

## 방선균 *Streptomyces* sp. No.4가 생산하는 Cholesterol Oxidase의 정제 및 특성

†김 현 수 · 고 희 선

계명대학교 자연과학대학 미생물학과  
(접수 : 1999. 3. 18., 게재승인 : 1999. 5. 3.)

### Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase Produced by *Streptomyces* sp. No.4

Hyun-Soo Kim† and Hee-Sun Ko

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea  
(Received : 1999. 3. 18., Accepted : 1999. 5. 3.)

The cholesterol oxidase(EC.1.1.3.6) produced from *Streptomyces* sp. No.4 which isolated from soil was purified and investigated for the enzymatic properties. The enzyme was purified specifically by cholesterol affinity column chromatography with a yield of 28.3%. The purified enzyme showed a single polypeptide on SDS-PAGE and the molecular weight was estimated to be 60,000 daltons. The enzyme activity was strongly inhibited by metal ions such as  $HgCl_2$  and  $CuSO_4$ . Dithiothreitol and mercaptoethanol inhibited the enzyme activity at concentration of 1mM. The Michaelis constant( $K_m$ ) for cholesterol was found to be 1.38mM by Lineweaver-Burk plot analysis. Amino acid analysis showed that the enzyme protein was composed of 416 amino acid residues including 52moles of glycine and 19moles of tryptophane.

Key Word : Cholesterol oxidase, purification, characterization, cholesterol affinity column chromatography

### 서 론

Cholesterol oxidase( $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase, 이하 COA로 표기함)는  $3\beta$ -hydroxy steroids의 산화 및 이성화를 촉매하는 효소로서 cholesterol(5-cholesten- $3\beta$ -ol)을 4-cholesten-3-one(cholestenone)으로 산화반응을 촉매한다. COA의 연구는 Turfitt의 steroid 분해 미생물에 관한 연구인 *Arthrobacter*속(1)에서 시작되어 1973년 Richmond(2)와 Flegg(3)에 의해 cholesterol oxidase(EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. COA를 생산하는 미생물은 *Pseudomonas*속(4,5), *Nocardia*속(2,6), *Arthrobacter*속(1), *Streptomyces*속(7), *Brevibacterium*속(8) 및 *Corynebacterium*속(9) 등 다양한 미생물에서의 생산이 보고되어 있다. 특히 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 COA는 Kamci(10)에 의해서 분리, 정제된 바 있으며, 최근에는 Murooka(11)에 의해 COA의 생합성 유전자의 cloning을 비롯하여 활발히 연구가 수행되고 있다. 국내에서는 이 등(12)이 토양에서 분리한 방선균에서 COA를 분리·정제한 보고와 Lee 등(5)의 *Pseudomonas* sp에서 효소의 분리·정제를 비롯하여 박

등(13)의 창란젓에서 분리한 *Rhodococcus* sp.으로부터 효소생산의 보고가 있으나 외국에 비해 연구가 미흡하다. COA는 임상적인 분야에서 혈중 cholesterol의 농도를 측정하는 지표가 되고 있어 동맥경화, 동맥협착증, 고혈압 예방에 기여할 수 있으며, 현재에는 COA의 유전자 연구가 활발히 이루어져 *Streptomyces* sp. SA-COO(14)의 경우, DNA-binding protein과 putative transmembrane을 코딩하는 cholesterol oxidase(*choA*)-cytochrome P450(*choP*)오페론의 upstream region의 아미노산이 분석되어 있으며, sequence 분석 결과 4개의 open reading frame을 소유하며, 유전자산물은 2개의 group으로 분석되어 repeating unit으로 구성되는 것으로 밝혀졌다. 한편 *Streptomyces* sp. A19249(15)에서의 구조유전자 *choM*이 살충 활성이 있는 COA를 코딩하며, 이 유전자는 *Escherichia coli*에서도 동일한 살충 활성을 가지는 효소로 발현되는 것으로 나타나 농업 분야에서 새로운 농약으로 주목을 받고 있다. 또한 COA의 반응에 의해 생성되는 cholestenone은 무색, 무미, 무취로 유지에 용해성이 우수하며 안정한 화합물로서 체지방의 축적을 억제하며, 혈중 lipoprotein의 농도를 저하시키는 기능이 발견되어 식품 분야에서는 치즈, 햄, 소시지 및 각종 유제품에 첨가하여 cholesterol 저감의 diet식품 및 비만의 예방제, 고 lipoprotein혈증, 비만증의 치료약 등으로서의 이용 가능성과 함께 산업적으로 넓은 응용면(16)이 예상되고 있다. 이같은 최근의 연구보고에서 COA의 새로운 기능면의 이용을 위해 대량생산 기술개발과 안정화방법 등이 연구 중에 있으며,

