한국생물공학회지 제 14권 제 2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 14, No. 2, 174-180(1999)

방선균으로부터 Cholesterol Oxidase의 생산 및 특성

†김 현 수 · 고 희 선
계명대학교 자연과학대학 미생물학과
(접수 : 1998. 11. 2., 게재승인 : 1999. 3. 15.)

Production and Characterization of Cholesterol Oxidase from *Streptomyces* sp. No.4

Hyun-Soo Kim† and Hee-Sun Ko
Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea
(Received · 1998. 11. 2., Accepted · 1999. 3 15.)

An actinomycetes strain No.4, which produce the cholesterol oxidase(EC 1.1.3.6), was isolated from soil and identified as *Streptomyces* sp. based on taxonomic studies. The conditions of cholesterol oxidase production and enzymatic properties were investigated. The optimum composition of medium for production of the enzyme was 1% soluble starch, 2% corn steep liquor, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $NaNO_3$ and 0.05% $MgSO_4$ (pH 7.0). The optimum pH and temperature of the cholesterol oxidase were pH 6.0~7.5 and 37℃, respectively. The enzyme was stable in the range of pH 6.0~9.0. The isoelectric point determined by multichambered electrofocusing unit was in the range of pH 6.0~6.5

Key Words : Cholesterol oxidase, producing condition, characterization, *Streptomyces* sp.

서 론

Cholesterol oxidase(3β-hydroxysteroid oxidase)는 trans A:B ring junction을 가지는 steroid의 산화 및 이성화를 수행하는 효소로서 cholesterol(5-cholesten-3β-ol)을 4-cholesten-3-one으로 산화반응을 촉매한다. Cholesterol oxidase의 연구는 Turfitt의 steroid 분해 미생물에 관한 연구인 *Arthrobacter*속(1)에서 시작되어 1973년 Richmond(2)와 Fregg(3)에 의해 cholesterol oxidase(EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. Cholesterol oxidase를 생산하는 미생물로는 *Pseudomonas*속(4, 5), *Nocardia*속(2, 6), *Arthrobacter*속(1), *Streptomyces*속(7), *Brevibacterium*속(8) 및 *Corynebacterium*속(9) 등 다양한 미생물에서의 생산이 보고되어 있다. 특히 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 cholesterol oxidase는 Kamei(10)에 의해서 분리, 정제된 바 있으며, 최근에는 Murooka(11)에 의해 cholesterol oxidase의 생합성 유전자의 cloning을 비롯하여 활발히 연구가 수행되고 있다. 국내에서는 이 등(12)이 토양에서 분리한 방선균에서 cholesterol oxidase의 분리·정제한 보고와 Lee 등(5)의 *Pseudomonas* sp.에서 효소의 분리·정제를 비롯하여 박 등(13)의 창란젓에서 분리한 *Rhodococcus* sp.으로부터 효소생산의 보고가 있으나 외국에 비해 연구가 미흡하다. 특히 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 cholesterol oxidase는 *Pseudomonas fluorescens*나 *Nocardia erythropolis* 등이 생산하는 효소와 비교시 경제적 비용과 긴 효소의 stability(14)를 보이기 때문에 임상효소제제로서 대량생산을 위한 연구개발이 수행되고 있다. Cholesterol oxidase는 임상적인 분야에서 혈중 cholesterol의 농도를 측정하는 지표가 되고 있어 동맥경화, 동맥혈착증, 고혈압 예방에 기여할 수 있으며, 현재에는 cholesterol oxidase의 유전자 연구가 활발히 이루어져 *Streptomyces* sp. SA-COO(15)의 경우, DNA-binding protein과 putative transmembrane을 코드하는 cholesterol oxidase(*cho*A)-cytochrome P450(*cho*P)오페론의 upstream region의 아미노산이 분석되어 있으며, sequence 분석 결과 4개의 open reading frame을 소유하며, 유전자산물은 2개의 group으로 분석되어 repeating unit로 구성되는 것으로 밝혀졌다. 한편 *Streptomyces* sp. A19249(16)에서의 구조유전자 *cho*M이 살충 활성이 있는 cholesterol oxidase를 코드하며, 이 유전자는 *Escherichia coli*에서도 동일한 살충 활성을 가지는 효소로 발현되는 것으로 나타나 농업 분야에서 새로운 농약으로 주목을 받고 있다. 식품 분야에서는 치즈, 햄, 소시지 및 각종 유제품에 cholesterol 저감 식품으로서의 이용가능성과 함께 산업적으로 넓은 응용면(17)이 예상되고 있다. 따라서 국외에서는 이같은 최근의 연구보고와 같이 cholesterol oxidase의 새로운 기능면의 이용을 위해 대량생산 기술 개발을 비롯한 많은 연구가 수행중에 있으나, 국내에서는 임상진단용시약으로 고가로 수입에 의존하고 있어서 사용면에서의 어려움이 많음에도 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따

