

가자미 식해로부터 콜레스테롤 분해세균의 분리 및 특성

김관필 · 이창호 · 박희동
경북대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Cholesterol Degradation Bacteria from Korea Traditional Salt Fermented Flat Fish

Kwan-Pil Kim, Chang-Ho Rhee and Heui-Dong Park

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract

In order to develop the production and application of cholesterol oxidase, a cholesterol degradation bacteria which produces a remarkable amount of extracellular cholesterol oxidase has been isolated from Korea traditional salt fermented flat fish. The isolated strain was identified as a strain of *Bacillus* sp. based on its morphological, physiological characteristics and cellular fatty acid compositions. Experiments were carried out to optimize the condition of cholesterol oxidase production using *Bacillus* sp. SFF34. *Bacillus* sp. SFF34 was shown to give the maximum yield of cholesterol oxidase in the medium containing 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025% K_2HPO_4 , 0.15% NH_4NO_3 and 0.2% cholesterol. The optimum culture conditions, temperature, initial pH and agitation speed were 30°C, 7.0 and 150rpm, respectively. The enzyme production reached a maximum level at 24 hrs of cultivation(2.42 U/ml).

Key words : *Bacillus* sp. SFF34; cholesterol degradation; korean traditional salt fermented flat fish, producing conditions

서 론

Cholesterol oxidase는 cholesterol을 산화시켜 cholestenone과 H_2O_2 의 생성을 촉매 시켜 주는 효소 중의 하나이며(1,2), 또한 유리형 cholesterol에 특이성이 있는 것이 아니라 β -위치에 수산기(hydroxyl group)를 가진 steroid 화합물, 즉 3β -hydroxy steroid

를 기질로 사용하는 효소로서 1973년 Richmond(1)와 Flegg 등(3)에 의해서 cholesterol oxygen oxidoreductase (EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. 1944년 Turffic 등(4)이 *Proactinomyces erythropolis*에서 추출한 효소를 사용하여 cholesterol로부터 Δ^4 -cholesten-3-one이 생성됨을 발표한 이후 미생물을 이용한 cholesterol 분해에 관한 연구가 이루어져 왔다. Cholesterol을 산화 할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas* sp.(5), *Mycobacterium* sp.(6,7), *Nocardia* sp.(8-10), *Arthrobacter* sp.(11), *Streptomyces* sp.(12,13), *Brevibacterium* sp.(14,15),

Corresponding author : Heui-Dong Park, Department of Food Science and Technology College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea
E-mail : hpark@knu.ac.kr

Corynebacterium sp.(16) 및 *Rhodococcus* sp.(17-19)등이 보고되었다.

Fukada(20)와 Uwajima 등(12)은 효소 생산 및 정제가 용이하며 생산 원가를 절감할 수 있는 방법으로 *Streptomyces violascens*와 *Brevibacterium sterolicum*을 선별하여 cholesterol oxidase를 분리·정제하여 효소의 특성에 대하여 보고하였다. Watanabe 등(18)은 동물성 식품에서 분리한 *Rhodococcus* sp. 균주가 생산한 cholesterol oxidase의 특성에 관하여 조사하였고, 이 효소는 extracellular enzyme이라고 발표하였다.

그러나 국내 연구로는 Choe 등(21)의 간헐적으로 첨가된 cholesterol로부터 미생물 전환에 의한 AD(androst-4-ene-3,17-dione)의 생산에 대한 발표와 Lee 등(22)의 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 cholesterol oxidase의 정제와 특성에 관한 연구 발표, 그리고 Lee 등(23)의 토양에서 분리한 미생물이 생산하는 cholesterol oxidase 및 Park 등(24)이 창난젖에서 분리한 미생물이 생산하는 cholesterol oxidase의 분리·정제 및 특성에 관한 연구 발표에 그치고 있다.

