

Streptomyces polychromogenes IFO 13072가 생산하는 Cholesterol Oxidase의 정제 및 효소학적 특성

김현수* · 성림식 · 이경화 · 이용직 · 이인선¹ · 유대식
계명대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹계명대학교 자연과학대학 식품가공학과

Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase Produced by *Streptomyces polychromogenes* IFO 13072. Kim, Hyun-Soo*, Lim-Shik Seong, Kyung-Hwa Lee, Yong-Jik Lee, In-Seon Lee, and Tae-Shick Yu. Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ¹Department of food science and technology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea - *Streptomyces polychromogenes* IFO 13072 was used as a strain producing cholesterol oxidase(EC 1.1.3.6). The conditions of cholesterol oxidase production were investigated. The optimum composition of medium for production of the enzyme was 1% dextrin, 0.5% casamino acid, 0.1% KH₂PO₄, 0.5% NaNO₃ and 0.05% MgSO₄ (pH 7.3). The enzyme was purified specifically by cholesterol affinity column chromatography with a yield of 23.2%. The purified enzyme showed a single polypeptide on SDS-PAGE and the molecular weight was estimated about 52,000 daltons. The optimum pH and temperature of the cholesterol oxidase were pH 7.0 and 37°C, respectively. The enzyme was stable in the range of pH 6.0~7.0 and 25°C. The cholesterol oxidase activity was strongly inhibited by metal ions such as Hg²⁺ and Fe²⁺ and inhibitors such as dithiothreitol, mercaptoethanol and isonicotinic acid. The Michaelis constant(K_m) for the cholesterol was found to be 25 mM by Lineweaver-Burk plot analysis.

Key words: Cholesterol oxidase, *Streptomyces polychromogenes*, producing condition, purification, characterization, cholesterol affinity column chromatography

Cholesterol oxidase(3 β -hydroxysteroid oxidase)는 trans A:B ring junction을 가지는 steroid의 산화 및 이성화를 수행하는 효소로서 cholesterol(5-cholesten-3 β -ol)을 4-cholesten-3-one으로 산화반응을 촉매한다. Cholesterol oxidase의 연구는 Turfitt의 steroid 분해 미생물에 관한 연구인 *Arthrobacter*속[29]에서 시작되어 1973년 Richmond [23]와 Fregg[4]에 의해 cholesterol oxidase(EC 1. 1. 3. 6)로 분류되었다. Cholesterol oxidase를 생산하는 미생물로는 *Streptomyces*속[5], *Pseudomonas*속[1,16], *Brevibacterium*속[30], *Nocardia*속[23,32], *Arthrobacter*속[29] 및 *Corynebacterium*속[27] 등 다양한 미생물에서의 생산이 보고되어 있다. 특히 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 cholesterol oxidase는 Kamei[9]에 의해서 분리, 정제된 바 있으며, 최근에는 Murooka[20]에 의해 cholesterol oxidase 생합성 유전자의 cloning을 비롯하여 활발한 연구가 수행되고 있다. 국내에서는 Lee 등[14]이 토양에서 분리한 방선균에서 cholesterol oxidase의 분리·정제한 보고와 Lee 등[16]

의 *Pseudomonas* sp.에서 효소의 분리·정제를 비롯하여 박 등[22]의 창란젓에서 분리한 *Rhodococcus* sp.으로부터 효소생산의 보고가 있으며, 본 연구자도 토양에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp. No. 4가 생산하는 cholesterol oxidase의 생산, 정제 및 특성에 관한 연구를 보고한 바 있으나[10,11] 외국에 비해 연구가 미흡하다. 특히 방선균 *Streptomyces*속이 생산하는 cholesterol oxidase는 *Pseudomonas fluorescens*나 *Nocardia erythropolis* 등이 생산하는 효소와 비교시 경제적 비용과 긴 효소의 stability[18]를 보이기 때문에 임상효소제제로서 대량생산을 위한 연구개발이 수행되고 있다. Cholesterol oxidase는 임상적인 분야에서 혈중 cholesterol의 농도를 측정하는 지표가 되고 있어 동맥경화, 동맥협착증, 고혈압 예방에 기여할 수 있다. 또한, *Streptomyces* sp. A19249[3]에서의 구조유전자 *choM*이 살충 활성이 있는 cholesterol oxidase를 코딩하며, 이 유전자는 *Escherichia coli*에서도 동일한 살충 활성을 가지는 효소로 발현되는 것으로 나타나 농업 분야에서 새로운 농약으로 주목을 받고 있다. 식품 분야에서는 치즈, 햄, 소시지 및 각종 유제품에 cholesterol 저감식품으로서의 이용가능성과 함께 산업적으로 넓은 응용면[21]이 예상되고 있다. 이같은 최근의 연구 보고에서 cholesterol oxidase의 새로운 기능면의 이용을 위해 대량생산 기술 개발이 연구 중에 있으며, 국내에서는 임

