

## 창난젓에서 분리한 *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj가 생산하는 Cholesterol Oxidase의 정제 및 특성

†박 상 현 · <sup>1</sup>김 한 수 · <sup>1</sup>이 윤 수 · <sup>1</sup>권 익 부 · 전 억 한  
경희대학교 식품가공학과, <sup>1</sup>롯데그룹 중앙연구소  
(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 3. 5.)

### Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase Produced by *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj Isolated from Changran-jeot

Sang Hyun Park†, Han Soo Kim<sup>1</sup>, Yoon Soo Lee<sup>1</sup>, Ik Boo Kwon<sup>1</sup>, and Uck Han Chun  
Department of Food Technology College of Industry, Kyung Hee University, Kyonggi 449-701, Korea  
<sup>1</sup>Lotte Group R & D Center, Seoul 150-104, Korea  
(Received : 1997. 12. 12., Accepted : 1998. 3. 5.)

The cholesterol oxidase was purified from the culture broth of *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj strain by procedures involving filtration, acetone precipitation, DEAE-Sephadex A-50, and cholesterol affinity column chromatography with a recovery of 15% to specific activity of 25.6 units/mg. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 52,000 daltons by SDS-PAGE. Optimum pH and temperature for the enzyme activity were approximately pH 7.0 and 50°C, respectively. The Michaelis constant (Km) for cholesterol was found to be  $3.2 \times 10^{-4}$  M. The enzyme showed a high substrate specificity for 3 $\beta$ -hydroxysterols and the relative oxidation rates were 100% for cholesterol, 89% for campesterol, 55% for stigmaterol, etc. Amino acid analysis showed that the enzyme protein was composed of 440 amino acid residues without cystein and tryptophan.

Key Words : cholesterol oxidase, purification, characterization

### 서 론

콜레스테롤 산화효소에 관한 연구는 현재 세계 각국에서 많이 수행되고 있는 분야 중의 하나이다. 콜레스테롤 산화효소는 Richmond(1)와 Flegg(2)에 의해서 cholesterol oxidase(EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. 콜레스테롤 산화효소를 생산하는 미생물로는 *Pseudomonas*속(3), *Nocardia*속(1,4,5), *Arthrobacter*속(6, 7, 8), *Streptomyces*속(9~16), *Brevibacterium*속(17) 및 *Corynebacterium*속(18) 등이 보고되어 있다. Watanabe 등(16)은 탄소원으로서 콜레스테롤을 이용할 수 있는 16종류의 박테리아 균주를 닭의 지방, 돼지지방, 베이컨, 버터 등의 동물성 식품에서 분리하였다. 이들 중 콜레스테롤의 분해활성이 가장 높은 균주는 *Rhodococcus erythropolis*에 속하는 것으로 밝혀졌고, 이 균주가 생산하는 효소는 intracellular enzyme이라고 보고하였다. Fukuda(19)와 Uwajima 등(17)은 효소생산 및 정제가 용이

하며 생산원가를 절감할 수 있는 방법으로 *Streptomyces violascens*와 *Brevibacterium sterolicum*을 선별하여 콜레스테롤 산화효소를 분리·정제하여 효소의 특성에 대하여 보고하였다. Watanabe 등(15)은 동물성 식품에서 분리해낸 *Rhodococcus*속 균주가 생산한 콜레스테롤 산화효소의 특성에 관하여 조사하였고, 이 효소는 extracellular cholesterol oxidase라고 발표하였다.

그러나 국내 연구로는 최 등(20)의 간헐적으로 첨가된 콜레스테롤로부터 미생물전환에 의한 AD(androsta-4-ene-3,17-dione)의 생산에 대한 발표와 이 등(2)의 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 정제와 특성에 관한 연구발표 그리고, Lee 등(5)의 토양에서 분리한 미생물이 생산하는 콜레스테롤산화효소의 분리·정제 및 특성에 관한 연구 발표에 그치고 있다.

미국, 유럽, 일본 등의 지역에서는 콜레스테롤, 왁스, 스티그마스테롤, 캄페스테롤과 같은 각종 스테롤류로부터 미생물을 이용하여 스테로이드 의약품의 전구물질인 AD 및 ADD(androsta-1,4-diene-3,17-dione)의 생산에 관한 연구는 거의 완벽하게 이루어져 있으며(21,22), 식품 뿐만 아니라 체내의 콜레스테롤을 저하시킬 수 있는 assimilation분야도 상당히 연구가 진척되어져 있는 상태이나(23), 국내에서는 미생물을 이용한

† Corresponding Author : Analysis Section, Lotte R&D Center, #23, 4-Ka Yangpyong-Dong, Youngdeungpo-Ku, Seoul 150-104, Korea  
Tel : 02-670-6522, Fax : 02-634-6184

콜레스테롤에 관한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 특히 식생활의 서구화경향으로, 고콜레스테롤증으로 인한 각종 순환계 질병이 점차 증가하고 있는 상황에서 미생물을 이용한 콜레스테롤의 대사에 관한 연구는 꼭 이루어져야 된다고 생각한다. 이러한 배경 하에서 본 연구에서는 우리나라의 수산발효식품중의 창난것으로부터 분리한 *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj 균주가 생산하는 콜레스테롤산화효소를 정제하여 그 효소의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 시약

본 연구에 사용한 cholesterol oxidase 생산균주는 창난것에서 분리한 *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj이며 균주의 배양배지의 조성은 1.0 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L NaCl, 20 g/L trypton, 1 g/L cholesterol, 5 g/L maltose를 사용하였다. 효소활성 측정용 기질은 cholesterol(Aldrich Chemical Co., USA)를 사용하였다.

