

고정화된 *Aspergillus phoenicis* 를 이용한 progesterone 전환

박희은·김말남

상명여자대학교 생물학과

Bioconversion of Progesterone by Immobilized *Aspergillus phoenicis*

Park, Hee-Eun and Mal-Nam Kim

Department of Biology, Sang Myung Women's University

**ABSTRACT:** Progesterone bioconversion by immobilized *Aspergillus phoenicis* was studied. Progesterone was converted into 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 3-minor byproducts. Whole cells of *A. phoenicis* were immobilized by entrappment with calcium-alginate, K-carrageenan, or polyacrylamide. Of these materials tested, cell immobilized in Ca<sup>2+</sup>-alginate gels showed the highest activity for 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone. In the case of mycelia immobilized in Ca<sup>2+</sup>-alginate, further progressing hydroxylation of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone was greatly reduced. Spores of *A. phoenicis* which were immobilized with Ca<sup>2+</sup>-alginate and germinated *in situ* for 25 hours showed higher 11 $\alpha$ -hydroxylase activity than those of entrapped whole mycelia and maintained initial enzyme activity for all 8 times of repeated use. After 16 times of reuse, the activity was declined 30% or more. When culture media and Zn<sup>2+</sup> were introduced into the reaction media, the activity of the immobilized mycelia which had been lowered due to many times of reuse was effectively reactivated.

**KEY WORDS** □ *Aspergillus phoenicis*, progesterone bioconversion, immobilization

세포 자체를 고정화함으로써 효소원의 재사용 및 연속적인 반응을 가능하게 하는 기술(Klein과 Wagner, 1983)은 1966년 Mosbach에 의해 처음 개발되었다. 이 기술은 특히 기질이나 생성물의 분자량이 낮을 경우에 유리하게 이용된다(Chibata와 Tosa, 1983).

순수효소를 고정화하는 경우, 필요한 생성물만을 수득할 수 있는 장점을 갖게 되나 효소를 분리·추출 및 정제하는 데는 많은 비용이 요구될 뿐만 아니라 정제된 효소는 외부환경에도 매우 불안정하다. 따라서 세포자체를 효소원으로 이용함으로써 효소는 원래의 환경속에서 안정화되며, ATP와 NADPH를 비롯한 조효소의 공급이 원활하게 이루어지고(Brodelius와 Vandamme, 1987) 다 효소 체계의 생화학 반응에도 손쉽게 응용될 수 있다(Chibata와 Tosa, 1983).

고정된 세포는 여러 분야에서 이용되고 있다. 효소(Li 등, 1984)와 생화학 약품의 생산(Kopp와 Rehm, 1983), 유기산의 합성(Tuli 등, 1985), 알콜이나 아미노산의 생산에 이용되며(Krug 등, 1983) pH의 특정 화학물질을 분석하는 전극으로서(Ochiai 등, 1983), 그리고 폐수처리에도 이용되고 있으며(Cheethan과 Bucke, 1984), 생체내 대체장기로도 활용될 수 있을 것으로 전망된다(Kierstan과 Coughlan, 1985). 고정화 방법중 세포나 효소를 adsorption 시키므로 aggregates를 형성하거나 담체에 covalent binding 시키는 것은 효소활성 및 다른 특성을 잃게 되는 단점이 수반된다. 따라서 고정화 조건이 온화하며 gel matrix가 open pore system이므로 물질전달이 쉽게 일어나 생존 미생물을 고정하기에 적절하다 할 수 있는 entrappment 방법이 보편적으로 많이 이용된다

(Kierstan과 Coughlan, 1985).

류마치스성 관절염을 비롯한 여러 질병에 치료 효과가 뛰어난 corticosteroids 생성에 필수적인 11-hydroxylation 과정은 조효소의 재생을 필요로 하는 다효소 체계이므로 생존미생물이 효소원으로 사용되고 있다. 진균을 이용하여 progesterone을 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone으로 전환시키는 반응은 생성되는 부산물 또한 소량이므로 (Smith, 1984), corticosteroids 제조에 이용되는 다른 미생물 전환반응보다 경제적이다 할 수 있다.

