

전통발효식품에서 Cholesterol Oxidase를 생산하는 미생물의 분리 및 효소생산에 관한 연구

†박 상 현 · ¹권 익 부 · ²함 영 태 · ³신 동 훈 · 전 역 한

경희대학교 식품가공학과, ¹롯데그룹 중앙연구소, ²중앙대학교 생물공학과, ³고려대학교 식품생명공학과
(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 5. 8.)

Studies on the Isolation of the Cholesterol Degrading Enzyme Producing Microorganism from Traditional Fermented Foods and the Culture Condition for the Production of the Enzyme

Sang Hyun Park[†], Ik Boo Kwon¹, Young Tea Hahn², Dong-Hoon Shin³, and Uck Han Chun

Dept. of Food Science & Technology, Kyung Hee University, Kyonggi 449-701, Korea

¹Lotte Group R & D Center, Seoul 150-104, Korea

²Dept. of Biotec., Chung Ang Univ., Kyonggi 456-756, Korea

³Grad. Sch. of Biotec., Korea Univ., Chungnam 339-700, Korea

(Received : 1997. 12. 12., Accepted : 1998. 5. 8.)

About 75 strains which utilize cholesterol as sole carbon and energy source were isolated from 10 samples of Kimchi and 18 samples of fermented fish food (2 Ojingo-jeots, salt-fermented squid ; 5 Changran-jeots, salt-fermented pollack tripe ; 5 Myungran-jeots, salt-fermented Alaska pollack roe ; 3 Gajami-sikhae-jeots, fermented flat fish ; 2 Gul-jeots, salt-fermented oyster ; a Juneo-jeot, salt-fermented shad). Among them tested, the 3T6-5Mj strain isolated from Changran-jeot showed the highest activity on cholesterol degradation. The optimal composition of medium for the producing cholesterol degradation enzyme by 3T6-5Mj strain was 1.0 g/L NH_4NO_3 , 1.0 g/L K_2HPO_4 , 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L NaCl, 5 g/L Trypton, 1 g/L Cholesterol, and 5 g/L Maltose at 30°C, pH 7.5, and the enzyme production reached a maximum level at 140 hours of cultivation.

Key Words : cholesterol degradation, bioconversion, cholesterol degrading enzyme

서 론

미생물을 이용한 콜레스테롤 대사에 관한 연구는 먼저 콜레스테롤을 분해할 수 있는 균주를 탐색하여 이 균주에 의한 식품 중의 콜레스테롤 함량을 낮추는데 응용하는 분야와 bioconversion에 의한 스테로이드 의약품의 전구물질 생산에 응용하는 분야, 그리고 콜레스테롤 산화효소 생산에 관한 분야로 구분할 수 있다(1). 이러한 연구는 자연계에 존재하는 여러 종류의 스테롤류가 미생물에 의해 선택적으로 분해 될 수 있다는 사실이 밝혀진 이후부터 크게 발전하였다. 특히 초기에는 콜레스테롤을 분해할 수 있는 미생물을 탐색하는 과정이었다. 1913년 Sohnegen 등(2)은 콜레스테롤을 assimilation 할 수 있는 균주

로 *Nocardia(Proactinomyces)*와 *Mycobacterium*균을 토양으로부터 분리하였고, 돼지의 분변으로부터는 *Pseudomonas*를 분리하였다고 보고하였다. 이때 사용한 배지는 탄소원으로서 오직 콜레스테롤만을 강화한 기본영양배지에 pH 7.0으로 조절하고, 30°C에서 배양하면서 각 균주를 탐색하였다. 이는 미생물을 이용하여 콜레스테롤로부터 구조가 매우 복잡한 스테로이드 의약품의 전구물질을 생산할 수 있는 가능성을 확인해 주는 연구 결과였다. 또 Arima 등(3)도 토양 및 여러 종류의 식품으로부터 콜레스테롤 분해에 활성을 나타내는 균주로 *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Archrobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* 등의 균을 분리하여 보고하였다. 이때 균주의 탐색과 특성연구에 이용된 배양조건도 상기의 조건과 비슷한 콜레스테롤 강화용 배지와 pH 7.0, 온도 30°C였다. 이들의 연구는 주로 콜레스테롤 분해에 활성을 나타내는 균주들의 탐색에 한정되어 있고, 각각의 균주들에 의한 콜레스테롤 분해효소의 최적 생성조건과 반응조건은 연구되지 않았다. 그 이후 Watanabe 등(4)은 콜레스테롤을 분