† Corresponding Author · Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea  
Tel 053-580-5284, Fax · 053-580-5164  
e-mail : hskim@kmucc.keimyung.ac.kr

biosensor에 이용을 위한 고정화 및 효소의 활성과 안정성을 위한 microencapsulation(17) 등의 보고에 비해 국내에서는 실용화를 위한 연구가 미흡하며 임상진단용시약으로 고가로 수입에 의존하고 있어서 사용면에서의 어려움이 많은 실정이다. 따라서 본 연구실에서는 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 COA는 *Pseudomonas fluorescens*나 *Nocardia erythropolis* 등이 생산하는 효소와 비교시 경제적 비용과 긴 효소의 stability(18)를 보이기 때문에 산업적 이용을 위한 대량생산에 관한 연구의 일환으로 토양에서 COA를 생산하는 *Streptomyces* sp. 방선균을 분리하여 속의 동정, 생산조건의 검토 및 일반적 특성을 보고하였으며(19), 본 논문에서는 분리균이 생산한 효소의 정제 및 효소학적 특성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용한 공시균주는 토양에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp. No.4(19)를 사용하였으며, ISP No. 2배지에서 7-10일간 배양후 사용하였다

### 조효소액의 조제

공시균의 배양은 7-10일 배양한 slant로부터 포자현탁액을 제조(≒ $10^8$  spore/ml)하여 기본 생육배지(glycerol 1%, corn steep liquor 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{NaNO}_3$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%, pH 7.0)에 0.1ml 접종한 후 28°C, 120rpm에서 36-48시간 전배양하여 사용할 때까지 -70°C에서 보존하였다. 조효소액의 조제는 사용배지에 전배양균을 3% 접종하여 28°C에서 5일간 전배양한 후 배양액을 여과지(Advantec Co. No.2)로 여과하여 균체를 제거한 다음 배양여액을 조효소액으로 사용하였다

### 효소 활성 측정

COA의 역가 측정은 공시균이 배양액중에 생산하는 melanin 색소의 영향을 고려하여 정제과정을 비롯한 색소의 존재시에는 Allain method(4)에 준하여 수행하였다 즉, 2μM 4-aminopyridine, 35μM phenol, 2,375units/l의 peroxidase (Sigma Co.)가 포함된 0.1M 인산완충액(pH 7.0) 1ml에 0.25ml의 효소 용액을 첨가하여 37°C에서 3분간 예열한 후 10% Triton X-100 (Merck Co.)에 13μmol/ml cholesterol(Sigma chemical Co)이 함유된 기질용액 0.05ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 다음, 반응액중에 생성된 quinoneimine dye는 흡광도 500nm에서 측정하였으며, COA의 활성은 37°C에서 1μmol의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 형성하는 효소의 양을 1 unit로 하여 산출하였다.

COA의 역가측정중 생산된 색소의 영향이 없는 경우는 Stadman method(20)를 이용하였다. 즉, 0.125M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.4ml에 효소 용액을 0.1ml 첨가하여, 37°C에서 3분간 예열한 다음, 12mM cholesterol이 함유된 isopropanol 25μl를 첨가하여 30분간 반응한 후 ethanol 2.0ml를 첨가하여 흡광도 240nm에서 측정하였다. COA 활성은 37°C에서 1μmol의 4-cholesten-3-one을 형성하는 효소량을 1unit로 산출하였다.

### 단백질 정량

정제과정중의 단백질 정량은 Bradford method(21)에 준한 protein assay kit(Bio rad Co.)를 사용하였으며, 표준단백질은 bovine serum albumin(Bio rad Co.)을 사용하였다.

