

Cholesterol Oxidase를 생성하는 토양 미생물의 분리 및 효소 생산에 관한 연구

이인애 · 최용경¹ · 이홍수 · 최인성¹ · 정태화*
KIST 유전공학연구소, 면역화학연구소, ¹세포생물학연구소

Studies on the Isolation of Cholesterol Oxidase Producing Soil Microorganism and the Culture Condition for the Production of High Activity Cholesterol Oxidase

Lee, In-Ae, Yong-Kyung Choe¹, Hong-Soo Lee,
In-Seong Choe¹ and Tai-Wha Chung*

Immunochemistry Lab., ¹Cell Biology Lab.
Genetic Engineering Research Institute, KIST
P.O. Box 17, Taeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — A novel strain of HSL613 producing a large amount of cholesterol oxidase as an extra-cellular enzyme was isolated from soil samples. Experiments were carried out to optimize the condition of cholesterol oxidase production using HSL613 strain. This microorganism was shown to give the maximum yield of cholesterol oxidase in the medium containing 2% glucose, 2% yeast extract, 0.2% K₂HPO₄, 0.1% NaCl, 0.005% CaCl₂·2H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O. The optimum temperature was 30°C and the enzyme production reached a maximum level at 144 hours of cultivation (10.3 μ/ml).

Cholesterol을 산화시키는 효소는 1973년 Richmond(1)와 Flegg(2)에 의해 cholesterol oxidase(EC 1.1.3.6)로 분류되었으며 cholesterol을 산화할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas*속(3), *Nocardia*속(1,4), *Arthrobacter*속(5), *Streptomyces*속(6,7), *Brevibacterium*속(8,9) 및 *Corynebacterium*속(10) 등이 보고되고 있다. Richmond(1)와 다른 연구자들(4)이 선별한 미생물인 *Nocardia erythropolis*는 균체내 효소를 생성하기 때문에 효소생산 및 정제가 어려우므로, Fukuda(7)와 Uwajima(9) 등은 효소생산 및 정제가 용이하며 생산원가를 절감할 수 있는 세포외 효소를 생산하는 *Streptomyces violascens*와 *Brevibacterium sterolicum*을 선별하여 cholesterol oxidase를 생산하고 분리 정제하여 효소의 특성을 조사하였다. 이와 같이 몇 종류의 미생물로부터 cholesterol oxidase가

생산되는 것이 알려져 있지만 국내에서는 극히 고가로 외국에서 수입하여 사용하고 있기 때문에 국내에서의 cholesterol oxidase 생산이 시급한 실정이므로 본 연구를 수행하였다. 본 연구는 국내에서 cholesterol을 정량하는 kit를 생산하기 위해서는 기본적인 단계인 cholesterol oxidase 생산 체계를 확립해야 하므로 세포외 효소를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하였고, 분리된 HSL613을 이용해서 효소생산조건을 검토하였다.

재료 및 방법

토양 시료의 채취 및 방선균의 분리

전국 각 지역에서 200여점의 토양(지표에서 5~10 cm 깊이의 토양)을 10~20g 정도씩 채취하여 3종류의 방선균 분리용 배지를 사용하여 총 695균주의 방선균을 분리하였다. 토양에서 cholesterol oxidase를 생산하는 방선균을 분리하기 위해서 희석법, 직접법

Key words: Cholesterol oxidase, soil microorganism, producing condition

*Corresponding author

및 시료 전 처리법을 이용하였다. 토양시료 1g을 멸균 생리 식염수 10 ml에 넣고 충분히 교반한 후 교반액을 $10^3 \sim 10^5$ 으로 생리 식염수를 사용하여 희석한 후 각각의 희석액을 0.1 ml 취하여 방선균 분리용 배지에 도달하여 30°C에서 3~5일간 배양한 후 생성되는 집락을 분리하였다. 이들 방선균 집락을 같은 배지에서 2회 이상 반복하여 배양하면서 분리하여 단일 균종만을 획득하였다. 토양 시료를 분쇄하여 방선균 분리용 배지의 한천배지상에 도달하여 30°C에서 수일간 배양한 후 생육한 균주를 얻는 직접법을 수행한 다음 분리된 균주들은 희석법과 동일한 방법으로 재분리하여 단일 균주만을 획득하였다. 토양 시료 1g을 분쇄한 후 50°C incubator에서 2시간 처리하는 시료 전처리법을 거친 후 희석법과 직접법을 이용하여 방선균을 분리하였다.

