응시켰다. 반응 조

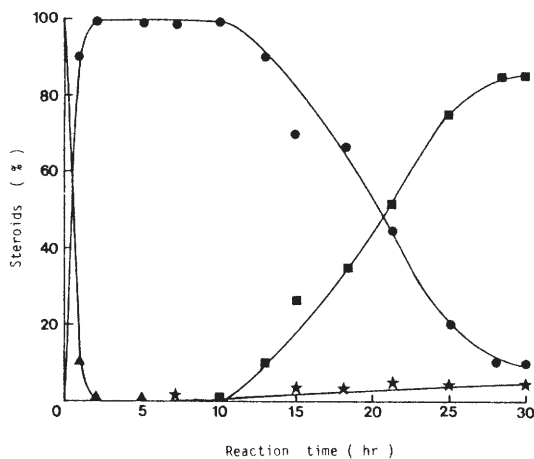


Fig. 1. Time course of progesterone transformation (Kim and Kim, 1987).

- ▲—▲: progesterone  
●—●: 11α-hydroxyprogesterone  
■—■: unidentified steroid  
★—★: 6β, 11α-dihydroxyprogesterone

건은 균사체 성장 조건과 동일하게 하였다. 반응 후 steroids의 추출은 Kim등 (1990)의 방법과 동일하게 하였다.

#### Chromatography

Thin Layer Chromatography는 Merk 60F-254 silica gel로 도포된 plate 상에서 전개하였다. 이때 용매계의 조성은

- I. chloroform: cyclohexane: ethanol=46:46:8
- II. cyclohexane: acetone:chloroform=62:21:17
- III. ethylene chloride: acetone=80:20

로 두었다. 각 steroids의 전개 위치는 254 nm의 UV lamp와 KI/I<sub>2</sub> 발색단을 이용하여 확인하였다. 각 steroids를 chloroform, cyclohexane, ethanol이 46:46:8로 이루어진 용매계를 이용하여 TLC rod (Iatron SIII) 상에서 전개한 후 Flame Ionization Detector (Iatron Iatroscan TH-10)로써 정량 하였으며 HPLC (Kim등, 1990)도 병행하여 사용하였다.

#### IR 및 <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy

IR spectrum은 TLC상에서 분리된 시료를 정교하게 긁어낸 후 KBr pellet 속에 함침시켜 얻었다. <sup>1</sup>H-NMP spectrum은 tetramethylsilane을 표준 물질로 하여 그 화학적 이동을 측정 하였으며 chloroform을 용매로 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

*R. nigricans*에 의한 progesterone 전환 반응의 생성물은 11α-hydroxyprogesterone, 6β, 11α-dihydroxyprogesterone 및 미확인 steroid로 구성되어 Fig. 1

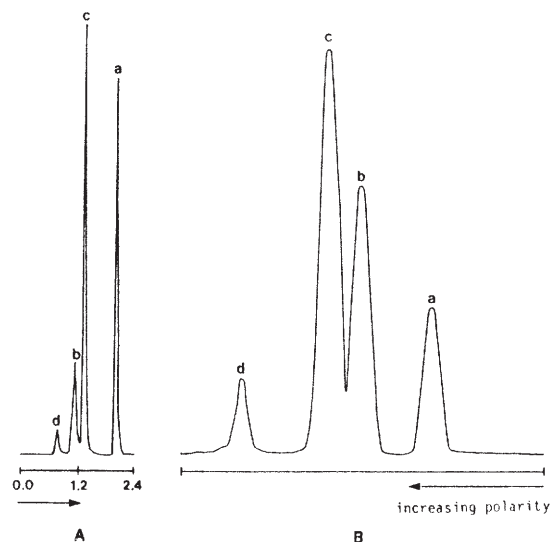


Fig. 2. Chromatograms of progesterone (a), unidentified steroid (b), 11α-hydroxyprogesterone (c), and 6β, 11α-dihydroxyprogesterone (d). A: Chromatogram of HPLC (numbers indicate elution volumes) B: Chromatogram of TLC.

은 progesterone으로부터 *R. nigricans*에 의하여 생성되는 이 물질들의 경시 변화를 나타낸다 (Kim과 Kim, 1987) 반응시간 10시간 이후부터 미확인 steroid가 팔목하게 많이 생성됨을 알 수 있으며, 이 반응의 체계적인 연구를 위하여 이 물질의 identification은 필히 요구된다.