† Corresponding Author · Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea
Tel : 053-580-5284, Fax : 053-580-5164
e-mail : hskim@kmucc.keimyung.ac.kr

라서 이같은 어려움을 해결하기 위한 일환으로 토양에서 cholesterol oxidase를 생산하는 새로운 *Streptomyces* sp 방선균을 분리하여 대량생산 및 다양한 분야에로의 응용을 위해 본 연구에서는 분리 방선균의 속의 동정, 생산조건의 검토 및 효소학적 특성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Cholesterol oxidase 생산 방선균의 분리

Cholesterol oxidase를 생산하는 방선균을 분리하기 위해서 계명대학교 주위의 토양 및 각종 토양시료 각 1g을 10ml의 6% yeast extract, 0.05% SDS가 함유된 인산완충액(pH 7.0)에 희석하고, 40℃에서 20분 동안 배양하였다. 이 시료를 멸균수로 10^5까지 희석하여 각 희석액 0.1ml를 방선균 분리배지인 Humic acid - Vitamin(HV) agar(18)배지에 도말하여 28℃에서 5~7일간 배양하였다. 생성된 colony는 방선균 보존용 배지(ISP medium No. 2)에 계대배양하였으며, 이들 분리균의 효소생산능은 cholesterol oxidase 생산 기본 배지를 사용한 평판배지에서 3~5일간 배양한 후, 0.5% cholesterol이 첨가된 반응 완충액(pH 7.0)에 적신 paper disc를 잎이 red color를 생성하는 plate assay법을 사용하여 cholesterol oxidase생산 방선균을 선별하였으며, 그 중 효소 생산능이 우수한 균(No. 4)을 본 연구의 공시균으로 사용하였다.

분리균주의 동정

분리 방선균의 속의 동정을 위하여 방선균의 동정 실험법(19) 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20)에 따라 배양학적 특성, 형태학적 특성, 생리적 특성을 조사하였다. 선별균주의 배양학적 특성은 ISP No. 1, 2, 4, 5, 7 배지에 접종한 후 28℃에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 이면 색깔, 배지 색깔, 생육정도, 가용성색소 생성유무를 관찰하였다. 분리균주의 형태는 slide culture를 통하여 기균사가 충분히 형성된 후 광학 현미경으로 관찰하였으며, 정밀한 외형을 관찰하기 위해 진공건조후 gold coating하여 주사현미경인 SEM JSM 5410(GEOL Co.)으로 포자의 사슬형태, 표면상태를 관찰하였다. 생리적 특성 중 당 이용성은 carbon utilization 배지에 arabinose, fructose, glucose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, sucrose, xylose를 첨가하여 2주일간 배양하여 생육상태를 조사하였으며, gelatin액화력, milk응고력, 전분 분해력, cellulose분해력, 멜라닌 색소 생성유무는 방선균의 동정 실험법(19)에 따라 실험하였다.

배양조건 및 조효소액의 조제

선별된 공시균의 배양은 7-10일 배양한 slant로부터 포자현탁액을 제조(≒10^9spore/ml)하여 기본 생육배지(glycerol 1%, corn steep liquor 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, pH 7.0)에 0.1ml 접종한 후 28℃, 120rpm에서 36~48시간 전배양하여 사용할 때까지 -70℃에서 보존하였다. 조효소액의 조제는 사용배지에 전배양균을 3%접종하여 28℃, 150rpm에서 5일간 진탕배양한 후 배양액을 여과지(Advantec Co. No. 2)로 여과하여 균체를 제거한 다음 배양여액을 효소반응을 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성 측정

Cholesterol oxidase의 역가 측정은 공시균이 배양액중에 산하는 melanin색소의 영향을 고려하여 Allain method(4)에 준하여 수행하였다. 즉, 2μM 4-aminoantipyrine, 35μM phenol, 2,375units/l의 peroxidase (Sigma Co.)가 포함된 0.1M 인산완충액(pH 7.0) 1ml에 0.25ml의 효소용액을 첨가하여 37℃에서 3분간 예열한 후 10% Triton X-100 (Merck Co.)에 13μmol/ml cholesterol(Sigma Co.)이 함유된 기질용액 0.05ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 다음, 반응액 중에 생성된 quinon-eimine dye는 흡광도 500nm에서 측정하였으며, cholesterol oxidase의 활성은 37℃에서 1μmole의 H_2O_2를 형성하는 효소의 양을 1 unit로 하여 산출하였다.