본 연구는 progesterone의 전환능력이 있다고 밝혀진 (Kim과 Lee, 1985) *A. phoenicis* 균체를 고정하였을 때 고정화 목적중의 하나인 재사용 가능성을 검토하였다. 또한 장기간의 재사용으로 인하여 활성이 저하된 효소의 재활성화에 기여할 수 있는 요인과 그 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

전환반응의 실험방법은 Kim과 Lee(1985)의 방법을 따랐으나, 다만 반응용 완충용액 (pH 4.5)은 0.1M succinic acid buffer를 이용하였다.

#### 고정방법

① Ca<sup>2+</sup>-alginate gel ; 2% alginate 용액 (10 ml)에 포자현탁액 (혹은 균사체)을 혼합한 후 0.05 M CaCl<sub>2</sub> 용액속에서 bead의 형태로 고정체를 얻었다. 약 1시간 후 수거하여 완충액으로 잘 세척한 후 반응에 이용하였다.

② K-carrageenan gel ; 2% K-carrageenan 용액 (10 ml)을 70°C 정도로 중탕하여 용해시킨 후 45°C 정도에서 균사체를 혼합하여 0.3M KCl 용액에서 beads를 만들었다.

#### Steroids 의 분석

HPLC (Waters Co.)를 이용하였다. Steroids 시료는 acetonitrile : water 가 30 : 70 및 95 : 5로 조성된 eluent를 따라 step gradient 방식으로 Nova pac C<sub>18</sub> column을 통과하면서 전개시켰다. 각 물질의 elution peak는 254 nm의 UV detector로 정량하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균사체의 고정화

Fig. 1은 고정되지 않은 균사체의 반응시간에 따

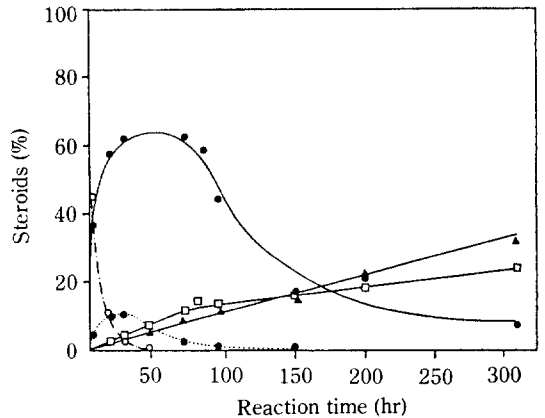


Fig. 1. Progesterone conversion with intact mycelia.

Progesterone concentration --0.1 g/l

Reaction temperature -----28-30°C

pH of reaction medium -----4.5

○--○ ; progesterone

●--● ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone

●---● ; 15 $\beta$ -hydroxyprogesterone

▲--▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone

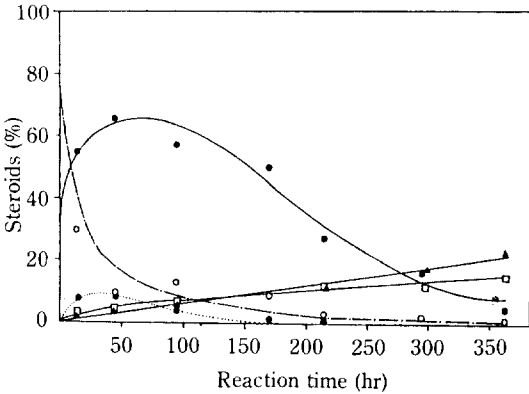
□--□ ; dihydroxyprogesterone

른 hydroxylation율을 나타낸 결과이다. 기질인 progesterone은 반응 10시간 이내에 80% 이상 전환되었다. 주요 산물은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이며 반응 48시간에서 최대 수득율 63%를 보였다. 뚜렷한 부산물은 3가지였으며, 이는 15 $\beta$ -hydroxyprogesterone, 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone과 제2의 dihydroxyprogesterone이었다.

