

토양 미생물 HSL613이 생산하는 Cholesterol Oxidase의 정제 및 특성

이홍수 · 이승철 · 권태종¹ · 정태화*

KIST 유전공학연구소 면역화학연구소, ¹건국대학교 공과대학 미생물공학과

Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase Produced by Soil Microorganism HSL613

Lee, Hong-Soo, Seung-Cheol Lee, Tae-Jong Kwon¹ and Tai-Wha Chung*

Laboratory of Immunochemistry, Genetic Engineering Research Institute,
KIST, P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

¹Department of Microbial Engineering, Kon-kuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — The extracellular cholesterol oxidase produced from a soil microorganism HSL613 was purified and partially characterized. Through a series of purification procedures including concentration with CH2 concentrator, DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Superose12, the purified enzyme was shown to have a specific activity of 108 units/mg protein giving 30.8-fold purification and final yield of 66%. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 59,500 daltons by SDS-PAGE. The optimum temperature and pH for this enzyme were 50°C and 6.0, respectively. The activity of the purified cholesterol oxidase was inhibited by Ag²⁺, Hg²⁺ and SDS.

건강에 대한 관심도가 높아짐에 따라 임상진단용 효소의 의학적 이용성이 증대되고 있다. Cholesterol은 성인병인 동맥협착증(atherosclerosis)의 주원인이 되고 있어서, 혈청 중의 cholesterol 정량은 동맥협착증을 예방할 수 있는 지침을 제공하므로 성인병 진단에 중요한 영역을 차지한다(1, 6, 7, 16, 20, 22).

Cholesterol oxidase는 cholesterol을 산화시켜 cholestenone과 H₂O₂의 생성을 촉매시켜 주는 효소로 cholesterol의 정량법(1, 7, 17, 32)에 사용되는 중요한 임상용 효소 중의 하나이다. Cholesterol oxidase는 1973년 Richmond(17)와 Flegg 등(7)에 의해서 cholesterol oxygen oxidoreductase(EC 1.1.3.6)로 명명되었고, 1944년 Turffic 등(27)이 *Proactinomyces erythropolis*에서 추출한 효소를 사용하여 cholesterol로부터 4-cholesten-3-one이 생성됨을 발표하였다. Schatz 등(18)은 *Mycobacterium*이 cholesterol을 산화할 수 있다는 사실을 보고하였으며, 이들의 세포

추출액이 cholesterol과 반응하여 4-cholesten-3-one을 생성함을 확인하였다. 그 후 cholesterol을 산화할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas*속(24), *Mycobacterium*속(23), *Nocardia*속(4, 21, 28), *Arthrobacter*속(2, 23), *Streptomyces*속(10, 25), *Brevibacterium*속(29, 30), *Corynebacterium*속(19) 등이 연구 보고되었다.

초기 Turffic 등(27)이 선별한 미생물인 *Nocardia erythropolis*는 균체내 효소를 생성하기 때문에 효소 생산 및 정제에 난점이 있어서, Fukuda(8)와 Uwajima 등(29)은 효소생산 및 정제가 용이한 *Streptomyces vilolascens*와 *Brevibacterium sterolicum*은 선별하여 cholesterol oxidase를 생산하고 분리정제하였다.

이와같이 몇 종류의 미생물로부터 효소생산이 알려져 있고 cholesterol oxidase의 산업적 생산이 이루어져 극히 고가로 판매되고 있다. 일본에서는 *Streptomyces*속의 한 균주를 분리하여 효소를 생산하는데 사용하고 있다고 보고하고 있다(33).

현재 국내에서 임상용으로 사용되는 cholesterol 정량 kit는 고가로 외국에서 수입하고 있는 실정이므로 국내에서도 고역가의 cholesterol oxidase를 생

Key words: Cholesterol oxidase, purification, characterization

*Corresponding author

산하는 연구가 필요하게 되었다. 이에 고역가의 cholesterol oxidase를 분리하는 미생물을 우리나라 토양으로부터 분리하였으며(34), 본 연구에서는 이 균체가 생산하는 효소를 정제하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 연구에 사용한 cholesterol oxidase 생산균주는 HSL613이라 명명한 미생물로 토양에서 분리한 *Streptomyces*속이며(34), 균주의 배양배지는 2% glucose, 2% yeast extract, 2% KH_2PO_4 , 0.1% NaCl, 0.005% CaCl_2 , 0.001% FeSO_4 를 사용하였다(34). 효소활성 측정용 기질은 cholesterol(Sigma)을 사용하였다.

조효소액 조제

HSL613균을 10% 접종하여 30°C에서 pH 7.0으로 맞추어 144시간 배양한 다음 배양액을 원심분리(8000 rpm, 15분간)하여 균체를 분리 제거시킨 상등액을 효소정제용 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Cholesterol oxidase의 활성은 Cheetham(4)의 방법에 따라 측정하였으며, 6 mM cholesterol을 isopropanol에 완전히 녹인 용액 50 μl 와 0.5% Triton X-100을 함유한 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml에 효소액 10 μl 를 가하고 30°C에서 1분 동안의 흡광도 변화를 파장 240 nm에서 측정하였다. 산화된 4-cholesten-3-one 1 μmole 을 1분당 생성하는 효소의 활성도를 1 unit라 정의하였다.

단백질정량

효소 정제 과정 중의 단백질 농도는 Uvicon 810 spectrophotometer(Kontron)로 측정된 280 nm에서의 흡광도로 표시하였다. 단백질 농도는 Bladford 방법(3)으로 측정하였고, 표준품으로는 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다.

효소의 정제

생산된 조효소액을 원심분리하여 상등액을 CH2 concentrator(Amicon)로 5°C의 cold room에서 농축한 후 sample volume의 100배 정도의 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2시간씩 다섯번에 걸쳐 투석하였으며, membrane은 M.W. 10,000(HIP 10-43)을

사용하였다. 위의 과정에서 얻은 효소용액을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 미리 평형시킨 DEAE-cellulose column(1.0×6.5 cm)에 loading한 후 같은 완충용액으로 용출액이 280 nm에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 세척하고 10~100 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 linear gradient를 하여 흡착된 단백질을 0.4 ml/min의 속도로 용출시켜 한 tube당 1.2 ml씩 받았다. Gel filtration은 superose 12 FPLC column(1.0×30 cm, pharmacia)에 sample을 loading하여 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 용출하였으며, 용출속도는 0.2 ml/min이고 tube당 0.6 ml씩 받아 cholesterol oxidase를 분리하였다.

분자량 측정

효소의 분자량은 Laemmli(11)의 방법에 준하여 측정하였는데 표준단백질로는 phosphorylase b(M.W. 94,000), bovine serum albumin(M.W. 67,000), ovalbumin(M.W. 43,000), carbonic anhydrase(M.W. 30,000), soybean trypsin inhibitor(M.W. 20,100), α -lactalbumin(M.W. 14,400)을 사용하였다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 12% acrylamide를 사용하였다(11). 전기영동을 행한 후 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였고 30% methanol과 10% acetic acid로 탈색하였다.

효소반응의 특성

최적 pH : 효소반응의 최적 pH를 검토하기 위하여 cholesterol oxidase를 아래의 완충용액에 넣고 30°C에서 반응시킨 후 효소의 역가를 비교하였다. pH 4.0~5.5에서는 50 mM citrate buffer를, pH 6.0~7.5에서는 50 mM phosphate buffer를, pH 8.0~8.5에서는 50 mM Tris buffer를 각각 사용하였다.

