

## *Bacillus sphaericus*로부터 Cholesterol Oxidase의 정제 및 특성

서형주<sup>1</sup> · 김태웅<sup>2</sup> · 손홍수\*

한림대학교 한국영양연구소, <sup>1</sup>고려대학교 병설 보건전문대학 식품영양과  
<sup>2</sup>강원대학교 생화학과

### Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase from *Bacillus sphaericus*

Suh, Hyung-Joo<sup>1</sup>, Tae-Woong Kim<sup>2</sup> and Hung-Soo Son\*

Korea Nutrition Institute, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Food Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences,  
Korea University, Seoul 136-703, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Biochemistry, Kangweon University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract** — The cholesterol oxidase produced from *Bacillus sphaericus* was purified and characterized. Through a series of purification procedures including DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex G-200 and DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, the purified enzyme was shown to have a specific activity of 0.179 units/mg protein having 31.8 fold purification and final yield of 12%. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 47 KDa and 47.5 KDa by Sephadex G-200 chromatography and SDS-PAGE. The optimum temperature and pH for the enzyme were 30°C and 6.0, respectively. The activity of the purified cholesterol oxidase was inhibited by Fe<sup>2+</sup> and Hg<sup>+</sup>.

Cholesterol oxidase(cholesterol oxygen oxidoreductase, EC. 1.1.3.6)는 분자상의 산소를 이용하여 cholesterol(5-cholesten-3-β-ol)을 4-cholesten-3-on으로 산화시키고 이때 동량의 과산화수소를 생성시키는 반응을 촉매하는 효소(1)이다. 본 효소는 cholesterol esterase, peroxidase와 함께 혈청중의 cholesterol 함량을 측정하는 진단용시약으로 널리 쓰이고 있으며 (1, 2), 또한 식품산업에도 응용할 수 있는 여러 미생물들(5-10)이 보고되었으며 일부의 효소는 정제가 되어 그 효소학적 성질이 부분적으로 밝혀져 있다.

이와같이 여러 미생물로부터 효소생산이 알려져 cholesterol oxidase의 산업적 생산이 이루어졌으나 극히 고가로 판매되고 있다. 일본에서는 *Streptomyces*속의 균주를 분리하여 cholesterol oxidase를 생산하는데 사용하고 있다(9).

한편 저자 등은 cholesterol oxidase를 생산하는

균주를 토양시료로부터 분리, 동정하고 효소생산조건을 보고하였으며(11), 이에 따라 본 연구소에는 토양으로부터 분리한 *Bacillus sphaericus*에 의한 cholesterol oxidase의 산업적 생산에 앞서 본 균주가 생산하는 cholesterol oxidase를 분리, 정제하여 그 효소특성을 조사하여 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 효소의 생산

토양에서 분리, 동정한 *Bacillus sphaericus*를 cholesterol 액체배지(11)를 사용, 5l 발효조에서 30°C, 300 rpm으로 교반하면서 36시간 배양하였다. 이때 통기 조건은 1.0 vvm 이었고 0.01% PL 60을 소포제로 사용하였다. 조효소는 5,000 rpm에서 20분 원심분리하여 얻은 균체를 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척후 동 완충용액에 현탁시켜 sonicator(Karl Kolb 200-w)를 이용, 균체를 파쇄한 다음 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로

**Key words:** Cholesterol oxidase, *Bacillus sphaericus*, Purification, Characterization

\*Corresponding author

사용하였다.

### 효소의 정제

**DEAE-Toyopearl 650C chromatography :** 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 평형시킨 DEAE-Toyopearl 650C column(4.3×15 cm)에 조효소액을 주입, 700ml의 동일 완충액으로 세척 후 다시 0~800 mM의 NaCl 직선농도차를 이용하여 54 ml/hr의 속도로 용출시켜 4.5 ml/씩 분획을 모았다.

**Sephadex G-200 chromatography :** DEAE-Toyopearl 650C chromatography에 의해 얻은 활성분획을 PL-10 한외여과막을 이용하여 농축 후 20 mM 인산완충용액에 평형시킨 Sephadex G-200 column (2.5×55 cm)에 효소액을 주입, 동일 완충용액으로 7.5 ml/hr의 속도로 용출하여 2.5 ml/씩 분획을 모았다.