Fig. 2와 3은 각각 K-carrageenan과 Ca<sup>2+</sup>-alginate에 고정된 균사체의 hydroxylation을 나타낸다. 고정된 균사체가 고정되지 않은 균사체에 비하여 오히려 더 높은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득율을 보여주었다. 특히 Ca<sup>2+</sup>-alginate로 고정하였을 경우에는 생성된 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone이 다른 부산물로 거의 전환되지 않았고 반응 200 시간에서도 약 60% 정도의 높은 수득율을 유지하였다.

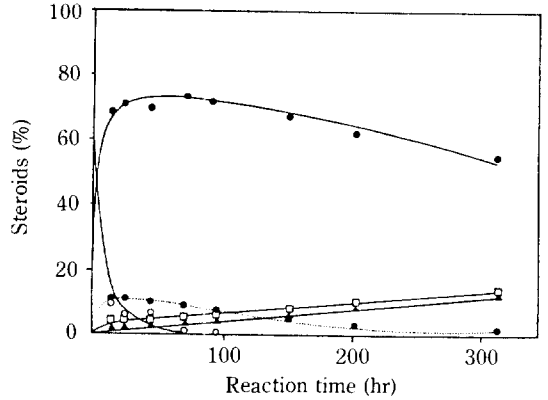
따라서 Ca<sup>2+</sup>-alginate로 고정하였을 때 생성된 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone을 다른 물질로 전환시키는 반응에 대한 억제효과가 있었다고 판단된다.

실험결과를 본 논문에서 제시하지는 않았지만 polyacrylamide로써 고정된 경우에 효소의 활성은 거의 없는 것으로 측정되었다.



**Fig. 2.** Progesterone hydroxylation by *A. phoenicis* mycelia entrapped in *K-carrageenan* beads. Progesterone concentration --0.1 g/l Reaction temperature -----28-30°C Reaction medium -----0.1M citric acid buffer (pH 4.5)

- ; progesterone
- ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
- ; 15 $\beta$ -hydroxyprogesterone
- ▲-▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone
- ; dihydroxyprogesterone



**Fig. 3.** Progesterone hydroxylation by *A. phoenicis* mycelia entrapped in  $Ca^{2+}$ -alginate beads. Progesterone concentration --0.1 g/l Reaction temperature -----28-30°C Reaction medium -----0.1M succinic acid buffer (pH 4.5)

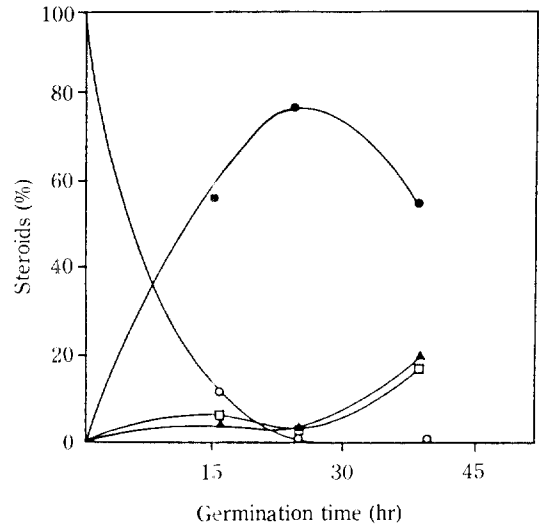
- ; progesterone
- ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
- ; 15 $\beta$ -hydroxyprogesterone
- ▲-▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone
- ; dihydroxyprogesterone

**포자의 고정화**

*A. phoenicis* 포자체는 progesterone의 11 $\alpha$ -hydroxylase 활성이 전혀 없는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 1982). 그러나 Ohlson 등(1980)의 방법에 따라 포자를 고정화한 후 그 자체를 발아시켜 얻은 균사체를 효소원으로 이용한 결과 고정된 포자에는 11 $\alpha$ -hydroxylation 능력이 있었으며 이는 발아시간에 따라 달랐다.