최적온도 : 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 6 mM의 cholesterol을 기질로 사용하여 25°C부터 65°C까지 5°C 간격으로 변화시키면서 각각의 온도에서 효소의 반응을 비교하였다.

pH에 대한 안정성 : 효소를 pH 3.0에서 pH 11.0까지 아래 완충용액을 사용하여 25°C에서 20시간 처리 후 효소의 잔존역가를 측정하였다. pH 3.0은 50 mM potassium acetate buffer를, pH 4.0~5.5에서는 50 mM citrate buffer를, pH 6.0~7.5에서는 50 mM pho-

sphate buffer를, pH 8.0~8.5에서는 50 mM Tris buffer를, pH 9.0~10.0에서는 50 mM sodium carbonate buffer를, pH 11.0은 50 mM CAPS buffer를 각각 사용하였다.

온도에 대한 안정성 : 효소를 30°C 에서 60°C 까지 5°C 간격으로 각각의 온도에서 15분간 처리한 후 효소의 잔존역가를 측정하였다.

기질의 농도에 따른 반응속도의 변화 : Cholesterol의 농도를 1, 2.5, 5, 6, 7 mM로 만들어 반응시킴으로써 기질의 농도에 따른 효소의 반응속도를 측정하였다.

Metal ion의 영향 : 효소액을 다양한 metal ion과 함께 25°C 에서 60분간 반응시킨 후 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 남아있는 효소활성을 조사하였다.

기질특이성 : 효소의 각종 기질에 대한 분해정도를 측정하기 위해 cholesterol, stigmasterol, hecogenin, lanosterol, ergosterol, diosgenin 등의 기질을 6 mM로 만들어 isopropanol에 완전히 녹인 각각의 액 50 μ l와 0.5% Triton X-100을 함유한 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml에 정제된 효소액 10 μ l씩 가하여 30°C 에서 1분간 반응속도를 파장 240 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol oxidase의 정제 및 분자량 측정

DEAE-cellulose column chromatography : Cholesterol oxidase를 생산하는 HLS613을 배양한 다음 배양액을 농축하여 효소의 비활성을 측정된 결과 6.6 units/mg으로 나타났으며, cholesterol oxidase의 정제를 위해 농축된 조효소액을 DEAE-cellulose column을 통과시켜 Fig. 1의 결과를 얻었다. 첫번째 peak에서는 결합되지 않은 단백질로 효소활성이 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 cholesterol oxidase가 DEAE-cellulose에 결합하는 것으로 나타났으며, 결합된 단백질을 10~100 mM linear gradient로 용출시킨 2번째 peak인 45~61번 분획에서 cholesterol oxidase의 활성을 갖는 용액이 용출되었으며, 약 15 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 용출되는 것으로 나타났다. 이때 효소의 비활성은 81.5 units/mg 단백질이었다(Table 1).

Gel-filtration : 위 방법에 의해 얻은 효소용액을 농축하여 gel filtration column인 superose 12 FPLC column을 사용하여 cholesterol oxidase를 정제한 결과 단백질의 pattern을 보면 두개의 peak가 나타났다(Fig. 2). 표준단백질을 이용하여 단백질의 크기를 보정한 결과에 의하면 앞쪽 peak는 100~80 kD 정도이며, 뒷 peak는 50~60 kD인 크기를 보였다. 한편 cholesterol oxidase의 활성을 측정해 본 결과 뒷 peak에서만 역가를 나타내었다. 이때의 비활성은 108 U/mg protein이었고, Fig. 3에서와 같이 단일밴드를 얻었으며, 이렇게 하여 30.8배 정제할 수 있었다(Ta-