### 조효소액의 조제

효소의 생산을 위하여 *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj 균주를 100 mL의 nutrient broth배지에 접종하고 24시간 동안 30°C의 항온 수욕조내에서 흔들려주면서 배양한 후, 콜레스테롤 산화효소 생산배지 2 L에 종배양액을 1%가 되도록 접종하여 30°C에서 pH 7.5로 맞추어 진탕교반하면서 6일간 배양하였다. 배양액은 4°C에서 원심분리(9,500×g, 30 min)하여 균체를 제거하고, 0.2  $\mu\text{m}$ 의 필터를 통과시킨 후 100 mM potassium phosphate buffer를 첨가하여 pH 7.0으로 조정하여 조효소액으로 사용하였다.

### 콜레스테롤 산화효소의 활성측정

Richmond(1)의 방법에 따라 cholesterol이  $\Delta^4$ -cholestenone으로 전환되는 속도를 240 nm에서 직접 흡광도의 증가율을 측정하여 수행하였다.

효소역가 1 unit는 1  $\mu\text{mol}$ 의 cholesterol을 30°C에서 1분 동안에 산화시키는 콜레스테롤 산화효소의 양으로 정한다.

### 효소의 분리 및 정제

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography : Shirokane 등(18)의 방법에 따라 효소를 분리하기 위하여 DEAE-Sephadex A-50(Pharmacia Co., Sweden)을 사용하여 예비실험을 실행하였다. 먼저 6개의 시험관에 각각 1 mL의 DEAE-Sephadex A-50을 넣고, 첫 번째 시험관에 10 mM NaCl이 포함된 10 mL의 0.5 M pH 7.0 potassium phosphate buffer로 10회 세척하여 pH를 7.0으로 조절하였고, 나머지 시험관도 각각 pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5의 buffer로 세척하여 pH를 조절한 후 효소액을 100  $\mu\text{L}$ 씩 부가하여 혼합하고 정치하여 상등액의 효소활성을 측정하여 본 결과 pH 9.0에서 가장 높은 흡수율을 보였다. 생산된 조효소액에 미리 -20°C로 냉각시켜 놓은 1.3배의 아세톤을 가하여 -20°C에서 1시간 정치시킨 후, 원심분리(9,500×g, 30 min)하여 침전물을 수거였다. 이 침전물에 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 다시 용해시켰다. 이 효소액으로부터 효소를 분리하기 위하여 10 mM carbonate buffer (pH 9.0)로 미리 평형화시킨 DEAE-

Sephadex A-50 column(25×30cm)에 loading한 후 같은 완충용액으로 용출액이 280 nm에서 흡광도가 0.05이하가 될 때까지 세척하고 0~80 mM NaCl로 linear gradient를 하여 흡착된 효소를 60 mL/hr의 속도로 용출시켜, 각 분획당 10 mL씩 받았다. 용출된 액은 280 nm에서 흡광도 측정과 효소활성을 측정하였다. 활성을 나타내는 분획을 모아 다시 아세톤으로 침전시킨 후 원심분리(9,500×g, 30 min)하여 potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 용해하였다.

Affinity column chromatography on cholesterol : Kamei(11)의 방법에 따라 콜레스테롤을 증류수에 현탁하여 끓인 후 침전된 콜레스테롤을 분리하여 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시켜서 column(4.0 × 30 cm)에 충전시켰다. DEAE-Sephadex A-50 음이온 교환수지를 통과시킨 효소액을 콜레스테롤이 충전된 column을 통과시키면서 콜레스테롤분해효소를 콜레스테롤에 결합시켰다. 그리고 buffer로 충분히 세척한 후 0.1%의 Triton X-100용액을 60 mL/hr의 속도로 용출시키면서 한 tube당 10 mL씩 받아서 bicinchoninic acid assay kit(Piers Co., USA)를 이용하여 단백질 함량을 측정하였고, 효소활성은 위의 Richmond(1)의 방법에 따라 효소활성을 측정하였다. 활성을 나타내는 분획을 모아 다시 에탄올로 침전시킨 후 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해 후 동결건조 하여 -70°C에 보관하였다.

### 전기영동

효소의 순도확인 및 분자량을 결정하기 위하여 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하였다. stacking gel은 4%를, separation gel은 10~20%, gel thickness는 1 mm의 Precast Gradient Tricine Gel (NOVEX™ Co, U.S.A)를 구입 하여 125 V로 10°C에서 전기영동하였다. 전기영동을 행한 후, 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였고 30% methanol과 10% acetic acid로 탈색하였다. 분자량을 결정하기 위한 전기영동 시에는 15% gel을 사용하였으며, 분자량 표준단백질로는 Mark12 Wide Range Protein Standard(NOVEX™ Co, U.S.A)의 M.W. 200,000 daltons의 myosin(rabbit muscle), M.W. 116,300의  $\beta$ -galactosidase (*E.coli*), M.W. 97,400의 phosphorylase B, M.W. 66,300의 bovine serum albumin, M.W. 55,400의 glutamate dehydrogenase (bovine liver), M.W. 36,500의 lactate dehydrogenase (porcine muscle), M.W. 31,000의 carbonic anhydrase(bovine erythrocyte), M.W. 21,500의 trypsin inhibitor(soybean), M.W. 14,400의 lysozyme(chicken egg white), M.W. 6,000의 aprotinin(bovine lung), M.W. 3,500의 insulin B chain, M.W. 2,500의 insulin A chain을 사용하였다.