**DEAE-Sephadex A-50 :** 인산완충용액으로 평형화된 DEAE-Sephadex A-50 column(1.8×20 cm)에 농축한 활성분획을 주입하고 동일 완충용액으로 세척 후 0~500 mM NaCl 직선 농도차를 이용하여 15 ml/hr 용출속도로 2.0 ml/씩 분획을 모았다.

### 효소의 활성 측정 및 단백질 측정

Cholesterol oxidase의 활성은 Lartillot 등(10) 방법에 따라 500 nm에서 흡광도를 측정 후 흡광계수 ( $12.1 \mu\text{mole}^{-1} \cdot \text{m} \cdot \text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 생성된 4-cholesteron-3-one양을 측정하였다. 단백질의 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광계수( $0.6604 \text{mg}^{-1} \cdot \text{m} \cdot \text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 계산하거나 Bradford 방법(12)으로 측정하였다.

효소활성은 산화된 4-cholesteron-3-one 1  $\mu\text{mole}$ 을 1분당 생성하는 효소의 활성을 1 unit라 정의하였으며 비효소활성은 효소단백 mg당 unit로 정의하였다.

### 분자량 측정

정제된 효소의 분자량은 Andrews 방법(13)에 의해 Sephadex G-200 chromatography를 사용하여 표준 단백질 BSA(67 KDa), ovalbumin(43 KDa), chymotrypsinogen(25 KDa)과 비교하여 분자량을 측정하였으며, 효소의 subunit는 Laemmli 방법(14)에 따라 albumin(68 KDa), egg albumin(42 KDa), pepsin(35 KDa), trypsinogen(24 KDa),  $\beta$ -lactoglobulin(18.5 KDa)과 lysozyme(14.5 KDa)을 표준 단백질로 사용 측정하였다.

### 전기영동

Ames 등(15)의 방법에 따라 7.5% polyacrylamide gel 농도에서 Tris-glycine 완충용액(pH 8.6)을 사용하여 전기영동 후 coomassie brilliant blue R-250에 의해 염색하였고, ethanol-acetic acid-water(3 : 1 : 6) 용액을 사용하여 탈색하였다.

## 결과 및 고찰

### Cholesterol oxidase의 정제

**DEAE-Toyopearl 650C column chromatography :** *Bacillus sphaericus*를 cholesterol 액체배지를 사용, 5 l 발효조에서 30°C, 3,000 rpm으로 교반하면서 36시간 배양하여 얻은 균체를 5,000 rpm에서 20분 원심분리하여 회수하였다. 회수한 균체를 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척후 동 완충용액에 현탁시켜 sonicator(Karl Kolb 200-W)를 이용, 균체를 파쇄한 다음 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 이때 조효소액의 비활성은 측정된 결과 0.0057 units/mg으로 나타났으며, cholesterol oxidase의 정제를 위해 조효소액을 DEAE-Toyopearl 650C column을 사용하여 정제한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 세척단계에서 효소의 활성이 없는 비흡착 단백질이 용출되었고, 0~800 mM NaCl 직선적 농도차를 이용하여 용출한 결과 약 300 mM NaCl 농도에서 효소의 활성을 가진 단백질이 용출되었다. 이때 활성분획의 비활성은 0.1030 units/mg이었다(Table 1).

**Sephadex G-200 column chromatography :** DEAE-Toyopearl 650C chromatography에 의해 얻은 조효소액을 Amicon PL-10 한외여과막을 이용하여 농축 후 Sephadex G-200 column을 사용하여 cholesterol oxidase를 정제한 결과, 두개의 단백질이 나타났다(Fig. 2). Cholesterol oxidase의 활성을 측정된 결과 앞쪽 분획에서 효소의 활성이 나타났다. 이때 활성분획의 비활성은 0.157 units/mg이었다(Table 1).

**DEAE-Sephadex A-50 column chromatography :** Sephadex G-200 chromatography에 의해 얻은 효소를 농축하여 DEAE-Sephadex A-50 column을 사용하여 cholesterol oxidase를 정제한 결과(Fig. 3), 한개의 대칭적인 피크를 얻었으며 이 피크가 효소의 활성분획임을 확인하였다. 이때 활성분획의 비활성은 0.179 units/mg이었다.