미국, 유럽 등의 지역에서는 cholesterol, wax등과 같은 각종 스테롤류로부터 미생물을 이용하여 steroid 의약품의 전구 물질인 AD 및 ADD(androst-4-diene-3,17-dione)의 생산에 관한 연구는 거의 완벽하게 이루어져 있으며(25,26), 식품뿐만 아니라 체내의 cholesterol을 저하시킬 수 있는 assimilation 분야도 상당히 연구가 진척되어 있는 상태이나(27), 국내에서는 미생물을 이용한 cholesterol 분해에 관한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 특히 식생활의 서구화 경향으로 고콜레스테롤증으로 인한 각종 순환계 질병이 점차 증가하고 있는 상황에서 미생물을 이용한 cholesterol 대사에 관한 연구는 꼭 이루어져야 된다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 우리나라의 발효 식품인 가자미 식해로부터 세포의 cholesterol oxidase를 생산하는 균주를 분리하여 동정하였으며, 분리된 균주를 이용하여 효소의 최적 생산 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

Cholesterol oxidase의 생산하는 균주의 분리는 국내에 시판중인 수산발효식품 33종류를 수집하여 분리원으로 사용하였다. 시료를 멸균된 0.9% NaCl 용액에 적당량 희석한 상등액을 cholesterol을 유일 탄소원으로 함유한 분리 배지(cholesterol 0.1%, yeast extract 0.5%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, K_2HPO_4 0.025%, NH_4NO_3 0.1%, agar 1.5%)에 도말하여 30℃에서 2일간 배양한 후, colony 형태에 따라 100여 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 유일 탄소원으로 cholesterol을 함유한 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후, 배양 상등액의 cholesterol 분해력을 측정하여 cholesterol 분해력이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

균주의 동정

분리된 세균의 동정은 배양학적, 형태학적, 생화학적 특성 및 세포의 지방산 조성을 분석하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 색인(28)에 따라 동정하였다.

Cholesterol 분해력 측정

Cholesterol의 분해력 측정은 Flegg와 Cho의 효소적 방법(3,29)에 따라 잔존 cholesterol 함량을 측정하여 계산하였다. 각각의 균주는 콜레스테롤 분해력 측정용 배지(Cholesterol 0.1%, yeast extract 0.5%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, K_2HPO_4 0.025%, NH_4NO_3 0.1%) 10ml에 접종하여 30℃에서 4일간 배양하였다. 효소적 측정 방법은 상기의 균주 배양액을 80℃ 3분간 가열한 후, vortex mixer로 1분간 균질화 하였다. 이 액을 Isopropanol로 10배 희석하여 잔존 cholesterol 양을 Test kit (Boehringer Mannheim Co. Germany)를 이용하여 측정하였다. 이때 흡광도 측정은 Spectrophotometr (UV-161, Shimatzu, Japan)를 파장 405 nm으로 조정하여 콜레스

테롤 표준품(Aldrich Co., USA)을 이용하여 표준곡선을 작성하여 cholesterol량을 계산하였다.

Cholesterol oxidase 활성측정

Richmond의 방법(1)에 따라 콜레스테롤이 Δ^4 -Cholestenone으로 전환되는 속도를 240 nm에서 직접 흡광도의 증가율을 측정하였다. 30°C 항온 수조에서 0.05% triton X-100을 함유하는 0.1 M sodium phosphate 완충 용액(pH 7.0) 3.0 ml를 10 mm lightpath의 cuvette에 첨가한 다음 50 μ l의 효소 조제액을 첨가하여 혼합하였다. 상기의 용액에 6 mM이 되도록 isopropanol에 용해한 cholesterol을 기질로 50 μ l 첨가하여 혼합한 후, 1분간 흡광도 변화를 측정하였다. (ΔA). Δ^4 -Cholestenone의 molar absorptivity (ϵ)는 12.2×10^3 liter/mole · cm였다. 따라서 cholesterol oxidase의 activity는 다음과 같이 계산하였다.

$$\frac{\Delta A \times 0.082 \times \text{반응 Volume}}{\text{효소액의 Volume}} = \frac{\Delta A \times 0.082 \times 3.1 \text{ ml}}{0.05 \text{ ml}}$$

$$= 5.1 \times \Delta A \times \dots$$

효소 활성도는 반응 온도가 30°C일 때 1 μ mol의 cholesterol을 1분 동안에 산화시키는 양을 효소 역가 1 unit로 표시하였다.