*Corresponding author
Tel. 053-580-5284, Fax. 053-580-6447
E-mail: hskim@kmu.ac.kr

상진단용시약으로 고가로 수입에 의존하고 있어서 사용면에서의 어려움이 많은 실정이다. 본 연구에서는 이 같은 어려움을 해결하기 위한 일환으로 본 연구실에서 보유하고 있는 방선균을 대상으로 cholesterol oxidase를 생산하는 방선균을 탐색하여 그중 효소의 생산이 우수한 *S. polychromogenes* IFO 13072를 선별하여 최적 생산조건과 효소정제 및 효소학적 특성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

Cholesterol oxidase 생산 방선균의 검색

Cholesterol oxidase를 생산하는 방선균을 검색하기 위하여 실험실에서 보유하고 있는 방선균을 cholesterol oxidase 생산 기본 배지를 사용한 평판배지에서 3~5일간 배양한 후, 0.5% cholesterol이 첨가된 반응 완충액(pH 7.0)에 적신 paper disc를 얹어 red color를 생성하는 plate assay법을 사용하여 cholesterol oxidase 생산 방선균을 선별하였으며, 그중 효소 생산능이 우수한 균(*Streptomyces polychromogenes* IFO 13072)을 본 연구의 공시균으로 사용하였다.

배양조건 및 조효소액의 조제

선별된 공시균의 배양은 7~10일 배양한 slant로부터 기본 생육배지인 soluble starch 1%, peptone 2%, KH_2PO_4 0.1%, NaNO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (pH 7.3) 조성의 배지에 slant로부터 2백금이 접종하여 28°C, 150 rpm에서 36~48시간 배양하여 사용할 때까지 -70°C에서 보존하였다. 조효소액의 조제는 dextrin 1%, casamino acid 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, NaNO_3 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (pH 7.3) 조성의 배지에 전배양균을 3% 접종하여 28°C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양한 후 배양액을 여과지(Advantec Co. No. 2)로 여과하여 균체를 제거한 다음 배양여액을 효소반응을 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성 측정

Cholesterol oxidase의 활성 측정은 공시균이 배양액중에 생산하는 색소의 영향을 고려하여 Allain등[1]의 방법을 사용하였다. 즉 2 μM 4-aminoantipyrine, 35 μM phenol, 2,375 units/L의 peroxidase(Sigma Co.)가 포함된 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.0) 1 mL에 각각의 효소용액을 0.25 mL 첨가한 후 37°C에서 3분간 예열시킨 다음 10% Triton X-100(Merck Co.)에 13 $\mu\text{mol/mL}$ 의 cholesterol(Sigma Co.)이 함유된 기질용액 0.05 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 quinoneimine dye는 흡광도 500 nm에서 측정하였으며, 효소용액 중에 존재하는 색소의 흡수는 제외하였다. Cholesterol oxidase의 활성은 37°C에서 1 μmol 의 H_2O_2 를 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 하였으며, 생성된 H_2O_2 의 양은 H_2O_2 의 정량곡선을 이

용하여 산출하였다.

효소 생산조건 검토

효소 생산조건을 검토하기 위해 생육 기본배지에 탄소원으로 dextrin, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, sodium acetate, soluble starch, sucrose, xylose를 1%씩 첨가한 각각의 본배양 배지 25 mL에 전배양균을 3%되게 접종하여 28°C, 150 rpm에서 2~5일간 배양하여 효소 활성을 측정하였다. 또한 효소 생산성이 우수한 탄소원을 0.5, 1, 2, 3%의 농도별로 첨가하여 효소생산 최적 농도를 결정하였다.