### 단백질 정량

효소정제 과정중의 단백질 농도는 bicinchoninic acid assay kit(Piers Co., USA)를 사용하였으며, bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 564 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하여 정량하였다.

### 효소의 물리화학적 성질의 측정

pH의 영향 : 효소반응의 최적pH를 검토하기 위하여 50 mM

citrate buffer(pH 4.0~5.5) 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0~7.5), 50 mM Tris buffer(pH 8.0~9.0)를 사용하여, 0.1 mL 완충용액을 정제효소액 50  $\mu$ L을 혼합한 다음 30°C에서 30분 동안 정치한 뒤 50  $\mu$ L의 6 mM-cholesterol/IPA (isopropyl alcohol) 용액을 부가하고 30°C에서 5분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소의 pH에 대한 안전성을 pH 3.0에서 pH 11.0까지 아래의 완충용액을 사용하여 25°C에서 20시간 처리 후 효소의 잔존여가를 측정하였다. pH 3.0은 50 mM potassium acetate buffer를, pH 4.0~5.5에서는 50 mM citrate buffer를, pH 6.0~7.5에서는 50 mM phosphate buffer를, pH 8.0~9.0에서는 50 mM Tris buffer를, pH 9.5~10.0은 sodium carbonate buffer, pH 11.0은 50 mM CAPS buffer를 각각 사용하였다.

**온도의 영향 :** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해서 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에서 6 mM의 cholesterol/IPA를 기질로 사용하여 20°C 부터 70°C 까지 5°C 간격으로 변화시키면서 각각의 온도에서 효소의 반응을 비교하였다. 온도에 대한 안전성은 효소를 20°C에서 70°C 까지 5°C 간격으로 각각의 온도에서 15분간 처리한 후 효소의 잔존여가를 측정하였다.

**기질의 농도에 따른 반응속도의 변화 :** 기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 콜레스테롤의 농도를 1, 2.5, 5, 6, 7 mM 까지 기질의 농도를 달리 하였을 때 효소활성 변화를 측정 후 Lineweaver-Burk plotting하여 Km값을 구하였다.

**효소의 기질특이성 :** 효소의 각종 기질에 대한 분해정도를 측정하기 위해 cholesterol, stigmasterol, hecogenin, lanosterol, ergosterol, diosgenin 등의 기질을 6 mM로 만들어 isopropyl alcohol에 완전히 녹인 각각의 액 50  $\mu$ L와 0.5% Triton X-100을 함유한 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 mL에 정제된 효소액 10  $\mu$ L씩 가하여 30°C에서 1분간 반응속도를 파장 240 nm에서 측정하였다.

**효소의 아미노산 조성 분석 :** 효소의 아미노산 조성은 OPA-Post Column Derivatization System ( Perkin Elmer, USA)을 이용하여 분석 하였고, 시료의 조제방법은 다음과 같이 실행하였다. 효소(10  $\mu$ g)를 10  $\mu$ L의 증류수에 용해시키고, 아미노산 표준용액 10  $\mu$ L(250 pmol)를 취하여 5 mL sample tube에 넣고 동결건조 하였다. 그 후 sample tube 보다 크고 진공상태를 유지할 수 있는 cap이 부착된 tube에 200  $\mu$ L의 6 N HCl을 넣은 상태에서 5 mL sample tube를 넣어 sample과 6 N HCl이 직접적인 접촉이 없도록 한 후 진공상태로 110°C에서 24시간 산가수분해하여 HPLC에 20  $\mu$ L 주입하였다.

**결과 및 고찰**

**콜레스테롤 산화효소의 분리 및 정제**

**효소의 분리 및 정제 :** *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj의 배양액으로 부터 효소를 분리하기 위하여 DEAE-Sephadex A-50 음이온 교환수지가 충전된 column(2.5×30 cm)에 콜레스테롤 산화효소를 흡착시키고 carbonate buffer로 세척하고, 0~80 mM NaCl 농도 구배를 걸어 각 분획당 10 mL 씩 용출하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 Figure 1과 같은 결과를 얻었다. 용출시킨 3개의 단백질 피크에서 모두 효소여가를 가졌지만 3번째

단백질 피크인 55번째 분획부터 66번째 분획에서 cholesterol oxidase의 활성이 가장 강한 피크로 나타났고, 이때 효소의 비활성은 1.48 units/mg 단백질이었다. DEAE-Sephadex A-50 음이온교환수지를 사용하여 분리된 효소를 더 정제하기 위하여 콜레스테롤에 대해 affinity column chromatography(4×30 cm)를 수행하였다. 각 분획당 10 mL를 용출시킨 결과 단백질 피크가 2개 나타났으며, 콜레스테롤 산화효소의 활성은 2번째

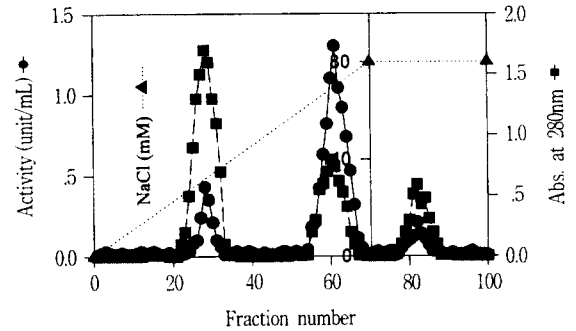


Figure 1. Column chromatography of cholesterol oxidase on DEAE-Sephadex A-50 operated at pH 9.0 with flow rate of 60 mL/hr. Size of column used : 2.5×30cm.