### 효소의 정제

본 효소의 정제를 위해 생산최적매지 100ml (500ml 삼각플라스크 사용)에 전배양균을 3% 접종하여 동일배양조건하에서 5일간 배양하였다. 배양액을 여과지로 여과하여 균체를 제거한 후 배양여액을 조효소액으로 하여 효소를 정제하였다. 효소의 정제는 조효소액 1L에 황산암모늄을 50% 포화되게 첨가하여 4°C에서 3시간 방치 후, 12,000rpm에서(4°C) 15분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상등액을 80% 포화되게 황산암모늄을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 50~80% 포화 황산암모늄 희분을 동일조건에서 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 멸균수에 용해시켜 투석한 후 황산암모늄 침전확분으로 사용하였다. Cholesterol affinity column chromatography는 Kamei 등(10)의 방법에 따라 cholesterol(Sigma Co.) 10g을 증류수 100ml에 넣고 가열하여 침전시킨 다음 column(φ4×30cm)에 충전하여 10mM 인산완충액(pH 7.0)으로 평형화한 후, 투석한 황산암모늄 침전확분을 주입하였다. 효소 단백질의 용출은 사용 완충액으로 충분히 세척후 0.1% Triton X-100이 함유된 10mM 인산완충액으로 용출하여 tube당 3ml씩 분취하였다

### 전기영동

정제효소의 순도확인 및 분자량의 결정은 mini-gel kit (Hofer Co.)를 사용하여 12.5% SDS-PAGE(22)를 수행하였다. 단백질의 검출은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였으며, marker protein으로 phosphorylase b(M.W. 94,000), albumin(M.W. 67,000), ovalbumin(M.W. 43,000), carbonic anhydrase(M.W. 30,000), trypsin inhibitor(M.W. 20,100) 및 α-lactalbumin(M.W. 14,400)을 사용하였다.

### 기질농도에 따른 반응속도의 변화

본 효소의 기질농도에 따른 반응속도를 조사하기 위해 반응액중에 기질인 cholesterol을 10, 15, 20, 50, 100mM 되게 첨가하여 효소반응속도를 측정하였으며 Lineweaver-Burk plot을 통하여 Km치 및 Vmax를 산출하였다

### 금속이온의 영향

효소반응에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 반응액중에 각각의 금속이온 1mM을 첨가하여 효소활성을 측정하였다.

### 저해제의 영향

효소반응에 미치는 저해제의 영향을 조사하기 위해 반응액중에 각종 저해제를 1mM 농도로 첨가하여 효소활성을 측정하였다

### 아미노산 조성분석

정제효소의 아미노산 조성의 분석은 Biochrom-20(Pharmacia Co.)자동분석 장치를 이용하였으며 Bio 20 PEEK Sodium column(φ4.6 × 200mm)을 사용하여 분석하였다. 시료의 조제는 효소단백질 10μl(10μg)을 가수분해용 tube에 넣고 5.7N

HCl(Sigma Co.) 200  $\mu$ l을 첨가한 후 용존산소를 제거하고 110°C에서 24시간 가수분해하여 건조한 후 분석을 수행하였다. Tryptophane의 분석은 4N methane sulfonic acid(Sigma Co.)를 사용하여 동일조건에서 48시간 가수분해하여 분석을 수행하였다.

**실험결과 및 고찰**

**Cholesterol oxidase의 분리 및 정제**

공시균이 생산하는 COA를 분리하기 위하여 최적 생산배지에서 배양한 배양여액을 조효소액으로하여 효소를 정제하였다. 조효소액 1L(0.838 units/mg)를 0~50% 및 50~80% 황산암모늄으로 포화시켜, 원심분리하여 얻은 각 침전물을 소량의 멸균수에 용해하여 멸균 증류수로 투석한 후(50~80%획분; 2.57 units/mg) 정제를 수행하였다. 이들 획분중 0~50%획분은 불안정하여 정제후 급속히 실활되어(결과 미계재) 50~80% 침전획분을 사용하여 cholesterol affinity column에 흡착시켜 0.1%

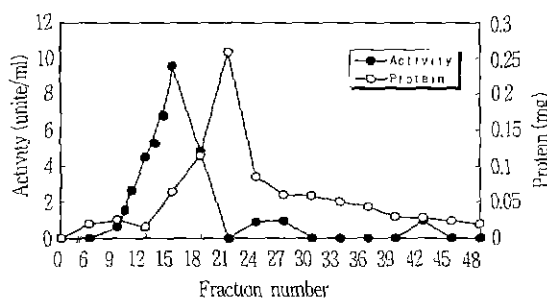


Figure 1. Affinity column chromatography of the cholesterol oxidase on cholesterol column.

The concentrated solution(2.57umts/mg) from 50~80% saturation of ammonium sulfate was applied to cholesterol affinity column. After washing with water, protein was eluted with 0.1% Triton X-100 at a flow rate of 5 sec/drop. Protein concentration was determined by Bradford method

Table 1. Summary of purification of the cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. No. 4.