효소 생산조건 검토

효소 생산조건을 검토하기 위해 생육 기본배지에 탄소원으로서는 dextrin, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, sodium acetate, soluble starch, sucrose, xylose를 1%씩 넣은 각각의 배지 25ml에 전배양균을 3%씩 접종하여 배양일수별로 효소생산성을 측정하였다.

질소원의 경우 유기 질소원인 asparagine, casamino acid, corn steep liquor, leucin, meat extract, peptone, soybean meal, tryptone, urea, yeast extract를 0.5% 그리고 무기 질소원인 ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate를 0.1% 농도로 각각 첨가하여 동일한 방법으로 효소생산을 측정하였다. Cholesterol oxidase 생산이 우수한 탄소원, 질소원에 대해 농도에 따른 효소생산성을 검토하였으며, 우수 탄소원을 대상으로 복합사용에 따른 효소생산 효과를 비교하였다.

최적온도

효소반응의 최적온도는 100mM인산 완충액(pH 7.0)에서 13mM cholesterol을 기질로 사용하여 25℃에서 60℃까지 각 온도에서 효소활성을 비교하였다.

최적 pH

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 효소를 아래의 각 완충액의 pH하에서 반응시킨 후 효소의 역가를 검토하였다. 사용 완충액은 pH 4.0~5.0은 50mM citrate buffer, pH 6.0~8.0은 50mM phosphate buffer 그리고 pH 9.0~10.0은 50mM glycin-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

온도 안정성

효소의 온도 안정성은 100mM 인산완충용액(pH 7.0)중에 효소를 첨가하여 30℃에서 60℃까지의 각 온도에서 10, 20, 30, 40, 50분간 처리 후 잔존 효소활성을 검토하였다.

pH 안정성

효소를 pH 4.0에서 10.0까지의 각 완충액에 첨가하여 4℃에서 10, 20, 30, 40, 50분간 처리후 잔존 효소활성을 검토하였다.

등전점 측정

효소의 등전점을 측정하기 위하여 multichambered elect-

rofocusing unit(Isoprime, Hoefer Co, USA)를 사용하였다. 즉, 제조사의 사용방법에 따라 acrylamido buffer를 사용하여 pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0의 7종류의 immobilized membrane을 제작하여 설치한 다음, 각 chamber에 증류수 20ml씩을 첨가하였으며 조효소액 20ml는 임의(membrane pH 6.5~7.0사이)의 chamber(chamber 수; 8개)에 주입하여 4℃에서 18시간 영동시킨후, 각 chamber내에 이동한 단백질을 대상으로 효소의 활성을 측정하여 활성있는 chamber의 membrane pH를 등전점으로 산출하였다.

실험결과 및 고찰

Cholesterol oxidase 생산 방선균 분리

Cholesterol oxidase을 생산하는 방선균의 분리를 위하여 계명대학교 주변 등의 토양 시료로부터 Humic acid-Vitamin agar에서 155주의 방선균을 순수분리하였다 이들 분리균 중 Allain method에 준한 plate assay법을 사용하여, cholesterol oxidase의 활성을 나타내는 5주(No 2, 4, 5, 6, 8)를 선별한 후, 이 중 액체배양에서 가장 활성이 높은 균주(이하 No. 4으로 표기함)를 본 실험의 공시균으로 사용하였다