이와같은 연속적 column chromatography에 의해

정제한 cholesterol oxidase의 정제 여부를 확인하기 위해 7.5% polyacrylamide disc gel electrophoresis를 행한 결과(Fig. 4), 전기영동적으로 단일 밴드를 얻음으로 순수 분리, 정제되었음을 확인하였다.

이상의 정제과정에 의하면 cholesterol oxidase는 연속적인 DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex G-200과 DEAE-Sephadex A-50 chromatography에 의해 약 31 배 정도의 정제도를 보였으며 이때의 회수율은 12%로 이 등(16) 보고와 동일한 수준의 정제도를 보였으나 다소 낮은 회수율을 보인 반면 *Streptomyces*속(10)으로부터 분리한 cholesterol oxidase 정제시보다 높은 정제도를 보였다.

### 분자량 측정

연속적 chromatography에 의해 정제된 cholesterol oxidase의 분자량을 측정하기 위해 Sephadex G-200 column(1.8×60 cm)을 사용하여 표준단백질과 비교한 결과(Fig. 5A), 47 KDa였으며, subunit의 분자량을 조사하기 위하여 0.1% sodium dodecyl sulfate를 함유한

7.5% polyacrylamide gel electrophoresis한 결과(Fig. 5B), 단일 밴드를 보임으로서 본 효소는 한개의 subunit로 구성되어 있으며 표준단백질과 분자량 비교시 47.5 KDa였다. 이상의 결과는 *Streptomyces*속(17)이 생산하는 cholesterol oxidase 분자량 61 KDa, Shirokane 등(18)은 57 KDa, 이 등(19)과 Watanabe 등(20)의 56 KDa라는 보고와는 다소 차이가 있으나 대부분의 cholesterol oxidase의 분자량이 50~65 KDa라는 결과와는 유사하다. 반면 Uwajima 등(8)의 31 KDa라는 보고보다는 높은 분자량을 가졌다.

### Cholesterol oxidase의 성질

pH : 효소액을 pH 3~11 사이에서 기질과 반응시켜 cholesterol oxidase의 활성을 측정한 결과 효소의 최적반응 pH는 6.0이었다(Fig. 6). 또한 pH 7~8 사이에서도 90% 이상의 높은 활성을 보였으며 산성에 비해 알카리성에서 비교적 효소의 활성이 높았다.

이는 Lartillot 등(10)과 이 등(19)이 최적 반응 pH 7.8이라는 보고와는 다소 차이가 있으나 토양으로부터

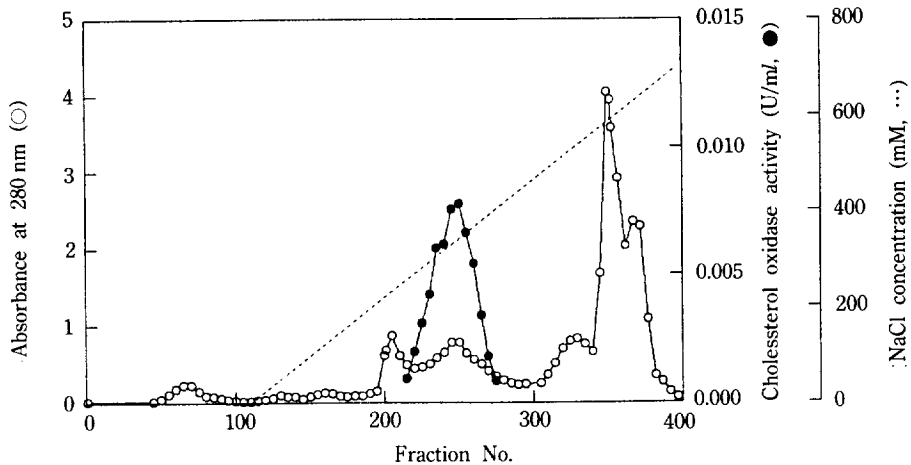
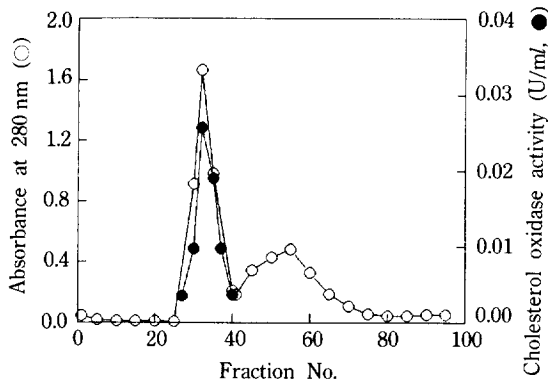


Fig. 1. Chromatography of cholesterol oxidase on DEAE-Toyoperl 650C.