균주 분리용 배지 및 보존용 배지

*Streptomyces*속의 분리를 위하여 Bennett's agar (11), *Actinomycetes* isolation agar(12), Oatmeal agar 배지를 사용하였으며 분리된 균주 중 집락 모양 및 색깔, 포자 형성 상태, 수용성 색소 등을 육안으로 관찰하여 1차적으로 선별하였다. 이들 선별된 분리주를 대상으로, cholesterol oxidase 활성을 검사하여 효소활성을 가진 분리주만 2차 선별하여 보존용 배지인 Bennett's agar에서 배양하여 보관하고 이들

보존용 배지에서 포자와 군사체를 한 백금이씩 취하여 50% glycerol 용액에 현탁시켜 -70°C deep freezer에 보존하였다. 이때 사용한 배지 조성은 Table 1과 같다.

방선균의 배양

선별된 방선균의 종균 배양액을 배양용 배지 150 ml이 들어있는 500 ml의 Sakaguchi flask에 1%(v/v) 접종하고 진탕배양기(170 rpm)에서 30°C로 8일간 배양하였다.

Cholesterol oxidase 생산용 배지

1차와 2차의 선별 과정을 거친 후 cholesterol oxidase의 생산을 위해 사용한 배지의 조성은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of fermentation medium

Composition	Amount (g/l)
Soluble starch	10.0
Glucose	20.0
Soytone	25.0
Beef extract	1.0
Yeast extract	4.0
Sodium chloride	2.0
Dipotassium hydrogenphosphate	0.05
pH 7.0	

Table 1. Medium composition*

	Bennett's agar	Actinomycetes isolation agar	Oatmeal agar
Glucose	10.0	5.0	
Oatmeal			20.0
N-Z Amine type A	2.0		
Beef extract	1.0		
Yeast extract	1.0		
Sodium caseinate		2.0	
Asparagine		0.1	
Sodium propionate		4.0	
Dipotassium phosphate		0.5	
Magnesium sulfate		0.1	
Ferrous sulfate		0.001	
Nystatin	50 µg		50 µg
Agar	15.0	15.0	18.0
pH	7.2	7.0~7.2	7.0~7.2

*Each component is represented g/l, except the nystatin.

Cholesterol oxidase 활성 측정

Richmond의 방법(1)에 따라 용존산소의 소비속도를 직접 측정하였다. 기질로는 cholesterol(Sigma Co. 분자량 386.7)을 6 mM이 되도록 isopropanol에 용해한 후 0.05 ml를 취하고 0.05 M의 인산완충용액(pH 7.0)에 0.05%(w/v)의 Triton X-100이 함유된 용액을 0.94 ml 첨가한 후 효소액을 0.01 ml 첨가하여 1 ml cuvette에서 잘 섞어준 다음 30°C 에서 파장 240 nm로 흡광도의 증가율을 측정하였다. 효소활성도는 반응온도가 30°C 일 때 1분당 1 μmole의 산소가 소비되는 양을 효소역가 1 unit로 표시하였다.

균체량 측정

균체 증식량을 측정하기 위해서 배양액을 분광분석기(Beckman DU-70)로 파장 660 nm에서 현탁도를 측정하여 경시적으로 균체의 증식량을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생산균주의 선별

시료 채취와 균주 분리 : 전국 각 지역에서 지표로부터 5~10 cm 깊이의 토양을 10~20g 정도씩 200여점 채취하여 3종류의 방선균 분리용 배지를 사용하여 총 695균주의 방선균을 분리하였다. 토양으로부터 방선균을 분리하기 위하여 희석법, 직접법 및 시료 전 처리법을 각각 이용하였다.