균주의 동정

선별 방선균 No 4균주의 형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과 Table 1에서 보인 바와 같이 본 균주의 형태적 특징으로 ISP No. 2(Yeast-malt extract agar)에서 생육한 colony의 주변부는 확산되었으며 중심부는 융기된 형태를 보였고, No. 4(Inorganic salt-starch agar)배지에서도 확산 및 주름이 있는 융기된 형태를 보였다. 기균사의 착생상태는 아주 풍부하게 형성되었으며 포자의 색은 회색을 나타내었다 No. 5(Glycerol-asparagine agar)배지에서 생육한 영양균사는 노란색을 띄었으며, 가용성색소는 생성하지 않았다 생리적 특징은 Table 2에서와 같이 melanin색소의 생성은 No. 7(Tyrosine agar)배지에서만 적색색소를 생성하였고, 탄소원의 이용성은 xylose, glucose, fructose, sucrose만을 이용하였다. 생육온도는 ISP. No. 2배지에 접종하여 조사한 결과 배양온도 10℃ 및 37℃(11일 배양)에서는 약간 생육하였으나 포자는 생성하지 않았으며, 45℃에서는 생육하지 않았다. 생육이 양호한 27℃ 및 30℃의 경우 30℃에서 melanin색소가 생성되었다. 전분분해력, cellulose분해력 및 우유응고력은 보이지 않았으나 gelatin액화력은 존재하였다. NaCl내성은 4, 7, 10, 13%까지 첨가시 생육되지 않은 결과로부터 4%미만으로 표기하였다 형태적 특징으로 No 2배지에서 2주일간 배양한 후 광학 현미경으로 검경한 결과(Figure 1A) 기균사의 형태는 spiral형을 나타내었으며 전자현미경으로 관찰한 결과 균사는 spiral형이었으며 포자의 표면은 smooth type이었다(Figure 1B). 이들 결과로부터 본 분리균주는 *Streptomyces* sp.으로 판단되었으며, starch분해능, 탄소원의 자화능 등 생리적 특성에서 이 등(25)이 분리한 방선균 HSL-613과 다른 종으로 추정되며, 또한 Kamei 등(10)이 보고한 *Streptomyces violascens*의 생리적 특성(20)과 비교해 보면 tyrosine agar에서 색소생성과 45℃에서 생육이 불가능한 점은 일치하나, spore color, 생육가능 NaCl농도(7%) 및 탄소원의 자화능 등에서 차이를 보임에 따라 종의 동정을 통하여 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

(A)

(B)

Figure 1. Light micrograph(A, × 600) and scanning electron micrograph(B, × 7,500) of Streptomyces sp. No. 4 on ISP medium No. 2

탄소원의 영향

Cholesterol oxidase 생산을 위한 최적 탄소원을 검토하기 위해 생육기본배지에 탄소원으로 dextrin, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, sodium acetate, soluble starch, sucrose, xylose를 1% 농도로 각각 첨가하여 28℃에서 5일간 배양하여 효소 생산을 검토하였다. Table 3에서와 같이 soluble starch가 cholesterol oxidase 생산이 가장 우수하였으며 glucose, dextrin도 양호하였으나, fructose, lactose, xylose는 저조하였다. 이 결과는 이 등(26)이 보고한 방선균 HSL-613균주의 경우 galactose, glucose, xylose, glycerol이 효소생산이 양호하다는 결과와 차이를 보임에 따라 본 분리균주와 다른 특성을 가진다고 사료되었다.

Table 1 Morphological characteristics of strain No 4.

]Characteristics	Strain No.4
Colony morphology on ISP* 2 and 4	
Periphery	Spreading, spreading
Surface	Elevated, Raised(wrinkled)
Aerial mycelium	Abundant, abundant
Spore mass color	Gray
Spore chains on ISP 2	Spiral
Color of colony on ISP 5	
Substrate mycelium	Yellow
Soluble pigment on ISP 5	None

*ISP medium:
No. 1 ; Tryptone-yeast agar, No. 2; Yeast-malt extract agar
No. 4 , Inorganic salt-starch agar, No. 5; Glycerol-asparagine agar
No. 7 ; Tyrosine agar

Table 2. Physiological characteristics of the strain No 4.

Characteristics	Strain No.4
Optimal growth temperature	27 ~ 30℃
Liquefaction of gelatin	+
Coagulation of skim milk	-
Hydrolysis of starch	-
Hydrolysis of cellulose	-
Tolerance of NaCl	below 4%
Melanin pigment on ISP 7 and 1	Red, None
Carbon utilization	
D-fructose	+
D-glucose	+
Inositol	-
D-mannitol	-
Raffinose	-
L-rhamnose	-
Sucrose	+
D-xylose	+

Table 3. Effect of carbon sources on the production of the cholesterol oxidase.