The column (4.3×15 cm) was eluted with a linear gradient from 0 mM to 700 mM NaCl in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 54 ml/hr; 4.5 ml fractions were collected.

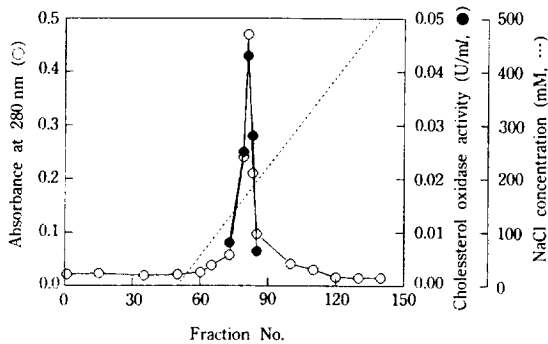
Table 1. Summary of purification steps on cholesterol oxidase

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification -fold
Crude enzyme	307.7	1.76	0.0057	100	1.0
DEAE-Toyopearl 650C	8.2	0.84	0.1030	48	18.0
Sephadex G-200	1.8	0.28	0.1570	16	27.4
DEAE-Sephadex A-50	1.2	0.21	0.1790	12	31.3



**Fig. 2. Chromatography of cholesterol oxidase on Sephadex G-200.**

The column (2.5×55 cm) was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 7.5 ml/hr; 2.5 ml fractions were collected.



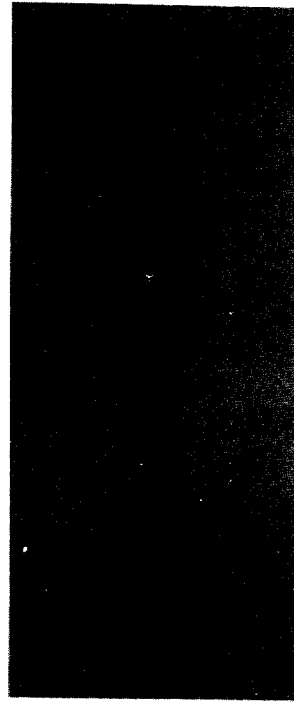
**Fig. 3. Chromatography of cholesterol oxidase on DEAE-Sephadex A-50.**

The column (1.8×20 cm) was eluted with a linear gradient from 0 to 500 mM NaCl in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 15 ml/hr; 2.0 ml fractions were collected.

터 분리한 HSL 613(16)의 효소의 최적 반응 pH가 6.0이라는 보고와는 일치하였다.

한편 pH에 대한 안정성을 검토하기 위해 각각의 완충용액(pH 3~11)에 효소액을 넣어 25°C에서 24시간 동안 방치 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과(Fig. 6), pH 4~9 사이에는 상당히 안정함을 보였다. 특히 알칼리성 pH에서는 90% 이상의 높은 pH 안정성을 보였다. 이는 *Pseudomonas*속(19)과 토양에서 분리한 HSL 613(16)로부터 분리한 효소가 pH 4~11에서 안정하다는 보고와 매우 유사한 pH 안정성을 보였다.