Fig. 4로부터 포자를 25시간 동안 발아 및 성장시켰을 때 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득율이 최대치에 도달하였으며 균사체를 직접 고정화한 경우보다 포자를 고정화한 후 발아시킨 경우보다 포자를 고정화한 후 발아시킨 균사체를 효소원으로 사용한 경우 더 높은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득율을 나타냄을 알 수 있다. 이 결과는 고정체(bead)의 크기 조절이 용이한 포자고정법이 더 우수한 방법임을 제시한다.

고정시 고정체의 크기는 효소활성에 많은 영향을 미친다고 알려져 있으며 특히 bead 내부로의 oxygen transfer를 어렵게 할 수도 있다. Chen과 Huang(1988)이  $Ca^{2+}$ -alginate gel로 고정된 *Trichosporon cutaneum*으로 연구한 바에 의하면



**Fig. 4.** Effect of germination time on progesterone transformation of  $Ca^{2+}$ -alginate immobilized *A. phoenicis* spores. Progesterone concentration --0.1 g/l Reaction time -----48 hrs.

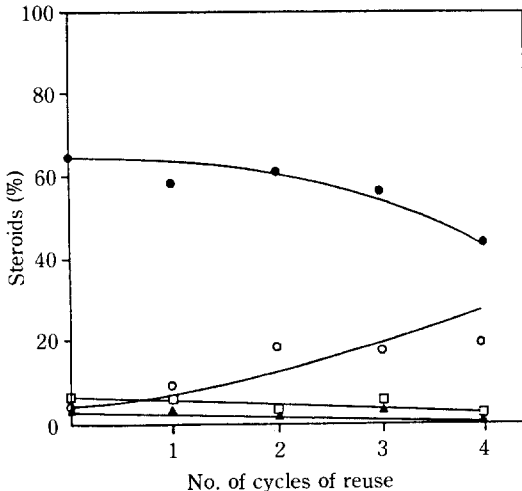
- ; progesterone
- ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
- ▲-▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone
- ; dihydroxyprogesterone

bead의 크기가 직경 1.5mm 이하일 때 bead 내부로의 물질전달 저항을 무시할 수 있다고 보고하였다.

**고정된 균체의 재사용**

Fig. 5는 균사체를 고정하여 반응에 반복적으로 사용해 본 결과이다. 1회 재사용은 24시간 동안의 전환반응으로 하였으며 그 후 효소원을 인출액으로 충분히 세척하여 다시 24시간 동안의 전환반응에 재사용 하는 일을 반복하였다. 재사용 횟수가 증가될수록 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득률이 감소되는 것을 알 수 있으며, 이는 재사용 횟수가 증가함에 따라 효소의 활성이 저하되는 것에 기인한다. 고정하지 않은 균사체를 효소원으로 하여 재사용을 시도하였으나 반응액의 오염 및 효소원의 분해현상 등 문제점이 많아 재현성 있는 실험 결과가 얻어지지 않았다. 그러므로 효소원의 재사용을 위하여는 세포의 고정화가 반드시 선행되어야 할 것으로 판단된다.

Fig. 6은 포자를 고정한 후 그 자체를 발아·성장시켜 얻은 균사체를 재사용했을 때의 효소활성을 나타내었다.