† 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

해할 수 있는 16종류의 박테리아를 닭의 지방, 돼지지방, 베이컨, 버터 등의 동물성 식품에서 분리하였다. 이들 중 활성이 가장 높은 균주가 *Rhodococcus erythropolis*에 속하는 것으로 밝혀졌고, 이 균주가 생산하는 효소는 intracellular enzyme으로 보고하였다. 이때 콜레스테롤 분해 효소의 생성조건은 콜레스테롤 강화배지의 30°C, pH 7.0이었으며, 콜레스테롤 분해효소의 최적 생산조건을 찾는 실험은 실시되지 않았다. 그리고 Lee 등(5)과 Liu 등(6)은 콜레스테롤을 분해하여 스테로이드 의약품으로 쓰이는 ADD(androsta-1,4-diene-3, 17-dione)로 전환하는 연구에서 *Mycobacterium* 균주를 이용하여 ADD의 최대 생산을 위한 세포의 고정화 방법이 효율적이었다고 연구 보고하였다. Smith 등(7)은 콜레스테롤과 함께 Tween 80을 배지에 첨가함으로써 콜레스테롤 입자를 작게 분산시킬 수 있기 때문에 콜레스테롤 분해에 보다 효과적이라고 보고하였다. Ahmad 등(8)은 토양에서 콜레스테롤을 분해하는 균주로 *Rhodococcus equi*를 분리하여 콜레스테롤 분해 효소의 생산조건으로 yeast extract와 tryptone을 질소원으로 이용하였고, Tween 80을 첨가하여 콜레스테롤을 분해 촉진시킬 수 있다는 보고와 2,2-pyridyl을 첨가하면 콜레스테롤의 side chain만을 분해하고 ring cleavage를 억제시키는데 효과적이라고 보고하였다. Lee 등(5)은 고농도의 콜레스테롤에 각종 계면활성제를 첨가한 결과 Triton X-100을 첨가했을 때 콜레스테롤의 스테로이드 의약품의 전환율이 가장 높았다고 보고하였다. 이 등(9)은 토양으로부터 콜레스테롤 분해에 활성을 나타내는 균주로 *Streptomyces* 속 균주를 분리한 후, 콜레스테롤 산화효소의 최적 생산조건으로 starch와 glucose를 각각 1.0%, 2.0%로 하여 soytone과 beef extract, yeast extract를 혼합하여 pH 7.0, 30°C에서 6일간 배양하였을 때 효소의 활성이 가장 높았다고 보고하였다. Martin(10)과 Kieslich(11)는 sterol류의 분해경로가 고리구조와 측쇄구조에 따라 서로 다른 경로를 통해서 일어나며, 이 반응은 서로 독립적이고 동시에 발생한다고 보고하였다.

이상과 같은 연구는 cholesterol oxidase의 생산과 steroid 의약품의 전구물질인 ADD, AD(androsta-4-ene-3,17-dione)의 생산(12-14), 그리고 식품 중에서 cholesterol을 제거하는데 활용하기 위한 기본적인 연구로 수행되고 있다. 특히 현재 우리나라의 식생활도 서구화 경향에 따른 각종 콜레스테롤 관련 질병이환율이 점차 높아져 가고 있기 때문에 국내에서도 미생물을 이용한 cholesterol bioconversion에 관한 연구가 꼭 이루어져야 된다고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 우리나라의 전통식품이면서 유산균이 많이 존재하는 김치와 콜레스테롤 함량이 높은 수산발효식품으로부터 콜레스테롤 분해 능력이 우수한 균주의 분리 및 분리한 균주가 생산하는 cholesterol degrading enzyme의 최적 생산조건을 알아보기 위하여 수행하였다

재료 및 방법

시료채취

김치는 서울 서부지역의 음식점과 일반가정에서 보관중인 것을 수집하였고, 수산발효식품은 서울 시중 백화점(잠실롯데백화점)에서 판매되고 있는 것을 1996년 3월부터 1996년 6월 사이에 걸쳐 총 28점을 Table 1과 같이 수집하여 4°C 냉장고에 보관하면서 콜레스테롤을 분해 할 수 있는 균주를 분리하는데 사

용하였다.

균주의 분리

Ahmad 등(8)의 방법에 따라 김치 및 수산 발효식품을 1g씩 채취하여 생리식염수 10 mL에 충분히 현탁하고 상등액은 10^{-3} ~ 10^{-6} 으로 생리식염수를 사용하여 희석한 후 10 mL의 콜레스테롤강화배지(Table 2)에 0.1 mL씩 접종하여 37°C에서 6일 배양하였다. 상기의 배양액은 다시 분리용 배지에 0.1 mL씩 접종하여 배양하는 과정을 3회 반복하였다. 최종 배양액을 멸균수로 10^{-3} ~ 10^{-6} 으로 희석하여 평판배양배지인 nutrient agar 배지(Table 3)에 각각 0.1 mL씩 도말 하여 37°C에서 4일 배양하였다. 위의 과정을 단일 colony가 얻어질 때까지 반복하였다.

Table 1. Sample sources for screening of cholesterol degrading strains from traditional fermented foods.

Sources	No. of samples	Location
Kimchi	10	Seoul
Ojingo-jeot	2	"
Changran-jeot	5	"
Myungran-jeot	5	"
Gajamu-sikhae-jeot	3	"
Gul-jeot	2	"
Juneo-jeot	1	"
Total	28	

Ojingo-jeot, salt-fermented squid ; Changran-jeot, salt-fermented pollack trape ; Myungran-jeot, salt-fermented Alaska pollack roe , Gajamu-sikhae-jeot, fermented flat fish ; Gul-jeot, salt-fermented oyster ; Juneo-jeot, salt-fermented shad