#### Steroids의 Chromatograms

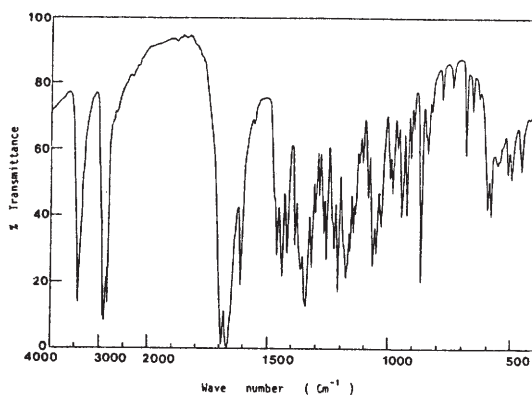
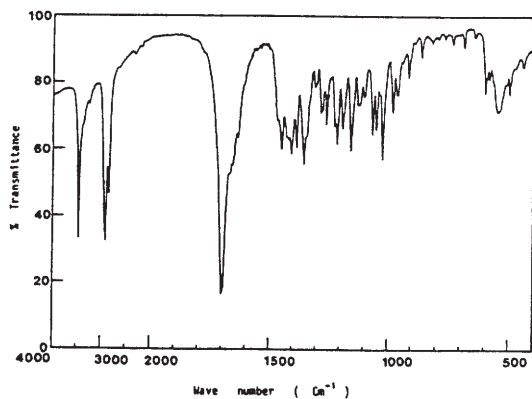
Fig. 2는 TLC와 HPLC에 의하여 분리된 steroids의 chromatogram을 각각 나타낸다. 두 경우 모두 progesterone과 6β, 11α-dihydroxyprogesterone은 용이하게 분리 되었으나 11α-hydroxyprogesterone과 미확인 steroid는 용매계를 다양하게 변화 시켰음에도 불구하고 Table 1의 유사한 R<sub>f</sub> 값으로부터 알 수 있는 바와 같이 분리가 잘 이루어지지 않았다. 그러므로 두 물질의 극성은 매우 유사할 것으로 판단 되었다. 또한 Table 1에 나타난 바와 같이 미확인 steroid는 다른 생성물질들과는 달리 254 nm의 UV를 거의 흡수하지 않으므로 이 물질의 구조에는 C=C bond가 없을 것으로 짐작될 뿐만 아니라 TLC 상에 분리된 생성물질들을 KI/I<sub>2</sub>로써 발색시켰을 때 발현된 색깔이 Sallam등 (1970)의 결과와 일치하였으므로 미확인 steroid는 11α-hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 추정되어 IR 및 <sup>1</sup>H-NMR spectra를 이용하여 이 물질의 구조를 유추함으로써 이를 확인하고자 하였다.

#### IR Spectra

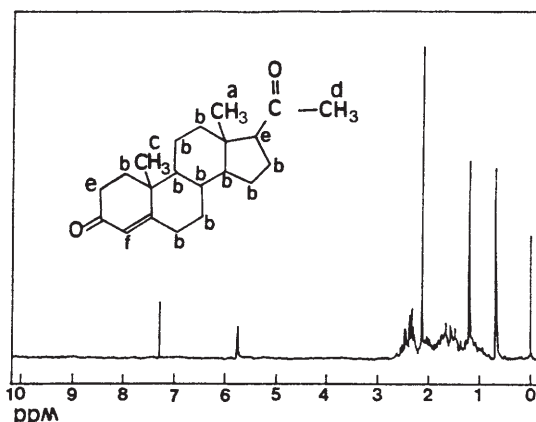
Fig. 3 및 Fig. 4는 11α-hydroxyprogesterone과 unknown sample의 IR spectra를 각각 나타낸다. 1600<sup>-1</sup>

**Table 1.** The  $R_f$  values and colours of the different transformation products.

Steroids	$R_f \times 100$ with solvent system			Colour after treatment with $KI/I_2$	UV <sub>254</sub> absorption
	I	II	III		
Progesterone	89	90	86	brown	+
11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	64	75	61	deep blue	+
Unidentified steroid	67	75	64	grey	
6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone	36	38	45	pale brown	+

**Fig. 3.** IR spectrum of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone.**Fig. 4.** IR spectrum of the byproduct to be identified.

cm 부근에서 sharp한 흡수 peak는 C=C bond의 stretching에 의한 것이며 unknown sample에는 이와 같은 흡수 peak가 나타나지 않았으므로 앞의 결과를 확인할 수 있다. 3400<sup>-1</sup> cm 부근에서 나타나는 흡수 peak는 -OH의 stretching에 의한 것으로 두 sample에서 유사한 위치에서 나타남을 알 수 있다. 1680<sup>-1</sup> cm 부근의 peak는 >C=O의 stretching에 의하여 흡수된 것이며 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone에서는 흡수 peak의 splitting이 일어났으나 unknown sample에서는 단일 peak로 나타났다. 이는 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 3 및 20 위치의 carbonyl기