**온도 :** 20 mM 인산완충액(pH 6.0)에 1.7 mM cholesterol을 기질로 사용하여 20~60°C까지 10°C 간격으로 온도를 변화시키면서 효소의 활성을 측정된 결과



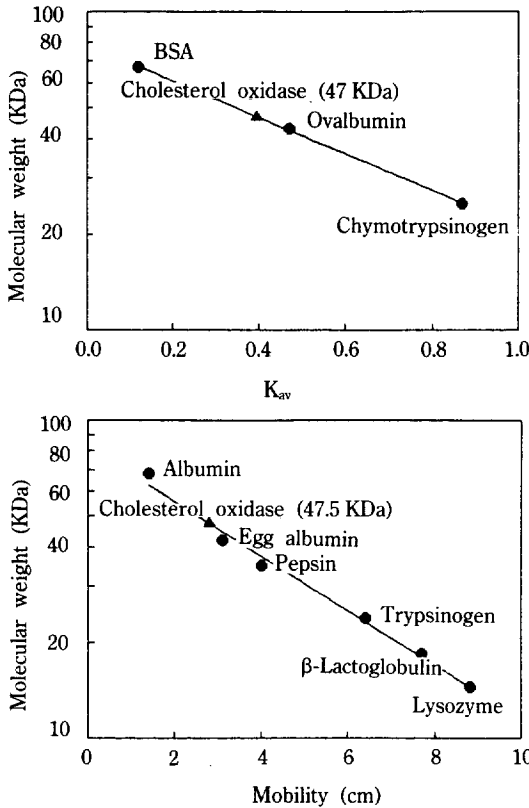
**Fig. 4. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified cholesterol oxidase.**

Purified enzymes (20 µg) were subjected to electrophoresis with 7.5% polyacrylamide gels in Tris-glycine buffer system. After running at current 5 mA, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

(Fig. 7), 30°C에서 효소의 활성이 가장 높았다. 또한 반응온도 37°C와 40°C에서는 90%와 88%의 비교적 높은 효소의 활성을 보였다. 이는 *Rodococcus equi* No 23(20)에서 분리한 효소의 최적 반응온도 47°C, *Arthrobacter simplex*(21)와 *Streptomyces*속(22)에서 분리한 효소의 최적 반응온도가 50°C로 대부분의 cholesterol oxidase의 최적 반응온도가 50°C 부근이나 본 효소는 이와는 달리 30°C에서 최대의 활성을 보이고 있다.

한편 효소의 열안정성을 측정하기 위해 30~70°C에서 각각 15분간 열처리 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과(Fig. 7), 40°C까지는 매우 안정하였으나 40~50°C에서 활성이 다소 떨어지기 시작하여 60°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하는 현상을 보였다. 이는 이 등(16)과 Watanabe 등(20)이 45°C까지 안정성을 보였다는 보고와 일치하고 있다. 일반적으로 cholesterol oxidase는 다른 효소에 비해 비교적 열안정이 낮은 것으로 생각된다.

**금속이온의 영향 :** 효소에 대한 여러가지 금속이온

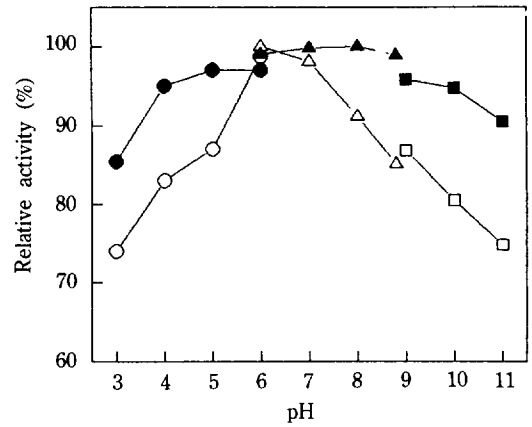


**Fig. 5. Determination of molecular weight of cholesterol oxidase by Sephadex G-200 and SDS-electrophoresis.** (A) The molecular weight of the enzyme was estimated by Sephadex G-200, using a column (1.8×60 cm) with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). The reference proteins are: BSA (67 KDa), ovalbumin (43 KDa), chymotrypsinogen (25 KDa). (B) The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-electrophoresis according to the method of Laemmli. The reference proteins are: albumin (68 KDa), egg albumin (42 KDa), pepsin (35 KDa), trypsinogen (24 KDa),  $\beta$ -lactoglobulin (18.5 KDa), lysozyme (14.5 KDa).

의 영향을 살펴 본 결과(Table 2), 금속이온중  $Fe^{2+}$ 와  $Hg^{+}$ 이온에 의해 효소의 활성 저해가 높았으며, 그 외의 금속이온에 대해 60~80% 정도의 잔존활성을 보였다. 이 등(16) 역시 대부분의 금속이온에서 저해 효과를 보였으며 특히 2 mM  $HgCl_2$  첨가시 효소의 활성이 전혀 검출되지 않았다고 보고하였으나 본 연구에서는 5 mM 첨가시 51%의 잔존활성을 보였다.