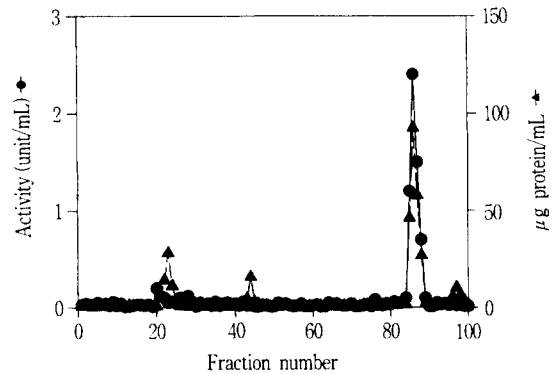


Figure 2. Affinity column chromatography of cholesterol oxidase operated by eluent of 0.1% Triton X-100 with flow rate of 60 mL/hr. Size of column used was 4.0×30cm.

Table 1. Summary of purification of cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj strain.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield(%)	Purification (fold)
Culture filtrate	1100	324.0	0.29	100	1
Acetone ppt.	228	145.2	0.63	44	2.2
DEAE-Sephadex A-50	67.2	99.6	1.48	30	5.1
Cholesterol column	1.92	49.2	25.6	15	88.3

Kinetic parameters of yield and purification were estimated by comparison with culture filtrate.

단백질 피크인 84번째 분획에서 부터 88번째에서 활성을 나타내었다(Figure 2). 이때의 비활성도는 25.6 units/mg 단백질이었다. 균체가 제거된 배양액으로부터 acetone침전에 의한 조효소의 회수율은 44%였으며, 정제율은 2.2배였고, DEAE-Sephadex A-50 음이온교환수지를 이용한 회수율은 30%, 정제율은 5.1배였고, affinity column chromatography를 수행한 결과 회수율은 15%, 정제율은 88배의 효소가 회수되었다(Table 1). 이상의 acetone 침전, DEAE-Sephadex A-50 음이온 교환수지, 및 affinity column chromatography에 의한 정제법으로 효소의 정제가 가능하였다.

**효소단백질의 순도검정**

정제효소의 순도검정을 하기 위하여 각 정제단계별 배양액의 농축액을 표준단백질과 함께 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한 결과 순수 정제된 효소는 단일띠를 나타내었으며(Figure 3) 분자량은 약 52,000 daltons인 것으로 추정되었다(Figure 4). 이 결과는 Kamei 등(11)의 *Streptomyces violascens*가 생산하는 cholesterol oxidase의 분자량이 61,000 daltons이란 보고와 Lee 등(3)의 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 효소분자량이 59,000 daltons이란 보고, 이 등(25)의 *Streptomyces* sp. HSL613이 생산하는 효소의 분자량이 59,500 daltons, Shirokane 등(18)의 *Corynebacterium cholesterolicum*이 생산하는 효소의 분자량이 57,000 daltons 그리고 Liu 등(7)의 *Arthrobacter simplex*가 생산하는

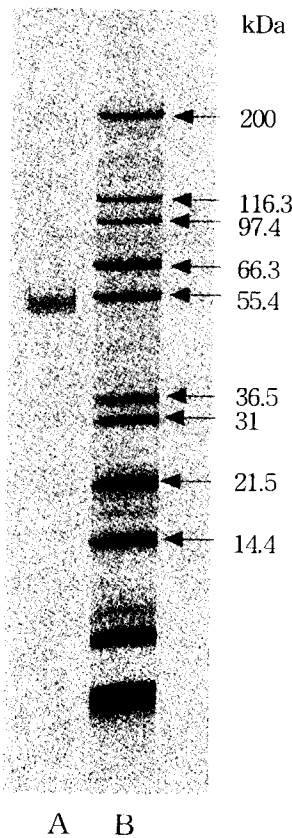


Figure 3. SDS-PAGE of purified cholesterol oxidase  
Lanes : A, cholesterol affinity chromatography  
B, protein molecular weight marker.

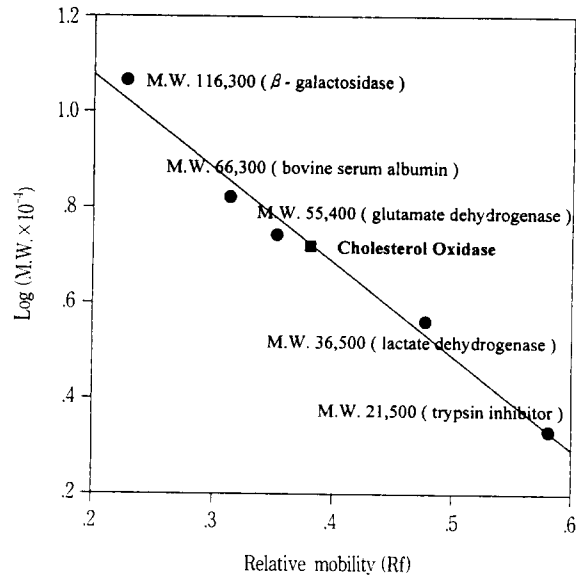


Figure 4. The calibration curve for the determination of molecular weight of cholesterol oxidase by SDS-PAGE.