콜레스테롤의 분해력 측정

콜레스테롤의 분해력 측정에는 Flegg(15)와 Cho(16)의 효소적 방법과 Pee 등(17)의 G/C(Gas Chromatography)를 이용한 방법에 따라 잔존 콜레스테롤 함량을 측정하여 계산하였다. 각각의 균주는 콜레스테롤 분해력 측정용 배지(NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.025%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, Yeast extract 0.5%, Cholesterol 0.1%) 10 mL에 접종하여 37°C에서 7일간 배양하였다. 효소적 측정방법은 상기의 배양균주액을 80°C에서 3분간 가열한 후 vortex mixer로 1분간 균질화 하였다. 이 액을 Isopropanol로 10배 희석하여 CHOL-TEST Kit (Boehringer GmbH Mannheim Co, Germany)을 이용하여 잔여 콜레스테롤량을 측정하였다. G/C를 이용한 방법은 배양액 0.5 mL을 Effendorff tube에 취하고 내부표준물질 5 α -cholestane(Sigma Co., USA)이 1 mg/mL가 되도록 조제된 n-hexane을 1 mL 가하여 vortex mixer로 1분간 추출하였다. 여기에 약 1g의 무수 Na_2SO_4 로 hexane 층을 통과시켜서 10분간 정치 후 상등액 hexane 층을 Gas Chromatograph (Hewlett Packard 5890 Series II, U.S.A)로 분석하였다. 이때 분석조건으로는 oven 온도는 290°C, injector 온도

Table 2. Composition of cholesterol enrichment medium for isolation of cholesterol degrading strains.

Components	Concentration (per liter)
NH ₄ NO ₃	1g
K ₂ HPO ₄	250mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1mg
Yeast extract	5g
Cholesterol	1 g/L(pH 7.5)

Table 3. Composition of nutrient agar medium.

Components	Concentration (%)
Yeast ext.	1.0
Tryptone	0.5
NaCl	0.5
Agar	1.5

Table 4. Composition of nutrient broth medium.

Components	Concentration (%)
Yeast ext.	1.0
Tryptone	0.5
NaCl	0.5

는 300°C, detector 온도는 310°C, detector로는 FID를 이용하였으며, column은 DB-5(J&W Co., U.S.A)의 capillary column (length 30 m, ID 0.32 mm, film thickness 0.5 μm)을 사용하였다.

콜레스테롤 산화효소의 활성측정

Richmond(18)의 방법에 따라 cholesterol이 Δ⁴-cholestenone으로 전환되는 속도를 240 nm에서 직접 흡광도의 증가율을 측정하여 수행하였다.

효소의 1 unit는 1 μmol의 cholesterol을 30°C에서 1분 동안에 산화시키는 효소의 양으로 정한다.

균체의 측정

Cholesterol을 분해하는 균주 중 가장 높은 활성을 나타내는 균주의 동정은 균주 동정 전문기관에 의뢰하였다.

결과 및 고찰

효소생산 균주의 선별 및 동정

서울지역의 가정용 김치 10종과 시중 백화점에서 판매되고 있

는 젓갈류 18종을 수거해 콜레스테롤 강화배지를 사용하여 총 75종의 균주를 분리하였다. 분리한 75종의 균주를 콜레스테롤 강화배지에 접종하여 30°C에서 7일간 배양시킨 후 콜레스테롤의 분해 정도와 활성도를 측정하였다(Table 5). 이들 균주 중에서, 어떤 균주도 접종하지 않은 control에 비하여, 90%이상의 콜레스테롤 분해 능력을 나타내는 5종의 우수한 균주를 얻었으며, 특히 창난젓에서 분리한 3T6-5Mj 균주가 콜레스테롤 분해능력이 가장 우수하였으므로 이 균주에 대하여 연구를 수행하였다.

3T6-5Mj 균주의 형태학적, 생화학적 특성과 배양 조건을 실험한 결과 그람양성균이며 glucose, sucrose 이용성은 양성을 나타내었다. 세포막의 지방산 조성을 분석하여 본 결과, 본 균주는 *Rhodococcus* 속으로 확인되었다. 균주의 형태는 배양 초기의 균주에서는 간균으로 관찰이 되었으나, 배양 후기에서는 간균과 구균이 동시에 관찰되었다. 이는 세대를 거듭함에 따라 초기의 긴 rod type의 균주가 쪼개져서 짧은 rod type 과 coccoid type으로 변화하기 때문인 것 같다. 이 결과는 Watanabe 등(4)이 분리한 *Rhodococcus* 균주의 특성을 조사한 자료와 Goodfellow(20)의 *Rhodococcus* 균주의 특성과 비교하였을 때 거의 일치하였다.

지금까지 콜레스테롤의 분해에 활성을 나타내는 균주는 많이 보고되어 있으나, 그 중에서도 활성이 높은 균주로는 Arima 등(3)과 Lee 등(9)이 보고한 토양에서 분리한 *Arthrobacterium*으로 이 균주는 ADD의 생산에 특히 활성을 나타내며, solvent system에서도 활성을 나타내는 특성을 보였다. Liu 등(6)은 *Arthrobacter simplex* 균주가 약 80%정도의 콜레스테롤을 분해한다고 보고하였다. Lee 등(9)은 토양에서 분리한 *Streptomyces* 균주가 콜레스테롤 분해에 90%정도의 활성을 나타내는 균주로 보고하였으며, 이 균주가 생산하는 효소는 콜레스테롤 산화효소의 작용에 의한 것으로 발표하였다. Watanabe(4)은 닭의 지방, 돼지지방, 베이컨, 버터 등의 동물성 식품으로부터 콜레스테롤 분해능력이 90%이상인 *Rhodococcus erythropolis*를 분리하여 보고하였다. Fukuda(20)와 Uwajima 등(21)은 효소생산 및 효소의 정제가 용이한 *Streptomyces violascens*와 *Brevibacterium sterolicum*을 각각 분리하여 보고하였다. 그리고 Gilliland(22)는 돼지의 분변으로부터 콜레스테롤을 assimilation 할 수 있는 균주를 분리하여 이 균주가 *Lactobacillus acidophilus*임을 확인하였다. 돼지를 대상으로 고콜레스테롤 식이를 공급한 임상실험에서 control의 부류는 52.23 mg/dL blood에서 74.44 mg/dL blood로 증가하였으나, *Lactobacillus acidophilus*의 균배양액과 함께 고콜레스테롤 식이를 공급한 부류에서는 52.4 mg/dL blood에서 62.29 mg/dL blood 정도의 증가만을 나타내었다고 보고하였다.