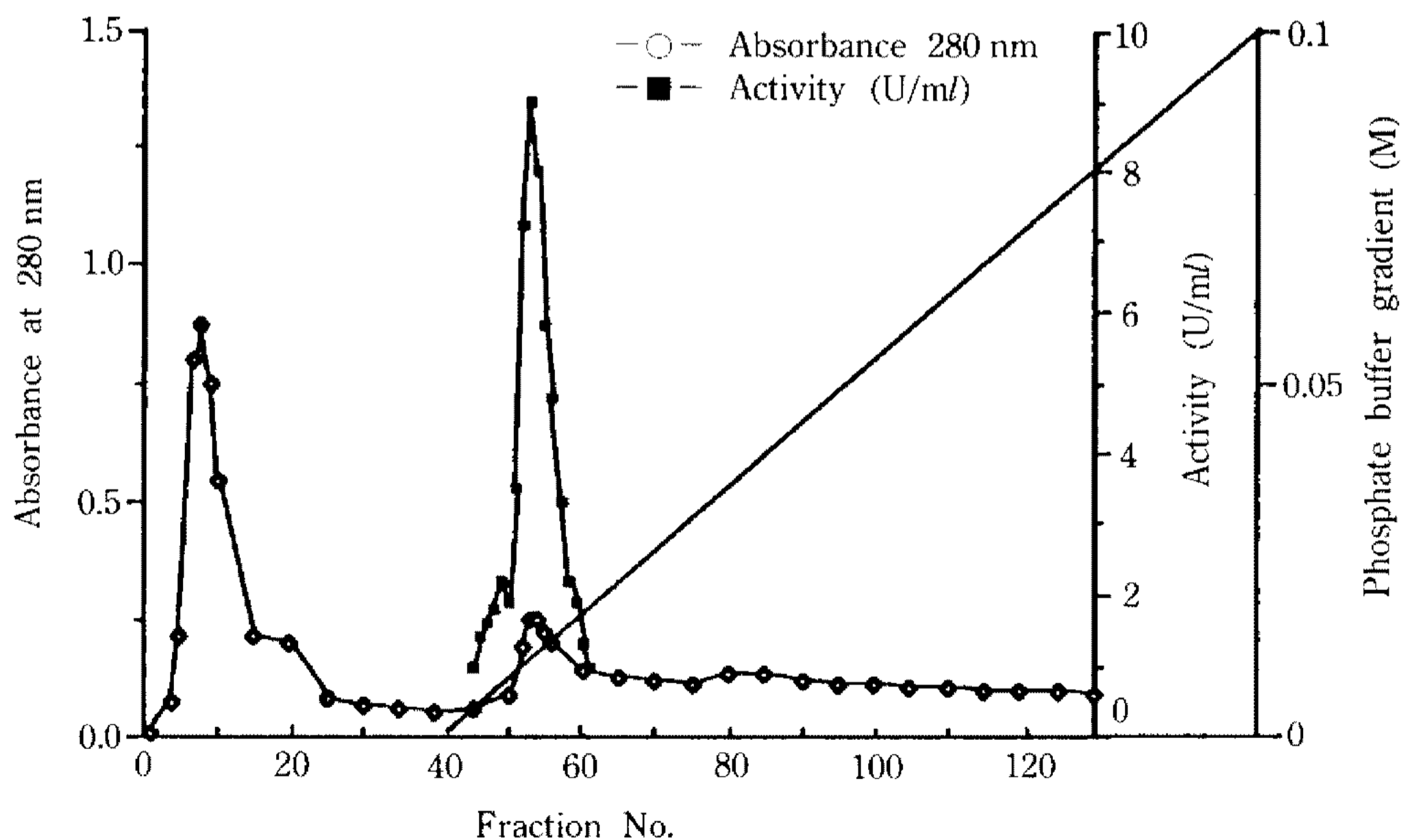
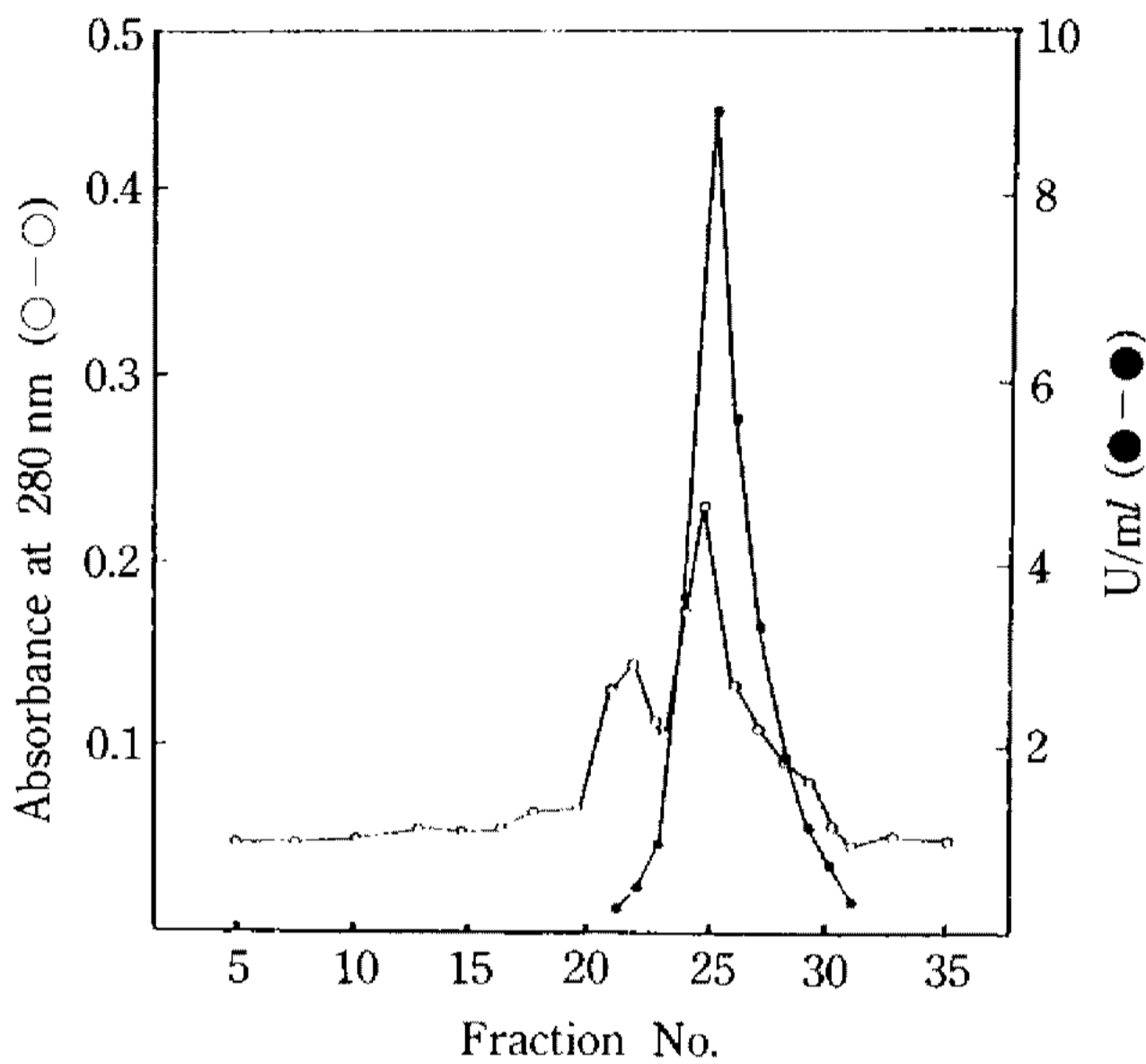


Fig. 1. Ion exchange chromatography of cholesterol oxidase using DEAE-cellulose column. Column size: 1.0×6.5 cm, flow rate: 1.2 ml/3 min, phosphate buffer: pH 7.0.

Table 1. Summary of the purification steps

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/ml)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture broth	6,400	5,724	20,382	3.5	100	1
Concentrate	420	2,924	19,320	6.6	94.8	1.8
DEAE-cellulose	20.4	0.846	68.95	81.5	71	23.3
FPLC	3.3	0.119	12.86	108	66	30.8

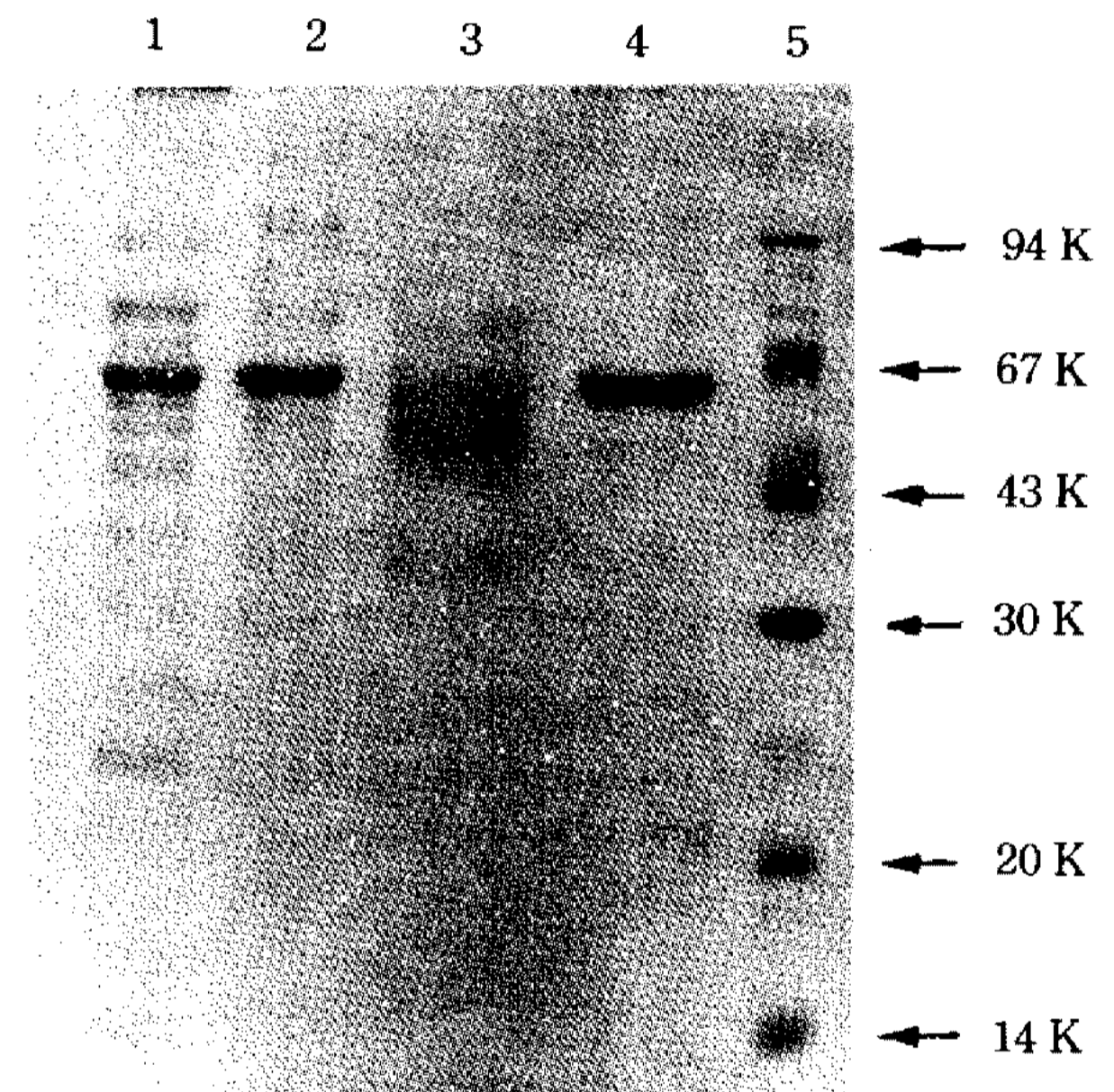
**Fig. 2.** FPLC column chromatography of cholesterol oxidase.