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (Fold)	Yield (%)
Culture broth	155.0	130.0	0.838	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (50~80%)	18.95	48.75	2.57	3.0	37.5
Cholesterol column	1.60	36.75	22.96	27.4	28.3

Triton X-100이 함유된 10mM 인산완충액(pH 7.0)으로 단백질을 용출하였다. 용출한 각 fraction(3ml/tube)의 효소활성을 측정된 결과, Figure 1에서 나타난 바와 같이 COA의 활성은 fraction number 10~18에서 우수하였으나 용출 단백질의 양이 많은 19~23획분은 활성을 보이지 않았다. 이 결과에서 19~23획분의 단백질은 불순단백질 및 실활된 변성단백질로 추정되어 활성이 우수한 10~18획분을 모아 amicon ultrafiltration kit로 농축하였다(22.96 umts/mg). 농축획분은 전기영동 및 HPLC를 통하여 정제를 확인하였다. 정제된 COA는 Table 1에서와 같이 정제도는 27.4배이고, 회수율은 28.3%를 나타내었으며 cholesterol affinity column이 우수한 정제효과를 나타내었다.

**전기영동 및 분자량 측정**

본 정제 효소의 정제도 및 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli(22)의 방법에 준하여 12.5% SDS - polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다. Figure 2(Lane E)에서와 같이, 본 정제효소는 단일 band를 나타내어 monomer인 단일 단백질로 정제되었다. 본 효소의 분자량을 측정된 결과, Figure 3에서와 같이 약 60,000dalton정도인 것으로 추정되었다. 이 결과는 Kamei 등(10)의 *Streptomyces violascens*가 생산하는 COA의 분자량이 61,000dalton라는 보고와 이 등(12)의 *Streptomyces* sp. HSL613이 생산하는 효소의 분자량이 59,500dalton라는 보고와 비슷하였으나 Inouye 등(23)이 보고한 다른 방선균속인 *Streptovorticillium cholesterolicum*유래의 분자량 56,000dalton인 효소와는 다소 차이를 보였다 또한 방선균 이외의 다른 균이 생산하는 효소의 분자량으로 Shirokane 등(24)의 57,000, Lee 등(5)의 56,000, Fukuyama 등(25)의 55,000, 박 등(13)의 52,000, Uwajima 등(8)의 31,000dalton보다 다소 큰 분자량을 나타내었다. 또한 본 정제효소의 순도를 검정하기 위해 gel filtration column(TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>, Tosoh Co.)을 이용한 HPLC(Shimadzu LC-10A)에서 분석한 결과 retention time 11.503분에 단일의 peak로서 검출(Figure 4)되어 단일 단백질로 정제되었다고 추정되었다.

**효소활성에 미치는 기질농도의 영향**

본 효소의 기질농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 cholesterol의 농도를 10, 15, 20, 50, 100mM로 조정하여 효소반응을 수행하여 Lineweaver - Burk plot를 이용하여 분석하였으며 (Figure 5) Km치는 1.38mM, Vmax는 4.48mM/min인 것으로 나타났다.

**금속이온의 영향**

금속 이온이 본 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위해 각각의 금속이온 1mM 존재하에서 효소활성을 측정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이, 본 효소는 대부분의 금속이온에 의해 20~60%정도 실활되는 것으로 나타났으며 특히 1mM HgCl<sub>2</sub>에 의해 96% 이상의 효소활성이 저해되었다. 반면 Ca이온과 Zn이온의 존재시에는 20% 정도 활성이 촉진되었다. 이 결과는 이 등(12), Inouye 등(23)의 보고와 다소 차이를 보이나 Hg이온에 의한 COA에 대한 강력한 저해는 거의 모든 보고와 일치하였다.