Rasic(23)은 젓산균과 *Bifidobacteria* 그리고 몇몇 균주를 대상으로 콜레스테롤의 assimilation 능력 실험을 통하여 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*가 가장 우수했으며 *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus* 순으로 나타났다고 보고하였다. 또한 Rasic 등(24)은 젓산발효의 일종인 Kefir culture에 의하여 우유 속의 콜레스테롤 함량을 10.8 mg/dL에서 5.3 mg/dL까지 줄일 수 있다고 보고하였다. 이때 관여하는 균주는 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Lactobacillus*

delbruecki 와 Yeast 등의 6종 이상의 균주가 서로 상호작용에 의한 것이라고 발표하였다. 콜레스테롤 산화효소를 생산하는 미생물로는 *Pseudomonas*속(25), *Nocardia*속(9, 26, 27), *Arthro-bacter*속(28, 29, 30), *Corynebacterium*(31) 등이 보고되어 있다.

효소의 생산조건

pH에 따른 효소생산 : 초기 pH를 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0으로 조정된 콜레스테롤 분해 측정용 배지에 3T6-5Mj 균주를 접종하여 진탕 배양하였을 때 최종 pH는 8.5~9.0 이었 으며, 초기 pH가 7.5~8.5인 배지에서 균의 생육 및 효소의 생

Table 5. Cholesterol degrading ability of isolated microorganisms from traditional fermented foods.

Strains	Cholesterol degradation(%)	Strains	Cholesterol degradation(%)
Kimchi		Changran-jeot(salt-fermented pollack tripe) I	
K14Mj	7.5	3T3-5Mj	78.7
K14Mi	17.4	3T3-5Mi-1	42.9
K23Mj	26.7	3T3-5Mi-2	51.7
K23Mi-1	6.6	3T4-5Mj	90.2
K23Mi-2	17.7	3T4-5Mi-1	58.1
K24Mj	22.3	3T4-5Mi-2	43.5
K24Mi	8.5	3T5-5Mj	92.2
K33-5Mj	77.3	3T5-5Mi	42.5
K33-5Mi	46.6	3T6-5Mj	96.5
Ojingo-jeot(salt-fermented squid) I		3T6-5Mi-1	47.9
IS-5Mj	49.7	3T6-5Mi-2	39.9
IS-5Mi-1-1	86.5	3T6-5Mi-3	40.6
IS-5Mi-1-2	91.2	Changran-jeot II	
IS-5Mi-2	91.3	2C5Mj	1.6
IS-5Mi-3	74.9	2C5Mi-1	13.2
IS-5Mi-5	40.5	2C5Mi-2	10.3
Ojingo-jeot II		2C5Mi-3	4.1
2O5Mj	55.8	3C5Mj	19.0
2O5Mi-1	26.0	3C5Mi-1	19.3
3O5Mi-1	28.9	3C5Mi-2	30.5
3O5Mi-2	33.5	3C5Mi-3	46.0

$$\text{Cholesterol degrading ability}(\%) = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A : Cholesterol residues in control

B : Cholesterol residues in sample

Control : Cholesterol sample without microorganism

Table 5. - continued 1

Strains	Cholesterol degradation(%)	Strains	Cholesterol degradation(%)
Myungran-jeot(salt-fermented Alaska pollack roe) I		Gajami-sikhae-jeot(fermented flat fish)	
2M5Mj	12.0	2G5Mj	69.2
2M5Mi-1	59.9	2G5Mi-1	60.5
2M5Mi-2	21.8	2G5Mi-2	13.0
3M5Mj	25.0	3G5Mj	12.0
3M5Mi-1	46.0	3G5Mi-1	14.4
3M5Mi-2	0.02	3G5Mi-2	52.8
		3G5Mi-3	18.6
Myungran-jeot II		Gul-jeot(salt-fermented oyster)	
MO13Mj	1.2	2Q5Mj	20.0
MO13Mi	25.5	2Q5Mi-1	20.3
MO14Mj	55.8	3Q5Mj	16.0
MO14Mi	26.0	3Q5Mi-1	17.4
MO15Mj	4.2	3Q5Mi-2	24.7
Myungran-jeot III		Juneo-jeot(salt-fermented shad)	
MN13Mj	12.7	2J5Mi-1	69.2
MN14Mj	15.4	2J5Mi-2	60.5
MN14Mi-1	30.1	3J5Mj	13.0
MN14Mi-2	23.0	3J5Mi-1	12.0
MN15Mj	25.5	3J5Mi-2	14.4
MN15Mi-1	30.9	3J5Mi-3	52.8
MN15Mi-2	13.7		

산이 우수하였다. 균의 생육은 초기 pH가 8.0일 때 가장 높았으나, 효소의 활성은 pH 7.5일 때 가장 높았다(Figure 1). 본 결과는 Watanabe 등(4)이 동물성 식품에서 분리한 콜레스테롤 분해능력을 갖고 있는 *Rhodococcus* 균주의 최적 pH가 7.0 ~ 8.0인 것으로 보고한 결과보다는 다소 높았다. Liu 등(6)이 토양

에서 분리한 *Arthrobacter* 균주의 최적 pH가 7.0~8.0이었다는 보고와 비슷하였고, 이 등(9)이 토양에서 분리한 *Streptomyces*속의 균주가 최적 pH가 8.5였다는 보고와도 유사하였다.