효소의 분자량이 57,000이라고 보고 와 비교하였을 때 본 균주가 생산한 cholesterol oxidase의 분자량은 약간 작은 것으로 추정되었다. Lartillot 등(12)의 *Streptomyces* sp.가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 분자량이 55,000 daltons, Watanabe 등(15)의 *Rhodococcus equi* NO.23이 생산하는 효소의 분자량이 56,000 daltons인 결과와는 다소 비슷하였다. 이상과 같이 콜레스테롤산화효소의 분자량은 대부분 50,000~61,000 daltons이라고 보고된 바에 의하면 본 균주가 생산하는 효소는 그 중에서 중간정도의 크기인 것으로 생각된다.

**효소의 물리화학적 성질**

**효소활성에 미치는 pH의 영향 :** pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 효소액을 pH 4.0~8.5인 완충용액에서 기질을 반응시켜 콜레스테롤 산화효소의 활성을 조사한 결과 최적 pH는 7.0이었다. pH 6.0이하에서는 효소활성이 급격히 감소하였으나 pH 6.5부터 pH 8.0사이에서는 최대효소활성의 90% 이상을 유지하였다(Figure 5). 콜레스테롤산화효소의 최적 pH에 대해서는 Lee 등(3)과 Lartillot 등(12)이 최적 pH가 7.0이라고 보고하였으며, Shirokane 등(18)은 최적 pH가 7.0~7.5, Tomioka 등(9)과 Liu 등(7)은 최적 pH가 7.5, Watanabe 등(15)은 최적 pH가 7.8, Shirokane 등(18)은 7.0~7.5 그리고 이 등(24)은 최적 pH가 6.0이라고 보고 하였다.

**효소의 pH안정성 :** 본 효소의 pH 안정성을 보기 위하여 pH 별 완충용액(pH 3.0~12.0)에 효소액을 넣어 25°C에서 20시간 처리한 후 효소액의 잔존여가를 측정 한 결과는 pH 6.5에서 pH 11.0까지 안정함을 나타내었다. 그러나 pH 6.0이하에서는 pH가 감소함에 따라서 효소의 잔존활성이 50%이하로 급격히 감소하기 시작하여 pH 3.0에서는 활성을 거의 상실하였다(Figure 6). 이 결과는 Lee 등(3)의 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 pH 안정성이 pH 4.0~11.0이란 결과와 이 등(24)의 *Streptomyces* sp.가 생산하는 효소의 pH 안정성이 6.0~11.0인 결과 처럼 상당히 넓은 범위에서 안정성을 나타내었다. 한편

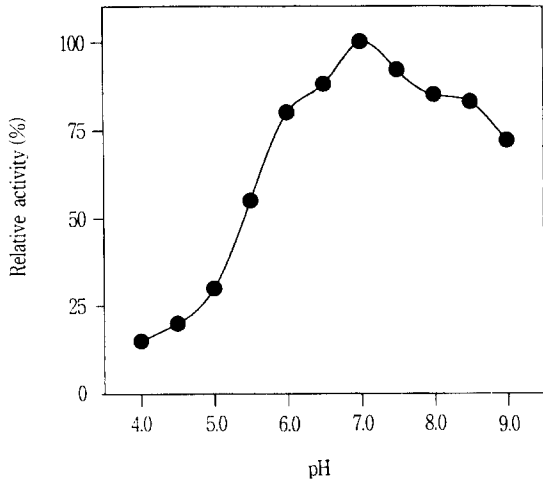


Figure 5. Effect of pH on the cholesterol oxidase at 30°C for 3 min;

pH 4.0 - 5.5 : 50mM citrate buffer  
 pH 6.0 - 7.5 : 50mM phosphate buffer  
 pH 8.0 - 9.0 : 50mM tris buffer.

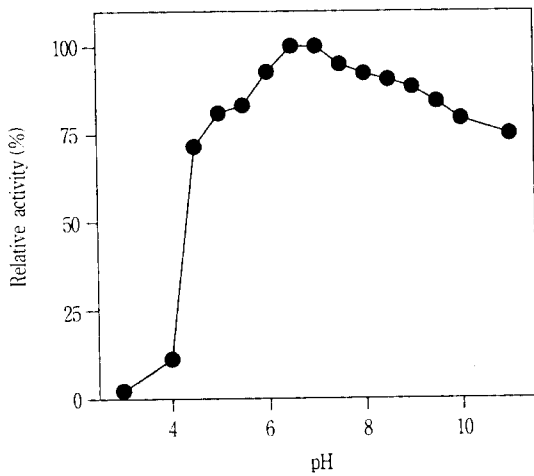


Figure 6. Effect of pH on the enzyme stability at 25°C after 20 hrs;

pH 3.0 : 50mM potassium acetate buffer  
 pH 4.0 - 5.5 : 50mM citrate buffer  
 pH 6.0 - 7.5 : 50mM phosphate buffer  
 pH 8.0 - 9.0 : 50mM Tris buffer  
 pH 9.5 - 10.0 : 50mM sodium carbonate buffer  
 pH 11.0 : 50mM CAPS buffer.