균체량 측정

균체 증식량을 측정하기 위하여 배양액을 분광 광도계(Shimazu UV-1601, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 경시적으로 균체의 증식량을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 선별 및 동정

수산발효 식품으로부터 cholesterol을 유일 탄소원으로 함유한 배지에서 colony의 형태에 따라 100여 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 유일 탄소원으로 cholesterol을 함유한 액체 배지에 접종하여

배양한 후, 잔존 cholesterol의 양을 측정하였다. 이들 중 cholesterol 분해력이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 SFF34로 명명하고, 효소 생산 조건을 최적화하기 위한 본 실험의 공시 균주로 사용하였다(data not shown). Cholesterol 분해력이 가장 우수한 균주 SFF34 균주의 배양학적 및 생리학적 성질을 조사한 결과(Table 1), Gram 염색시 양성으로서 운동성은 없었으며 내생포자를 형성하였다. Catalase 시험, oxidase 시험시 양성, VP 시험, methyl red 시험, indole 시험시 음성, gelatin 액화능과 전분 분해성이 존재하였으며, nitrate를 nitrite로 환원하였다. 그리고 구연산을 이용하였으며, urease 시험시 음성, NaCl 농도 5% 존재하에서 생육하였으며 glucose, arabinose, xylose, mannitol을 탄소원으로 첨가하였을 때 산을 생성하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과(Table 2) glucose, fructose, maltose, sucrose, cellobiose 및 arabinose 등을 자화하였으나, trehalose, erythritol, 결과(Fig. 1), 주요 지방산의 조성은 C15:0 anteiso dulcitol, adonitol 및 rhamnose 등의 탄소원들은 자화하지 못하였다. 또한 세포벽의 지방산조성을 분석한

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated strain SFF34

Morphological characteristics	
Form	Rods
Size	0.3~0.6 × 1.4~2.1 μ m
Gram stain	+
Mobility	-
Spore formation	+
Physiological characteristics	
Catalase	+
Methyl red test	-
V-P test	-
V-P test(below pH 7.0)	-
Indole production	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Utilization of citrate	+
Hydrogen sulfide production	+
Gas from glucose	-
Urease test	-
OF test	Fermentation
Oxidase test	+
Pigment production	-
Optimum growth temperature	25 ~ 35°C
pH	4.0 ~ 10.0
Acid from glucose	+
Growth in 5% NaCl	d

+, positive; d, weak; -, negative

(34.76%), C15:0 iso (16.05%), C17:0 iso (12.01%) 및 C17:0 anteiso (11.87%)로 나타났다. 이상의 배양학적, 생리학적 특성 및 세포벽 지방산 분석을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (28)에 기술된 분류 기준에 따라 동정한 결과 *Bacillus* sp. 또는 그 유연군으로 동정되어 분리균을 *Bacillus* sp. SFF34로 명명하였다.

Table 2. Carbon utilization of isolated strain SFF34

Carbon utilization	
Cellobiose	+
Dextrin	d
Trehalose	-
Arabinose	+
Raffinose	+
Xylitol	-
Arbutin	+
Erythritol	-
Dulcitol	-
Ribose	+
Maltose	+
Galactose	+
Adonitol	-
Rhamnose	-
Fructose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Glucose	+
Xylose	+
Sucrose	+
Sorbitol	+
Lactose	+
Melibiose	-
Methanol	-
Ethanol	-
Glucosamine	d
Glycine	+
Salicine	d
Succinate	-
Gluconic acid	+

+, positive; d, weak; -, negative

배양 조건에 따른 효소의 생산

온도의 영향 : *Bacillus* sp. SFF34의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지에 균을 접종한 후 20, 25, 30, 35 및 40℃ 등의 각 온도에서 150 rpm으로 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상청액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과, 배양 온도가 30℃일 때 cholesterol oxidase의 활성과 균의 생육 속도가 가장

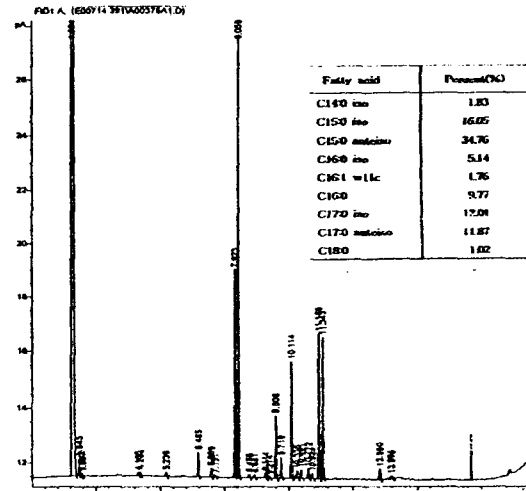


Fig. 1. Fatty acid composition of the SFF34 cell wall. The fatty acid analyzed using Hewlett-Packard model 6890A gas chromatography and MIDI Aerobe method, Chem Station ver 4.02

