

Bioconversion of Cholesterol by Organic Solvent Tolerant *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106

강정환, 정미연, 김미림, 박정옥¹, 주우홍@
 창원대학교 생명과학부, 창원대학교 유전공학 연구소¹
 전화(0551)279-7443, 팩스(0551)279-7440

An organic solvent-tolerant *Pseudomonas savastanoi* strain BCNU 106 was isolated. This bacterium was gram negative rod, and showed oxidase positive, catalase positive, and decarboxylase positive reactions. The *Pseudomonas* strain oxidized cholesterol on the medium supplemented with an organic solvent. The strain BCNU 106 is able to grow in presence of organic solvents of which log P_{ow} is between 1.5 to 7.0. The strain was well grown in a medium supplemented with a 10% volume of a organic solvent (toluene, *p*-xylene, cyclohexane, mesitylene) containing cholesterol(20mg/ml). Major conversion compound were 7-dehydrocholesteryl dimethylphosphate, cholesta-4,7-dien-3-one, and cholesta-3,5-dione.

서론

유기용매내성세균은 불수용성 화합물의 미생물학적 전환에 있어서의 응용 가능성을 지니고 있다. 불수용성 화합물의 하나가 cholesterol 이다. 대부분의 스테로이드 화합물의 용해도는 물의 10^{-2} 에서 10^{-3} g/water의 범위 정도로 매우 낮다. 이러한 저수용성 화합물의 생물학적 전환에 있어서 야기되는 경제적 시간적 문제를 각각의 목적에 맞는 적당한 유기용매내성세균을 사용하여 해결이 가능할 수 있다. 본 실험에 사용된 균주의 toluene에서의 좋은 성장은 cholesterol bioconversion 뿐만 아니라 다른 불수용성 화합물의 생물학적 전환도 기대할 수 있다고 본다. 본 실험은 유기용매내성세균인 *P. savastanoi* BCNU 106 균주를 이용하여 cholesterol의 전환확인과 유기용매에 따른 전환율을 측정하고자 하였다.

실험 및 방법

P. savastanoi BCNU 106균주는 화학공장폐수내에서 분리 하였고 cholesterol의 전환은 변형 배지인 conversion medium(Yeast-Extract 0.2%, NaCl 1%, ammonium sulfate 0.05%, MgSO₄ 10mM)을 사용하였다. Conversion medium에서 12시간 전배양한 균주를 1ml취하여 새로운 conversion medium 9 ml이 든 시험관에 1 ml의 유기용매에 2%의 cholesterol을 녹여 첨가한다. 35℃에서 180rpm 으로 4일간 진탕

배양하여 유기용매층을 Thin Layer Chromatography 방법으로 확인하였다. 유기용매 별로 cholesterol 의 전환을 측정을 위해 균주를 상기 방법으로 배양후 일일 별로 유기용매층을 취하여 소비량을 확인하였다. 생균수 측정을 위해 LBM 배지에서 성장하는 콜로니 수를 계산하였고 유기용매에 녹아있던 cholesterol은 HPLC를 이용하여 측정하였다. cholesterol 의 소비율은 대조구를 두어 비교 측정하였다.

결과 및 고찰

P. savastanoi BCNU 106 균주에 의한 cholesterol의 conversion 확인

TLC와 HPLC를 이용하여 cholesterol의 conversion 을 확인 한 결과 3개의 생성물이 생성됨을 확인 할수 있었다 (Fig. 1).

P. savastanoi BCNU 106 균주에 의한 *p*-xylene 및 toluene에서 cholesterol의 소비율, 생성물의 생성량과 생균수의 측정

Toluene 에서보다 *p*-xylene 에서 conversion율이 높음을 확인할수 있었고 toluene 에서는 2가지의 생성물이 *p*-xylene에서는 3가지의 생성물이 생성되었다 (Fig. 2, 3).

유기용매 첨가시 cholesterol의 소비율과 생균수

배양후 cholesterol이 2% 용해되어 있는 유기용매를 증정한 경우 cholesterol의 전환율이 높음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 같은 연구결과들로부터 유기용매의 존재하에서 미생물에 의한 cholesterol의 전환이 가능하다는 것을 지지해주며 생물학적 전환기술에, 분리된 극한세균 *P. savastanoi*가 응용될 수 있으리라 기대된다.