**기질 특이성**

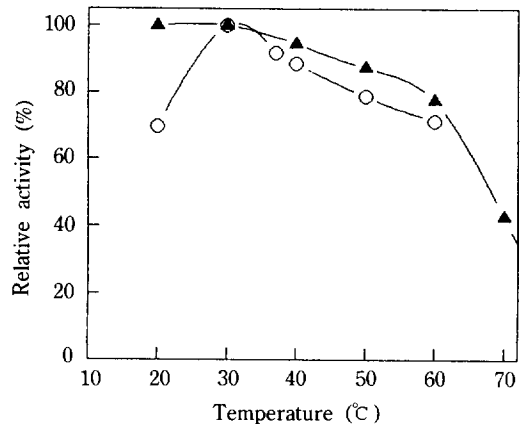
Cholesterol를 비롯한 cholesterol palmitate, 5 $\beta$ -



**Fig. 6. Effect of pH on the activity of cholesterol oxidase.**

For pH stability, the enzyme solution was incubated at various pH for 24 hr at 25°C. The remaining activity was measured under the standard condition. Buffers used were citrate-phosphate (○ or ●, pH 3.0~6.0), phosphate (△ or ◯, pH 6.0~8.8) and carbonate-bicarbonate (□ or ■, pH 7.0~11.0).

○, △, □: Opt. pH, ●, ▲, ■: pH stability



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

For thermal stability, the enzyme solutions were treated at various temperature for 15 min. After heat treatment, the enzyme solutions were immediately cooled in ice-water. The remaining activity was measured under the standard condition.

○: Opt. temperature, ▲: Thermal stability

cholesterol, diosgenin 등 각종 steroid에 대한 기질 특이성을 조사한 결과(Table 3), stigmasterol, dihydrocholesterol과 pregnenolone에는 84.8%, 78.3%와 70.6%의 비교적 높은 기질 특이성을 보였으나 나머지

기질에 대해서는 기질 특이성을 보이지 못했다. Lee 등(19) 역시 stigmasteol에서 높은 기질 특이성을 보고하였으며, *Schizophyllum commune*(23)에서 분리한 cholesterol oxidase 역시 cholesterol을 제외한 대부분의 steroid에서 낮은 기질 특이성을 보이고 있다.

한편 cholesterol 농도에 의한 효소의 반응속도를 측정하여  $K_m$ 값을 구한 결과 0.011 mM이었다(Fig. 8). 이는 이 등(16)이 cholesterol에 대한  $K_m$ 값을  $3.65 \times 10^{-3}$  M이라는 보고보다 높은 cholesterol 친화력을 보였다. 본 효소는 cholesterol에 특이적으로 작용하는 효소이며 다른 균주로부터 분리한 cholesterol oxidase에 비해 cholesterol에 대한 친화력이 상당히 높은 특징을 가지고 있다.

**Table 2. Effect of various metal ions on the activity of cholesterol oxidase activity**

Metal ion Compound	Remaining activity(%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
Cu <sup>2+</sup> CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	82.1	125.0
Co <sup>2+</sup> CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	83.0	81.0
Fe <sup>2+</sup> FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	62.5	18.5
Fe <sup>3+</sup> FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	90.2	82.1
Mg <sup>2+</sup> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	79.5	74.1
Na <sup>+</sup> NaCl	75.8	69.6
Ca <sup>2+</sup> CaCl <sub>2</sub>	75.0	78.6
K <sup>+</sup> KCl	73.2	72.3
Hg <sup>+</sup> HgCl	75.8	50.8

10  $\mu$ l of enzyme solution containing 1.5 mg/ml of cholesterol oxidase was incubated with various metal solution at 30°C for 10 min, the remaining activity was measured under the standard condition.

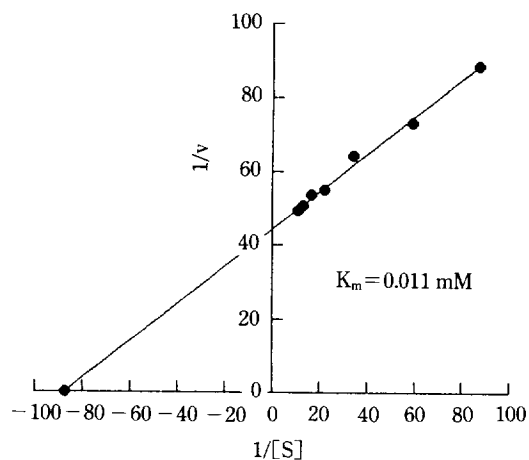
**Table 3. Effect of cholesterol derivatives on the activity of cholesterol oxidase**