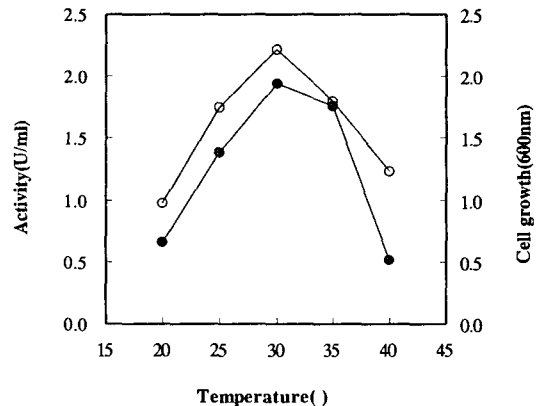


Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34.

After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various temperature for 24 h on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed in Materials and Methods. The cholesterol medium is composed of 0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001% FeSO₄·7H₂O, 0.025% MgSO₄·7H₂O, 0.025% K₂HPO₄, 0.1% NH₄NO₃. ○ -- ○, Cell growth; ● -- ●, Activity

높게 나타났다. 이 결과는 Lee 등(23)이 cholesterol oxidase의 생산 균주로 분리한 *Streptomyces* sp.이 30℃에서 효소의 생산이 가장 우수하였다는 보고와 Watanabe 등(18,19) 이 분리한 *Rhodococcus equi* No. 23균주는 30℃에서 효소의 생산이 가장 우수하였다는 보고와 비슷하였다. 젓갈류에서 분리된 균주는

저온 발효를 하기 때문에 대부분의 균주가 30 ~ 45°C에서 활성이 좋은 것으로 보고되어 있고, 본 균주도 젓갈류의 일종인 가지미 식해에서 분리한 균주이므로 저온 발효시 낮은 온도에 적응되었기 때문에 최적 온도는 약 30°C 전후인 것으로 생각된다.

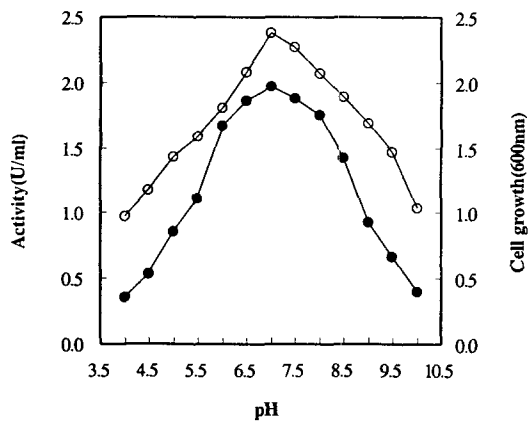


Fig. 3. Effect of initial pH on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34.

After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various initial pH at 30°C for 24 h on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed in Materials and Methods. The cholesterol medium is composed of 0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025% K_2HPO_4 , 0.1% NH_4NO_3 . ○ -- ○, Cell growth; ● -- ●, Activity

pH의 영향 : *Bacillus* sp. SFF34의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지의 초기 pH를 4.0에서 10.0까지 0.5간격으로 조정하여 배양하여 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, 초기 pH가 6.0 ~ 8.0일 때 cholesterol oxidase의 활성이 비교적 높게 나타났으며, 초기 pH가 7.0일 때 cholesterol oxidase의 활성과 균체의 생육도가 가장 높게 나타났다.

진탕 속도의 영향 : 진탕 속도에 따른 *Bacillus* sp. SFF34의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장의 변화를 조사하기 위하여 회전식 진탕 배양기의 회전 속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250 및 300 rpm으로 조정하여 진탕 배양하였다. 배양 조건은 초기 pH 7.0 및 배양 온도 30°C에서 24시간 진탕 배양하여 원심

분리한 후, 배양 상정액의 cholesterol 분해 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과, 최대 cholesterol oxidase의 생산은 진탕 속도가 150 rpm일 때 1.94 U/ml로 가장 높게 나타났으며, 균체 성장 또한 150 rpm일 때 가장 우수하였다. 그리고 진탕 속도가 150 rpm보다 느리거나 빠를수록 cholesterol oxidase의 생산은 감소하는 것으로 나타났다.