질소원의 경우 유기 질소원인 corn steep liquor, meat extract, soybean meal, casamino acid, yeast extract, peptone, tryptone, urea를 2%, 무기 질소원인 sodium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, ammonium chloride를 0.5% 농도로 각각 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하였다. 또한 가장 효소 생산성이 우수한 질소원을 0.5, 1, 2, 3, 4, 5%의 농도별로 첨가하여 최적 농도를 결정하였다.

단백질 정량

정제 과정중의 단백질 정량은 Bradford method[2]에 준하여 protein assay kit(Bio rad Co.)를 사용하였으며, 표준단백질은 bovine serum albumin(Bio rad Co.)을 사용하였다.

효소의 정제

본 효소의 정제를 위해 생산최적배지 100 mL(500 mL 삼각플라스크 사용)에 전배양균을 3%되게 접종하여 동일 배양 조건하에서 2일간 배양하였다. 배양액을 여과지로 여과하여 균체를 제거한 배양여액을 조효소액으로 하여 효소를 정제하였다. 효소의 정제는 조효소액 1 L에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 30% 포화되게 첨가하여 4°C에서 3시간 방치 후, 12,000 rpm에서 (4°C) 15분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상등액을 80% 포화되게 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 4°C에서 24 hr 방치하였다. 30~80% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 획분을 동일조건에서 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 10 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 용해시켜 투석하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전획분으로 사용하였다. Cholesterol affinity column chromatography는 Kamei 등[9]의 방법에 따라 cholesterol(Sigma Co.) 10 g을 증류수 100 mL에 넣고 가열하여 침전시킨 다음 column ($\phi 2.4 \times 30$ cm)에 충전하여 10 mM 인산 완충용액(pH 7.0)으로 평형화한 후, 투석한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전획분을 주입하였다. 효소 단백질의 용출은 사용 완충액으로 충분히 세척 후 0.1% Triton X-100이 함유된 10 mM 인산 완충용액으로 용출하여 tube당 3 mL씩 분취하였다.

전기영동

정제효소의 순도확인 및 분자량의 결정은 Laemmli[12]의

방법에 준하여 mini-gel kit(Hoefler Co.)을 사용하여 12.5% SDS PAGE를 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 -lactoalbumin(M.W. 14,400)을 사용하였다.

최적온도와 pH

효소반응의 최적온도는 100 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에서 13 mM cholesterol을 기질로 사용하여 25°C에서 60°C까지 각 온도에서 효소 활성을 비교하였다.

또한, 최적 pH를 검토하기 위해 효소를 아래의 각 pH의 완충액에 넣고 반응시킨 후 효소의 활성을 검토하였다. 사용 완충액은 pH 4.0-6.0은 50 mM citrate buffer, pH 6.0-8.0은 50 mM phosphate buffer 그리고 pH 8.0-10.0은 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

온도와 pH 안정성

효소의 온도 안정성은 100 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 효소를 첨가하여 25°C에서 60°C까지의 각 온도에서 10, 20, 30, 40, 50분간 처리 후 잔존효소 활성을 검토하였다.

pH 안정성은 효소를 pH 4.0에서 pH 10.0까지의 각 완충액에 첨가하여 4°C에서 10, 20, 30, 40, 50분간 처리 후 잔존 효소활성을 검토하였다.

기질농도에 따른 반응속도의 변화

본 효소의 기질농도에 따른 반응속도를 조사하기 위해 반응액에 기질인 cholesterol을 1, 2.5, 5, 10, 13 mM되게 첨가하여 효소의 활성을 측정하였으며 Lineweaver-Burk plot을 통하여 K_m 치를 산출하였다.

금속이온과 저해제의 영향

효소 반응액에 각각의 금속이온 또는 각종 저해제를 1 mM되게 첨가하여 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol oxidase 생산 방선균 검색

Cholesterol oxidase을 생산하는 방선균의 검색을 위하여 실험실에서 보유하고 있는 방선균을 ISP No. 2배지에 계대 배양하였다. Allain method[5]에 준한 plate assay법을 사용하여, cholesterol oxidase의 활성이 높은 *Streptomyces polychromogenes* IFO 13072를 공시균으로 사용하였다.

