

## Bacillus megaterium SFO41에 의한 Cholesterol Oxidase의 생산 및 최적 배양 조건

김관필 · 이창호 · 우철주 · 박희동<sup>†</sup>  
경북대학교 식품공학부

### Study on the Production and the Culture Condition of Cholesterol Oxidase from *Bacillus megaterium* SFO41

Kwan-Pil Kim, Chang-Ho Rhee, Cheol-Joo Woo and Heui-Dong Park<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### Abstract

A novel strain of SFO41 producing a large amount of cholesterol oxidase as an extracellular enzyme isolated from Korean salt fermented foods. The strain was identified as *Bacillus megaterium* based on morphological, cultural and physiological characteristics. Experiments were carried out to optimize the condition of cholesterol oxidase production using *B. megaterium* SFO41. *B. megaterium* SFO41 was shown to give the maximum yield of cholesterol oxidase in the medium containing 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.03% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.02% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and 0.2% cholesterol. The optimum culture conditions, temperature, initial pH and agitation speed were 30°C, 7.0 and 150 rpm, respectively. The enzyme production reached a maximum level at 24 hr of cultivation (2.37 U).

**Key words:** extracellular cholesterol oxidase, *Bacillus megaterium* SFO41, producing conditions

#### 서 론

건강에 대한 관심이 증가함에 따라 최근 들어 임상 진단 용 kit에 효소적인 방법이 이용되고 있는데 이들 가운데 cholesterol을 산화시키는 효소인 cholesterol oxidase는 혈청 중에 존재하는 cholesterol의 농도를 측정하는데 사용되고 있다. Cholesterol은 성인병인 동맥경화, 동맥 협착증, 고혈압의 주된 원인이 되고 있어서, 혈청 중의 cholesterol 정량은 성인병을 예방할 수 있는 지침을 제공하므로 성인병 진단에 중요한 영역을 차지한다(1-6).

Cholesterol oxidase는 cholesterol을 산화시켜 cholestenone과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 촉매시켜 주는 효소로 cholesterol의 정량법(1,3,7,8)에 사용되는 중요한 임상용 효소 중의 하나이며, 또한 cholesterol oxidase는 유리형 cholesterol에 특이성이 있는 것이 아니라 β-위치에 수산기(hydroxyl group)를 가진 steroid 화합물, 즉 3β-hydroxy steroid를 기질로 사용하는 효소로서 1973년 Richmond(7)와 Flegg(3)에 의해서 cholesterol oxygen oxidoreductase(EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. 1944년 Turfitt(9)는 *Proactinomyces erythropolis*에서 추출한 효소를 사용하여 cholesterol로부터 Δ4-cholesten-3-one이 생성됨을 보고하였다. Schatz 등(10)은 *Mycobacterium*이

cholesterol을 산화할 수 있다는 사실을 보고하였으며, 이들의 세포 추출액이 cholesterol과 반응할 경우 Δ4-cholesten-3-one이 생성됨을 확인하였다. Cholesterol을 산화할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas* sp.(11), *Mycobacterium* sp.(12), *Nocardia* sp.(13-15), *Arthrobacter* sp.(16), *Streptomyces* sp.(17,18), *Brevibacterium* sp.(19,20), *Corynebacterium* sp.(21) 및 *Rhodococcus* sp.(22-24) 등이 연구 보고되었다.

Watanabe 등(24)은 탄소원으로서 cholesterol을 이용할 수 있는 16종류의 미생물 균주를 닭의 지방, 베이컨, 버터 등에서 분리하였으며, 이들 중 cholesterol 분해 활성이 가장 높은 균주는 *Rhodococcus erythropolis*에 속하는 균주로 동정하였고, 이 균주가 생산하는 효소는 intracellular enzyme 이라고 보고하였다. Fukuda 등(25)과 Uwajima 등(19,20)은 효소 생산 및 정제가 용이하며 생산 원가를 절감할 수 있는 방법으로 *Streptomyces violascens*와 *Brevibacterium stercorarium*을 선별하여 cholesterol oxidase를 분리·정제하여 효소의 특성에 대하여 보고하였다. Watanabe 등(23)은 동물성 식품에서 분리한 *Rhodococcus* sp. 균주가 생산한 cholesterol oxidase의 특성에 관하여 조사하였고, 이 효소는 extracellular enzyme이라고 발표하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author E-mail: hpark@knu.ac.kr  
Phone 82-53-950-5774. Fax: 82-53-950-5774

그러나 국내 연구로는 Choi 등(26)의 간헐적으로 첨가된 cholesterol로부터 미생물 전환에 의한 AD(androst-4-ene-3, 17-dione)의 생산, Lee 등(27)의 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 cholesterol oxidase의 정제와 특성, Lee 등(28)의 토양에서 분리한 미생물이 생산하는 cholesterol oxidase 배양 조건 및 Park 등(29)이 창란젓에서 분리한 미생물이 생산하는 cholesterol oxidase의 분리·정제 및 특성에 관한 연구 발표에 그치고 있다.