요약

P. savastanoi BCNU 106 균주에 의해 cholesterol 이 전환됨을 확인하였고 toluene 에서보다는 *p*-xylene 에서 전환율이 높음을 관찰할 수 있었다. 또 균주 배양후 cholesterol이 녹아있는 유기용매를 첨가하였을 때가 전환율이 높음을 확인 할 수 있었다

참고 문헌

1. Rikizo Aono, Noriyuki Doukyu, Hideki Kobayash, Harushi Nakajima, and Koki Holikodhi. "Oxidative Bioconversion of Cholesterol by System" (1994). Applied and Enviromental Microbiology, 60(7), 2518-2523.

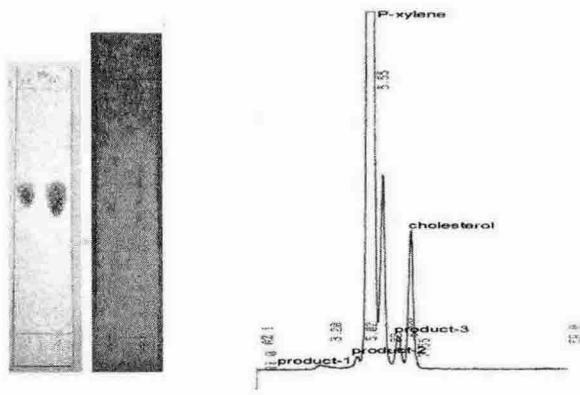


Fig. 1. Bioconversion of cholesterol dissolved in the organic solvent.

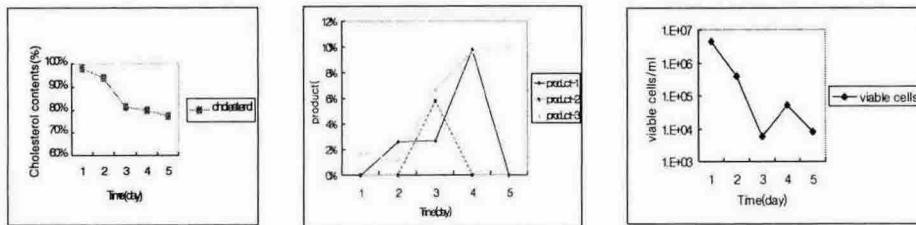


Fig 2. Effect of *p*-xylene on cholesterol consumption by *P. savastanoi* BCNU 106.

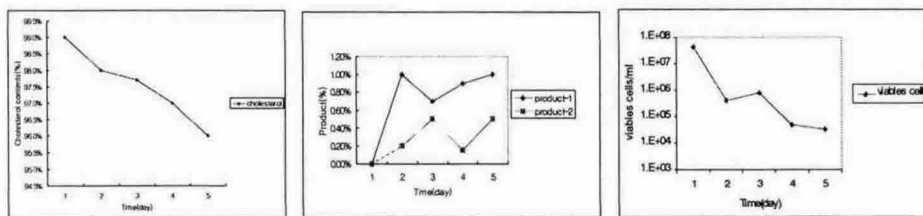


Fig 3. Effect of toluene on cholesterol consumption by BCNU106 cell grown

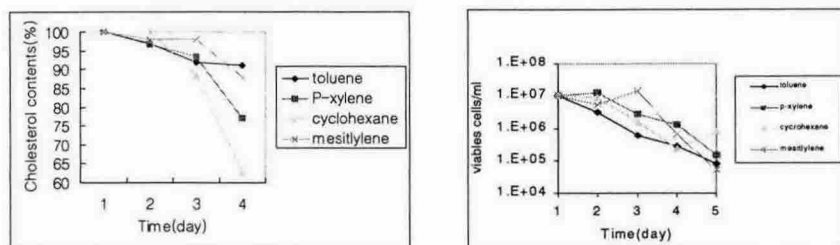


Fig 4. Effect of organic solvents on the cholesterol consumption by *P. savastanoi* strain BCNU106 cells grown without organic solvent or cholesterol.