탄소원의 영향

효소 생산을 위한 최적 탄소원을 검토하기 위하여 효소생

산배지를 기본으로 하여 탄소원의 종류별로 효소 생산을 조사하였다. Table 1에서 보는바와 같이 dextrin, maltose, sodium acetate, sucrose의 순으로 비교적 높은 효소생산성을 나타냈으며, lactose와 soluble starch도 효소생산성이 양호하다고 판단되었다. Fructose, glucose, glycerol, xylose는 효소생산성을 나타내지 않았다. 이 결과는 이 등[15]이 보고한 방선균 HSL-613균주의 경우, galactose, glucose, xylose, glycerol이 효소 생산이 양호하다는 결과와 차이를 보임에 따라 본 공시균과 다른 특성을 가진다고 사료되었다. 또한 김 등[10]의 *Streptomyces* sp. No. 4 균주의 경우 soluble starch, glucose, dextrin에서 효소 생산이 양호하였으나, 본 공시균은 glucose에서 효소를 생산하지 않았다.

Table 1에서 탄소원의 종류에 따라 효소 생산의 차이를 보이므로, 이 중 효소 생산성이 우수한 탄소원인 dextrin,

Table 1. Effect of carbon sources on the production of cholesterol oxidase.

Carbon sources	Cholesterol oxidase activity (munit/mL)
Dextrin	38
Fructose	-
Glucose	-
Glycerol	-
Lactose	22
Maltose	29
Sodium acetate	28
Souble starch	21
Sucrose	28
Xylose	-

Table 2. Effect of carbon sources concentration on the production of cholesterol oxidase.

Carbon sources	Cholesterol oxidase activity (munit/mL)	
concentration (%)		
Dextrin	0.5	19
	1	38
	2	37
	3	33
Maltose	0.5	20
	1	29
	2	36
	3	34
Sodium acetate	0.5	-
	1	28
	2	29
Sucrose	2	30
	0.5	21
	1	28
Sucrose	2	23
	3	19

maltose, sodium acetate, sucrose의 농도에 따른 효소 생산성을 검토하였다. 그 결과 Table 2에서 보인바와 같이 1% dextrin 첨가시 가장 높은 효소 생산성을 나타내었다.

질소원의 영향

Cholesterol oxidase 생산에 미치는 탄소원의 영향 중에서 Table 2에서 보는바와 같이 dextrin 첨가 시, 효소생산성이 높은 결과를 바탕으로, 탄소원으로 dextrin 1%의 존재 하에서 질소원의 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 3에서 보는바와 같이 유기질소원으로 casamino acid와 beef extract 첨가시 cholesterol oxidase의 생산이 가장 우수하였으며, yeast extract, tryptone, peptone도 양호하였으나, urea, corn steep liquor, malt extract에서는 효소를 생산하지 않았다. 무기질소원의 경우는 sodium nitrate가 양호하였

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of cholesterol oxidase.

Nitrogen source	Cholesterol oxidase activity (munits/mL)
Organic	
Beef extract	40
Casamino acid	40
Corn steep liquor	-
Malt extract	-
Peptone	33
Soybean meal	19
Tryptone	34
Urea	-
Yeast extract	36
Inorganic	
Ammonium chloride	18
Ammonium nitrate	23
Ammonium sulfate	31
Sodium nitrate	35

Table 4. Effect of nitrogen source concentration on the production of cholesterol oxidase.