미국, 유럽 등의 지역에서는 cholesterol, wax 등과 같은 각종 스테롤류로부터 미생물을 이용하여 steroid 의약품의 전구 물질인 AD 및 ADD(androst-4-diene-3,17-dione)의 생산에 관한 연구는 거의 완벽하게 이루어져 있으며(30,31), 식품뿐만 아니라 체내의 cholesterol을 저하시킬 수 있는 assimilation 분야도 상당히 연구가 진척되어 있는 상태이나(32), 국내에서는 미생물을 이용한 cholesterol 분해에 관한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 특히 식생활의 서구화 경향으로 고콜레스테롤증으로 인한 각종 순환계 질병이 점차 증가하고 있는 상황에서 미생물을 이용한 cholesterol 대사에 관한 연구는 꼭 이루어져야 된다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 현재 우리의 식생활과 밀접한 관련이 있는 전통 발효 식품으로부터 cholesterol 분해능이 우수하며, 세포외 cholesterol oxidase를 생산하는 균주를 분리하여 동정한 후, 분리된 균주를 이용하여 효소의 최적 생산 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

Cholesterol oxidase를 생산하는 균주의 분리는 국내에 시판 중인 전통 발효식품 33종류(침채류와 젓갈류)를 수집하여 분리원으로 사용하였다. 시료를 멸균된 0.9% NaCl 용액에 적당량 희석한 상등액을 cholesterol을 유일 탄소원으로 함유한 분리 배지(0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 후, cholesterol 분해능이 우수한 100여 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 유일 탄소원으로 cholesterol을 함유한 액체 배지에 접종하여 cholesterol 분해력을 측정하여 cholesterol 분해력이 가장 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

### 균주의 동정

분리된 세균의 동정은 배양학적, 형태학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 색인(33)에 따라 동정하였다.

### Cholesterol 분해력 측정

Cholesterol의 분해력 측정은 Fiegg(3)와 Cho(2)의 효소

적 방법에 따라 잔존 cholesterol 함량을 측정하여 계산하였다. 분리한 각각의 균주는 콜레스테롤 분해력 측정용 배지(0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 10 mL에 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다. 효소적 측정 방법은 상기의 균주 배양액을 80°C 3분간 가열한 후, vortex mixer로 1분간 혼합하였다 이 액을 isopropanol로 10배 희석하여 잔존 cholesterol 양을 test kit (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 이용하여 측정하였다. 이때 흡광도 측정은 분광광도계(UV-161, Shimadzu, Japan)를 파장 405 nm으로 조정하여 콜레스테롤 표준품(Aldrich Co., USA)을 이용하여 표준곡선을 작성하여 cholesterol량을 계산하였다.

### Cholesterol oxidase 활성측정

Richmond의 방법(7)에 따라 콜레스테롤이  $\Delta^4$ -Cholestenone으로 전환되는 속도를 240 nm에서 흡광도의 증가율로 측정하였다. 30°C 항온 수조에서 0.05% triton X-100을 함유하는 0.1 M sodium phosphate 완충 용액(pH 7.0) 3.0 mL와 50  $\mu\text{L}$ 의 효소 조제액을 cuvette에 첨가한 다음, 상기의 용액에 6 mM이 되도록 isopropanol에 용해한 cholesterol을 기질로 50  $\mu\text{L}$  첨가하여 혼합한 후, 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다( $\Delta A$ ).  $\Delta^4$ -Cholestenone의 molar absorptivity( $\epsilon$ )는  $12.2 \times 10^3$  liter/mole·cm였다. 따라서 cholesterol oxidase의 activity는 다음과 같이 계산하였다.

$$\frac{\Delta A \times 0.082 \times \text{반응 Volume}}{\text{효소액의 Volume}} = \frac{\Delta A \times 0.082 \times 3.1 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}} = 51 \times \Delta A$$

효소 활성도는 반응 온도가 30°C일 때 1  $\mu\text{mol}$ 의 cholesterol을 1분 동안에 산화시키는 양을 효소 역가 1 unit로 표시하였다.