Assignments (No. of Proton)			
a.	0.69	(3)	b. 0.75-2.10 (17)
c.	1.20	(3)	d. 2.13 (3)
e.	2.20-2.70	(3)	f. 5.74 (1)

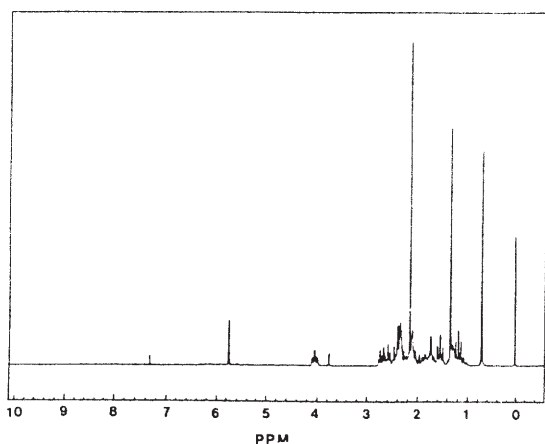
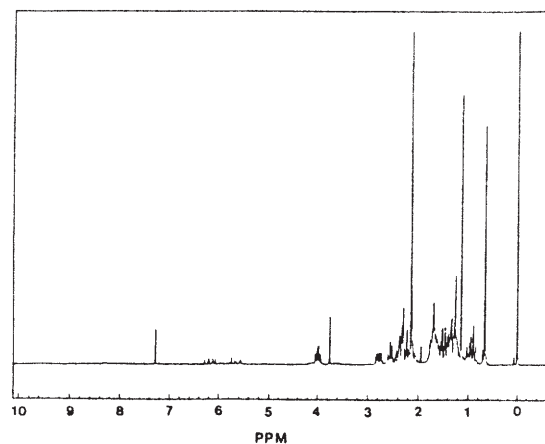
**Fig. 5.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum of progesterone (Aldrich Library of NMR Spectra)

중에서 3위치의 carbonyl기가 4위치의 C=C double bond의 영향을 받아 그 흡수 peak의 splitting이 일어난 것으로 보이며 unknown sample을 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 볼 경우 3 및 20 위치에 있는 carbonyl기 주위에는 이와 같은 구조가 없으므로 단일 흡수 peak가 나타난다고 판단할 수 있다.

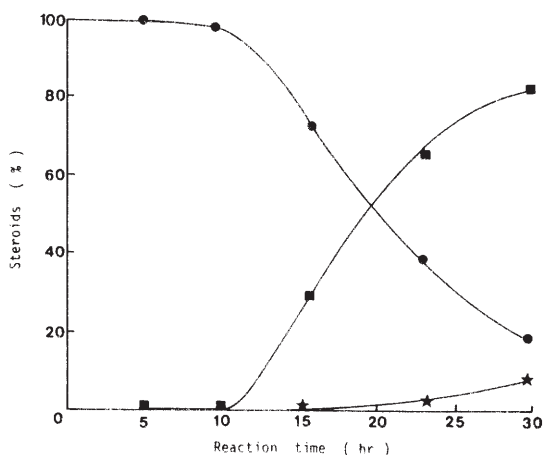
#### <sup>1</sup>H-NMR Spectra

Fig. 5는 Aldrich Library of NMR Spectra에 수록되어 있는 progesterone의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 각 carbon에 결합되어 있는 수소가 나타내는 chemical shift data이다.

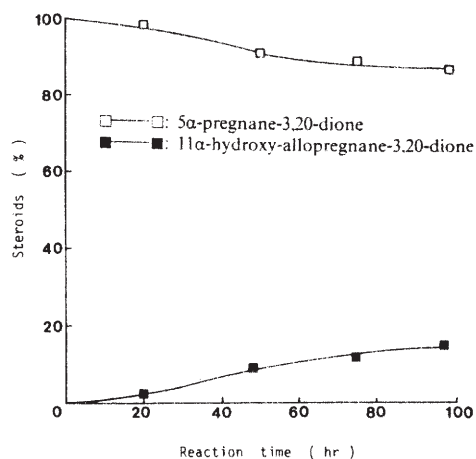
Fig. 6과 Fig. 7은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone과 unknown sample의 <sup>1</sup>H-NMR spectra이다. 5.8 ppm 위치의 chemical shift는 4위치의 탄소에 결합되어 있는 수소에 해당하는데 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone과는

Fig. 6.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone.Fig. 7.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the byproduct to be identified.