Nitrogen source concentration(%)	Cholesterol oxidase activity(munits/mL)	
Casamino acid	0.5	40
	1	35
	2	29
	3	33
	4	31
Sodium nitrate	5	27
	0.5	35
	1	33
	2	24
	3	-
4	-	
5	-	

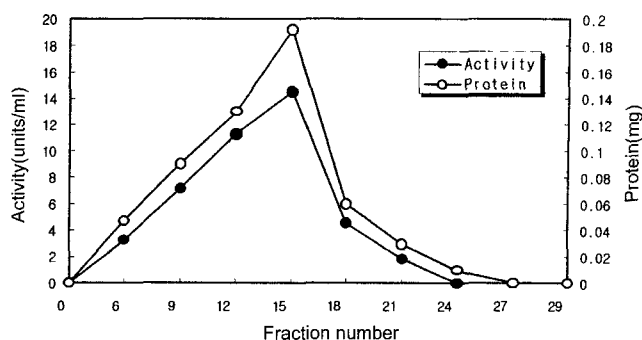


Fig. 1. Affinity column chromatography of the cholesterol oxidase on cholesterol column.

The concentrated solution(2.582 units/mL) from 30-80% saturation of ammonium sulfate was applied to cholesterol affinity column. After washing with phosphate buffer(pH 7.0), protein was eluted with 0.1% Triton X-100 at a flow rate of 5 sec/drop. Protein concentration in the elute was determined by Bradford method.

으나 유기질소원에 비해 비교적 생산성이 낮았다. 이 결과는 이 등[15]의 분리균주는 yeast extract가 효소 생산이 우수하다는 결과 및 김 등[10]의 분리균주 *Streptomyces* sp. No. 4가 corn steep liquor에서 효소 생산이 가장 우수하다는 결과와 차이를 나타내었다.

탄소원으로 효소 생산능이 우수한 dextrin을 1% 첨가한 생산배지에 효소 생산성이 우수한 유기 질소원(casamino acid) 및 무기질소원(sodium nitrate)을 각각 농도별로 첨가하여 효소 생산성을 비교하였다. Table 4에서 보는바와 같이 두 가지 질소원 모두 0.5% 첨가 시 효소의 생산이 가장 양호하였으며, 유기 질소원이 무기질소원 첨가시 보다 효소생산이 우수하였다.

Cholesterol oxidase의 정제

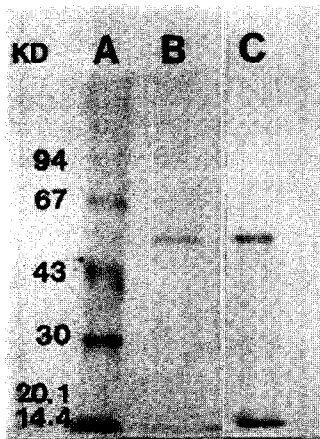
공시균이 생산하는 cholesterol oxidase를 분리하기 위하여 배양여액을 조효소액으로하여 효소를 정제하였다. 조효소액 1 L(0.847 units/mg)를 30~80% (NH₄)₂SO₄로 포화시켜, 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 10 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 용해하여 투석한 후(2.582 units/mg), cholesterol affinity column에 흡착시켜 0.1% Triton X-100이 함유된 10 mM 인산 완충용액(pH 7.0)으로 단백질을 용출하였다. 용출한 각 fraction(3 mL/tube)의 효소활성을 측정된 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 cholesterol oxidase의 활성은 fraction number 11~17에서 우수하였으므로, 이 활성획분을 모아 Amicon ultrafiltration kit로 농축하였다(24.4 units/mg). 정제된 cholesterol oxidase는 Table 5에서와 같이 정제도는 24.4배이고, 회수율은 23.2%를 나타내었다.

분자량 측정

본 정제 효소의 정제도 및 분자량을 측정하기 위하여

Table 5. Summary of purification of the cholesterol oxidase.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (Fold)	Yield (%)
Culture broth	167.8	142.2	0.85	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (30-80%)	20.5	53.0	2.58	3.1	37.3
Cholesterol column	1.4	33.0	24.4	28.8	23.2

**Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified cholesterol oxidase.**

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the cholesterol oxidase was performed with protein of each purification steps. The gel was stained with coomassie brilliant blue R-250.