### 균 증식도 측정

균 증식도를 측정하기 위하여 배양액을 분광 광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 선별

우리 나라 전통 발효 식품(침채류와 젓갈류)으로부터 cholesterol을 분해능이 있는 100여 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주를 cholesterol을 함유한 액체 배지에 접종하여 배양한 후, 잔존 cholesterol의 양을 측정하여 cholesterol 분해능이 우수한 10개의 균주를 재 선별하여 이들 균주의 cholesterol 분해능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 그 결과, 10개 균주의 cholesterol 분해능은 대부분 80% 이상이었으며, 이들 10개의 균주 중 어리굴젓에서 분리한 균주인 SFO 41의 cholesterol 분해능이 96.8%로 가장 우수하여 SFO41을 효소 생산 조건을 최적화 하기 위한 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

Table 1. Cholesterol degrading ability of isolated microorganisms from traditional fermented foods

Strains <sup>1)</sup>	Cholesterol degradation (%)
SFS50	84.4
SFH80	86.9
SFC111	85.9
SFU16	84.8
SFR171	85.8
SFQ372	90.5
SFA202	86.6
SFG211	86.7
SFP35	86.5
SFO41	96.8

<sup>1)</sup>SFS, salt-fermented sea-squirts; SFH, salt-fermented herring roe; SFC, salt-fermented clam; SFU, salt-fermented urchin; SFR, salt-fermented crab; SFQ, salt-fermented squid; SFA, salt-fermented anchovies; SFG, salt-fermented gills of fish; SFP, salt-fermented pollackroe; SFO, salt-fermented oyster.

균주의 동정

Cholesterol 분해능이 가장 우수한 균주 SFO41 균주의 생리학적 성질을 조사한 결과(Table 2), Gram 염색시 양성으로서 운동성은 없었으며 내생포자를 형성하였다. Catalase 시험, oxidase 시험시 양성, VP 시험, methyl red 시험, indole 시험시 음성, gelatin 액화능과 전분 분해성이 존재하였다. 그리고 구연산을 이용하였으며, urease 시험시 음성이 나타났다. Glucose, arabinose, xylose, mannitol을 탄소원으로 첨가하였을 때 산을 생성하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과(Table 3), glucose, fructose, maltose, sucrose, cellobiose 및 arabinose 등을 이용하였으나, trehalose, erythritol, dul-

Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated strain SFO41

Morphological characteristics	
Form	Rods
Size	0.5~1.0×1.6~2.5 μm
Gram stain	+ <sup>1)</sup>
Mobility	-
Spore formation	+
Physiological characteristics	
Catalase	+
Methyl red test	-
V-P test	-
V-P test (below pH 7.0)	-
Indole production	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Utilization of citrate	+
Hydrogen sulfide production	+
Gas from glucose	-
Urease test	-
OF test	Fermentation
Oxidase test	+
Pigment production	-
Optimum growth temperature	25~35°C
pH	4.0~10.0
Acid from glucose	+
Growth in 5% NaCl	d

<sup>1)</sup>+, positive; d, weak; -, negative.

Table 3. Carbon utilization of isolated strain SFO41

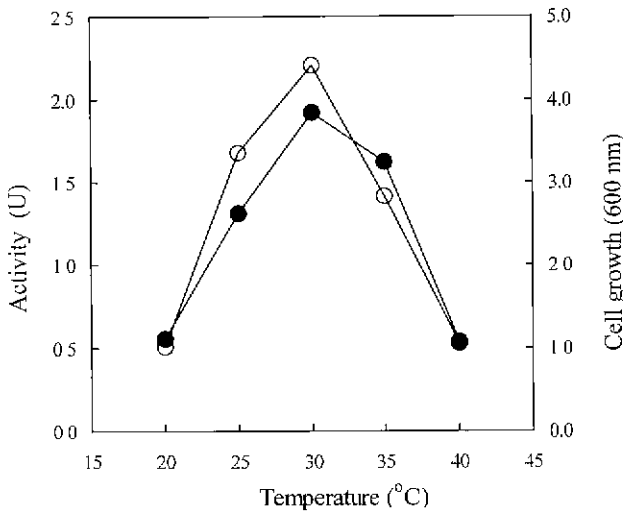
Carbon utilization	
Cellobiose	+ <sup>1)</sup>
Dextrin	d
Trehalose	-
Arabinose	d
Raffinose	+
Xylitol	-
Arbutin	+
Erythritol	-
Dulcitol	-
Ribose	+
Maltose	+
Galactose	+
Adonitol	-
Rhamnose	-
Fructose	+
Mannitol	d
Inositol	-
Glucose	+
Xylose	d
Sucrose	+
Sorbitol	+
Lactose	+
Melibiose	-
Methanol	-
Ethanol	-
Glucosamine	d
Glycine	+
Salicine	d
Succinate	-
Gluconic acid	+

<sup>1)</sup>+, positive; d, weak; -, negative.

citol, adonitol 및 rhamnose 등의 탄소원들은 이용하지 못하였다. 이상의 형태 및 생리학적 특성을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(33)에 기술된 분류 기준에 따라 동정한 결과 *Bacillus megaterium* 또는 그 유연균으로 동정되어 분리균을 *Bacillus megaterium* SFO41로 명명하였다.