달리 unknown sample에는 이 peak가 나타나지 않았다. 이는 unknown sample을  $11\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 볼 경우 4위치의 탄소에 부가된 수소는 0.9-2.80 ppm에 걸쳐 나타나는 여러 peak에 해당되기 때문이다. Fig. 5의 progesterone NMR spectrum에서 11위치의 탄소에 결합된 수소는 b peak에 해당하지만 Fig. 6의  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone의 11위치의 탄소에 결합된 수소는 4.0 ppm 부근에서 그 peak를 나타내는 것도 같은 이유이다. 1.32 ppm에서 나타나는 sharp한 peak는 18위치의 탄소에 결합되어 있는 3개의 수소에 의한 것이며 unknown sample의 경우에 비하여 downfield쪽으로 약간 이동되어 있음을 알 수 있다. 이는 unknown sample을  $11\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 볼 경우  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone은 4위치의 C=C double bond에 의한 ring current의 deshielding

Fig. 8. Time course of  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone transformation.

●—●:  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone.  
 ■—■:  $11\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione  
 ★—★:  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone

Fig. 9.  $11\alpha$ -hydroxylation of  $5\alpha$ -pregnane-3,20-dione as a function of reaction time.

effect로 인하여 downfield 쪽으로 이동 하였기 때문으로 판단할 수 있다.

한편  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone의 11위치의 탄소에 결합되어 있는 수소의 peak area와 전체 수소의 peak area의 상대적인 비로부터 이 물질의 수소 수는 30개로 확인되며 unknown sample의 경우에는 32개로 계산되므로  $11\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione의 수소 수와 일치함을 알 수 있다.

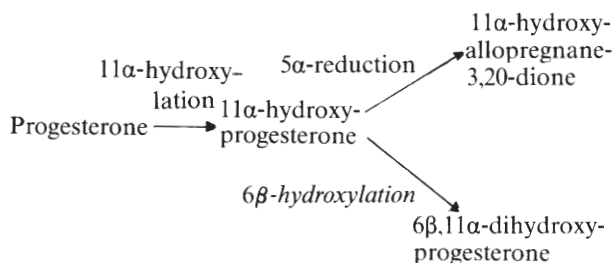
이상의 결과로 부터 미확인 steroid는  $11\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione인 것으로 확인할 수 있다. 이 steroid는 *A. suniculosis*, *R. nigricans* REF 129등에

의하여 생성된다고 보고되었으나 (Monem등, 1969; Sallam등, 1970) 10% 미만으로 그 생성량은 본 연구의 결과 (Fig. 1)와는 달리 소량이었다.

#### Progesterone transformation 반응 경로

Fig. 8은 0.05 g/l (최종농도)의 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone을 기질로 하였을 때 반응 산물의 경시 변화를 나타낸다. 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone의 농도가 감소함에 따라 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione의 농도는 상승하며 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone도 미량 생성됨을 알 수 있다. 11 $\alpha$ -Hydroxy-allopregnane-3,20-dione과 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone은 각각 progesterone의 두 위치에서 변형이 일어난 구조 (C<sub>5</sub>와 C<sub>11</sub>, C<sub>6</sub>과 C<sub>11</sub>)이기 때문에 progesterone으로부터 각각 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione (Lefebvre등, 1974)과 6 $\beta$ -hydroxyprogesterone (Schneider 등, 1974)의 중간 산물을 거쳐 생성될 수도 있다. 실제로 *R. nigricans*는 Fig. 9에 나타낸 바와 같이 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione을 기질로 하였을 때 소량의 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3, 20-dione을 생성하였

다. 그러나 *R. nigricans*에 의한 progesterone 전환 산 dione의 생성은 전혀 관찰되지 않았으므로 이 물질을 중간 생성물로 하여 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione이 생성되지 않음을 유추할 수 있다. 6 $\beta$ -Hydroxyprogesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylation도 6 $\beta$ -hydroxyprogesterone이 반응물 속에서 검출되지 않았으므로 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone의 생성 경로가 아님을 알 수 있다. 그러므로 *R. nigricans*는 Fig. 1과 Fig. 8의 결과로부터 다음과 같은 progesterone 전환 반응 경로를 나타낸다고 판단된다.