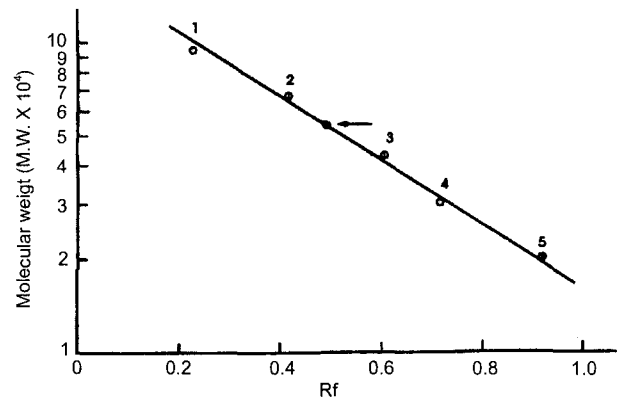
Lane A : Standard protein

Lane B : After cholesterol column by 30%-80% ammonium sulfate precipitation.

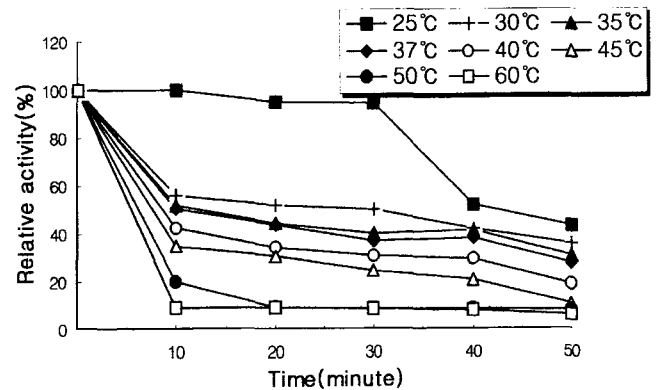
Lane C : After 30%-80% ammonium sulfate precipitation.

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), α -lactalbumin(M.W. 14,400).

Laemmli[23]의 방법에 준하여 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다. Fig. 2(lane B)에서와 같이, 본 정제효소는 단일 band를 나타내어 monomer인 단백질로 정제되었다. 본 효소의 분자량을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 약 52,000 Da정도인 것으로 추정되었다. 이는 방선균 유래인 Kamei 등[9]의 *Streptomyces violascens*가 생산하는 cholesterol oxidase의 분자량이 61,000 Da, 이 등[14]의 *Streptomyces* sp. HSL613이 생산하는 효소의 분자량이 59,500 Da, 김 등[11]의 *Streptomyces* sp. No. 4가 생산하는 효소의 분자량이 60,000 Da이라는 보고와 차이를 나타내었으나, Inouye 등[26]이 보고한 다른 방선균 속인 *Streptoverticillium cholesterolicum* 유래의 분자량 56,000 Da 보다는 다소 작은 크기의 결과를 보였다. 또한 방선균 이외의 다른 균이 생산하는 효소의 분자량으로 Shirokane

**Fig. 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.

**Fig. 4. Effect of temperature on stability of the cholesterol oxidase.**

The enzyme solution was preincubated in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) at various temperature.

등[24]의 57,000, Lee 등[16]의 56,000, Fukuyama 등[6]의 55,000, 박 등[22]의 52,000과는 비슷한 결과이며, Uwajima 등[30]의 31,000 Da보다는 다소 큰 분자량의 cholesterol oxidase인 것으로 추정되었다.

온도 안정성

본 효소의 온도 안정성을 검토하기 위하여 효소액을 25°C에서 60°C까지의 각 온도에서 10분, 20분, 30분, 40분, 50분간 열처리한 후, 급냉각시켜 37°C에서 잔존효소 활성을 측정하였다.

본 효소의 온도 안정성은 Fig. 4에서 나타낸 것과 같이 25°C에서 30분까지 거의 안정하였으나, 이후에는 50%이하로 급격히 실효되었으며 다른 온도에서는 10분간 열처리 시에도 효소활성이 급격히 저하되었다. 이 결과는 이 등[14]이 보고한 *Streptomyces* sp. HSL613의 cholesterol oxidase의