배양온도에 따른 효소생산

*B. megaterium* SFO41의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지에 균을 접종한 후 20, 25, 30, 35 및 40°C 등의 각 온도에서 150 rpm으로 24시간 배양하여 균 증식도를 측정하는 다음, 배양액을 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 1) 그 결과, 배양 온도가 30°C일 때 cholesterol oxidase의 활성은 1.92 U로 가장 높게 나타났으며 균체 성장 또한 30°C일 때 가장 우수하였다. 이러한 결과는 Lee 등(28)이 cholesterol oxidase의 생산 균주로 분리한 *Streptomyces* sp.가 30°C에서 효소의 생산이 가장 우수하였다는 보고와 Watanabe 등(23,24)이 분리한 *Rhodococcus equi* No. 23균주는 30°C에서 효소의 생산이 가장 우수하였다는 보고와 비슷하였다. 젖갈류에서 분리된 균주는 저온 발효를 하기 때문에 대부분의 균



**Fig. 1. Effect of temperature on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41.**  
After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various temperature for 24 hr on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed. The cholesterol medium is composed of 0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.0001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.025% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.025% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. ○—○, Cell growth, ●—●, Activity.

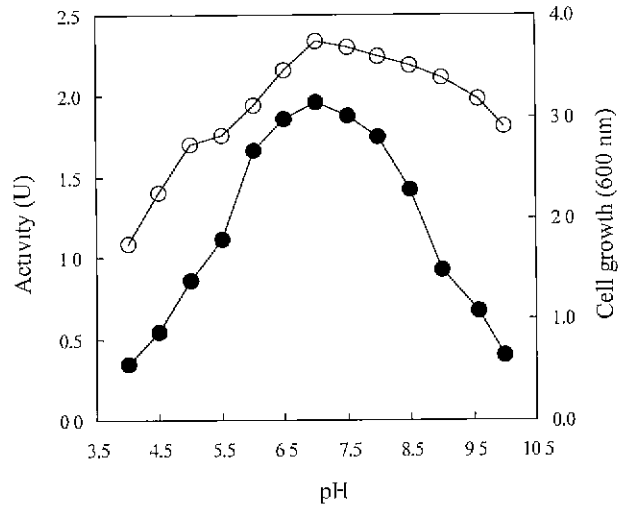
주가 30~45°C에서 활성이 좋은 것으로 보고되어 있고, 본 균주도 젓갈류인 어리굴젓에서 분리한 균주이므로 저온 발효시 낮은 온도에 적응되었기 때문에 최적 온도는 약 30°C 전후인 것으로 생각된다.

**pH에 따른 효소생산**

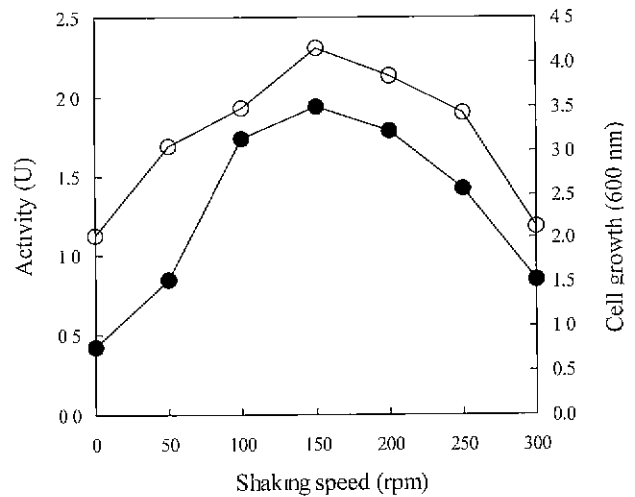
*B. megaterium* SFO41의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지의 초기 pH를 4.0에서 10.0까지 0.5 간격으로 조정하여 30°C에서 150 rpm으로 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과, 초기 pH가 증가함에 따라 cholesterol oxidase의 활성도 증가하여 초기 pH가 5.0~9.0일 때 cholesterol oxidase의 활성이 1.0 U 이상으로 비교적 높게 나타났으며, 초기 pH가 7.0일 때 cholesterol oxidase의 활성이 2.0 U로 가장 높게 나타났다. 균체 성장 또한 cholesterol oxidase의 활성과 마찬가지로 초기 pH가 7.0일 때 가장 우수하였다.