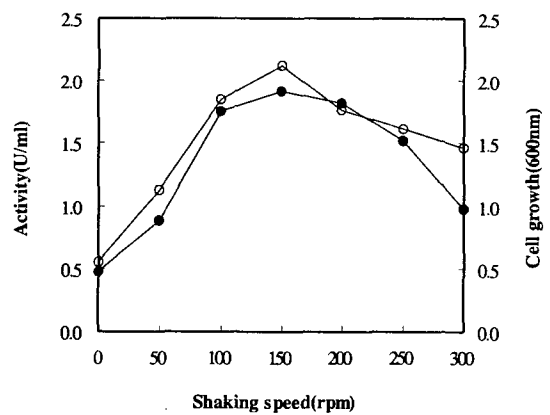


Fig. 4. Effect of shaking speed on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34.

After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various shaking speed at 30°C for 24 h on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed in Materials and Methods. The cholesterol medium is composed of 0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025% K_2HPO_4 , 0.1% NH_4NO_3 . ○ -- ○, Cell growth; ● -- ●, Activity

Cholesterol 농도의 영향 : *Bacillus* sp. SFF34의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 초기 cholesterol 농도의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol을 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25%, 0.30%, 0.35%, 0.40%, 0.45% 및 0.50%로 각각 조정하여 첨가한 후, 30°C에서 24시간 배양하여 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 5). 그 결과, cholesterol의 초기 농도가 0.20%일 때 효소의 활성이 가장 높게 나타났다. 또한 0.05% ~ 0.20%까지는 효소의 활성이 증가하였으나, 0.20% 이상의 농도에서는 효소의 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 균체의 생육도는 cholesterol 농도가 0.25%일 때 가장 우수하였다.

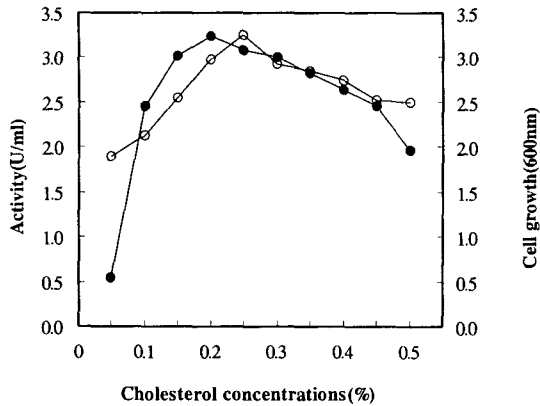


Fig. 5. Effect of cholesterol concentrations the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34.

The bacteria were cultured in the cholesterol medium supplement with various concentrations of cholesterol. Cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed in Materials and Methods. ○ -- ○, Cell growth; ● -- ●, Activity

배지 조성에 따른 효소의 생산

Cholesterol oxidase의 생산에 미치는 영양소들의 영향을 알아보기 위하여 탄소원, 질소원 및 무기성분의 종류와 농도를 각각 다르게 하여 실험한 후 cholesterol oxidase 생산에 적합한 배지 조성을 조사하였다.

탄소원의 영향 : 효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 먼저 glucose의 농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 조정하여 실험한 결과 2.0%일 때 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 탄소원의 농도를 2.0%로 하여 기본 배지에 탄소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30℃에서 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 그 결과, glucose를 첨가한 실험구에서 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 raffinose, rhamnose, galactose, fructose, maltose 순으로 cholesterol oxidase의 생산성이 높게 나타났으며, 그외의 탄소원은 탄소원을 첨가하지 않은 경우보다 cholesterol oxidase의 활성을 저해 하였다. 특히 soluble starch, inuline, xylose를 첨가한 경우에는 cholesterol oxidase의 생산

성이 매우 낮았다. 이와 같은 결과로 볼때 탄소원으로는 glucose, raffinose 및 rhamnose 등이 효과적이라고 판단되며, 본 실험에서는 이용율이 가장 높은 탄소원으로 밝혀진 glucose를 사용하였다.

Table 3. Effects of various carbon sources on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34

Carbon sources(2.0%)	Cell growth(600nm)	Activity(U/ml)
Fructose	2.71	1.95
Sucrose	2.38	1.56
Rhamnose	3.57	2.07
Ribose	0.24	0.71
Raffinose	4.814	2.18
Galactose	3.10	2.02
Lactose	2.21	1.74
Mannitol	2.12	1.42
Glucose	4.83	2.38
Inositol	2.27	1.69
Arabinose	3.49	1.74
Maltose	3.95	1.89
Xylose	2.94	0.56
Inuline	0.38	0.48
Soluble starch	0.37	0.42
None	1.88	1.83

The bacteria were cultured at 30℃ for 24 h in a liquid medium containing 2% various carbon sources instead of 2% glucose in cholesterol media(2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 0.025% K₂HPO₄, 0.1% NH₄NO₃, 0.0001% FeSO₄ · 7H₂O, 0.1% cholesterol). Cholesterol oxidase activity of the culture supernatant was determined by the method of Richmond.