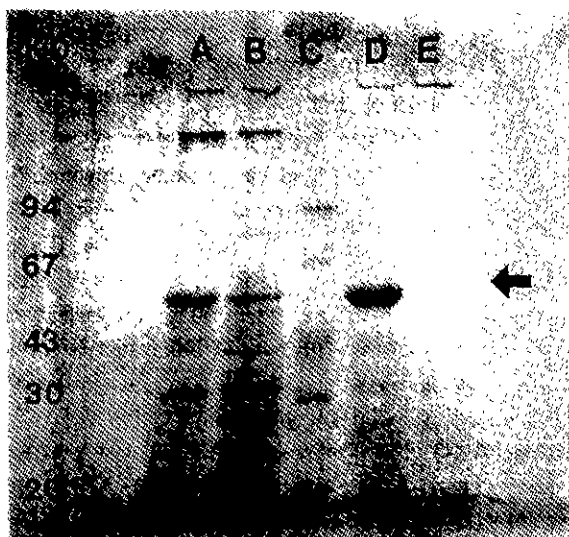


Figure 2. SDS - polyacrylamide gel electrophoresis of the cholesterol oxidase at the various purification steps.

SDS-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis was performed with protein of each purification step. The gel was stained with coomassie brilliant blue R-250.

Lane A, after 50% ammonium sulfate precipitation; Lane B, after 50%~80% ammonium sulfate precipitation; Lane C, standard protein, Lane D, after cholesterol column by 50% ammonium sulfate precipitation, Lane E, after cholesterol column by 50%~80% ammonium sulfate precipitation. The standard proteins and their molecular weight(M.W.) were as follows: phosphorylase b(M.W.94,000), albumin (M.W.67,000), ovalbumin(M.W.43,000), carbonic anhydrase (M.W.30,000), trypsin inhibitor(M.W.20,100),  $\alpha$ -lactalbumin (M.W.14,400).

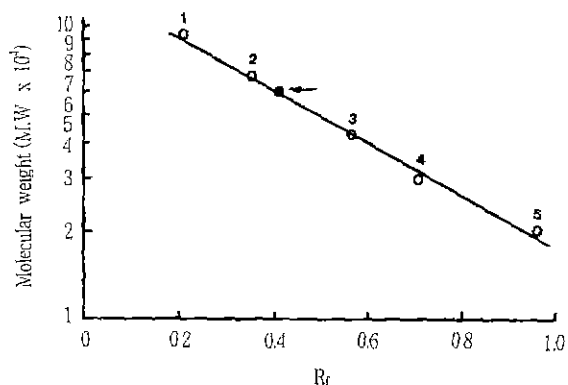


Figure 3. Determination of molecular weight of the purified cholesterol oxidase by SDS-PAGE.

The standard proteins and their molecular weight(M.W.) were as follows.

1. Phosphorylase b(M.W.94,000), 2. Albumin(M.W.67,000),
3. Ovalbumin(M.W.43,000), 4. Carbonic anhydrase(M.W.30,000),
5. Trypsin inhibitor(M.W.20,100). ○; standard protein, ●; purified cholesterol oxidase

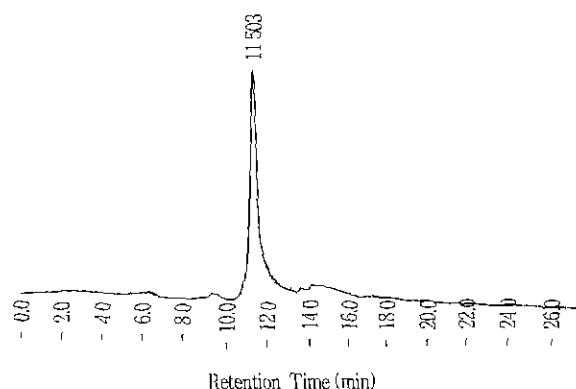


Figure 4. Elution profile of the purified cholesterol oxidase from HPLC using TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> column.

The elution was done on a molecular sieve column (TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>, Tosoh Co., 7.8 × 300mm) with 10mM phosphate buffer(pH 7.0) containing 0.2M NaCl at a flow rate of 0.8ml/min and detected at 280nm

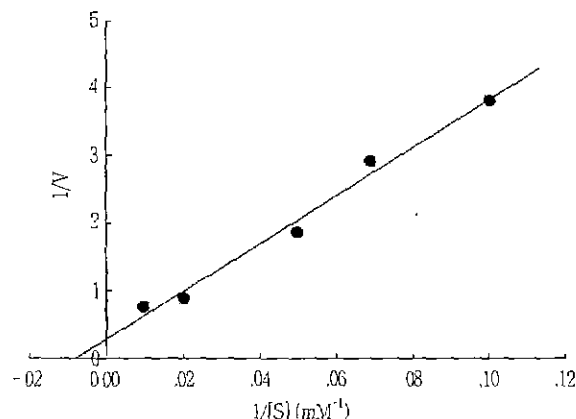


Figure 5. Determination of Km value for cholesterol oxidase by Lineweaver - Burk plot.