우수 균주의 선별 : 분리된 695개의 균주를 효소생산용 배지에 접종하여 30°C 에서 8일간 배양시킨 후, 원심분리하여 상등액을 얻어 cholesterol oxidase 활성도를 조사하였다. 이들 중 cholesterol oxidase의 활성도가 높은 6개의 우수한 균주를 얻었으며 이들 균주의 효소활성도는 Table 3과 같다. 이 등(13)은 YD-84-5라는 방선균을 30°C 에서 3~4일 배양하여 평균 1.0~1.5 U/ml의 활성을 얻었고, 이들을 최적 배지

Table 3. Comparison of cholesterol oxidase productivity among the selected microorganisms

Microorganisms	Enzyme activity (units/ml broth)
SL 351	5.17
HSL 599	7.54
HSL 605	8.28
HSL 608	8.36
HSL 613	8.69
HSL 617	5.49

조건과 fermentor에서 통기배양한 결과 2.0~2.5 U/ml을 얻었다고 보고하였다. 이와 비교하여 저자들이 새로 분리한 균에서는 약 5~10배 더 높은 효소를 생산하였다(10.3 U/ml) 효소활성이 가장 높은 토양 미생물 선정하여 HSL 613이라 명명하고, 효소생산 조건을 최적화하기 위한 실험을 수행하였다. 이 균주를 동정하기 위한 연구는 현재 수행하고 있다.

배양온도에 따른 효소생산

배양온도에 따른 균체량 및 효소생산의 변화를 보기 위하여 30, 37°C 에서 각각 배양하여 비교해 본 결과는 Fig. 1과 같다. 균체의 생산은 37°C 에서 4일간 배양했을 때 최고값을 나타냈으나 30°C 에서 배양했을 때는 배양 5일 후에 최고값에 도달하였다. 효소활성은 37°C 에서 배양했을 때 균체 생산이 가장 많은 때인 배양 4일 후에 가장 높았으나 30°C 에서 배양했을 때는 6일 동안 배양한 후 가장 높은 값을 보였다. 배양온도가 30°C 와 37°C 일 경우 가장 높은 cholesterol oxidase의 활성은 각각 9.02 U/ml와 7.13 U/ml이며 30°C 에서 배양했을 때가 27% 더 높은 효소활성도를 나타냈다.

배양시간에 따른 효소생산 및 pH의 변화

HSL613을 30°C 에서 170 rpm으로 8일간 배양하면서 배양시간에 따른 균체량 및 효소생산과 pH의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. 균체의 생산량은