**Fig. 5.** Reuse of Ca<sup>2+</sup>-alginate immobilized *A. phoenicis* mycelia (2 g/l, dry weight) for 11 $\alpha$ -hydroxylation reaction.  
 Progesterone concentration --0.1 g/l  
 Reaction time -----24 hrs.  
 ○-○ ; progesterone  
 ●-● ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone  
 ▲-▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone  
 □-□ ; dihydroxyprogesterone

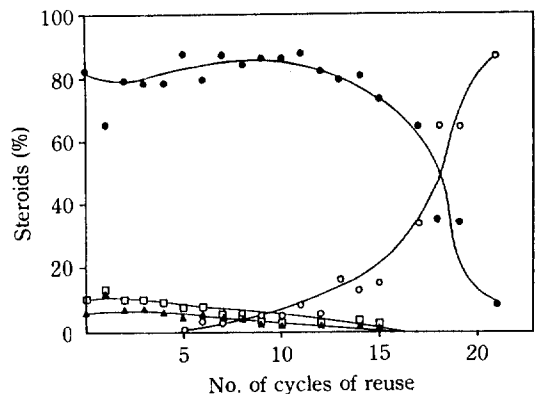
Sonomoto 등(1982)은 *Rhizopus stolonifer*를 photo-crosslinkable resin polymer로 고정시켜 11 $\alpha$ -hydroxylation 반응에 재사용한 결과 2회 사용 후에 초기 활성의 30% 수준만을 유지하였다고 보고 하였으며, Bihari 등(1984)은 polyacrylamide에 고정된 *Aspergillus ochraceus*의 경우 재사용 4회까지는 활성이 그대로 유지되다가 재사용 10회에 이르러서는 초기 활성의 50% 수준으로 저하되었다.

이에 반하여 고정된 *A. phoenicis* 포자를 발아시켜 얻은 균사체는 재사용 8회(약 200 시간)까지도 그 효소활성이 매우 안정하며 높은 11 $\alpha$ -hydroxylation 활성을 유지하였다. 재사용 16회에서는 약 30%의 활성감소를 보인 후 20회에는 10% 내외의 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone만이 생성되었다.

**고정된 균체의 재활성화**

*A. phoenicis* 고정체의 11 $\alpha$ -hydroxylase 활성은 16회 이상 재사용할 경우 저하되어 반응액내에 전환되지 않고 남아 있는 progesterone 양이 점차 증가한다. 이때 효소의 재활성화를 도모하기 위하여 여러 요인으로 처리한 결과를 Table 1과 Fig. 7에 나타내었다.

균체성장용 배지로 처리한 경우와 Zn<sup>2+</sup>로 처리



**Fig. 6.** Reuse of immobilized mycelia which were obtained from 2.85 × 10<sup>6</sup> spores entrapped with 10 ml of 2% alginate gel.  
 Progesterone concentration --0.1 g/l  
 Reaction time -----24 hrs.  
 ○-○ ; progesterone  
 ●-● ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone  
 ▲-▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone  
 □-□ ; dihydroxyprogesterone

**Table 1.** Factors for reactivation of 11 $\alpha$ -hydroxylase in *A. phoenicis* mycelia entrapped within Ca<sup>2+</sup>-alginate