Carbon source	Enzyme activity(munits/ml)
Dextrin	58.5
Fructose	16.4
Glucose	66.3
Glycerol	51.0
Lactose	16.4
Maltose	29.9
Sodium acetate	38.7
Soluble starch	67.7
Sucrose	28.6
Xylose	13.0

질소원의 영향

Cholesterol oxidase 생산을 위한 최적질소원을 검토하기 위해 유기질소원으로 asparagine, casamino acid, corn steep liquor, leucin, meat extract, soybean meal, peptone, tryptone, urea, yeast extract를 각각 0.5%, 그리고 무기질소원으로는 $NaNO_3$, NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$를 각각 0.1% 첨가한 배지에 배양하여 효소생산을 검토하였다. Table 4에서와 같이 유기질소원으로 corn steep liquor가 cholesterol oxidase생

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of the cholesterol oxidase

Nitrogen source	Enzyme activity(munits/ml)
Organic	
Asparagine	13.3
Casamino acid	55.1
Corn steep liquor	58.3
Leucine	21.3
Meat extract	34.7
Peptone	45.1
Soybean meal	25.0
Tryptone	55.5
Urea	1.7
Yeast extract	33.0
Inorganic	
Ammonium chloride	28.8
Ammonium nitrate	25.2
Ammonium sulfate	29.8
Sodium nitrate	39.0

산이 가장 우수하였으며 casamino acid, tryptone도 양호하였으나 asparagine, urea, leucin등 저분자량의 질소원은 생산성이 미흡하였다 무기질소원의 경우 $NaNO_3$가 양호하였으나 유기질소원에 비해 생산성이 낮았다. 이 결과는 이 등(26)의 분리균주는 yeast extract가 효소 생산성이 우수하다는 결과와 다른 점에서 본 분리균주는 다른 종으로 추정되었다

탄소원 · 질소원의 농도에 따른 영향

효소생산에 미치는 탄소원과 질소원의 최적 농도를 검토하기 위하여 탄소원의 경우 soluble starch를 1%, 3%, 5% 및 복합 탄소원 그리고 질소원의 경우에는 유기질소원인 corn steep liquor를 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 및 무기질소원인 $NaNO_3$를 각각 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%로 첨가하여 5일간 배양하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 효소생산에 탄소원으로는 1%의 soluble starch가 가장 양호하였으며, 생산능이 우수한 탄소원(glucose, dextrin, soluble starch, Table 3)을 2종류(1% glucose + 1% soluble starch 및 1% glucose + 1% dextrin)씩 복합첨가한 경우는 soluble starch 단일 첨가시에 비해 효소생산성이 저조하였다. 이 결과는 단당류인 glucose가 먼저 균증식에 이용됨에 따라 효소 등의 2차 대사산물의 생산이 지연되거나 감소하는 결과라고 추정되었다. 질소원의 농도에 따른 효과는 Table 6에서 보는 바와 같이 2%의 corn steep liquor 및 0.1% $NaNO_3$가 효소 생산에 우수하였다. 이들 결과에서 본 공시균주의 효소생산최적 배지로서 soluble starch 1%, corn steep liquor 2%, $NaNO_3$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%(pH 7.0)조성의 배지를 사용하였다.

Table 5. Effect of various concentrations of soluble starch and complex carbon source on the production of the cholesterol oxidase

Concentration	Enzyme activity(munits/ml)
Soluble starch	
1%	75.8
2%	75.1
3%	70.0
Complex carbon source	
1% Glucose + 1% Soluble starch	47.8
1% Glucose + 1% Dextrin	49.0

Table 6. Effect of various concentrations of corn steep liquor and sodium nitrate on the production of the cholesterol oxidase.

Concentration	Enzyme activity(munits/ml)
Corn steep liquor	
0.1%	45.2
0.5%	43.2
1%	60.3
2%	70.3
Sodium nitrate	
0.05%	41.7
0.1%	50.8
0.5%	45.7
1%	31.2

열 안정성

본 효소의 열 안정성을 검토하기 위해서 효소액을 30℃에서 60℃까지의 각 온도에서 10분, 20분, 30분, 40분, 50분간 열처리한 후, 급냉각시켜 37℃에서 잔존효소 활성을 측정하였다.

본 효소의 열 안정성은 Figure 2에서 나타낸 것과 같이 30℃, 37℃ 및 40℃에서 50분간 열처리시 잔존활성이 80%정도 유지되어 안정함을 보였고, 45℃에서는 20분까지는 70%정도 잔존활성을 보였으나, 50℃, 60℃에서는 10분 처리시 80%이상 실활되었다. 이는 이 등(12)이 보고한 *Streptomyces sp* HSL613의 cholesterol oxidase의 활성이 15분 열처리시 45℃까지 안정했다는 보고와 박 등(13)이 보고한 *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ 유래의 효소가 30-45℃까지 안정하다는 보고와 유사하였다.