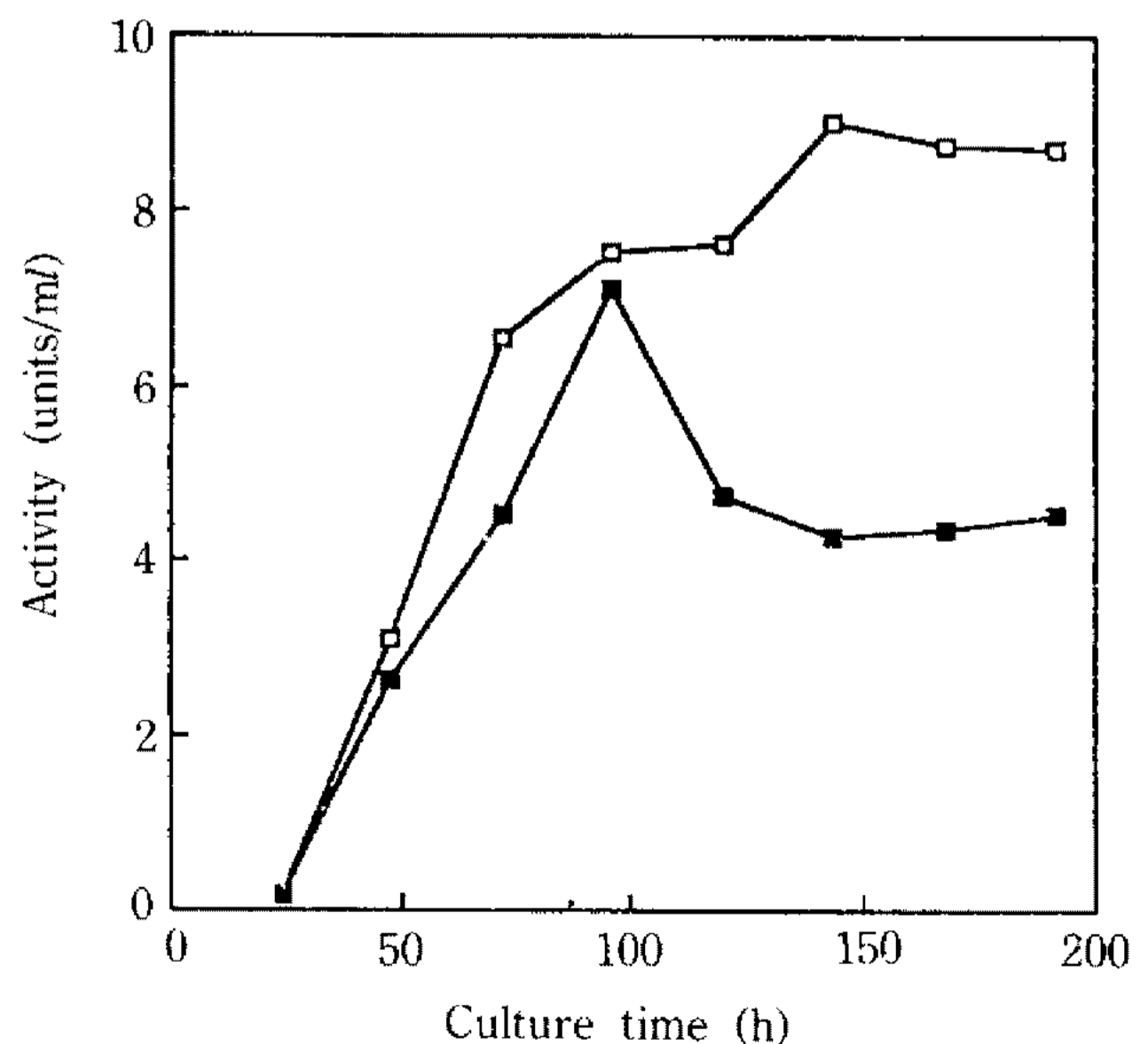


Fig. 1. Effect of temperature on the production of cholesterol oxidase.
 —□— 30°C, —■— 37°C