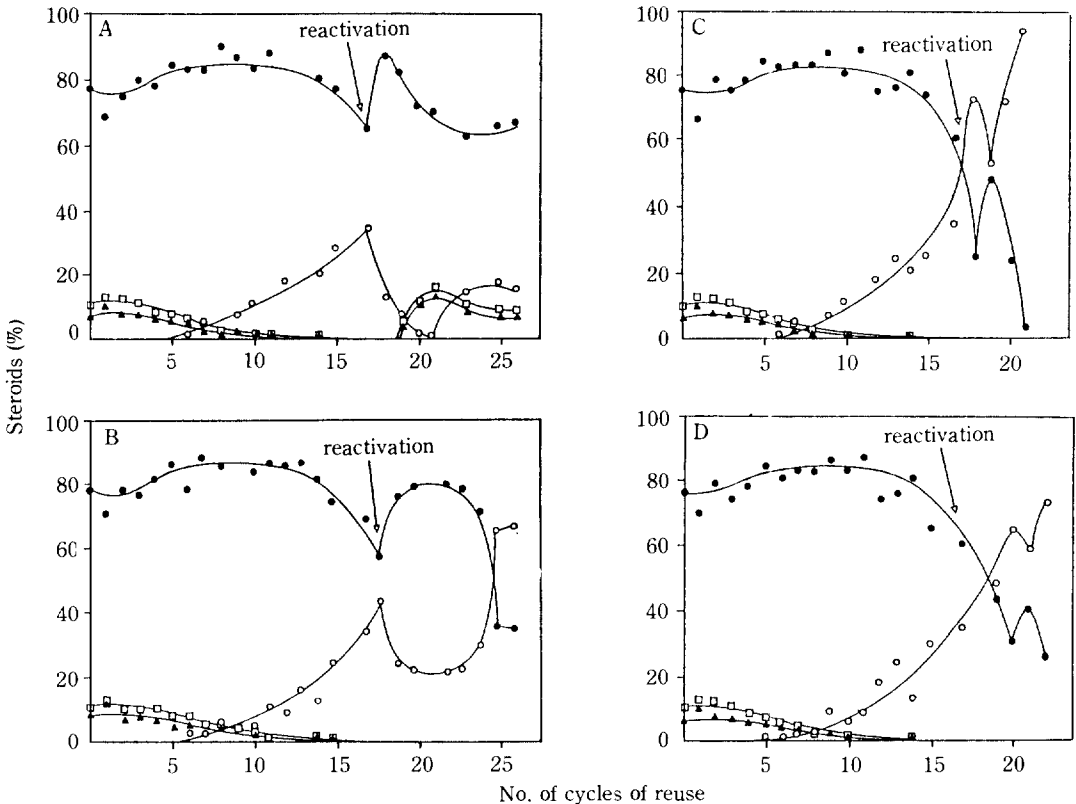
Factors	Effect of reactivation
Nutrient media	+
Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> )	+
Fe <sup>3+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	-
Glucose	-
Glycerol	-
Biotin	-
Sodium meta periodate	+
Penazin mesosulfate	+
Menadione	-

한 경우 효소 재활성화에 좋은 효과가 나타났다. 이는 균체성장용 배지로 1회 처리하면, 고정체 내부에서 균사체의 재성장이 일어나므로 막성 효소

가 재생되거나 혹은 새로이 합성되기 때문으로 보인다. Larsson 등(1979)은 균체성장용 배지로 처리하면 세포의 성장에 따른 효소의 선택적인 합성으로 인하여 재활성화가 있었다고 하였으며, Sonomoto 등(1982)도 유사한 결과를 보고하였다.

*A. phoenicis*의 경우는 효소의 재활성화가 11 $\alpha$ -hydroxylase 활성 이외에도 dihydroxyprogesterones로의 전환반응도 촉진시켜 이들의 생성량이 다소 증가되었다.

Zn<sup>2+</sup>도 효소 재활성화에 크게 기여하였다(Fig. 7-B). Zn<sup>2+</sup>는 hydroxylase 효소합성 혹은 그 활성에 영향을 준다고 추정된다. Dulaney 등(1955)도 progesterone의 6 $\beta$ -hydroxylation 반응에 관여하는 효소의 생성에 Zn<sup>2+</sup>가 필수요소라고 보고하였다. Zn<sup>2+</sup>가 유전자 기능을 조절하거나



**Fig. 7.** Reactivation of the deactivated cells entrapped with Ca<sup>2+</sup>-alginate using several chemicals.

- A; nutrient media                      ○ - ○ ; progesterone
- B; Zn<sup>2+</sup>                                      ● - ● ; 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
- C; penazin mesosulfate                ▲ - ▲ ; 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone
- D; sodium meta periodate            □ - □ ; dihydroxyprogesterone