Column size: 1.0×30 cm, flow rate: 0.3 ml/min, phosphate buffer: pH 7.0

ble 1). 이때 회수율은 66%로 나타났다.

분자량 측정: 한편 본 정제효소의 분자량을 결정하기 위해 12% gel을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동한 다음 측정된 cholesterol oxidase의 분자량은 59,500 dalton 정도로 추정되었다 (Fig. 3, 4).

Kamei(10)는 *Streptomyces*속이 생산하는 cholesterol oxidase의 분자량 61,000이라고 보고하여 본 균주와 가장 비슷하였으며, Shirokane(19) 등은 57,000, Lee(13) 등과 Watanabe(31) 등은 56,000, Lartillot(12) 등은 55,000, Fukuyama(9) 등은 53,000이라고 보고하였다. Cholesterol oxidase의 분자량은 대부분 50,000~61,000이었으나 Uwajima(129) 등은 31,000이라고 보고하여 본 균주가 생산하는 효소보다 분자량이 매우 작은 것으로 나타났다.

**Fig. 3.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified cholesterol oxidase.

1: culture broth
2: DEAE-cellulose fraction
3: FPLC fraction-peak 1
4: FPLC fraction-peak 2
M: standard molecular weight marker

Cholesterol oxidase의 성질

pH: 효소액을 pH 4.0~8.5인 완충용액에서 기질과 반응시켜(30°C) cholesterol oxidase 활성을 조사한 결과 최적 pH는 6.0이었다(Fig. 5). 그러나 pH 6.5와 pH 7.0에서도 활성의 90%는 유지되었다. Lee(13)와 Lartillot 등(12), Liu 등(15)은 최적 pH가 7.0이라고 보고하였으며, Watanabe 등(31)은 pH 7.8이 최적 pH라고 보고하였다. Toyobo Enzyme 회사(26) 제품은 pH 6.5가 최적 pH로 본 효소와 가장 근접한 값을 보였다. 한편 pH별 완충용액(pH 3.0~11.0)에 효소액을 넣어 25°C에서 20시간 동안 처리한 후 효소의 잔존여가를 측정된 결과 pH 6.0에서 pH 11.0까지 상당히 안정함을 보여주었다(Fig. 6). Lee 등(13)에 의

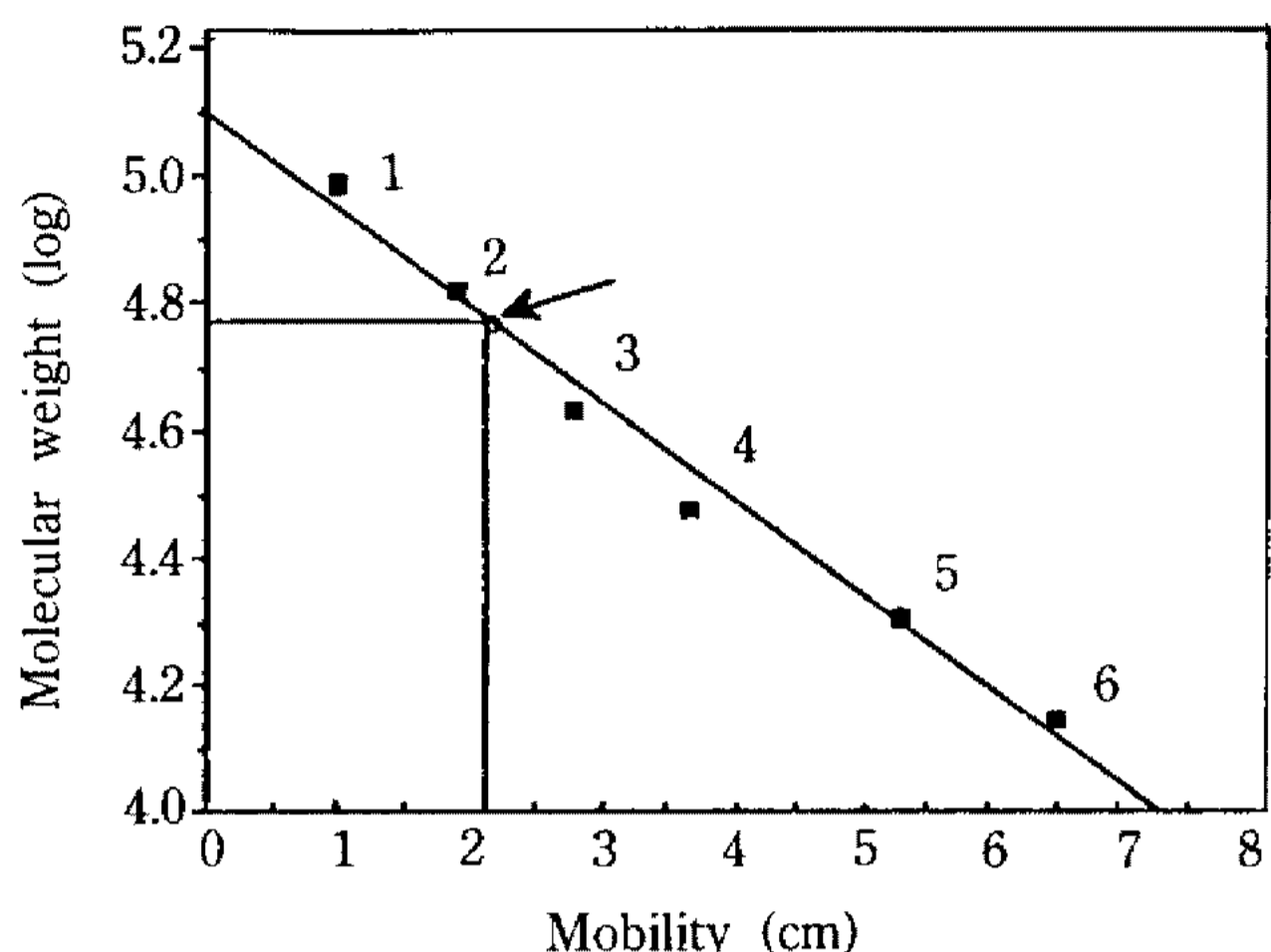


Fig. 4. Determination of the molecular weight of cholesterol oxidase by SDS-PAGE (12%).