질소원의 영향 : 효소 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 먼저 yeast extract의 농도를 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 조정하여 실험한 결과 0.5%일 때 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 질소원의 농도를 0.5%로 하여 기본 배지에 질소원의 종류를 달리하여 첨가하여 배양한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 그 결과, 실험에 사용한 질소원 중에서 yeast extract를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 활성이 1.97 U/ml로 가장 높게 나타났으며, tryptone > soytone > peptone 순서로 높게 나타났다.

Table 4. Effects of various nitrogen sources on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34

Nitrogen source(0.5%)	Cell growth(600nm)	Activity(U/ml)
Tryptone	2.17	1.74
Soytone	2.44	1.86
Peptone	1.47	1.54
Yeast extract	1.64	1.97
Malt extract	0.55	0.49
Casamino acid	0.57	0.21
Skim milk	0.60	0.34
Polypeptone	0.97	0.46
Beef extract	1.07	0.78

The bacteria were cultured at 30°C for 24 h in a liquid medium containing 0.5% various sources instead of 0.5% yeast extract in cholesterol media(2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025% K_2HPO_4 , 0.1% NH_4NO_3 , 0.0001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% cholesterol). Cholesterol oxidase activity of the culture supernatant was determined by the method of Richmond.

무기 성분의 영향 : *Bacillus* sp. SFF34의 cholesterol oxidase의 생산과 균체 성장에 미치는 각종 무기 성분의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지(cholesterol 0.1%, yeast extract 0.5%)에 각종 무기 성분의 최종 농도를 다르게 첨가하여 배양한 후, 배양상징액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정된 결과는 Table 5와 같다. 그 결과, 실험에 사용한 무기 성분 중에서 ammonium nitrate를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 상대 활성이 가장 높게 나타났으며 농도는 0.15%일 때 효소의 활성이 1.99 U/ml로 가장 높게 나타났다. 그 다음으로는 0.25%의 dipotassium hydrogen phosphate를 첨가시 활성이 1.97 U/ml, 0.03%의 magnesium sulfate를 첨가시 1.87 U/ml의 순으로 비교적 높게 나타났다. 그리고 그의 sodium chloride, ammonium sulfate, ferrous sulfate, calcium chloride를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 활성을 대조구와 비교시 비슷한 활성을 나타내거나 효소활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

배양 시간의 영향

이상에서 검토한 최적 배지 조성(Cholesterol 0.2%, yeast extract 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, K_2HPO_4 0.02%, NH_4NO_3 0.2%, cholesterol 0.2%)과 최적 배양

Table 5. Effects of various inorganic compounds on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34

Inorganic compound	Concentration (%)	Cell growth (600nm)	Activity (U/ml)
Ammonium nitrate	0.05	1.57	1.56
	0.10	1.65	1.89
	0.15	1.70	1.99
	0.20	1.72	1.71
	0.30	1.83	1.44
Dipotassium hydrogen phosphate	0.010	1.50	1.52
	0.015	1.62	1.67
	0.020	1.66	1.75
	0.025	1.68	1.97
	0.030	1.62	1.88
Sodium chloride	0.05	1.61	1.42
	0.10	1.68	1.46
	0.15	1.86	1.64
	0.20	1.77	1.56
	0.30	1.67	1.46
Ammonium sulfate	0.10	1.74	1.51
	0.20	1.71	1.39
	0.30	1.70	1.37
	0.40	1.68	1.13
	0.01	1.69	1.62
Magnesium sulfate	0.02	1.73	1.86
	0.03	1.59	1.70
	0.04	1.57	1.41
	0.001	1.35	1.30
	0.002	1.86	1.40
Ferrous sulfate	0.003	2.41	1.32
	0.005	1.70	1.11
	0.005	1.54	1.27
	0.010	1.65	1.66
	0.015	1.63	1.34
Calcium chloride	0.020	1.52	1.16
	None	1.43	1.49

The bacteria were cultured at 30°C for 24 h in a liquid medium containing 0.5% yeast extract, 0.1% cholesterol. Cholesterol oxidase activity of the culture supernatant was determined by the method of Richmond.