본 균주는 알칼리성 쪽에서 활성을 나타내는 호알칼리성 균주인 것으로 생각된다.

배양온도에 따른 효소생산 : 배양온도에 따른 균체의 성장속도 및 효소생산의 변화를 보기 위하여 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50℃에서 각각 배양하여 비교해 본 결과는 Figure 2와 같았다. 30℃에서 균체의 성장속도 및 그 활성이 가장 우수하였다. 이 결과는 이 등(9)이 콜레스테롤 산화효소의 생산균주로 분리한 *Streptomyces*속이 37℃에서 생육과 활성이 가장 좋았다는 보고와 비교하면 본 균주가 다소 낮게 나타났으나, Ahmad 등(8)이 분리한 *Rhodococcus equi* DSM89-133 균주는 30℃에서 가장 높게 나타났다는 보고와 유사하였다. 젓갈류에서 분리된 균주는 저온 발효시키기 때문에 대부분의 균주가 30~45℃에서 생육과 활성이 좋은 것으로 보고되었고, 본 균주도 창란젓에서 분리된 균주이므로 저온 발효 시 낮은 온도에 적응되었기 때문에 최적 온도는 약 30℃인 것으로 생각된다.

접종 종균량에 따른 효소생산 : 종균량에 따른 균체량 및 효소생산의 결과는 Figure 3과 같았다. 종균량에 따른 균체의 생산량은 거의 차이가 없었으나 효소의 활성은 종균량을 1.0%로 접종하여 배양하였을 때 가장 높은 활성과 콜레스테롤의 분해능력을 보였다. 이 결과는 이 등(9)의 콜레스테롤 산화효소를 생산

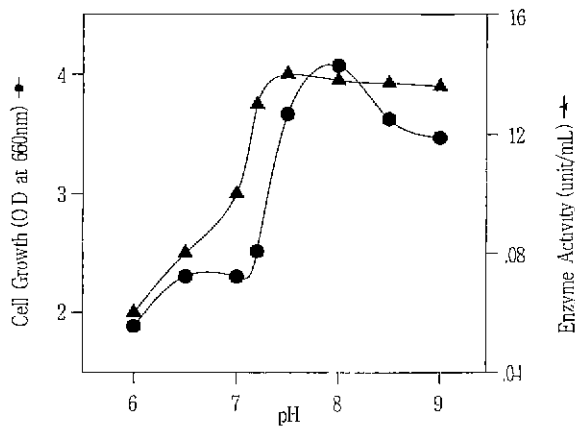


Figure 1. Effect of initial pH on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain grown on the basal medium at 30℃ for 4 days.

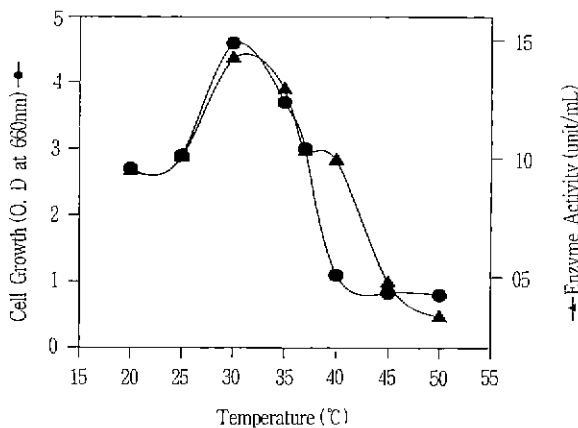


Figure 2. Effect of temperature on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain on the basal medium at pH7.5 for 4 days.

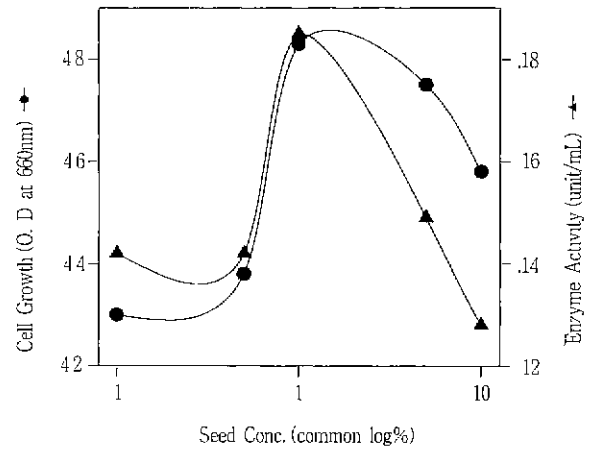


Figure 3. Effect of seed concentration on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj grown on the basal medium at 30℃, pH7.5 for 4 days.

하는 *Streptomyces*속이 1.0%였다는 결과와 일치하였다. 그리고 Watanabe 등(4)이 *Rhodococcus*속 균주의 콜레스테롤산화효소의 생산조건에서도 1%였다는 보고와 일치하였다.