Liu 등(7)이 보고한 *Arthrobacter simplex*가 생산하는 콜레스테롤 산화효소의 안정성이 pH 6~10, Shirokane 등(18)의 *Corynebacterium cholesterolicum*이 생산하는 효소의 안정성이 pH 5~9의 결과와 비교하였을 때는 약간 넓은 범위의 pH 안정성을 나타내었다.

효소에 미치는 온도의 영향 : 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 20°C에서 70°C까지 5°C간격으로 변화시키

면서 효소활성을 측정된 결과는 Figure 7과 같이 50°C에서 최대의 활성을 나타내었으며, 20°C이하와 70°C이상에서는 효소의 활성을 상실하였다. 이는 Watanabe 등(15)의 *Rhodococcus equi* NO.23가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 최적온도가 47°C이란 보고와, 이 등(24)의 *Streptomyces* sp.가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 효소의 최적온도도 50°C이라는 보고와 Tomioka 등(9)의 *Streptomyces violascens*가 생산하는 효소 그리고 Liu 등(7)의 *Arthrobacter simplex*가 생산하는 효소의 최적온도가 50°C이란 결과와 일치하였다. 그러나 Shirokane 등(18)의 *Corynebacterium cholesterolicum*이 생산하는 효소의 최적온도가 40~42°C였다는 보고와 비교하였을 때 다소 높은 최적온도를 나타내었다.

효소의 열안정성 : 본 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70°C에서 효소의 활성을 측정된 결과는 Figure 8과 같이 30~45°C에서는 활성의 감소가 없이 매우 안정하였으나, 45°C이상부터는 활성이 다소 떨어지기 시작하여 55°C이상에서는 급격히 감소함을 나타내었다. 이는 Watanabe 등(15)의 *Rhodococcus equi* NO.23가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 열안정성이 20~50°C 사이에서 안정하다는 보고와 비슷하였다. 그러나 Lee 등(3)의 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 콜레스테롤산화 효소가 70°C에서 30분간 안정하고 80°C에서 5분간 가열하면 활성이 상실된다는 결과보다 열안정성이 다소 떨어졌다.

효소의 Kinetic constant : 기질의 농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 콜레스테롤농도를 1, 2.5, 5, 6, 7 mM까지 기질의 농도를 달리하여 효소활성을 측정된 후 Fig. 9.와 같이 Lineweaver - Burk plotting 하여  $3.2 \times 10^{-4}$  M의 Km 값을 얻었다.

효소의 기질 특이성 : 효소의 각종 기질에 대한 분해의 정도를 조사하기 위하여 cholesterol, 4-androstene-3,17-dione, 1,4-androstadiene-3,17-dione, 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione, hecogenin, campesterol(24 $\alpha$ -methyl-5-cholestene-3 $\beta$ ol), 5 $\alpha$ -cholestane, cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, 4-cholesten-3-one, coprostanol,

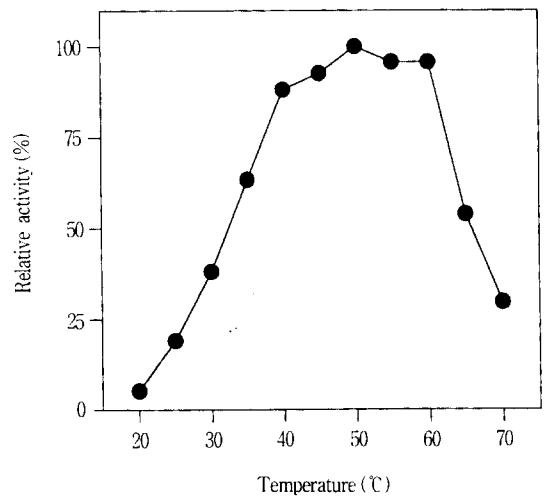


Figure 7. Effect of temperature on the cholesterol oxidase at pH 7.0.

cholesterol-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -epoxide, dehydroisoandrostandane, dihydrocholesterol, epiandrostenone, hecogenin, lanosterol,  $\beta$ -sistosterol, stigmasterol 등의 기질과 반응시킨 효소의 활성은 Table 2와 같은 결과를 나타내었다. 각종 스테롤류의 기질특이성을 콜레스테롤에 대한 기질특이성에 나타난 효소의 활성도와 비교하였을

때 campesterol에는 89%, hecogenin에는 40% 그리고  $\beta$ -sistosterol에는 25%의 상대 활성도를 나타내었다. 그러나, 이외의 나머지 기질에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 효소의 아미노산 조성 : 아미노산 조성 분석은 본 효소와 분자량

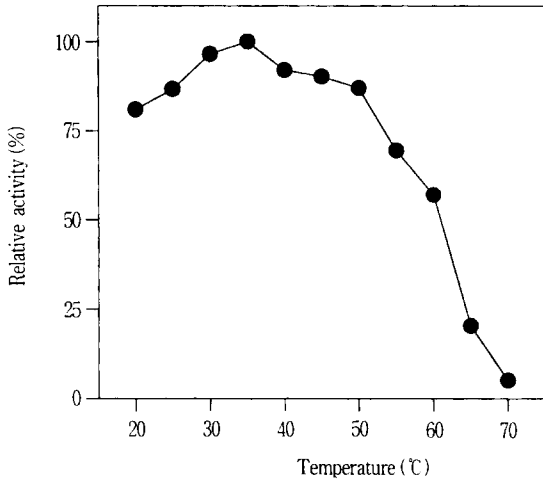


Figure 8. Effect of temperature on the stability of cholesterol oxidase at pH 7.0.