조건에서 균주의 생육과 효소의 생산을 경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. 그 결과, 균의 생육은 배양 22시간일 때 최고의 생육을 나타내었으며, 효소의 활성은 배양 24 시간일 때 2.42 U/ml로 가장 높게 나타났으며 그 이후의 시간에는 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Lee 등(23)이 보고한

cholesterol oxidase 생산 균주인 *Streptomyces* sp.가 100시간이 경과하여야 효소의 활성을 나타내었다는 보고와 Liu 등(30,31)이 *Arthrobacter simplex*, Ahmad 등(32)과 Watanabe 등(18)의 *Rhodococcus equi* 와 Uwajima 등(15)의 *Brevibacterium sterolicum*이 생산하는 cholesterol oxidase의 생산 조건으로 평균 4일 이상 배양 시키는 결과 보다 빠른 시간내에 효소의 생산성을 나타내었다. 또한 cholesterol oxidase의 활성은 Park 등(24)이 *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ가 생산하는 효소의 활성이 0.29 U/ml, Suh 등(33)이 보고한 *Bacillus sphaericus*가 생산하는 효소의 활성이 0.05 U/ml, Liu 등(30,31)이 보고한 *Arthrobacter simplex*가 생산하는 효소의 활성이 1.5 U/ml 보다는 활성이 높게 나타났으며, Lee 등(23)이 보고한 *Streptomyces* sp. 이 생산하는 cholesterol oxidase의 활성이 8.5 U/ml 보다는 낮은 활성을 나타내었다.

cholesterol oxidase 생산성이 우수한 미생물을 선별하여 그 특성을 조사하였다. Cholesterol oxidase의 생산성이 가장 우수한 SFF34의 배양학적, 생리학적 특성 및 세포벽 지방산 조성을 조사하여 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*의 분류기준에 따라 동정한 결과 *Bacillus* sp. 또는 그 유연군으로 동정되어 분리군을 *Bacillus* sp. SFF34로 명명하였다. Cholesterol oxidase의 생산 조건을 검토한 결과 최적 배지 조성은 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02% K_2HPO_4 , 0.2% NH_4NO_3 , 0.2% cholesterol로 판명되었으며, 배양 조건은 30°C, 초기 pH 7.0, 진탕속도는 150rpm에서 24시간 배양시효소 생성이 가장 우수하였다 (2.42 U/ml).

참고문헌

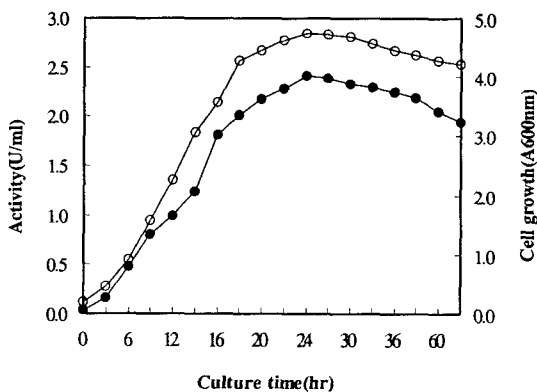


Fig. 6. Time course of the cell growth and cholesterol oxidase activity of *Bacillus* sp. SFF34.

After bacteria were cultured in a cholesterol medium at 30°C, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed in Materials and Methods. The cholesterol medium is composed of 0.2% cholesterol, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose, 0.2% NH_4NO_3 , 0.02% K_2HPO_4 , 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. ○ — ○, Cell growth; ● — ●, Activity

요 약

전통 발효 식품인 가자미 식해로부터 cholesterol oxidase 생산성이 있는 균주를 분리하고 이들 분리된 균주들로부터 여러 단계의 균주 선별시험을 통하여

1. 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
2. Weyman, A.E. (1974) Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.*, 56, 13-21
3. Flegg, H.M. (1973) An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.*, 10, 79-84
4. Turfitt, G.E. (1944) The microbiological degradation of steroids. 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.*, 38, 49-62
5. Talalay, P. and Dobson, M.M. (1953) Purification and properties of a β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 205, 823-837
6. Schatz, A., Savard, K. and Pinter, I.J. (1949) The ability of soil Microorganisms the decompose steroids. *J. Bacteriol.*, 58, 117-120
7. Stadtman, T.C., Cherkes, A. and Anfinsen, C.B. (1954) Studies on the microbiol degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 206, 511-523
8. Buckland, B.C., Lilly, M.D. and Dunnill, P. (1976)