탄소원에 따른 효소생산 : 효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 먼저 glucose의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0% (w/v)으로 하여 실험 해 본 결과 균의 성장은 5%일 때 가장 높았으나, 효소의 활성은 0.5%일 때 가장 높았다. 따라서 각각의 탄소원 농도를 0.5%로, 기본 배지에 탄소원의 종류를

Table 6. Effect of carbon sources on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain.

Carbon sources	Relative activity(%)	Cell Growth (O. D at 660 nm)	pH
Glucose	136	7.3	7.95
Galactose	73	5.1	8.30
Mannose	91	6.7	8.12
Fructose	147	4.9	8.03
Xylose	56	5.5	7.84
Mannitol	113	5.0	8.00
Sucrose	102	5.5	8.34
Lactose	34	5.3	8.33
Maltose	158	5.2	8.27
Raffinose	26	4.6	8.43
Dextrin	13	-	8.23
Soluble starch	28	-	8.21
Sorbitol	11	5.1	8.20
None	100	4.5	8.26

달리하여 첨가한 후 30°C에서 4일간 진탕 배양하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 6에 제시하였다. Glucose를 첨가한 배지에서 균의 성장정도가 가장 양호하였으나, 효소의 활성도는 탄소원을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 136%로 3번째 활성을 나타내었다. Maltose를 첨가한 배지에서는 균의 성장정도가 다른 대조구에 비하여 중간정도 였으나, 효소의 활성이 탄소원을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 158%로 가장 좋았다.

질소원에 따른 효소생산 : 효소생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 먼저 yeast extract의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0% (w/v)으로 하여 실험해 본 결과 2.0%일 때 가장 높은 효소 활성을 보였다. 기본배지에 각종 유기질소원의 농도를 2.0%가 되도록 첨가하여 30°C에서 4일간 진탕 배양한 후 효소생산에 미치는 유기질소원의 영향을 조사한 결과 Figure 4와 같았다. 효소의 생산은 질소원을 첨가하지 않은 대조구에 비해서 trypton을 첨가한 배지에서 가장 높은 120%의 relative activity를 나타내었다. Bacto peptone을 첨가한 시험구에서는 80%의 relative activity를 나타내었고, yeast extract를 첨가한 시험구에서는 75%의 relative activity를 나타내었다. 창난것에서 분리한 본 균주는 casein을 췌장액으로 분해하여 만든 trypsin에서 균의 성장은 약간 느리지만, 콜레스테롤 산화효소를 유도하는 데는 다른 질소원에 비하여 아주 좋았다. 이 등(9), Ahmand 등(8)과 Watanabe 등(4)의 결과와 비교해 보면, 복합 질소원에 따른 효소생산은 모두가 다르게 나타났다 따라서 콜레스테롤 산화효소생산에 좋게 영향을 미치는 특성의 질소원이 있는 것은 아니고 균주의 특성에 따라 질소원도 변화되는 것으로 생각된다.

무기성분에 따른 효소생산 : 효소생산을 촉진할 수 있는 특수 무기성분의 영향을 검토하기 위하여 기본배지의 조성에다 통상의 무기성분의 농도를 달리하여 30°C에서 4일간 배양하여 효소활성을 조사한 결과를 Table 7에 나타내었다. 무기성분 중에서 potassium phosphate를 첨가한 시험구가 효소활성이 가장 높았고, 농도는 0.5%일 때 효소의 relative activity가 150.5%로 활성이 가장 좋게 나타났다. 그 다음으로 0.01%의 magnesium sulfate는 효소의 relative activity가 145%, 0.1%의 ammonium

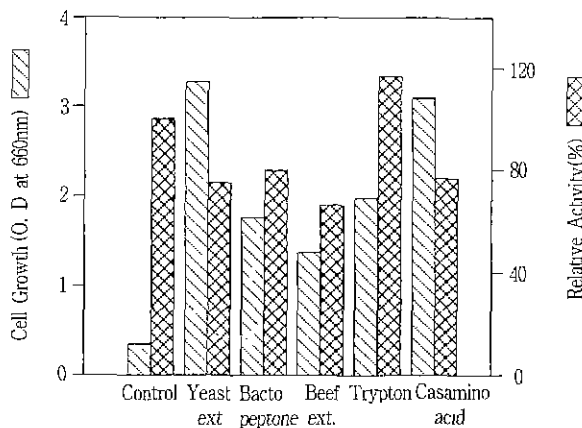


Figure 4. Effect of nitrogen source on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain grown on the basal medium at 30°C for 4 days.

nitrate도 relative activity가 145%를 나타내었고, 0.001%의 ferrous sulfate는 효소의 relative activity가 138.2%를 나타내었다. 0.1 ~ 0.2%의 낮은 농도의 sodium chloride조건에서는 효소활성에 큰 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 이 등(9)의 토양에서 분리한 *Streptomyces*와 Ahmand 등(8)의 토양에서 분리한 *Rhodococcus* 등에서도 같은 경향을 보였다. 즉, 각종 무기질이 종합적으로 공급되었을 때 균주의 성장과 콜레스테롤의 산화효소도 활성이 높게 나타남을 알 수 있었다.