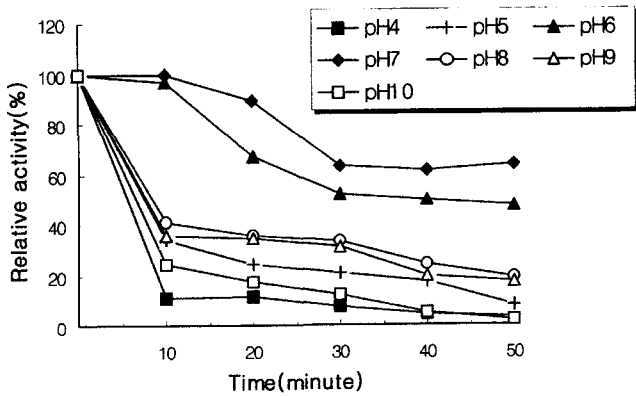


Fig. 5. pH stability of the cholesterol oxidase.
The enzyme solution was preincubated at various pH range. The used buffer system were : 50 mM citrate buffer(pH 4.0-5.0), 50 mM phosphate buffer(pH 6.0-8.0), 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0-10.0).

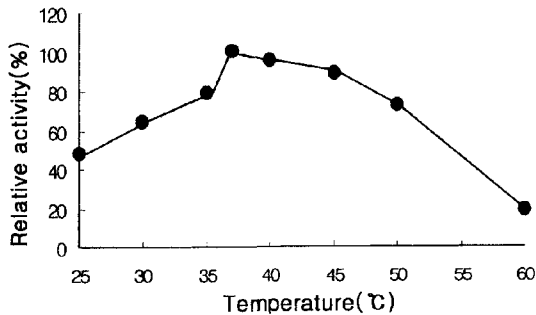


Fig. 6. Effect of temperature on the cholesterol oxidase activity.
The enzyme activity was measured at various temperatures.

활성이 15분 열처리시 45°C까지 안정했다는 보고와 박 등 [22]이 보고한 *Rhodococcus* sp. 3T6-5MJ 유래의 효소가 30-45°C까지 안정하다는 보고 및 김 등 [10]이 보고한 *Streptomyces* sp. No. 4 유래의 효소가 30-40°C까지 안정하다는 보고와는 차이를 보였으며, 열에 대한 안정성이 낮은 효소라고 판단되었다.

pH 안정성

본 효소 안정성에 미치는 각 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 4에서 pH 10까지 pH가 다른 여러 종류의 완충 용액과 효소액을 혼합하여 4°C에서 10분, 20분, 30분, 40분, 50분간 처리한 후, 그 잔존 효소활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성은 Fig. 5에서와 같이 pH 6-7까지의 범위에서 70%이상 안정한 것으로 나타났으나 나머지 pH에서는 처리 10분 후 50%이상 실패되는 결과를 보였다. 이는 이 등 [14]이 보고한 *Streptomyces* sp. HSL613 유래의 효소가 pH 6-11까지 안정하다는 결과와 Inouye 등 [8]의 *Streptovorticillium cholesterolicum*이 생산한 효소가 pH 4-12.5까지 안정하였다는 결과 및 김 등 [10]의 *Streptomyces* sp. No. 4가 생산하는 효소가 pH 6.0-9.0까지 안정하다는 결과

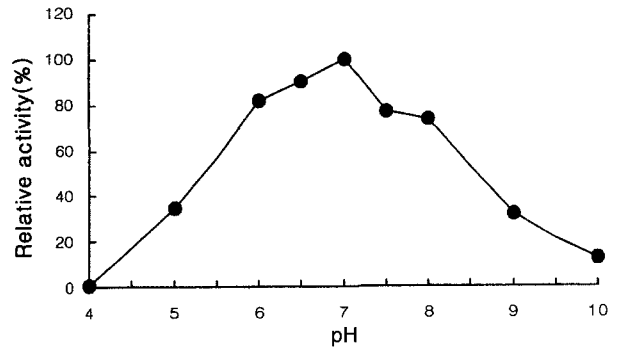


Fig. 7. Effect of pH on the cholesterol oxidase activity.
The enzyme activity was measured at various pHs. The buffer systems employed were identical as described in Fig. 5