- The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by *Nocardia rhodocrous*. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 601-621
9. Sih, C.J. and Wang, K.C. (1965) Mechanism of steroid oxidation by microorganism. *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 1387-1391
 10. Turfitt, G.E. (1947) Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.*, **54**, 557-562
 11. Arima, K., Nagasawa, M., Bae, M. and Tamura, G. (1969) Microbiol transformation of sterols. I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **22**, 1636-1643
 12. Kamei, T., Takiguchi, Y. Suzuki, H. and Nakamura, S. (1978) Purification of 3β -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol. *Chem. Pharm. Bull(Tokyo)*, **26**, 2799-2804
 13. Tomioka, H., Kagawa, M. and Nagamura, S. (1976) Some enzymatic properties of 3β -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens*. *J. Biol. Chem.*, **79**, 903-915
 14. Uwajima, T., Yagi, H., Nagamura, S. and Terada, O. (1973) Isolation and crystallization of extracellular 3β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2345-2350
 15. Uwajima, T., Yagi, H. and Terada, O. (1974) Properties of crystalline 3β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1149-1156
 16. Shirokane, Y., Nakamura, K. and Mizusawa, K. (1977) Purification and some properties of an extracellular 3β -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 337-342
 17. Krent, J., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994) Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells production and extraction. *J. Biotechnol.*, **33**, 271-282
 18. Watanabe, K., Aihara, H., Nakagawa, Y. and Sasaki, T. (1989) Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1178-1182
 19. Watanabe, K., Shimizu, H., Aihara, H., Nakamura, R., Suzuki, K.I. and Momagata, K. (1986) Isolation and identification of cholesterol-degradation *Rhodococcus* strains food of animal origin and their cholesterol oxidase activities. *J. Gem. Appl. Microbiol.*, **32**, 137-147
 20. Fukuda, H., Kawakami, Y. and Nagamura, S. (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
 21. Choi, S.K., Kim, H.S. and Park, Y.H. (1988) Microbiol conversion of cholesterol to 4-androstene-3, 17-dione by intermittent addition of substrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 187-192
 22. Lee, S.Y., Rhee, H.I., Tae, W.C., Shin, J.C. and Park, B.K. (1989) Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of the strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 542-546
 23. Lee, I.A., Choe, Y.K., Lee, H.S., Choe, I.S. and Chung, T.W. (1992) Studies on the isolation of cholesterol oxidase producing soil microorganism and the culture condition for the production of high activity cholesterol oxidase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **20**, 395-400
 24. Park S.H., Kim, H.S., Lee, Y.S., Kwon, I.B. and Chun, U.H. (1998) Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ isolated from Changran-jeot. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 195-202
 25. Srivastava, S.K., Srivastava, R.A.K. and Mathur, S.N. (1985) Biotransformation of sugar-cane sterols into Androsta,4-dione-3,17-dione(ADD) by *Arthrobacter*

- globiformis* and *Str. Oxidans*. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 399-402
26. Goetschel, R. and Bar, R. (1992) Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids. *Enzyme. Microb. Technol.*, **14**, 462-469
27. Jaspers, D.A., Massey, L.K. and Luedcke, L.O. (1984) Effect of consuming yogurt prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.*, **49**, 1178-1181
28. John, G.H., Noel, R.K., Peter, H.S.S. James, T.S. and Stanely, T.W. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. (1994)
29. Cho, B.H.S. (1983) Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues. *Clin. Chem.*, **29**, 166-168
30. Liu, W., Hsu, J. and Wang, W. (1983) Production of cholesterol oxidase by antibiotic resistant mutant and a constitutive mutant *Arthrobacter simplex* B-7. *Proc. Natl. Sci.*, **7**, 225-260
31. Liu, W., Meng, M. and Chen, K. (1988) Purification and some properties of cholesterol oxidase produced by an inducible and a constitutive mutant *Arthrobacter simplex*. *Agric. Biol. Chem.*, **5**, 413-418
32. Ahmad, S. and Roy, P.K. (1991) Microbial transformation of sterols to C19-steroids by *Rhodococcus equi*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 557-561
33. Suh, H.J., Kim, T.W. and Son, H.S. (1993) Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Bacillus sphaericus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 446-452

(접수 2001년 1월 9일)