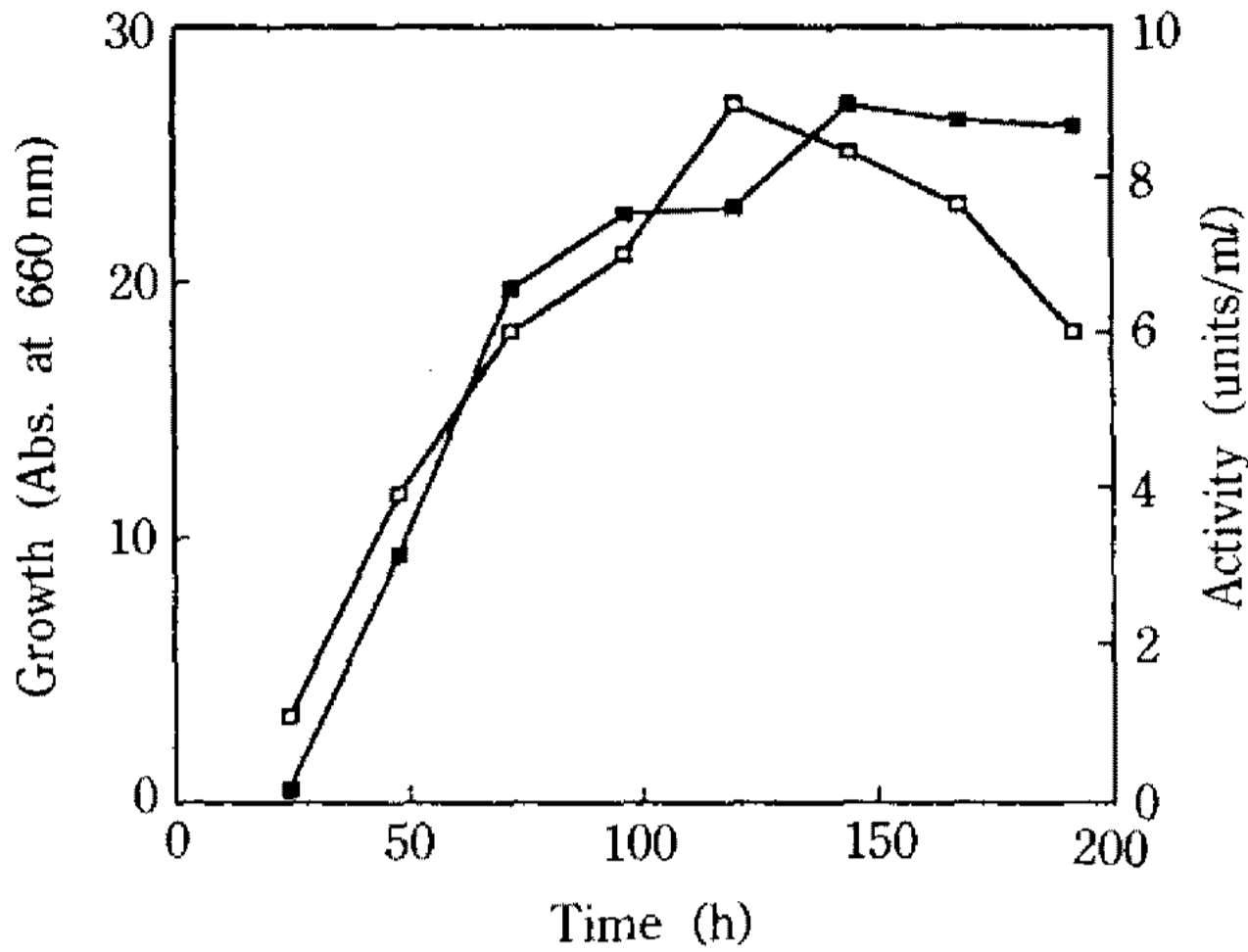


Fig. 2. Time course of cholesterol oxidase production. -□- growth, -■- activity

5일간 배양하였을 때 최고값을 나타내었고, 효소활성은 6일 배양 후 가장 높게 나타났으며(9.02 U/ml), pH는 8.5로 변화하였다.

종균 접종량에 따른 효소생산

종균량에 따른 균체량 및 효소생산의 변화를 살펴 보기 위해 종균량을 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0%로 각각 달리하여 배양하면서 그 변화를 측정된 결과는 Table 7과 같다.

종균량에 따른 균체 생산량에는 거의 차이가 없었으며 120~144시간 배양하였을 때 가장 균체량이 많았고 효소생산량은 종균량을 1.0%로 하여 144시간 배양하였을 때 가장 높은 효소생산량을 보였다(1 ml/당 8.88 units).

효소의 생산조건

Cholesterol oxidase의 생산에 미치는 영양소들의 영향을 알아보기 위하여 Table 2에 제시된 배지조성 중에서 탄소원, 질소원, 무기성분의 종류와 함량을 각각 바꾸어 실험한 후 가장 좋은 배지 조성을 찾았다.

탄소원의 영향: 효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 먼저 glucose의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 하여 실험해 본 결과 2.0%일 때 가장 높은 효소의 활성을 보였다. 따라서 각 탄소원의 농도를 2.0%로 하여 기본배지에 탄소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30°C 에서 8일간 진탕배양하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다. Galactose 첨가구에서 cholesterol oxidase가 제일 많이 생산되었으며, 그 다음이 glucose, xylose,

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

Carbon source	Relative activity (%)
Glucose	100
Galactose	107
Mannose	42
Fructose	40
Xylose	98
Mannitol	37
Glycerol	86
Sucrose	27
Lactose	25
Maltose	26
Raffinose	22
Dextrin	34
Soluble starch	26
Arabinose	24
Dulcitol	20
Rhamnose	20
Inositol	22
None	20