배양시간에 따른 효소생산 : 이성에서 검토한 최적 배지 조성 (Table 8)을 사용하여 1%의 점중량으로 균주의 생육과 효소의 생산 및 pH의 변화를 경시적으로 관찰한 결과는 Figure 5와 같았다. 균의 생육은 24시간까지 배지의 환경에 적응하는 유도기를 거쳐서 96시간에서 최고 생육을 나타내었다. 효소의 활성은 72시간 이후부터 0.16 (unit/mL)으로 거의 일정하게 유지되었고, 콜레스테롤의 분해정도는 140시간이 지나야 90%이상의 분해효과를 나타내었다. 본 균주의 성장곡선 중 대수기때는 maltose를 탄소원으로 이용하여 자라기 때문에 콜레스테롤 산화효소가 많이 유도되지 않았지만, maltose가 전부 고갈되고 나면 콜레스테롤을 탄소원으로 이용하기 때문에 정지기 이후부터 효소의 활성이 높아진 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 이 등(9)이 보고한 콜레스테롤 산화효소 생산균주인 *Streptomyces* sp. 도 100시간이 경과하여야 효소의 활성을 나타내었다는 결과와 유사하였다. Liu 등(6)의 *Arthrobacter simplex*, Ahmad 등(8)과 Watanabe 등(4)의 *Rhodococcus equi*와 Uwajima 등(21)의 *Brevibacterium sterolicum*이 생산하는 콜레스테롤산화

Table 7. Effect of inorganic compounds on the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain.

Inorganic compounds	Concentration (%w/v)	Relative activity (%)	Cholesterol degrading activity(%)	Cell Growth (O. D at 660 nm)
Ammonium nitrate	0.1	145.0	77.5	1.64
	0.2	138.4	67.7	1.74
	0.5	138.4	72.3	1.73
Potassium phosphate	0.1	150.5	84.1	1.65
	0.2	144.7	84.6	1.50
	0.5	134.4	80.5	1.43
Sodium chloride	0.1	118.5	78.3	2.18
	0.2	118.5	72.4	1.93
	0.5	114.4	73.3	1.80
Magnesium sulfate	0.01	145.0	79.4	1.81
	0.02	138.2	74.0	1.75
	0.05	111.9	75.4	1.70
Ferrous sulfate	0.001	138.2	87.0	1.61
	0.002	125.5	85.3	1.40
	0.005	105.4	64.8	1.20
None		100.0	3.19	1.65

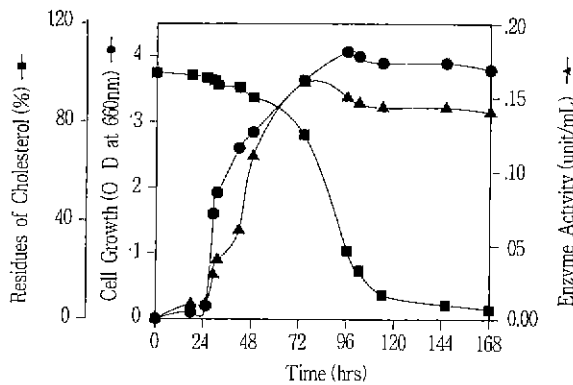


Figure 5. Time course of the cell growth and crude enzyme activity of 3T6-5Mj strain.

Table 8. Composition of optimal medium for the production of crude enzyme from 3T6-5Mj strain.

Components	Concentration (g/L)
NH ₄ NO ₃	1
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
NaCl	1
Trypton	20
Cholesterol	1
Maltose	5 (pH 7.5)

효소의 생산조건으로 평균 4일 이상 배양시키는 결과와도 유사하였다.

요 약

본 연구에서는 미생물을 콜레스테롤의 assimilation 과 bioconversion에 이용하기 위하여 우리 나라의 전통발효식품인 김치와 젓갈류에서 콜레스테롤 분해능력이 있는 가장 우수한 균주를 분리하여 이 균주가 생산하는 콜레스테롤 분해 효소의 최적생산조건을 조사하였다. 일반 가정용 김치 10종과 젓갈류(오징어젓, 창난젓, 명란젓, 가자미식해, 어리굴젓, 전어젓) 18종으로부터 콜레스테롤 분해에 활성을 나타내는 총 75여종의 균주를 분리하였다. 90%이상 콜레스테롤을 분해할 수 있는 균주는 창난젓에서 3균주, 오징어젓에서 2균주 이었다. 그 중에서 콜레스테롤 분해능력이 가장 우수한 균주는 창난젓에서 분리한 3T6-5Mj였으며 이 균주를 선발하여 동정하였다. 이 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생태학적, 화학적 특성을 조사한 결과 호기성으로 그람양성의 간균과 구균이 동시에 관찰되었으며, Acid-fastness는 부분적으로 양성을 나타내었다. 그리고 세포막의 지방산 조성을 분석한 결과를 종합해볼 때 *Rhodococcus* 속으로 분류되었으며 따라서 본 균주에 대한 명명은 *Rhodococcus* sp. 3T6-5Mj로 하였다.

3T6-5Mj 균주에 의한 콜레스테롤 산화 효소의 생산 조건은 온도 30°C, pH 7.5이었으며 최적배지조성은 1.0 g/L NH₄NO₃, 1.0 g/L K₂HPO₄, 0.01 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.001 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 1 g/L NaCl, 20 g/L trypton, 1 g/L cholesterol, 5 g/L maltose 이었다. 이 조건에서 종균량 1%를 접종하여 배양하였을 때 시간에 따른 조효소의 최대 활성도는 140시간이었다.