- 1: phosphorylase b (M.W. 94,000)
- 2: bovine serum albumin (M.W. 67,000)
- 3: ovalbumin (M.W. 43,000)
- 4: carbonic anhydrase (M.W. 30,000)
- 5: soybean trypsin inhibitor (M.W. 20,100)
- 6: α -lactalbumin (M.W. 14,400)

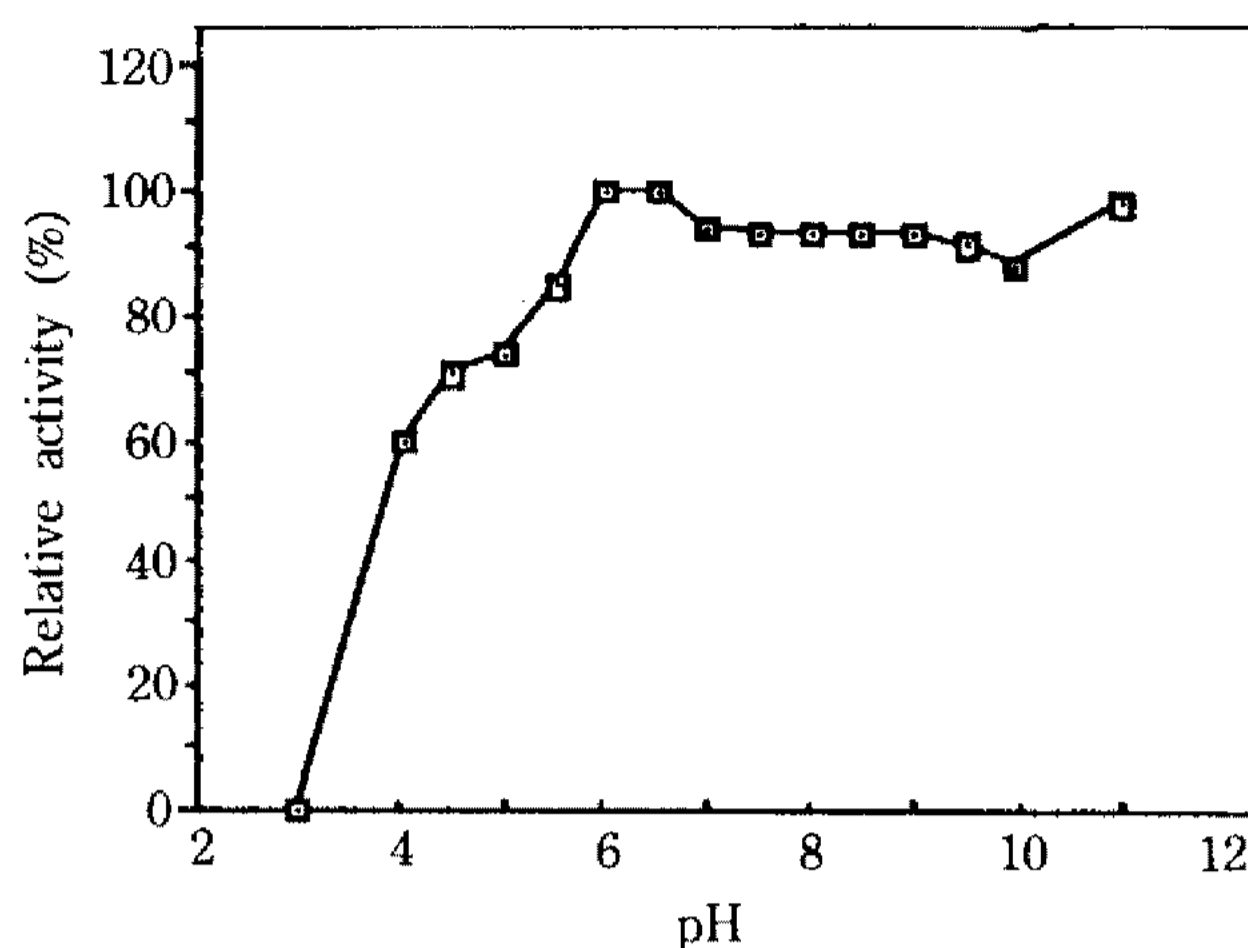


Fig. 6. Effect of pH on stability of cholesterol oxidase (25°, 20 hrs preincubation).

- pH 3.0: 50 mM potassium acetate buffer
- pH 4.0~5.5: 50 mM citrate buffer
- pH 6.0~7.5: 50 mM phosphate buffer
- pH 8.0~8.5: 50 mM Tris buffer
- pH 9.0~10.0: 50 mM sodium carbonate buffer
- pH 11.0: 50 mM CAPS buffer

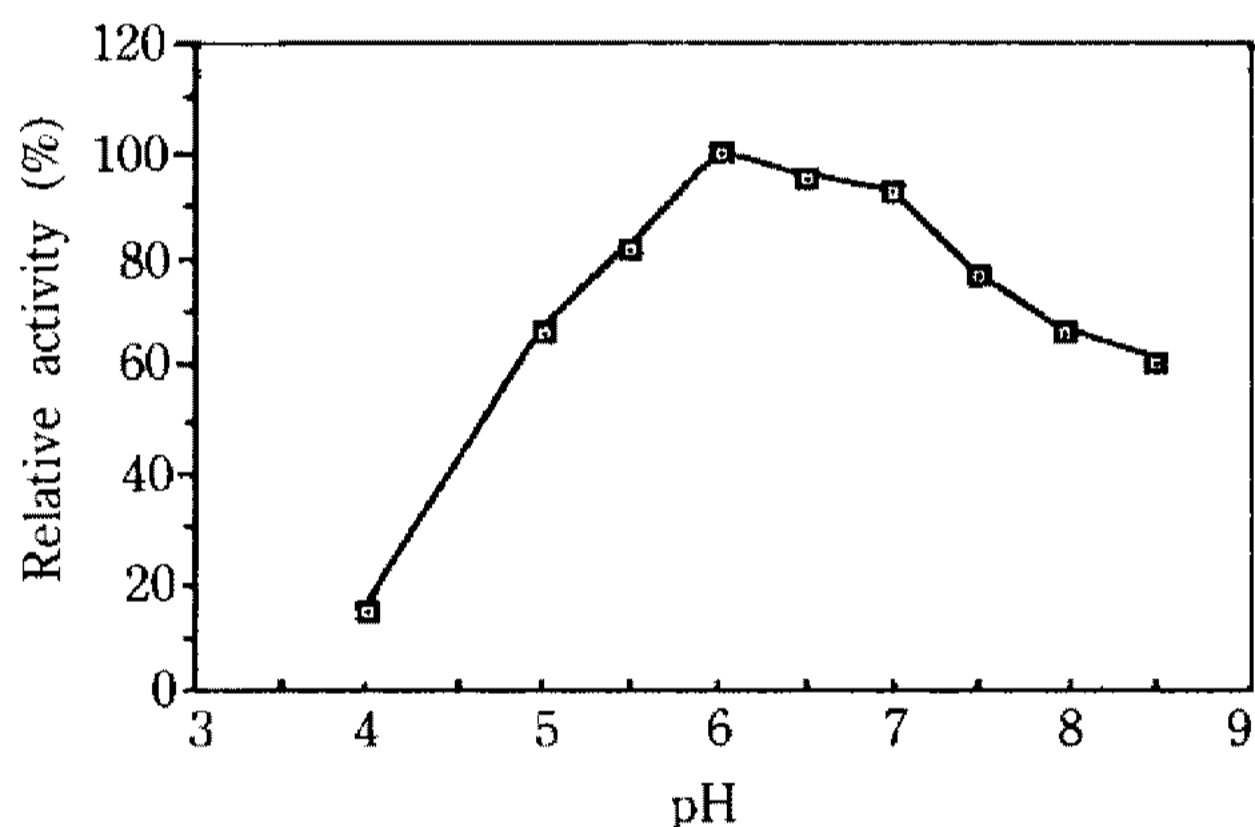


Fig. 5. Effect of pH on the cholesterol oxidase. Enzyme was assayed at 30°C for 1 min in various pH range.