The used cholesterol concentrations were 10mM, 15mM, 20mM, 50mM and 100mM. Velocity(V) was expressed as specific activity(units/mg)

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

Metal ion(1mM)	Relative activity(%)
None	100.00
CaCl <sub>2</sub>	125.03
CdCl <sub>2</sub>	78.38
CuSO <sub>4</sub>	41.88
FeCl <sub>3</sub>	61.66
HgCl <sub>2</sub>	4.39
MnCl <sub>2</sub>	74.84
PbCl <sub>2</sub>	65.81
ZnSO <sub>4</sub>	118.92

The enzyme activity was measured by Stadtman method.

Table 3. Effect of inhibitors on the cholesterol oxidase activity.

Inhibitor(1mM)	Relative activity(%)
None	100.00
2,2'-bipyridine	137.94
Dithiothreitol	30.00
EDTA	124.35
Mercaptoethanol	12.69
Monoiodoacetate	135.12
<i>o</i> -phenanthroline	105.38
PMSF	121.28
Sodium azide	93.20
Trichloroacetate	86.28

The enzyme activity was measured by Stadtman method

Table 4. Amino acid composition of the purified cholesterol oxidase.

Amino acid	Number of residues per molecule	
	Found	Integral
Aspartic acid /Asparagine	11.6	12
Threonine	40.6	41
Serine	29.5	30
Glutamic acid	27.1	27
Proline	N.D	N.D
Glycin	51.5	52
Alanine	49.5	50
Cystine	31.4	31
Valine	20.7	21
Methionine	0.6	1
Isoleucine	0.7	1
Leucine	17.8	18
Tyrosine	26.8	27
Phenylalanine	14.7	15
Histidine	14.2	14
Lysine	33.4	33
Tryptophane <sup>1)</sup>	18.7	19
Arginine	23.8	24
Total		416

The results were obtained by assuming the molecular weight to be 60,000.

<sup>1)</sup>Estimated by 4N methane sulfonic acid hydrolysate

#### 저해제의 영향

본 효소의 활성부위의 특성을 조사하기 위해 각종 저해제의 첨가에 따른 효소의 활성을 검토하였다. 각 저해제 1mM이 존재시에 효소활성에 미치는 영향은 Table 3에 나타난 바와 같이 mercaptoethanol에 의해 88%, dithiothreitol의 존재시 70%의 저해를 받는 것으로 나타났으며, 다른 저해제의 존재시에는 효소활성에 거의 영향을 미치지 않거나, 20~30%의 활성 증가를 보였다. 이 결과에서 본 효소의 활성부위에는 disulfide bond가 존재하는 것으로 추정되며, chelating agent에는 저해가 나타나지 않은 점은 Shirokane 등(24)의 보고와 유사하나 COA가 EDTA에 다소 저해를 받는다는 이 등(12)의 보고나 iodine에

민감하게 저해 받는다는 Inouye(23)의 보고와 비교시 효소학적 특성이 다른 성질의 효소라고 추정되었다.

#### 정제효소의 아미노산 조성

본 정제효소의 아미노산 조성은 Table 4에서 보인 바와 같이 약 416개의 잔기로 추정되며 glycine, alanine, threonine의 함량이 높은 반면, methionine, isoleucine의 함량은 극히 낮았다. COA를 생산하는 균주의 아미노산 조성을 본 실험의 결과와 비교 할때 막 등(13)이 분리한 *Rhodococcus* sp. 경우 asp/asn, gln/glu, gly, Shirokane 등(24)이 분리한 *Corynebacterium cholestelicum*의 경우 asp, gly, 그리고 Fukuyama 등(25)이 분리한 *Schizophyllum commune*의 경우 asp, glu, gly, ala의 함량이 높다고 보고한 결과에서 glycine의 함량이 대부분 높은 것으로 사료되었다. 그러나 이들 실험의 결과로 아미노산 조성을 분석하는 것은 가수분해조건의 상이성에서 다소 차이가 있다고 사료되어 보다 정확한 N-terminal amino acid sequence 등을 통하여 계속 연구할 계획이다.