pH 안정성

본 효소의 안정성에 미치는 각 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 4.0에서 pH 10.0까지 pH가 다른 여러 종류의 완충용액과 효소액을 혼합하여 4℃에서 10분, 20분, 30분, 40분, 50분간 처

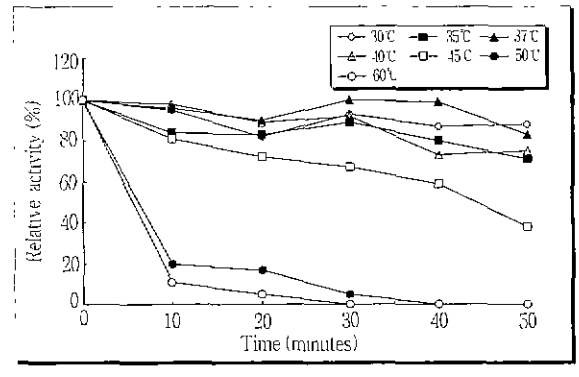

Figure 2. Effect of temperature on stability of the cholesterol oxidase at pH 7.0. The enzyme solution was preincubated in 100mM phosphate buffer(pH 7.0) at various temperatures for 10min~50min Residual activity of treated enzyme was measured at 37℃.

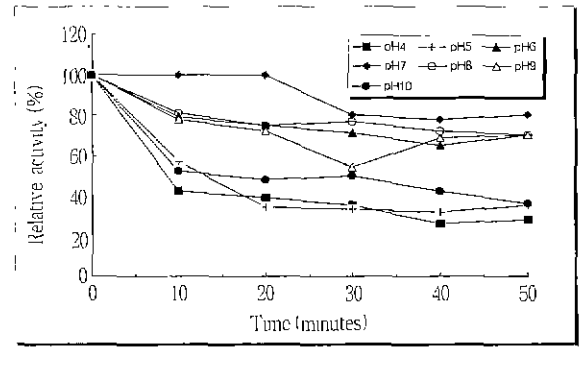

Figure 3. Effect of pH on stability of the cholesterol oxidase at 4℃ The enzyme solution was preincubated at various pHs for 10min-50min The used buffer systems were · 50mM citrate buffer(pH 4.0~5.0), 50mM phosphate buffer(pH 6.0~8.0), 50mM glycine-NaOH buffer(pH 9.0~10.0)

리한 후, 그 잔존 효소활성을 측정하였다 효소의 pH 안정성은 Figure 3에서와 같이 pH 6.0~9.0까지의 범위에서 80%이상 효소활성이 유지되어 안정한 것으로 나타났으나 pH 4.0, 5.0 및 10.0에서는 처리 10분후 50%이상 실활되는 결과를 보였다. 이는 이 등(12)이 보고한 *Streptomyces* sp. HSL613유래의 효소가 pH 6.0~11.0까지 안정하다는 결과와 Inouye 등(21)의 *Streptoverticillium cholesterolicum*이 생산한 효소가 pH 4.0~12.5까지 안정하였다는 결과에 비해 다소 안정성의 범위가 좁은 효소라고 사료되었다.

반응 최적 온도

본 효소활성에 미치는 반응 온도를 조사하기 위해 25℃에서 60℃까지 각 온도에서 효소활성을 측정하였다. Figure 4에서 나타난 바와 같이 반응 최적 온도는 37℃였으며, 이는 Liu 등(22), 이 등(12), Watanabe 등(23), 박 등(13)이 분리한 효소의 반응 최적 온도가 50℃부근이라는 보고와 차이를 보이나, Lee 등(5)이 보고한 결과와는 유사하였다.

반응 최적 pH

본 효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 효소반응액을 pH 5.0~10.0까지의 각 완충용액을 사용하여 37℃에서 기질과 반응시킨 후 활성을 측정하였다. Figure 5에서 나타난 바와 같이 pH 6.5~7.5에서 효소활성이 가장 우수하였으며, 이 결과는 Fukuyama(24)가 분리한 효소의 반응 최적 pH가 5.0인 것과는 다르나, 대부분의 보고에서 cholesterol oxidase의 반응최적 pH가 6.0~7.5범위라는 보고(21, 12, 5, 22, 13, 9)와 일치하였다

등전점 측정

본 효소의 등전점을 측정하기 위하여 multichambered electrofocusing unit(Isoprime)를 사용하여 acrylamido buffer로 pH 5.0, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0, pH 9.0의 immobilized membrane을 제작하여 수행하였다. pH 6.5와 7.0membrane사이의 chamber에 효소액을 첨가하여 4℃에서 18시간 영동시킨 후 각 chamber에 이동된 단백질의 효소활성을 측정하였다. Table 7에서 보인 바와 같이 pH 6.0과 6.5 membrane 사이의 chamber에서 효소활성이 확인됨에 따라 본 효소의 등전점은 6.0~6.5인 것으로 추정되었다.