- pH 4.0~5.5: 50 mM citrate buffer
- pH 6.0~7.5: 50 mM phosphate buffer
- pH 8.0~8.5: 50 mM Tris buffer

해 분리된 *Pseudomonas*속의 cholesterol oxidase도 pH 4.0~11.0에서 안정한 것으로 보고되어 본 효소와 매우 흡사하였다.

온도 : 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 6 mM cholesterol을 isopropanol에 녹인 기질을 사용하여 25~65°C 까지 5°C 간격으로 변화시키면서 효소역가를 측정 한 결과 50°C 에서 효소의 역가가 가장 높았다 (Fig. 7). Liu 등(15)에 의해 *Arthrobacter simplex*에서 분리된 cholesterol oxidase와 Toyobo Enzyme(26)인

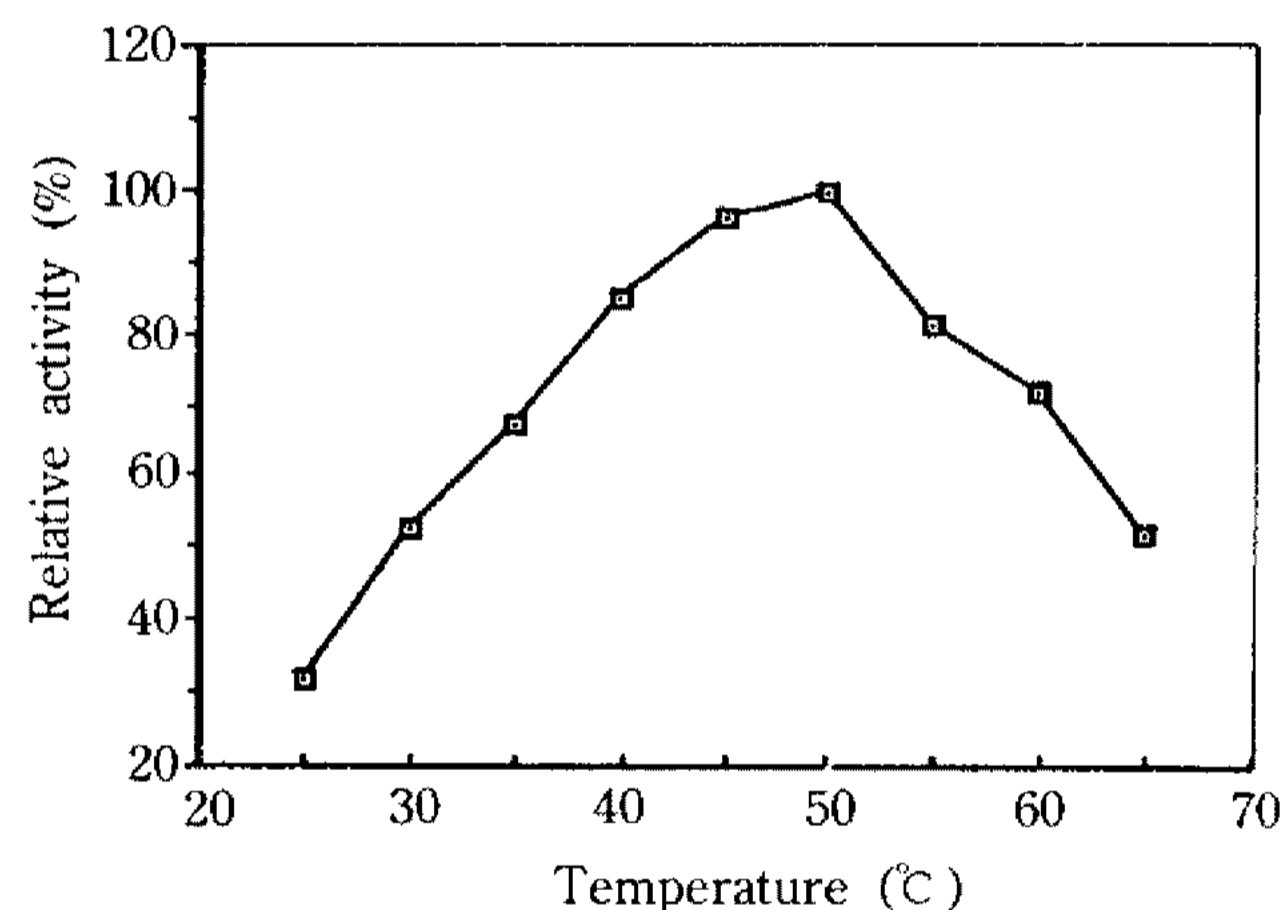


Fig. 7. Effect of temperature on the cholesterol oxidase activity.

Enzyme was assayed in phosphate buffer (pH 7.0) at various temperature.

*Streptomyces*속에서 분리된 효소의 최적온도가 50°C 이고, Watanabe 등(31)이 *Rhodococcus equi* NO.23 에서 분리한 cholesterol oxidase는 최적온도가 47°C 로 보고되어 있어 최적온도가 50°C 부근임을 알 수 있다. 한편 효소액을 30~60°C 까지 15분간 처리한 후 효소의 활성을 측정 한 결과, 45°C까지는 매우 안정 하였으나, 45~50°C에서는 활성이 다소 떨어지기 시작하여 55°C 이하에서는 활성이 급격히 감소함을 나타내었다(Fig. 8). 이는 Toyobo Enzyme(26)인 *Streptomyces*속에서 분리한 효소와 Watanabe 등(31)이