**진탕 속도에 따른 효소생산**

진탕 속도에 따른 *B. megaterium* SFO41의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장의 변화를 조사하기 위하여 회전식 진탕 배양기의 회전 속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250 및 300 rpm으로 조정하여 진탕 배양하였다. 배양 조건은 초기 pH 7.0 및 배양 온도 30°C에서 24시간 진탕 배양하여 원심 분리한 후, 배양 상정액의 cholesterol 분해 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, 최대 cholesterol oxidase의 생



**Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41.**  
After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various initial pH at 30°C for 24 hr on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed. The cholesterol medium is composed of the same as Fig. 1. ○—○, Cell growth; ●—●, Activity



**Fig. 3. Effect of shaking speed on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41.**  
After bacteria were cultured in a cholesterol medium at various shaking speed at 30°C for 24 hr on the shaker, cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed. The cholesterol medium is composed of the same as Fig. 1. ○—○, Cell growth; ●—●, Activity.

산은 진탕 속도가 150 rpm일 때 1.94 U로 가장 높게 나타났으며, 균체 성장 또한 150 rpm일 때 가장 우수하였다. 그리고 진탕 속도가 150 rpm보다 느리거나 빠를수록 cholesterol oxidase의 생산은 감소하는 것으로 나타났다.

**Cholesterol 농도에 따른 효소생산**

*B. megaterium* SFO41의 cholesterol 분해 효소의 생산과 균체 성장에 미치는 초기 cholesterol 농도의 영향을 조사하

기 위하여 cholesterol 배지에 cholesterol의 최종 농도를 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25%, 0.30%, 0.35%, 0.40%, 0.45% 및 0.50%로 각각 조정하여 30°C에서 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과, cholesterol의 초기 농도가 0.20%일 때 효소의 활성이 1.91 U로 가장 높게 나타났다. 또한 0.05%~0.20%까지는 효소의 활성이 증가하였으나, 0.20% 이상의 농도에서는 효소의 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 균체 성장에 미치는 cholesterol의 최적 농도는 cholesterol의 농도가 0.25%일 때 가장 우수하여 cholesterol oxidase의 활성과 균체 성장에 미치는 cholesterol의 농도가 일치하지 않음을 알 수 있었다.

**효소의 생산조건**

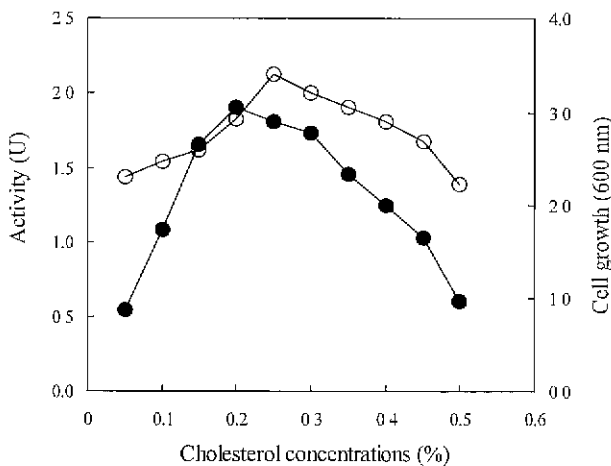
Cholesterol oxidase의 생산에 미치는 영양소들의 영향을 알아보기 위하여 탄소원, 질소원 및 무기성분의 종류와 농도를 각각 다르게 하여 실험한 후 cholesterol oxidase 생산에 적합한 배지 조성을 조사하였다.

**탄소원의 영향** : 효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 먼저 glucose의 농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 조정하여 실험을 한 결과 2.0%일 때 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 탄소원의 농도를 2.0%로 하여 기본 배지에 탄소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30°C에서 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정할 결과, glucose를 첨가한 실험구에서 cholesterol oxidase의 활성이 1.97 U로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 rhamnose(1.96 U), sucrose(1.92 U), ribose(1.69

U), maltose(1.59 U), mannitol(1.57) 순으로 생산성이 높게 나타났다. Fructose, raffinose, galactose, arabinose 등이 첨가된 배양액(1.26 U~1.33 U)은 glucose 첨가구에 비해 약 65% 정도밖에 생산하지 못하였고, 특히 soluble starch, inulin, xylose를 첨가한 경우에는 cholesterol oxidase의 생산성이 매우 낮았다(0.39 U~0.73U). 이와 같은 결과로 볼 때 cholesterol oxidase의 생산성을 위한 탄소원으로는 glucose, rhamnose 및 sucrose 등이 효과적이라고 판단되어, 본 실험에서는 탄소원 이용율과 cholesterol oxidase의 활성이 가장 우수한 탄소원으로 밝혀진 glucose를 사용하였다.