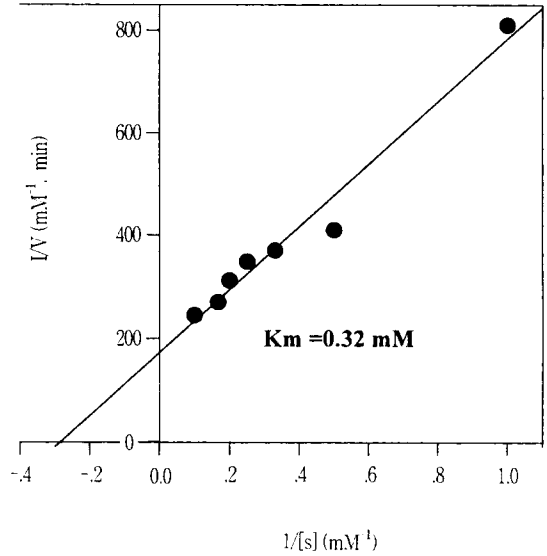


Figure 9. Lineweaver-Burk plot on the reaction rate of the cholesterol oxidase.

Table. 2. Substrate specificity of cholesterol oxidase.

Substrates	Concentration (mM)	Relative activity(%)
cholesterol	6	100
4-androstene-3,17-dione	6	0
1,4-androstadiene-3,17-dione	6	0
5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione	6	1.4
campesterol(24 $\alpha$ -methyl-5-cholestene-3 $\beta$ ol)	6	89.3
5 $\alpha$ -cholestane	6	0
cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	6	1.7
4-cholesten-3-one	6	0
5 $\alpha$ -cholestene-3 $\beta$ -ol-7-one	6	2.7
coprostane	6	0
cholesterol-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -epoxide	6	4.8
dehydroisoandrostandane	6	0
dihydrocholesterol	6	0
epiandrostenone	6	0
hecogenin	6	40.1
lanosterol	6	0
$\beta$ -sistosterol	6	25.2
stigmasterol	6	55.1

Table. 3. Amino acid composition of cholesterol oxidase.

Amino acids	<i>Rhodococcus</i> sp. 3T6-5Mj		<i>Corynebacterium cholesterolicum</i>	
	Number of residues per molecule	mole/asp	Number of residues per molecule	mole/asp
Asparagine/Aspartic acid	60.8	100.0	52.5	100.0
Threonine	23.7	39.0	33.1	63.0
Serine	29.1	47.9	26.5	50.5
Glutamine/Glutamic acid	50.9	83.7	34.2	65.1
Proline	41.9	68.5	20.3	38.9
Glycine	27.5	45.2	53.0	100.9
Alanine	35.1	57.7	36.0	68.6
Cysteine	N.D	N.D	N.D	N.D
Valine	16.7	27.5	35.1	66.9
Methionine	28.2	46.4	13.6	25.5
Isoleucine	8.8	14.5	21.7	41.3
Leucine	18.9	31.1	27.3	52.0
Tyrosine	11.3	18.6	16.1	30.9
Phenylalanine	12.8	21.1	22.6	43.0
Histidine	34.2	56.3	2.7	5.1
Lysine	17.6	28.5	27.1	51.8
Arginine	22.1	36.3	17.4	33.1
Tryptophan	N.D	-	8.5	16.1
Total	439.6		447.7	

이 비슷한 Shirokane 등(18)이 발표한 *Corynebacterium cholesterolicum*이 생산한 효소의 아미노산조성비교는 Table 3과 같았다. 본 균주가 생산하는 효소는 asparagine/aspartate, glutamine/glutamate, glycine의 함량이 높은 것으로 나타났다. 한편 Shirokane 등(18)의 *Corynebacterium cholesterolicum*이 생산한 효소는 glycine, aspartic acid, alanine의 함량이 높은 것으로 보고 하였으며 그리고 Watanabe 등(15)의 *Rhodococcus equi* NO.23가 생산하는 효소는 alanine > glutamic acid > aspartic acid의 순서대로 함량이 높은 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과를 종합해볼 때 콜레스테롤 산화효소는 생산균주의 종류에 따라 그의 아미노산 조성도 서로 다르다는 사실을 알 수 있었다. 아미노산 조성만으로는 본 콜레스테롤 산화효소를 특징지을 수 없었고, 보다 더 정확한 조사를 위해서는 N-terminal amino acid sequence 등의 조사가 필요하리라 생각된다.

## 요 약

*Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj 균주의 배양액으로부터 0.2  $\mu$ m membrane filter을 통과시키고, 아세톤침전, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography의 약음이온 교환수지, cholesterol affinity column chromatography를 통과시켜서 콜레스테롤산화

효소를 25.6 units/mg의 비활성도, 15%의 회수율, 88배로 정제할 수 있었다. 본 균주가 생산하는 콜레스테롤산화효소의 분자량은 SDS-PAGE로 측정된 결과 약 52,000 daltons 정도로 추정 되었다. 그리고 이효소의 Km값은 콜레스테롤을 기질로 측정하였을 때  $3.2 \times 10^{-4}$  M이었다.