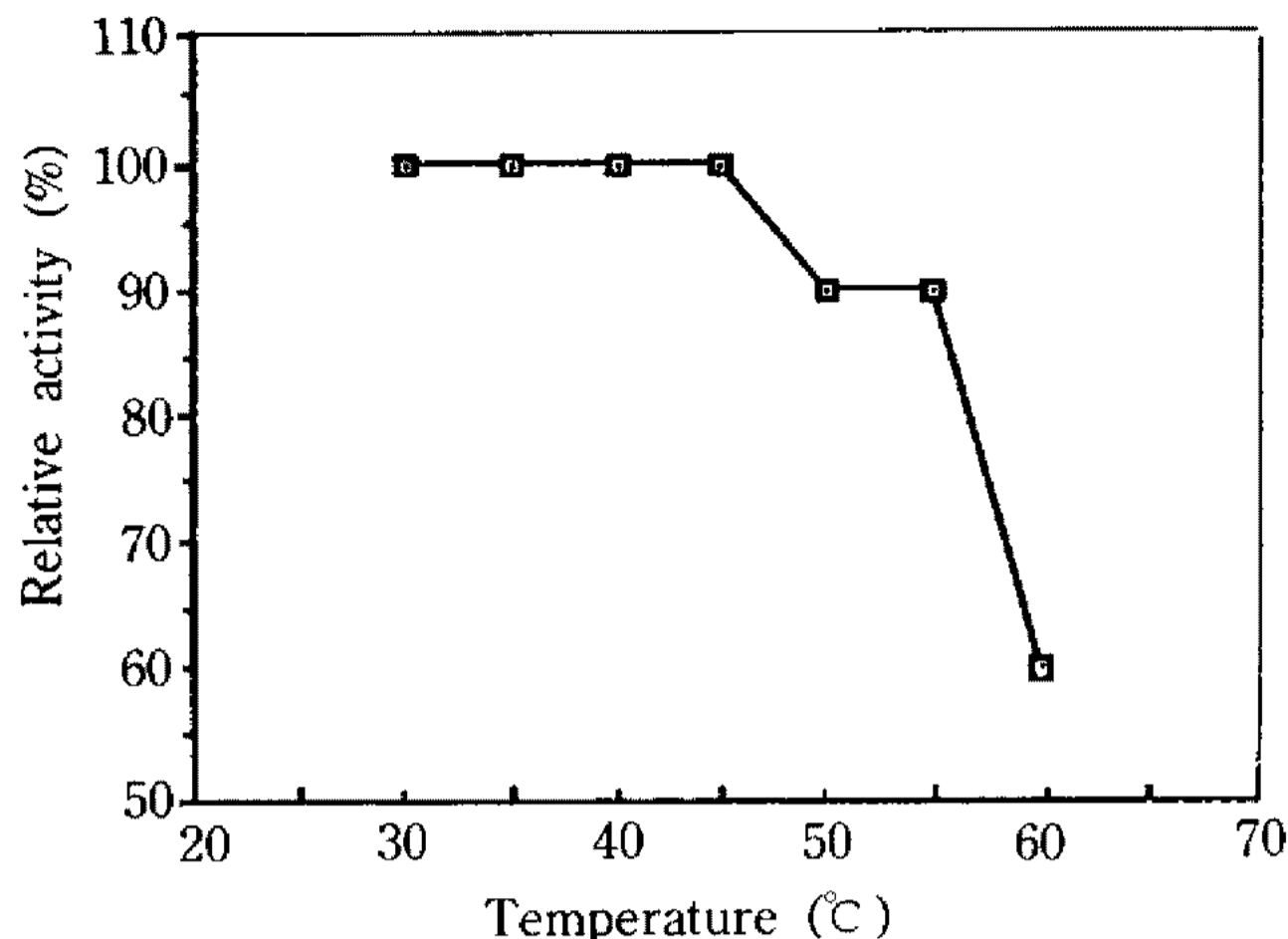


Fig. 8. Effect of temperature on stability of cholesterol oxidase (15 min preincubation).

Table 2. Effect of various chemicals on the activity of cholesterol oxidase

Chemical	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
MgCl ₂	2.0	100
CaCl ₂	2.0	99
BaCl ₂	2.0	97
FeCl ₃	2.0	99
MnCl ₂	2.0	96
ZnSO ₄	2.0	87.5
AgNO ₃	2.0	4
HgCl ₂	2.0	0
NaN ₃	20	85
Borate	20	99
EDTA	5.0	85.7
<hr/>		
Triton X-100	0.1 (%)	94.6
Brij 35	0.1 (%)	99
SDS	0.1 (%)	0
Taurocholate	0.1 (%)	87

Rhodococcus equi No. 23에서 분리한 효소도 45°C까지는 안정함을 보여 본 효소와 일치함을 나타내었다.

Metal ion 및 저해제의 영향

효소에 대한 여러가지 metal ion 및 저해제의 영향을 살펴보았다(Table 2). 실험 시료 중에서는 HgCl₂와 AgNO₃가 가장 효소활성을 저해하였으며, NaN₃와 EDTA, ZnSO₄가 다소 저해를 보였으나 나머지는 모두 90% 이상의 잔존여가를 보였다. Detergent 중에서는

Table 3. Substrate specificity of cholesterol oxidase

Substrate	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Cholesterol	6.0	100
Stigmasterol	6.0	71.6
Hecogenin	6.0	18
Lanosterol	6.0	10
Ergosterol	6.0	5.3
Diosgenin	6.0	0

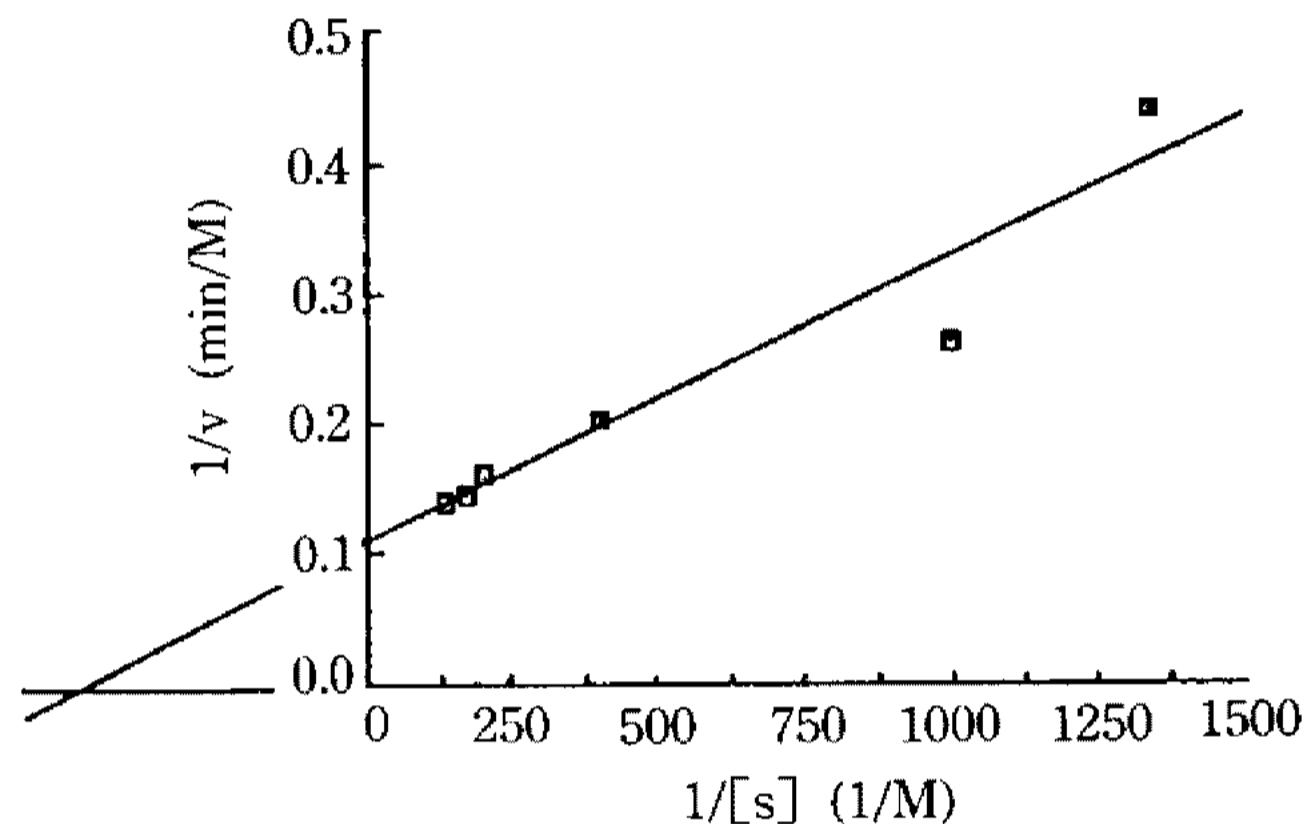


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot on the reaction rate of the cholesterol oxidase.