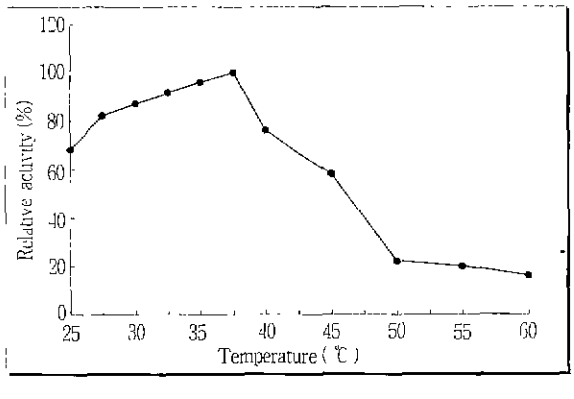

Figure 4 Effect of temperature on the cholesterol oxidase activity The enzyme activity was measured at various temperatures.

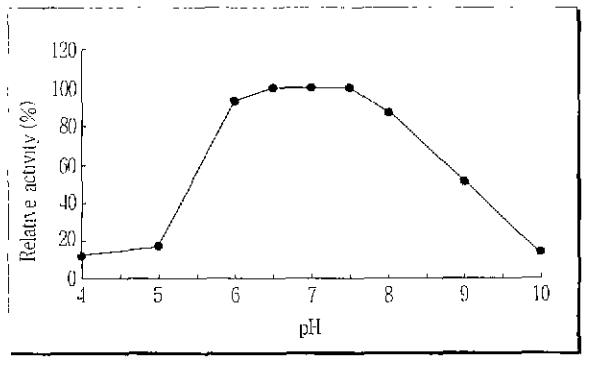

Figure 5. Effect of pH on the cholesterol oxidase activity. The enzyme activity was measured at various pHs. The buffer systems employed were identical as described in Fig. 3.

Table 7. Determination of isoelectric point of the cholesterol oxidase by multichambered electrofocusing unit.

Membrane	Chamber	Activity
	ch. 1	-
pH 5.0	ch. 2	-
pH 6.0	ch. 3	+
pH 6.5	ch 4	-
pH 7.0	ch. 5	-
pH 7.5	ch. 6	-
pH 8.0	ch. 7	-
pH 8.5	ch. 8	-
pH 9.0		

Enzyme activity of the recycled proteins in each chamber was measured.

요 약

Cholesterol oxidase(EC.1.1.3.6)는 cholesterol을 산화 또는 이성화시키는 효소로, 혈중 cholesterol 측정 등의 임상진단용 시약에 이용되고 있으며, 여러종류의 미생물에서 분리, 연구되어 왔다. 현재에는 농업 및 식품 등에도 응용이 기대되고 있는 매우 유용한 효소이다. 본 실험은 토양에서 분리한 방선균으로부터 cholesterol oxidase생산능이 우수한 균주를 선발하여 속의 동정, 효소의 생산조건 및 효소학적 특성을 조사하였다.

본 분리균주는 배양학적, 형태학적, 생리학적 특성 및 현미경 검경을 통하여 *Streptomyces* sp.으로 동정하였다. 본 효소의 생산 조건을 조사한 결과 탄소원으로 1% soluble starch, 질소원으로 2% corn steep liquor가 효소생산에 우수하였으며, 이들 탄소원, 질소원이외 0.1% $NaNO_3$, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4$가 함유된 배지를 생산 최적 배지로 사용하였다. 본 효소의 특성을 검토한 결과, 최적온도와 최적pH는 각각 37℃, pH 6.5~7.5이었으며, 효소의 안정성은 온도 30~40℃에서 80%이상 활성이 유지되었으며, pH 6.0~9.0의 범위까지 안정한 것으로

나타났다. 본 효소의 등전점은 multichambered electrofocusing unit를 사용하여 측정한 결과 6.0-6.5인 것으로 추정되었다.