#### 요 약

토양에서 분리된 *Streptomyces* sp. 으로부터 cholesterol oxidase의 정제 및 효소학적 특성을 조사하였다. 본 효소의 정제는 50~80% 포화도의 황산암모늄 침전 및 cholesterol affinity column chromatography를 통하여 28.3%의 수율로 정제되었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드를 보였으며 분자량은 약 60,000 dalton으로 추정되었으며, HPLC분석 결과 단일의 peak로 검출되었다. 본 효소의 특성을 검토한 결과, 금속이온으로 Hg와 Cu의 존재시 크게 저해를 받았고, dithiothreitol과 mercaptoethanol과 같은 저해제에 의해서 상당히 실패되었다. 본 cholesterol oxidase의 Michaelis 상수는 cholesterol을 기질로하여 Lineweaver-Burk plot분석에서 1.38mM로 추산되었다. 정제효소의 아미노산 조성은 약 416개의 잔기로 추정되며 glycine, alanine, threonine의 함량이 높은 반면, methionine, isoleucine의 함량은 극히 낮았다.

#### 참 고 문 헌

- 1 Turfitt, G. E. (1944), The microbiological degradation of steroids. 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp., *Biochem. J.*, 38, 49-62.
- 2 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
- 3 Flegg, H. M. (1973), An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method, *Ann Clin Biochem.*, 10, 79-84
- 4 Allain, C. C., L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, and P. C. Fu. (1974), Enzymatic determination of total serum cholesterol, *Clin. Chem.*, 20, 470-475.
- 5 Lee, S. Y., H. I. Rhee, W. C. Tae, J. C. Shin, and B. K. Park. (1989), Purification and characterization of chole-

- sterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of strain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 542-546.
6. Weyman, A. E. (1974), Accidental hypothermia in an alcoholic population, *Am. J. Med.*, **56**, 13-21.
  7. Fukuda, H., Y. Kawakami, and S. Nagamura. (1973), A method to screen anticholesterol substance produced by microbes and a new cholesterol oxidase produced by *Streptomyces violascens*, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2057-2060
  8. 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.
  9. Tolalay, P. and M. M. Dobson (1953), Purification and properties of  $3\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **205**, 823-837.
  10. Kamei, T., Y. Takaguchi, 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**, 2799-2804.
  11. Murooka, Y., T. Ishizaki, O. Niimi, and N. Maekawa (1986), Cloning and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptomyces lividans* with plasmid pIJ 702, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1382-1385.
  12. Lee, H. S., S. C. Lee, T. J. Kwon, and T. W. Chung, (1992), Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by soil microorganism HSL613, *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 401-408.
  13. Park, S. H., H. S. Kim, Y. S. Lee, I. B. Kwon and U. H. Chun (1998), Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ isolated from Changran-jeot, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 195-202
  14. Molnar, I. and Y. Murooka (1993), Nucleotide sequence analysis of a region upstream of the cholesterol oxidase - cytochrome P450 operon of *Streptomyces* sp. SA-COO revealing repeating units coding for putative transmembrane and DNA-binding proteins, *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 257-264
  15. Corbin, D. R., J. T. Greenplate, E. Y. Wong, and J. P. Purcell (1994), Cloning of an insecticide cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts, *Appl Environ Microbiol.*, **60**, 4239-4244.
  16. Murooka Y (1996), Cholesterol oxidase. *Bioscience and Industry*, **54**, 16-22.
  17. Vasudevan, P. T. and T. Zhou (1996), Cholesterol oxidation by microencapsulated cholesterol oxidase, *Appl. Biochem. Bioeng.*, **59**, 1-7.
  18. Lolekha, P. H. and Y. Teerajetkul (1996), Optimization studies of components in enzymatic cholesterol regenis containing cholesterol oxidase from *Nocardia erythropolis*, *Streptomyces* sp. or *Pseudomonas fluorescens*, *J. Clin. Lab. Anal.*, **10**, 167-176.
  19. Kim, H. S. and H. S. Ko (1999), Production and characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces* No. 4, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 174-180.
  20. Stadtman, T. C., A. Cherkes, and C. B. Anfinsen (1954), Studies on the microbial degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **206**, 511-523.
  21. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
  22. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
  23. Inouye, Y., K. Taguchi, A. Fujii, K. Ishimaru, S. Nakamura, and R. Nomi (1982), Purification and characterization of extracellular  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptovercillum cholesterolicum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 951-958.
  24. Shirokane, Y., K. Nakamura, and K. Mizusawa (1977), Purification and some properties of an extracellular  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolium*, *J. Ferment. Technol.*, **55**, 337-346
  25. 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.