**질소원의 영향** : 효소 생산에 미치는 유기 질소원의 영향을 조사하기 위하여 먼저 yeast extract의 농도를 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 3.0, 5.0%(w/v)로 조정하여 실험을 한 결과, 0.5%일 때 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 유기 질소원의 농도를 0.5%로 하여 기본 배지에 질소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30°C에서 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정할 결과, 실험에 사용한 유기 질소원 중에서 yeast extract를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 활성이 1.91 U로 가장 높게 나타났으며, tryptone(1.79 U)>peptone(1.62 U)>soytone(1.59 U)>beef extract(1.45 U)>polypeptone(1.37 U)>casamino acid(1.26 U)>skim milk(1.15 U) 순서로 높게 나타났다. 그러나 실험에 사용한 유기 질소원 중에서 malt extract의 경우에 효소의 활성이 0.48U로서 yeast extract를 첨가한 경우와 비교시 약 25% 정도의 효소 활성을 나타내었다.

**무기 성분의 영향** : *B. megaterium* SFO41의 cholesterol oxidase의 생산에 미치는 각종 무기 성분의 영향을 조사하기 위하여 cholesterol 배지(cholesterol 0.1%, yeast extract 0.5%)에 각종 무기 성분의 최종 농도를 다르게 첨가하여 30°C에서 24시간 배양하여 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 상정액의 cholesterol oxidase의 활성을 측정할 결과는 Table 4와 같다. 그 결과, 실험에 사용한 무기 성분 중에서 magnesium sulfate를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 활성이 가장 높게 나타났으며 농도는 0.03%일 때 효소의 활성이 1.91 U로 가장 높게 나타났다. 그 다음으로는 dipotassium hydrogen phosphate와 ammonium nitrate를 첨가한 실험구에서 각각의 농도가 0.02%와 0.2%에서 효소의 활성이 각각 1.90 U와 1.86 U로 비교적 높게 나타났다. 그리고 그의 sodium chloride, ammonium sulfate, ferrous sulfate, calcium chloride를 첨가한 경우 cholesterol oxidase의 활성을 대조구와 비교시 비슷한 활성을 나타내거나 효소활성을 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Lee 등(28)이 보고한 연구 결과와 비교시 dipotassium hydrogen phosphate는 효소 활성에 미치는 영향이 비슷한 결과를 나타내었으나, 나머지 무기염들은 서로 상반된 결과를 나타내었다.



**Fig. 4. Effect of cholesterol concentrations on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41.** The bacteria were cultured in the cholesterol medium supplement with various concentrations of cholesterol. Cell growth and cholesterol oxidase activity were assayed. The cholesterol medium is composed of 0.5% yeast extract, 0.0001% FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.025% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.025% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. ○—○, Cell growth; ●—●, Activity.

Table 4. Effects of various inorganic compounds on the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41

Inorganic compound	Concentration (%)	Cell growth (600 nm)	Activity (U/mL)
Ammonium nitrate	0.05	3.56	1.56
	0.10	3.53	1.60
	0.15	3.34	1.65
	0.20	3.68	1.86
	0.30	3.77	1.44
Dipotassium hydrogen phosphate	0.010	3.01	1.44
	0.015	3.01	1.59
	0.020	3.34	1.90
	0.025	3.56	1.77
	0.030	3.57	1.59
	0.030	3.57	1.59
Sodium chloride	0.05	3.96	1.60
	0.10	3.68	1.70
	0.15	3.75	1.60
	0.20	3.76	1.54
	0.30	3.34	1.49
Ammonium sulfate	0.10	3.99	1.49
	0.20	3.75	1.69
	0.30	3.49	1.49
	0.40	3.20	1.30
Magnesium sulfate	0.01	3.59	1.69
	0.02	3.82	1.83
	0.03	3.87	1.91
	0.04	3.92	1.74
Ferrous sulfate	0.001	3.90	0.98
	0.002	4.25	1.21
	0.003	4.43	1.51
	0.005	4.18	1.49
Calcium chloride	0.005	3.72	1.04
	0.010	3.68	1.20
	0.015	3.90	1.49
None	0.020	3.38	1.33
	None	3.29	1.48

The bacteria were cultured at 30°C for 24 hr in a liquid medium containing 0.5% yeast extract, 0.1% cholesterol. Cholesterol oxidase activity of the culture supernatant was determined by Richmond's method.

#### 배양 시간의 영향

이상에서 검토한 최적 배지 조성(cholesterol 0.2%, yeast extract 0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03%,  $K_2HPO_4$  0.02%,  $NH_4NO_3$  0.2%, cholesterol 0.2%)과 최적 배양 조건에서 균주의 생육과 효소의 생산을 경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. 그 결과, 균의 생육은 배양 27시간일 때 최고의 생육을 나타내었으며, 효소의 활성은 배양 24시간일 때 2.37 U로 가장 높게 나타났으며 그 이후의 시간에는 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Lee 등(28)이 보고한 cholesterol oxidase 생산 균주인 *Streptomyces* sp.가 100시간이 경과하여야 효소의 활성을 나타내었다는 보고와 Liu 등(34,35)이 *Arthrobacter simplex*, Ahmad와 Roy(36) 및 Watanabe 등(23)의 *Rhodococcus equi*와 Uwajima 등(20)의 *Brevibacterium sterolicum*이 생산하는 cholesterol oxidase의 생산 조건으로 평균 4일 이상 배양시키는 결과보다 빠른 시간내에 효소의 생산성을 나타내었다. 또한 cholesterol oxidase의 활성은