#### 적 요

*Rhizopus nigricans*에 의하여 생성되는 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone은 반응 시간에 따라 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone과 분리되기 어려운 부산물이 함께 생성된다. Chromatography와 IR 및 NMR spectroscopy로 분석한 결과 이 물질은 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione으로 동정되었다. *R. nigricans*는 progesterone으로부터 monoform의 intermediate로 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 만을 생성하고, 이 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone은 5 $\alpha$ -reduction과 6 $\beta$ -hydroxylation에 의하여 11 $\alpha$ -hydroxy-allopregnane-3,20-dione과 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone으로 전환되는 반응경로를 나타내는 균주로 판명되었다.

#### 사 사

본 연구는 한국과학재단연구비 지원(891-0407-029-2)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Aldrich Library of NMR Spectra.
2. Bihari, V., P.R. Goswami, S.H.M. Rizvi, A.W. Khan, S.K. Basu and V.C. Vora, 1984. Studies in immobilized fungal spores for microbial transformation of steroids: 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone with immobilized spores of *Aspergillus ochraceus* G8 on polyacrylamide gel and other matrices. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1403-1408.
3. El-Refai, A.H., L.A.R. Sallam and I.A. El-Kady, 1970. The transformation of progesterone by *Cladosporium cladosporioides* and *Aspergillus fischeri*. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie.*, **10**, 183-187.
4. El-Refai, A.H., A.F. Abdel Fattah, K.A. Ibrahim and L.A.R. Sallam, 1973. Degradation of progesterone by *Aspergilli* side chain cleaving enzymes. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie.*, **13**, 201-206.
5. Fieser, L.F. and M. Fieser, 1959. Steroids. Reinhold Publishing Corp. N.Y. pp. 675-678.
6. Hanisch, W.H., P. Dunnill and M.D. Lilly, 1980. Optimization of the production of progesterone 11 $\alpha$ -hydroxylase by *Rhizopus nigricans*. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 555-570.
7. Kieslich, K., 1980. Industrial aspects of biotechnological production of steroids. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 211-217.
8. Kim, M.H., J.J. Lee, M.N. Kim and B.R. Min, 1990. Optimal material and conditions for the immobilization of *Rhizopus nigricans* in the 11 $\alpha$ -hydroxylation reaction of progesterone. *Kor. J. Mycol.*, **18**, 84-88.
9. Kim, M.H. and M.N. Kim, 1987. Progesterone hydroxylation by *Rhizopus nigricans* (I): The effects of reaction conditions. *Kor. J. Mycol.*, **15**, 23-28.
10. Lefebvre, G., F. Schneider, P. Germain and P. Gay, 1974. Hydrogenation et deshydrogenation selectives de  $\Delta^4$ -ceto-3 steroids par *Nocardia*. *Tetrahedron Letters*, **2**, 127-128.



11. Monem, A., H.E. Lofty, L.A.R. Sallam and I.A. El-kady, 1969. Microbiological transformation of progesterone. *Jour. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 301-307.
12. Njar, V.C.O., S. Shapiro, T. Arunachalam and E. Caspi, 1985. Biotransformation of progesterone to 14 $\alpha$ -hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione, a novel fungal metabolite, by *Colletotrichum antirrhini*. *J. Steroid Biochem.*, **22**, 399-400.
13. Sallam, L.A.R., A. Monem, A.H. El-Refai and I.A. El-Kady, 1970. Transformation of progesterone by *Aspergillus niger* 100 and *Rhizopus nigricans* REF 129. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **43**, 1239-1242.
14. Sallam, L.A.R., A.H. El-Refai and I.A. El-Kaday, 1971. The *in vitro* transformation of progesterone by *Rhizopus nigricans* REF 129. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **11**, 325-300.
15. Sallam, L.A.R., A.H. El-Refai, S. Nada and A.F. Abdel-Fattach, 1973. Enzymatic hydroxylation and side-chain degradation of progesterone by *Aspergillus fischeri*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 155-160.
16. Sallam, L.A.R., N. Laim, A. Zeinel, A. Badr and A. H. El-Refai, 1976. Some factors influencing the enzymatic conversion of progesterone by *Aspergillus niger* 171. *Revista A.B.A.* **227**, 221-227.
17. Schneider, J.J., 1974. Influence of oxygen substituents at the C-11, -17, -20, and -21 positions on the extent of 6 $\beta$ -hydroxylation of steroids by the mold *Rhizopus arrhizus*. *J. Steroid Biochem.*, **5**, 9-13.
18. Sebek, O.A., L.M. Reineke and D.H. Peterson, 1962. Intermediates in the metabolism of steroids by *Penicillium lilacinum*. *J. Bacteriol.*, **83**, 1327-1331.

(Received March 22, 1991)

(Accepted April 9, 1991)