Cholesterol concentration: 1, 2.5, 5, 6, 7 mM, temperature: 30°C, time: 1 min, pH: 7.0

SDS가 가장 심한 저해성을 보였고 Brij 35는 거의 역가를 저해시키지 않는 것으로 나타났다.

기질특이성

Cholesterol을 비롯하여 stigmasterol, hecogenin, lanosterol, ergosterol, diosgenin 등 각종 steroid의 분해정도를 측정, cholesterol oxidase의 기질특이성을 조사한 결과 stigmasterol에는 70%에 분해력을 보였으나 나머지 기질에 대해서는 별 분해력을 보이지 않았다(Table 3). Lee 등(13)은 ergosterol, stigmasterol 순으로 분해력이 나타난다고 보고하여 본 연구와 차이를 보였다. 그러나 Liu 등(15)은 본 연구와 비슷하게 stigmasterol이 cholesterol 다음으로 잘 분해된다고 보고하였다. 또한 Fukuyama 등(9)은 본 연구와 비슷하게 lanosterol에 대하여 12% 정도의 분해력이 있다고 보고하여 cholesterol oxidase를 생산하는 균주의 종류에 따라 기질특이성에 차이점이 있음을 보여주었다. 한편 cholesterol의 농도를 의한 효소의 반응속도를 측정하여 K_m값을 구한 결과 K_m=

$3.65 \times 10^{-3} \text{ M}$ 이었고 $V_{max} = 9.5238 \text{ M/min}$ 이었다(Fig. 9).

요 약

Cholesterol oxidase를 생산한 균주를 토양으로 분리하고 이를 배양하여 효소를 생산한 후 정제하여 그 특성을 조사하였다. 본 효소는 CH2 concentrator에 의한 농축, DEAE-cellulose chromatography, Superose 12 column FPLC로 정제하였고, 비활성이 약 31배나 증가하였다. 이 효소는 50°C , pH 6.0에서 최대 활성을 나타냈고 $30 \sim 45^\circ\text{C}$ 범위에서는 안정하였다.

pH에 대한 안정성은 pH 6.0~11.0까지 광범위한 안정성을 보였으며, K_m 값은 cholesterol에 대해서 $3.65 \times 10^{-3} \text{ M}$ 이며 분자량은 59,500 dalton으로 추정된다. 또한 Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Brij 35에 의해서는 효소의 활성이 저해되지 않았지만, Hg^{2+} , Ag^{2+} 및 SDS에 의해서는 저해되는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Allian, C.C., L.S. Poon, C.S.G., W. Richmond, and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475.
- Arima, K., M. Nagasawa, M. Bae and G. Tamura. 1969. Microbial transformation of sterols. I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **22**: 1636-1643.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of μg proteins. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Buckland, B.C., M.D. Lilly and P. Dunnill. 1976. The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by *Nocardia rhodocrous*. *Biotechnol. Bioeng.* **18**: 601-621.
- Cheetham, P.S.J., P. Dunnill, M.D. Lilly. 1982. The characterization and interconversion of three forms of cholesterol oxidase extracted from *Nocardia rhodochrons*. *Biochem. J.* **201**: 515-521.
- Cho, B.H.S. 1983. Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues. *Clin. Chem.* **29**: 166-168.
- Flegg, H.M. 1973. An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* **10**: 79-84.
- Fukuda, H., Y. Kawakami and S. Nagamura. 1973. A method to screen anticholesterol substances produced by microbes and a new cholesterol oxidase produced by *Streptomyces violascens*. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 2057-2060.
- Fukuyama, M. and Y.J. Miyake. 1979. Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin. *J. Biochem.* **85**: 1183-1193.
- Kamei, T., Y. Takiguchi, H. Suzuki and S. Nakamura. 1978. Purification of 3β -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol. *Chem. Pharm. Bull(Tokyo)*. **26**: 2799-2804.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lartillot, S. and Kedziora, P. 1990. Production, purification and some properties of cholesterol oxidase from a *Streptomyces* sp. *Preparative Biochem.* **20**(1): 51-62.
- Lee, S.Y., H.I. Rhee and B.K. Park. 1990. Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of the strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 542-546.
- Liu, W.H., C.H. Cheng and Y.C. Su. 1980. Isolation and identification of a cholesterol oxidase producing bacterium. *Proc. Natl. Sci. Counc. Roc.* **4**: 433-437.
- Liu, W., M.H. Meng and K.S. Chen. 1988. Purification and some properties of cholesterol oxidase produced by an inducible and a constitutive mutant. *Agric. Biol. Chem.* **52**(2): 413-418.
- Rehak, and D.S. Young. 1982. Enzymatic determination of free and esterified cholesterol in serum by microcalorimetry. *Clin. Chem.* **28**: 2235-2240.
- Richmond, W. 1973. Preparation and properties of bacterial cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **19**: 1350-1356.
- Schatz, A., K. Savard, and I.J. Pinter. 1949. The ability of soil Microorganisms to decompose steroids. *J. Bacteriol.* **58**: 117-120.
- Shirokane, Y., K. Nakamura, K. Mizusawa. 1977. Purification and some properties of an extracellular 3β -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*. *J. Ferment. Technol.* **55**: 337-342.
- Siedel, J., E.O. Hagele, J. Ziegenhorn and Wahlefeld. 1983. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin. Chem.* **29**: 1075-1080.
- Sih, C.J. and K.C. Wang. 1965. Mechanism of steroid oxidation by microorganism. *J. Amer.*

- Chem. Soc.* **87**: 1387-1391.
22. Smith, A.G. and C.J.W. Brooks. 1974. Application of cholesterol oxidase in the analysis of steroids. *J. Chromatogr.* **101**: 373-378.
 23. Stadtman, T.C., A. Cherkes and C.B. Anfinsen. 1954. Studies on the microbial degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **206**: 511-523.
 24. Talalay, P. and M.M. Dobson. 1953. Purification and properties of a β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **205**: 823-837.
 25. Tomioka, H., M. Kagawa and S. Nagamura. 1976. Some enzymatic properties of 3β -hydroxysteroid oxidase produced by *Sterptomyces vilascens*. *J. Biochem.* **79**: 903-915.
 26. Toyobo Enzymes, Japan, Toyobo Co. Ltd., 1985.
 27. Turfitt, G.E. 1944. The microbiological degradation of steroids. 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**: 49-62.
 28. Turfitt, G.E. 1947. Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.* **54**: 557-562.
 29. Uwajima, T., H. Yagi, S. Nagamura and O. Terada. 1973. Isolation and crystallization of extracellular 3β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2345-2350.
 30. Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada. 1974. Properties of crystalline 3β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum*. *Agric. Biol. Chem.* **38**(6): 1149-1156.
 31. Watanabe, K., H. Aihara, Y. Nakagawa, R. Nakamura and T. Susaki. 1989. Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 13. *J. Agric. Food Chem.* **37**: 1178-1182.
 32. Weyman, A.E. 1974. Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.* **56**: 13-21.
 33. 松井脩, 中島和男, 谷口勉, 大林晃, 田邊脩, 山田秀明. 1979. Cholesterol 酸化酵素製造法. 特開昭 54-105291.
 34. 이인애, 최용경, 이홍수, 최인성, 정태화. 1992. Cholesterol oxidase를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소생산에 관한 연구. 산업미생물학회지 투고.

(Received June 3, 1992)