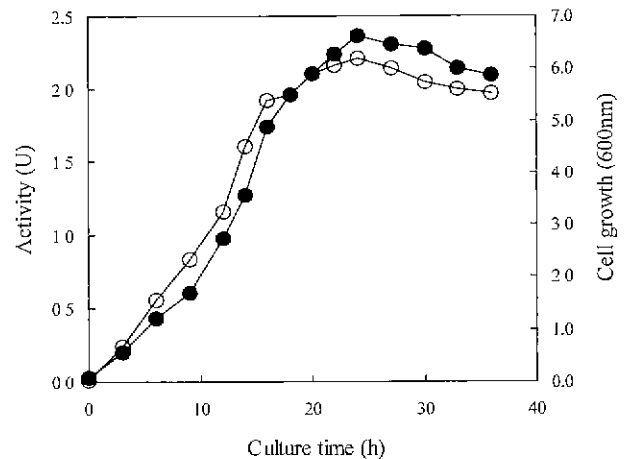


Fig. 5. Time course of the cell growth and cholesterol oxidase activity of *B. megaterium* SFO41.

Optimum culture conditions, temperature, initial pH and agitation speed were 30°C, 7.0 and 150 rpm. The cholesterol medium is composed of 0.2% cholesterol, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose, 0.2%  $NH_4NO_3$ , 0.02%  $K_2HPO_4$ , 0.03%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

○—○, Cell growth; ●—●, Activity

Park 등(29)이 *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ가 생산하는 효소의 활성이 0.29 U, Suh 등(37)이 보고한 *Bacillus sphaericus*가 생산하는 효소의 활성이 0.05 U, Liu 등(34,35)이 보고한 *Arthrobacter simplex*가 생산하는 효소의 활성이 1.5 U보다는 활성이 높게 나타났으며, Lee 등(28)이 보고한 *Streptomyces* sp.이 생산하는 cholesterol oxidase의 활성이 8.5 U보다는 낮은 활성을 나타내었다.

#### 요 약

우리나라 전통 발효식품(침채류 및 젓갈류)으로부터 cholesterol oxidase 생산성이 있는 균주를 분리하고 이들 분리된 균주들로부터 여러 단계의 균주 선별시험을 통하여 cholesterol oxidase 생산성이 우수한 미생물을 선별하여 그 특성을 조사하였다. Cholesterol oxidase의 생산성이 가장 우수한 SFO41의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류기준에 따라 동정한 결과 *Bacillus megaterium* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리균을 *Bacillus megaterium* SFO41로 명명하였다. Cholesterol oxidase의 생산 조건을 검토한 결과 최적 배지 조성은 2.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.03%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02%  $K_2HPO_4$ , 0.2%  $NH_4NO_3$ , 0.2% cholesterol로 판명되었으며, 배양 조건은 30°C, 초기 pH 7.0, 진탕 속도는 150 rpm에서 24시간 배양 시 효소 생성이 가장 우수하였다(2.37 U).