참 고 문 헌

1. Turfitt, G. E. (1944), The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp., *Biochem. J.*, **38**, 49-62.
2. 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
3. Flegg, H. M. (1973), An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method, *Ann. Clin. Biochem.*, **10**, 79-84.
4. Allain, C. C., L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, and P. C. Fu (1974), Enzymatic determination of total serum cholesterol, *Clin. Chem.*, **20**, 470-475.
5. Lee, S. Y., H. I. Rhee, W. C Tae, J. C Shin, and B. K. Park (1989), Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of strain, *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **31**, 542-546.
6. Weyman, A. E. (1974), Accidental hypothermia in an alcoholic population, *Am. J. Med.*, 56, 13-21.
7. Fukuda, H, Y. Kawakami, and S. Nagamura (1973), A method to screen anticholesterol substance produced by microbes and a new cholesterol oxidase produced by *Streptomyces violascens*, *Chem Pharm Bull.*, 21, 2057-2060.
8. 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
9. Shirokane, Y., K. Nakamura and K. Mizusawa (1977), Purification and some properties an extracellular 3β-hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*, *J. Ferment. Technol.*, 55, 337-346.
10. Kamei, T., Y. Takiguchi, M. Matsuzaki, and S. Nakamura (1978), Purification of 3β-hydroxysteroid oxidse of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol, *Chem. Pharm Bull.*, **26**, 2799-2804.
11. Murooka, Y., T. Ishizaki, O. Nimi, and N. Maekawa (1986), Cloning and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptomyces lividans* with plasmid pIJ 702, *Appl. Environ. Microbial.*, 52, 1382-1385
12. Lee, H. S., S. C. Lee, T. J. Kwon, and T W. Chung (1992), Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase Produced by Soil Microorganism HSL613, *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 401-408.
13. Park, S. H, H. S. Kim, Y. S. Lee, I. B. Kwon and U. H. Chun (1998), Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ isolated from Changran-jeot, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13, 195~202.
14. Lolekha, P. H. and Y. Tecrajetkul (1996), Optimization studies of components in enzymatic cholesterol regents containing cholesterol oxidase from *Nocardia erythropolis*, *Streptomyces* sp. or *Pseudomonas fluorescens*, *J. Clin. Lab Anal.*, **10**, 167~176.
15. Molnar, I. and Y. Murooka (1993), Nucleotide sequence analysis of a region upstream of the cholesterol oxidase - cytochrome P450 operon of *Streptomyces* sp. SA-COO revealing repeating units coding for putative transmembrane and DNA-binding proteins, *J Ferment. Bioeng.*, **76**, 257-264.
16. Corbin, D R., J. T. Greenplate, E. Y. Wong, and J. P. Purcell (1994), Cloning of an insecticide cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts, *Appl. Environ Microbiol.*, **60**, 4239-4244.
17. Murooka Y. (1996), Cholesterol oxidase, *Bioscience and Industry*, 54, 16~22.
18. Hayakawa, M. and H. Nonomura (1987), Humic acid - vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes, *J. Ferment. Technol.*, **65**, 501-509.
19. 宮野昭雄(1988), 放線菌の同定實驗法 pp.35-57, 日本放線菌學會, 東京.
20. Williams, S. T., M E. Sharpe, and J. G. Holt (1986), Bergey's manual of systematic Bacteriology Vol. 4, pp 2451-2498, Williams and Wilkins Co., Baltimore
21. Inouye, Y., K. Taguchi, A Fujii, K. Ishimaru, S. Nakamura, and R. Nomi (1982), Purification and characterization of extracellular 3β-hydroxysteroid oxidase produced by *Streptoverticillium cholesterolicum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 951~958.
22. Liu, W., M H. Meng, and K. S. Chem. (1985), Purification and some properties of cholesterol oxidase produced by an inducible and a constitutive mutant, *Agric Biol. Chem.*, **52**, 413~418.
23. Watanabe, K., H. Aihara, Y. Nakagawa, R. Nakamura, and K. Susaki (1989), Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No.13, *J. Agric. Food Chem*, **37**, 1178~1182.
24. Fukuyama, M. and Y. Miyake (1979), Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin, *J. Biochem.*, **85**, 1183~1193
25. Lee, H. S, I. A. Lee, Y. K. Choe, H. G. Lee, K. C. Lee, Y. H. Park, T. K. Oh, I. S. Choe, and T. W. Chung (1994), Cholesterol oxidase를 생산하는 방선균 분리주 HSL-613의 동정, *Kor. J Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 373-381.
26. Lee, I A., Y K. Choe, H. S. Lee, I. S. Choe, and T. W. Chung (1992), Cholesterol oxidase를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소생산에 관한 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 395-400.