Derivative	Relative activity(%)	Derivative	Relative activity(%)
Cholesterol	100.0	5 $\beta$ -Cholestane	23.9
Cholesterol 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxide	40.2	Cholestan-3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -triol	7.6
19-Hydroxycholesterol	26.1	25-Hydroxycholesterol	48.9
7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	32.4	5 $\alpha$ -Cholestane	5.4
5-Cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one	28.3	Dihydrocholesterol	78.3
Stigmasterol	84.8	Cholesterol palmitate	37.9
Diosgenin	28.3	Pregnenolone	70.6
Androsterone	6.5	Progesterone	6.5
Dehydroisoandrosterone	10.8		

## 요 약

*Bacillus sphaericus*가 생산하는 cholesterol oxidase를 정제하여 그 특성을 조사하였다. 본 효소는 DEAE-Toyopearl 650C chromatography, Sephadex G-200 chromatography와 DEAE-Sephadex A-50 chromatography에 의해 정제하였고, 비활성은 약 31배 증가하였다. 이 효소는 30°C, pH 6.0에서 최대활성을 나타냈고 30~40°C 범위에서는 안정하였다.

pH에 대한 안정성은 pH 4~11까지 광범위한 안정성을 보였으며,  $K_m$ 값은 cholesterol에 대해서 0.011 mM이며 효소는 단일 subunit로 구성되어 있으며 분자량은 47.5 KDa로 추정된다. 또한 Hg<sup>+</sup>와 Fe<sup>2+</sup>에



**Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of cholesterol oxidase on cholesterol.**

The reaction was carried out under the standard condition with various cholesterol concentration. Velocity ( $1/v$ ) was expressed as  $\mu$ mol of products per min.

의해 효소의 활성이 저해되는 것으로 나타났다.

### 감사의 글

본 연구는 1992년도 한림대학교 교비 연구비 지원 사업으로 수행된 결과의 일부로서 이에 심심한 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Allian, C.C., L.S. Poon, W. Richmond and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475.
- Cho, B.H.S. 1983. Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues. *Clin. Chem.* **29**: 166-168.
- Smite, M., C. Sullivan and N. Goodmen. 1891. Reactivity of milk cholesterol with bacterial cholesterol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 2158-2162.
- Turfitt, G.E. 1944. The microbiological degradation of steroids. 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**: 49-62.
- 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.
- Tomioka, H., M. Kagawa and S. Nagamura. 1976. Some enzymatic properties of 3 $\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptomyces vilascens*. *J. Biochem.* **79**: 903-915.
- 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.
- Uwajima, T., H. Yagi, S. Nagamura and O. Terada. 1973. Isolation and crystallization of extracellular 3 $\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2345-2350.
- 松井條, 中島和藍, 谷口勉, 大林見, 田邊條, 山田秀明. 1979. Cholesterol 酸化酵素製造法, 特開昭 54-1052 91.
- Lartillot, S. and P. Kedziora. 1990. Production, purification and some properties of cholesterol oxidase from a *Streptomyces* sp.. *Preparative Biochem.* **20**: 51-62.
- Son, H.S. 1992. Production of cholesterol oxidase by *Bacillus sphaericus*. *J. Inst. Biotechnol. Korea Univ.* **4**: 25-30.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of  $\mu$ g proteins. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
- Andrews, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-562.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Ames, G.F.L. 1974. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J. Bio. Chem.* **249**: 634-639.
- 이홍수, 이승철, 권태종, 정태화. 1992. 토양 미생물 HSL 613 이 생산하는 cholesterol oxidase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지.* **20**: 401-408.
- Kamei, T., Y. Takiguchi, H. Suxuki and S. Nakamura. 1978. Purification of 3 $\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol. *Chem. Pharm. Bull.* **26**: 2799-2804.
- Shirokane, Y., K. Nakamura and K. Mizusawa. 1977. Purification and some properties of an extracellular 3 $\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*. *J. Ferment. Technol.* **55**: 337-342.
- 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**: 542-456.
- 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.
- 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.
- Toyobo Enzyme, Japan, Toyobo Co. Ltd. 1985.
- 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.

(Received July 28, 1993)