참 고 문 헌

1. U. Schoemr, C. K. A. Martin (1980), Microbial Transformation of Sterols, *Biotech. and Bioeng.*, 22, 11~25.
2. Sohngen, N. L. (1913), *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt II*, 37, 595
3. M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, K. Arima (1969), Microbial Transformation of Sterols, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1644~1650.
4. K. Watanabe, H. Shimizu, H. Aihara, R. Nakamura, K. I Suzuki, K. Komagata (1986), Isolation and Identification of Cholesterol-degradation *Rhodococcus* strains from Food of Animal Origin and their Cholesterol Oxidation Activities, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 32, 137~147.
5. C. Y. Lee, C. D. Chen, W. H. Liu (1993), Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from Cholesterol Using Two-step Microbial Transformation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 447~452.
6. C. Y. Lee, W. H. Liu (1992), Production of androsta-1,4-diene-3, 17-dione from Cholesterol Using Immobilized Growing Cells of *Mycobacterium* sp. NRRLB-3683 Adsorbed on Solid Carrier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 598~603.
7. M. Smith, J. Zahnley, D. Pfeifer, D. Goff (1993), Growth and Cholesterol Oxidation by *Mycobacterium* Species in Tween 80 medium, *Appl. and Envir. Microbiol.*, 59, 1425~1429.
8. S. Ahmad, P. K. Roy (1991), Microbial Transformation of Steroids to C19-Steroids by *Rhodococcus equi*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 557~561
9. 이인애, 최용경, 이홍수, 최인성, 정태화 (1992), Cholesterol Oxidase를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소 생산에 관한 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 20, 395~400.
10. Martin, C. K. A (1984), Sterols, *Biotechnology : A Comprehensive Treatise in 8 volumes* (ed. H. J. Rehm. G. Reed), Vol. VI : *Biotransformations* (ed. K. Kieslich), 79~96.
11. Kieslich, K.(1985), Microbial Side-chain Degradation of Sterols, *J. Basic Microbiol.*, 25, 461~474.
12. Sih, C. J., H. H. Tai, Y. Y. Tsong (1967), The Mechanism of Microbial Conversion of Cholesterol into 17-ketosteroids, *J American Chem. Soci.*, 87, 1957~1958.
13. Talalay, P., V. S. Wang (1955), Enzymic Isomerization of Δ^5 -ketosteroids, *Biochem. Biophys. ATAC*, 18, 300~

- 301.
14. Srivastava, S. K., R. A. K. Srivastava, S. N. Mathur (1985), Biotransformation of Sugar-cane Sterols into Androsta 1,4-dione-3,17-dione(ADD) by *Arthrobacter globiformis* Str. *Oxydans*, *J. Applied Bacteriology*, 59, 399~402.
 15. Flegg, H. M. (1973), An Investigation of the Determination of Serum Cholesterol by Enzymatic Method. *Ann. Clin. Biochem.*, 10, 79~84.
 16. Cho, B. H. S. (1983), Improved Enzymatic Determination of Total Cholesterol in Tissues, *Clin. Chem.*, 29, 166~168.
 17. Pee, J. E. K. Spahis, C. Seillan (1990), Evaluation of Oxidative Degradation of Cholesterol in Food and Food Ingredients. *J. Agric. Food Chem.*, 38(4), 973~979.
 18. Richmond, W. (1973), Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from *Norcardia* sp. and Its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum, *Clin. Chem.*, 19, 1350~1356.
 19. M. Goodfellow (1979), Identification Methods for Microbiologists, *Academic Press, London*, 345~383.
 20. H. Fukuda, Y. Kawakami, 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.
 21. T. Uwajima, H. Yagi, S. Nakamura, O. Terada (1973), Isolation and Crystallization of Extracellular 3 β -Hydroxysteroids Oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp., *Agr. Biol. Chem.*, 37(10), 2345~2350.
 22. S. E. Grilliland, C. R. Nelson, C. Maxwell (1985), Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 377~381.
 23. J. L. Rasic, I. F. Vujicic, M. Skrinjar, M. Vulic (1992), Assimilation of Cholesterol by Some Cultures of *Lactic acid bacteria* and *Bifidobacteria*, *Biotechnol. Lett.*, 14, 39~44.
 24. J. L. Rasic, I. F. Vujicic, M. Skrinjar, M. Vulic (1992), Assimilation of Cholesterol in Milk by Kefir Cultures, *Biotechnol. Lett.*, 14, 847~850.
 25. S. V. Lee, H. I. Rhee, W. C. Tae, J. C. Shin, 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.
 26. W. Richmond (1973), Preparation and Properties of a Cholesterol oxidase from *Norcardia* sp. and its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum, *Clin. Chem.*, 19, 1350~1356.
 27. P. S. J. Cheetham, P. Dunnill, M. D. Lilly (1982), The Characterization and Interconversion of Three Forms of Cholesterol Oxidase Extracted from *Nordica rhodochrons*, *Biochem. J.*, 201, 515~521.
 28. S. E. Turfitt (1944), The Microbiological Degradation of Steroids, *Biochem. J.*, 38, 49~62.
 29. W. Liu, M. Meng, 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.
 30. W. Liu, J. Hsu, 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.
 31. Y. Shirokane, K. Nakamura, K. Mizusawa (1977), Purification and Some Properties of an Extracellular 3 β -Hydroxysteroid Oxidase Produced by *Corynebacterium cholesterolcum*, *J. Ferment. Technol.*, 55, 337~346.