#### 문 헌

1. Allian, C.C., Poon, L.S., Richmond, W. and Fu, P.C. Enzy-

- matic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, **20**, 470-475 (1974)
2. Cho, B.H.S. : Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues. *Clin. Chem.*, **29**, 166-168 (1983)
  3. Flegg, H.M. : An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann Clin. Biochem.* **10**, 79-84 (1973)
  4. Rehak, N.N. and Young, D.S. Enzymatic determination of free and esterified cholesterol in serum by microcalorimetry. *Clin Chem*, **28**, 2235-2240 (1982)
  5. Sidel, J, Hagele, E.O., Ziegenhorn, J. and Wahlefeld, A.W. : Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin. Chem.* **29**, 1075-1080 (1983)
  6. Smith, A.G. and Brooks, C.J.W. : Application of cholesterol oxidase in the analysis of steroids. *J. Chromatogr.* **101**, 373-378 (1974)
  7. Richmond, W. 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 (1973)
  8. Weyman, A.E. : Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.*, **56**, 13-21 (1974)
  9. Turfitt, G.E. : The microbiological degradation of steroids 2 Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**, 49-62 (1944)
  10. Schatz, A., Savard, K and Pinter, I.J. : The ability of soil microorganisms to decompose steroids. *J. Bacteriol.*, **58**, 117-120 (1949)
  11. Talalay, P. and Dobson, M.M. : Purification and properties of a  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **205**, 823-837 (1953)
  12. Stadtman, T.C., Cherkes, A. and Anfinsen, C.B. : Studies on the microbiol degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **206**, 511-523 (1954)
  13. Buckland, B.C., Lilly, M.D. and Dunnill, P. The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by *Nocardia rhodocrous*. *Biotechnol Bioeng.* **18**, 601-621 (1976)
  14. Sh. C.J and Wang, K.C. : Mechanism of steroid oxidation by microorganism. *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 1387-1391 (1965)
  15. Turfitt, G.E. : Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.*, **54**, 557-562 (1947)
  16. Arima, K., Nagasawa, M., Bae, M. and Tamura, G. : Microbiol transformation of sterols. I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **22**, 1636-1643 (1969)
  17. Kamei, T., Takiguchi, Y., Suzuki, H. and Nakamura, S. : Purification of  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **26**, 2799-2804 (1978)
  18. Tomioka, H., Kagawa, M. and Nagamura, S. : Some enzymatic properties of  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens*. *J. Biol. Chem.*, **79**, 903-915 (1976)
  19. Uwajima, T., Yagi, H., Nagamura, S. and Terada, O. : Isolation and crystallization of extracellular  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterohicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2345-2350 (1973)
  20. Uwajima, T., Yagi, H. and Terada, O. : Properties of crystalline  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterohicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1149-1156 (1974)
  21. Shirokane, Y., Nakamura, K. and Mizusawa, K. : Purification and some properties of an extracellular  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 337-342 (1977)
  22. Krent, J., Lefebvre, G. and Germain, P. : Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp cells production and extraction. *J. Biotechnol.*, **33**, 271-282 (1994)
  23. Watanabe, K., Aihara, H., Nakagawa, Y. and Sasaki, T. : Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1178-1182 (1989)
  24. Watanabe, K., Shimizu, H., Aihara, H., Nakamura, R., Suzuki, K.I. and Momagata, K. : Isolation and identification of cholesterol-degradation *Rhodococcus* strains from animal origin and their cholesterol oxidase activities. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 137-147 (1986)
  25. Fukuda, H., Kawakami, Y. and Nagamura, S. : A method to screen anticholesterol substances produced by microbes and a new cholesterol oxidase produced by *Streptomyces violascens*. *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2057-2060 (1973)
  26. Choi, S.K., Kim, H.S. and Park, Y.H. : Microbiol conversion of cholesterol to 4-androstene- $3,17$ -dione by intermittent addition of substrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 187-192 (1988)
  27. Lee, S.Y., Rhee, H.I., Tae, W.C., Shin, J.C. and Park, B.K. : Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of the strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 542-546 (1989)
  28. Lee, I.A., Choe, Y.K., Lee, H.S., Choe, I.S. and Chung, T.W. : Studies on the isolation of cholesterol oxidase producing soil microorganism and the culture condition for the production of high activity cholesterol oxidase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**, 395-400 (1992)
  29. Park, S.H., Kim, H.S., Lee, Y.S., Kwon, I.B. and Chun, U.H. : Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ isolated from Changran-jeot. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 195-202 (1998)
  30. Srivastava, S.K., Srivastava, R.A.K. and Mathur, S.N. : Bio-transformation of sugar-cane sterols into Androsta- $4,17$ -dione (ADD) by *Arthrobacter globiformis* and *Str. Oxidans*. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 399-402 (1985)
  31. Goetschel, R. and Bar, R. : Formation of mixed crystals in microbiol conversion of sterols and steroids. *Enzyme. Microb. Technol.*, **14**, 462-469 (1992)
  32. Jaspers, D.A., Massey, L.K. and Lueddecke, L.O. : Effect of consuming yogurt prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.* **49**, 1178-1181 (1984)
  33. John, G.H., Noel, R.K., Peter, H.S.S., James, T.S. and Stanely, T.W. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. (1994)
  34. Liu, W., Hsu, J. and Wang, W. : Production of cholesterol oxidase by antibiotic resistant mutant and a constitutive mutant *Arthrobacter simplex* B-7. *Proc. Natl. Sci.* **7**, 225-260 (1983)
  35. Liu, W., Meng, M. and Chen, K. : Purification and some properties of cholesterol oxidase produced by an inducible and a constitutive mutant *Arthrobacter simplex*. *Agric. Biol. Chem.* **5**, 413-418 (1988)
  36. Ahmad, S. and Roy, P.K. : Microbiol transformation of sterols to C19-steroids by *Rhodococcus equi*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 557-561 (1991)
  37. Suh, H.J., Kim, T.W. and Son, H.S. : Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Bacillus sphaericus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 446-452 (1993)