Table 5. Effect of nitrogen sources on the production of cholesterol oxidase

Nitrogen source	Relative activity (%)
None	3
Yeast extract	100
Bacto-peptone	68
Beef extract	85
Soytone	88
Casamino acid	15
Tryptone	60
Control*	81

*See Table 2.

glycerol 순으로 생산되었다. Mannose와 fructose 및 mannitol 등이 첨가된 배양액은 galactose나 glucose 첨가구에 비해 절반 정도 밖에 생산하지 못하였고 그 외의 탄소원이 첨가된 배지에서는 효소생성이 거의 이루어지지 않았다. 이와 같은 결과로 볼 때 탄소원으로는 galactose나 glucose가 가장 효과적이라고 판단되며, 본 실험에서 이용율이 가장 높은 탄소원으로 밝혀진 galactose를 농도별(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0% (w/v)로 각각 첨가한 배양액에서 배양하였을 때는 2.0%에서 가장 높은 효소활성을 보여주었다(배양액

Table 6. Effect of inorganic compound on the production of cholesterol oxidase

Inorganic compound	Concentration (%, w/v)	Relative activity (%)
None	—	100
Ammonium sulfate	0.1	116
	0.2	97
	0.5	121
Sodium nitrate	0.1	110
	0.2	120
	0.5	94
Dipotassium hydrogen phosphate	0.1	100
	0.2	131
	0.5	145
	0.7	133
	1.0	127
Sodium chloride	0.1	118
	0.2	100
	0.5	93
Magnesium sulfate	0.01	87
	0.02	106
	0.05	94
Ferrous sulfate	0.001	121
	0.002	123
	0.005	73
Calcium chloride	0.001	101
	0.002	100
	0.005	128
	0.01	146
	0.02	93.7

1 ml/당 9.1 units).

질소원의 영향: 효소생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 먼저 yeast extract의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 하여 실험해 본 결과 2.0%일 때 가장 높은 효소활성을 보였다. 기본배지에 각종 유기질소원의 농도를 2%가 되도록 첨가하여 30°C에서 8일간 진탕배양한 후 효소생산에 미치는 유기질소원의 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 유기질소원 중에서 yeast extract 첨가구가 효소생성능이 가장 우수하였으며 soytone>beef extract>bacto peptone의 순서로 좋게 나타났다.

무기성분의 영향: 본 효소생산을 촉진할 수 있는 특수 무기성분은 아직 알려져 있지 않고, 보통 사용되고 있는 무기성분만 알려져 있기 때문에 기본 배양배지의 조성에다 통상의 무기성분의 농도를 달리하여 효소활성의 영향을 검토하여 Table 6과 같은 결과를 얻었다. Table 6에서와 같이 무기질소원 중에서 K_2HPO_4 를 사용한 실험구가 효소활성이 가장 높았고 농도는 0.5%일 때 효소활성이 가장 좋게 나타났다. 그 다음으로는 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 와 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용한 실험구에서 각각의 농도가 0.005~0.01%와 0.001~0.002%일 때 효소활성이 높았다. 또한 0.1%의 NaCl을 사용할 때와 0.2% $NaNO_3$, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 각각 사용했을 때 높은 효소활성을 나타내었다.

따라서, 탄소원으로는 glucose를, 유기질소원으로 yeast extract를 각각 2.0%로 고정된 후 무기성분의

Table 7. Effect of seed concentration on the production of cholesterol oxidase

Seed conc. (%)	Culture time (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
0.1	(3.2) ^a	(18.4)	(23.8)	(24.3)	(26.2)	(28.7)	(24.7)
	0.98 ^b	3.36	5.41	5.58	5.90	7.79	7.95
0.5	(3.3)	(17.6)	(20.0)	(23.4)	(26.5)	(28.1)	(23.5)
	0.98	2.87	5.00	5.74	5.99	8.20	8.77
1.0	(3.8)	(16.3)	(18.6)	(25.5)	(28.3)	(23.5)	(22.9)
	1.64	2.54	4.02	5.25	8.61	8.88	8.20
5.0	(3.2)	(18.6)	(20.6)	(26.2)	(28.5)	(24.5)	(23.5)
	2.13	4.26	4.92	6.72	7.87	8.51	7.54
10.0	(3.1)	(20.7)	(21.4)	(28.6)	(28.1)	(23.6)	(23.4)
	1.89	3.77	5.41	5.74	7.13	8.77	8.53