(Crossley 등, 1982) 염색체 구성단백질을 변화시켜(Mazus 등, 1984) 특수 단백질의 생성을 촉진 또는 억제한다고 보고된 바 있다. 그러나 steroid bioconversion 반응에서  $Zn^{2+}$ 는 아무 영향이 없다고 하는 (Vézina 등, 1963) 보문도 있어서 hydroxylase에 대한  $Zn^{2+}$ 의 기능 규명에는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Progesterone의  $11\alpha$ -hydroxylation에는 cytochrome P-450이 관련된 일련의 전자전달계가 관여하며  $11\alpha$ -hydroxylase system은 cytochrome P-450, flavoprotein, iron-sulfurprotein의 3가지 구성성분으로 이루어지며(Jayanthi 등, 1982), cytochrome P-450이 hemoprotein이라는 점과 iron-sulfur protein이  $11\alpha$ -hydroxylase system

의 구성요소라는 점에서  $Fe^{3+}$ 이 재활성화에 기여할 것으로 예상되었으며, 그의 균체에 대한 에너지 공급 및 활성촉진에(Maddox 등, 1981; Clark 등, 1983) 효과가 있는 glucose 등도 재활성화에 효과가 있을 것으로 기대되었으나 효소원을 이들로써 처리한 결과 오히려 그 활성이 저하되었다.

뿐만 아니라 steroid hydroxylating enzyme은 NADPH나 reducing factor의 존재를 필요로 하므로(Ghosh와 Samanta, 1981) 외부 전자 수용체의 첨가가 효소활성을 상승시킬 것으로 기대되었으나 큰 효과가 없는 것으로 나타났다.

이에 대한 명확한 결론을 위하여 더 많은 실험자료가 필요할 것으로 판단된다.

## 적 요

고정된 *Aspergillus phoenicis*를 이용한 progesterone의 전환반응에 관하여 연구하였다. Progesterone은 주로  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone으로 전환되었으며 부산물로  $15\beta$ -hydroxyprogesterone과  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone 및 제2의 dihydroxyprogesterone이 생성되었다. Calcium alginate, *K*-carrageenan, polyacrylamide를 이용하여 균체를 고정하여 반응을 진행하였다. Calcium alginate로 고정한 경우에  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone이 불필요한 부산물들로 전환되는 반응이 억제되어 가장 높은  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone의 수득율이 얻어졌다. 균사체를 고정화하는 것보다는 포자를  $Ca^{2+}$ -alginate로 고정시켜 gel matrix 내부에서 발아시킨 것을 효소원으로 사용하였을 때 더 좋은 활성이 있어 고정된 포자를 25시간 동안 발아 및 성장시켰을 때 반응 48시간에서 progesterone의 수득율은 약 80%에 도달하였다. 고정된 포자내에서 발아한 균사체의 경우 반응횟수 8회까지 재사용이 용이하였으며, 16회 재사용 이상에서는 30% 이상 효소활성이 저하되었다. 활성이 저하된 고정체의 경우 균체성장용 배지와  $Zn^{2+}$ 가 효소의 재활성화에 효과를 보였다.

## REFERENCES

1. Bihari, V., P.P. Goswami, S.H.M. Rizvi, A.W. Kam, S.K. Basu, and V.C. Vora (1984). Studies on 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.
2. Brodelius, P., and E.J. Vandamme (1987). Immobilized cell systems (Chap. 8). in *Biotechnology*, Vol. 7. VCH Verlagsgesellschaft, 405-464.
3. Cheethan, P.S.J., and C. Bucke (1984). Immobilization of microbial cells and their use in waste water treatment. in *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*, 219-234.
4. Chen, K.C., and C.T. Huang (1988). Effect of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 284-292.
5. Chibata, I., and T. Tosa (1983). Immobilized cells; historical background. in *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4. Academic press, 1-9.
6. Clark, T.A., I.S. Maddox, and R. Chong (1983). The effect of glucose on  $11\alpha$ - and  $19$ -hydroxylation of Reichstein's substance S by *Pellicularia filamentosa*. *Eur. J. Appl. Micro-*