본 효소의 최적 온도는 50°C, 최적 pH는 7.0으로 나타났으며, 열에 대한 안정성은 30~45°C, pH에 대한 안정성은 6.5~11.0으로 나타났다. 본 효소는 cholesterol, campesterol, stigmasterol, hecogenin,  $\beta$ -sistosterol의 기질에 특이성을 나타내었다.

본 효소의 아미노산 440개의 잔기로 이루어져 있으며, 그 아미노산조성은 asparagine/aspartate > glutamine/glutamate > proline > alanine > histidine의 순으로 나타났다. 본 효소는 효소적 혈중 콜레스테롤의 측정방법에 필수적인 콜레스테롤 산화효소의 이용 가능성을 보여 주었다.

## 참 고 문 헌

1. Richmond, W. (1973), Preparation and Properties of a 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. 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 the strain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 542~546.
4. Cheetham, P. S. J., P. Dunnill, and M. D. Lilly (1982), The Characterization and Interconversion of three forms of Cholesterol oxidase extracted from *Nocardia rhodochrous*, *Biochem. J.*, **201**, 515~521.
5. 이인애, 최용경, 이홍수, 최인성, 정태화 (1992), Cholesterol Oxidase를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소 생산에 관한 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 395~400.
6. Turfitt, G. E. (1944), The Microbiological Degradation of Steroids, *Biochem. J.*, **38**, 49~62.
7. Liu, W., M. Meng, and K. Chen (1988), Purification and some Properties of Cholesterol Oxidase Produced by an Inducible and a Constitutive Mutant of *Arthrobacter simplex*, *Agric. Biol. Chem.*, **5**, 413~418.
8. Liu, W., J. Hsu, and W. Wang (1983), Production of Cholesterol Oxidase by an Antibiotic Resistant Mutant and a Constitutive Mutant of *Arthrobacter simplex* B-7, *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(A)*, **7**, 225~260.
9. Tomioka, H., M. Kagawa, and S. Nakamura (1976), Some Enzymatic Properties of  $3\beta$ -Hydroxysteroid Oxidase Produced by *Streptomyces violascens*, *J. Biochem.*, **79**, 903~915.
10. Somkuti, G. A., Daniel, K. Y., and D. H. Steinberg (1992), Expression of *Streptomyces* sp. cholesterol oxidase in *Lactobacillus casei*, *Applied microbiology & Biotechnology*, **37**, 330~334.
11. Kamei, T., Y. Takiguchi, H. Suzuki, M. Matsuzaki, and S. Nakamura (1978), Purification of  $3\beta$ -Hydroxysteroid Oxidase of *Streptomyces violascens* Origin by Affinity Chromatography on Cholesterol, *Chem. Pharm. Bull.*, **26** (9), 2799~2804.
12. Lartillot, S., and P. Kedziora (1990), Production, Purification and Some Properties of Cholesterol Oxidase from a *Streptomyces* sp., *Preparative Biochemistry*, **20**(1), 51~62.
13. Bar, R. (1988), Ultrasound enhanced bioprocess, *Biotechnology bioengineering*, **32**, 655~663.
14. Kreit, J., G. Lefebvre, and P. Germain (1994), Membrane-bound Cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells. Production and Extraction, *J. Biotechnol.*, **33**, 271~282.
15. Watanabe, K., H. Aihara, Y. Nakagawa and T. Sasaki (1989), Properties of the Purified Extracellular Cholesterol Oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1178~1182.
16. Watanabe, K., H. Shimizu, H. Aihara, R. Nakamura, K. I. Suzuki, and K. Komagata (1986), Isolation and Identification of Cholesterol-degradation *Rhodococcus* Strains from Food of Animal Origin and their Cholesterol Oxidase Activities, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 137~147.
17. Uwajima, T., H. Yagi, S. Nakamura and O. Terada (1973), Isolation and Crystallization of Extracellular  $3\beta$ -Hydroxysteroid Oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp., *Agr. Biol. Chem.*, **37**(10), 2345~2350.
18. Shirokane, Y., K. Nakamura and K. Mizusawa (1977), Purification and some Properties an Extracellular  $3\beta$ -Hydroxysteroid Oxidase Produced by *Corynebacterium cholesterolicum*, *J. Ferment. Technol.*, **55**, 337~346.
19. Fukuda, H., Y. Kawakami, and S. Nakamura (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.
20. 최상기, 김학성, 박영훈 (1988), 간헐적으로 첨가된 Cholesterol로부터 미생물전환에 의한 4-Androstene-3,17-dione의 생산, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 187~192.
21. Srivastava, S. K., R. A. K. Srivastava, and S. N. Mathur (1985), Biotransformation of sugar-cane sterols into Androstal,4-dione-3,17-dione(ADD) by *Arthrobacter globiformis* Str. *Oxydans*, *J. Applied Bacteriology*, **59**, 399~402.
22. Goetschel, R., and R. Bar (1992), Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 462~469.
23. Jaspers, D. A., L. K. Massey, and L. O. Luedecke (1984), Effect of Consuming Yogurts Prepared with Three Culture Strains on Human Serum Lipoproteins, *J. Food Sci.*, **49**, 1178~1181.
24. 이홍수, 이승철, 권태종, 정태화 (1992), 토양 미생물 HSL 613이 생산하는 Cholesterol Oxidase의 정제 및 특성, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 401~408.