^a Absorbance at 660 nm

^b Cholesterol oxidase activity: units/ml broth

농도를 여러가지로 달리하여 배양하였다. 단독으로 사용하였을 경우에는 무기성분 중에서는 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용한 실험구가 가장 높은 효소활성을 보였으며, 그 다음으로는 0.2% NaNO_3 와 0.5% K_2HPO_4 를 사용한 실험구가 각각 높은 효소활성을 보였다. 그 뒤로 0.001~0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 0.005~0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 순서로 높은 효소활성을 보였다. 이들의 무기성분을 배합하여 넣어 준 결과로는 0.1% NaCl , 0.2% K_2HPO_4 , 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 넣었을 때가 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% NaNO_3 , 0.1% NaCl , 0.5% K_2HPO_4 , 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 모두 넣었을 때나 이들의 일부를 섞은 0.5% K_2HPO_4 , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때와 0.2% K_2HPO_4 , 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 넣었을 때, 0.2% K_2HPO_4 , 0.001% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 넣었을 때, 0.2% K_2HPO_4 , 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 넣었을 때보다 가장 높은 효소활성을 보여주었다(1 ml당 10.3 units).

요 약

토양으로부터 cholesterol oxidase 생산성이 있는 균주를 분리하고, 이들 분리된 균주들로부터 여러 단계의 균주 선별 실험을 통하여 cholesterol oxidase 생산성이 가장 우수한 미생물을 선별하여 HSL613이라고 명명하였다. 이 HSL613은 37°C 에서 보다 30°C 에서 배양하였을 때 더 높은 효소생산성을 나타내었고 배양시간이 경과함에 따라 pH가 높아지면서 효소생성이 증가하여, 144시간 배양하였을 때 pH는 8.5로 높아졌고 효소생산량도 가장 높았다. 균체량은 120시간 배양하였을 때 가장 많았다.

본 실험에서 HSL613의 효소생산조건을 검토한 결과 최적 배지조성은 2.0% glucose, 2.0% yeast extract, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl , 0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 로 판명되었으며, 30°C 에서 144시간(6일) 배양하였을 때 효소생성이 가장 많았고(10.3 U/ml), 종균의 접종량은 1.0%(v/v)일 때가 가장 효소생성이 잘 되었다.

참고문헌

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. Flegg, H.M. 1973. An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* **10**: 79-84.
3. Allain, C.C., L.S. Poon, C.S.G., W. Richmand, and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475.
4. Weyman, A.E. 1974. Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.* **56**: 13-21.
5. Turfitt, G.E. 1944. The microbiological degradation of steroids. 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**: 49-62.
6. Turfitt, G.E. 1947. Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.* **54**: 557-562.
7. 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 viascens*. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 2057-2060.
8. Schatz, A., K. Savard, and I.J. Pinter. 1949. The ability of soil microorganisms to decompose steroids. **58**: 117-120.
9. Uwajima, T., H. Yagi, S. Nagamura, and O. Terada. 1973. Isolation and crystallization of extracellular β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2345-2350.
10. Tolalay, P. and M.M. Dobson. 1953. Purification and properties of a β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **205**: 823-837.
11. Waksman, S.A. 1961. *The Actinomycetes*, the Williams and Willkins Co., Baltimore, Vol. 2, p. 328.
12. Difco Laboratory. 1984. *Difco Manual, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology* (10th ed.), Detroit.
13. 이덕남. 1985. *Streptomyces* sp. YD-84-5에 의한 Cholesterol Oxidase의 생산 및 효소학적 특성. 건국대학교 산업대학원 미생물공학과 석사학위논문.

(Received June 3, 1992)