- biol. Biotechnol.*, **17**, 211-215.
7. Crossley, L.G., K.H. Falchuk, and B.L. Vallee (1982). Messenger ribonucleic acid function and protein synthesis in zinc-deficient *Euglena gracilis*. *Biochemistry*, **21**, 5359-5363.
  8. Dulaney, E.L., E.O. Stapley, and C. Hlavac (1955). Hydroxylation of steroids, principally progesterone, by a strain of *Aspergillus ochraceus*. *Mycologia*, **47**(4), 464-474.
  9. Ghosh, D., and T.B. Samanta (1981). 11 $\alpha$ -Hydroxylation of progesterone by cell free preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.*, **14**, 1063-1067.
  10. Jayanthi, C.R., P. Madyastha, and K.M. Madyastha (1982). Microbial 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone in *Aspergillus ochraceus*; part I; Characterization of the hydroxylase system. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **106**, 1262-1268.
  11. Kierstan, M., and M.P. Coughlan (1985). Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. in *Immobilised cells and enzymes*, IRL press. 39-48.
  12. Kim, M.N., F. Ergan, P. Dhulster, P. Atrat, G. Gelff, and D. Thomas (1982). Steroid modification with immobilized mycelium of *Aspergillus phoenicis*. *Biotechnology letters*, **4**, 203-208.
  13. Kim, M.N., and Y.J. Lee (1985). Steroid modification with *Aspergillus phoenicis*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 297-301.
  14. Klein, J., and F. Wagner (1983). Methods for the immobilization of microbial cells. in *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4. Academic press, 11-51.
  15. Kopp, B., and H.J. Rehm (1984). Semicontinuous cultivation of immobilized *Claviceps purpurca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 141-145.
  16. Krug, T.A., and A.J. Daugulis (1983). Ethanol production using *Zymomonas mobilis* immobilized on an ion exchange resin. *Biotechnology Letters*. **5**, 159-165.
  17. Larsson, P.O., S. Ohlson, and K. Mosbach (1979). Transformation of steroids by immobilized living microorganisms. in *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Vol. 2. Academic press, 291-302.
  18. Li, G.X., Y.Y. Linko, and P. Linko (1984). Glucoamylase and  $\alpha$ -amylase production by immobilized *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, **6**, 645-647.
  19. Maddox, I.S., P. Dunnill, and M.D. Lilly (1981). Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 345-354.
  20. Mazus, B., K.H. Falchuk, and B.L. Vallee (1984). Histone formation, gene expression and zinc deficiency in *Euglena gracilis*. *Biochemistry*, **23**, 43-47.
  21. Ochiai, H., A. Tanaka, and S. Fukui (1983). Immobilized organelles, in *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4. 152-189.
  22. Ohlson, S., S. Flyare, P.O. Larsson, and K. Mosbach (1980). Steroid hydroxylation using immobilized spore of *Curvularia lunata* germinated *in situ*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 1-9.
  23. Smith, L.L. (1984). Steroids, in *Biotechnology*. Vol. 6a. Verlag chemie GmbH, 31-78.
  24. Sonomoto, K., K. Nomura, A. Tanaka, and S. Fukui (1982). 11 $\alpha$ -Hydroxylation of progesterone by gel-entrapped living *Rhizopus stolonifer* mycelia. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 57-62.
  25. Tuli, A., R.P. Sethi, P.K. Khanna, and S.S. Marwaha (1985). Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 164-168.
  26. Vézina, C., S.N. Sehgal, and K. Singh (1963). Transformation of steroids by spores of microorganisms. I. Hydroxylation of progesterone by conidia of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.*, **11**, 50-57.

(Received Dec. 20, 1988)