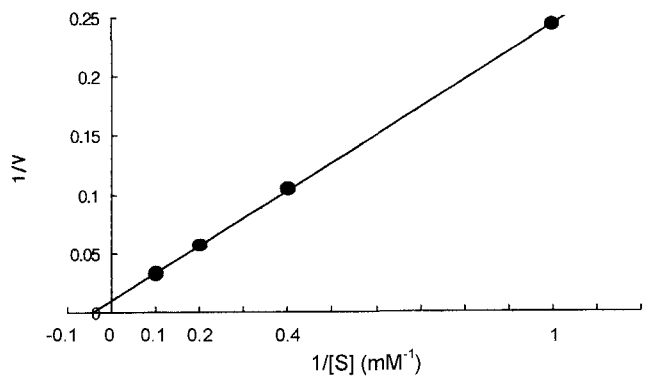


Fig. 8. Determination of Km value for cholesterol oxidase by Lineweaver-Burk plot.
The used cholesterol concentrations were 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM and 13 mM. Velocity(V) was expressed as specific activity (units/mg)

에 비해 안정성의 범위가 좁은 효소라고 사료되었다.

반응 최적 온도

본 효소활성에 미치는 반응 최적 온도를 조사하기 위해 25°C에서 60°C까지 각 온도에서 반응시킨 후 활성을 측정하였다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이 반응 최적 온도는 37°C였으며, 이는 Liu 등 [17], 이 등 [14], Watanabe 등 [31], 박 등 [22]이 분리한 효소의 반응 최적 온도가 50°C부근이라는 보고와 다르나, Lee 등 [16], 김 등 [10]이 보고한 결과와는 유사하였다.

반응 최적 pH

본 효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 효소반응액을 pH 5-10까지의 각 완충용액을 사용하여 37°C에서 기질과 반응시킨 후 활성을 측정하였다. Fig. 7에서 나타난 바와 같이 pH 7.0에서 효소활성이 가장 우수하였으며, 이 결과는 Fukuyama [6]가 분리한 효소의 반응 최적 pH가 5인 것과는 다르나, 대부분의 보고에서 cholesterol oxidase의 반응최적 pH가 6.0~7.5범위라는 보고 [10,14,18,

22,25,32]와 일치하였다.

효소활성에 미치는 기질농도의 영향

본 효소의 기질농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 cholesterol의 농도를 1, 2.5, 5, 10, 13 mM로 조정하여 효소반응을 수행하여 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 분석하였으며(Fig. 8) Km치는 25 mM인 것으로 나타났다.

금속이온의 영향

금속 이온이 본 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위해 각각의 금속이온 1 mM 존재하에서 효소활성을 측정하였다. Table 6에 나타난 바와 같이, 본 효소는 Mn 이온의 존재시에는 다소 활성이 촉진되었으며 Cu, Fe, Hg 이온의 존재시에는 효소활성이 40-80% 정도 실패되었고 특히, 1 mM HgCl₂에 의해 약 84% 이상의 효소활성이 저해되었다. 이 결과는 이 등[14], Inouye 등[8]의 보고와 다소 차이를 보이나 Hg 이온에 의한 cholesterol oxidase에 대한 강력한 저해는 거의 모든 보고와 일치하였다.

Table 6. Effect of metal ions on the cholesterol oxidase activity

Metal ion(1 mM)	Relative activity(%)
None	100.0
CaCl ₂	97.15
CdCl ₂	96.21
CuSO ₄	60.52
FeCl ₃	39.27
HgCl ₂	16.61
MnCl ₂	106.85
PbCl ₂	93.83
ZnSO ₄	98.58

The enzyme activity was measured by Allain method.

Table 7. Effect of inhibitors on the cholesterol oxidase activity

Inhibitor(1 mM)	Relative activity(%)
None	100.00
p-Chloromercuribenzoic acid	69.41
N-ethylmaleimide	100.27
Isonicotinic acid	22.37
EDTA	103.20
2,2'-bipyridine	103.70
PMSF	104.38
Iodoacetic acid	101.76
Trichloroacetate	100.80
o-phenanthroline	100.00
8-Hydroxyquinoline	92.69
Mercaptoethanol	8.65
Sodium azide	90.18
Dithiothreitol	0.04

The enzyme activity was measured by Allain method.

저해제의 영향

본 효소의 활성부위의 특성을 조사하기 위해 각종 저해제의 첨가에 따른 효소의 활성을 검토하였다. 각 저해제 1 mM이 존재시에 효소활성에 미치는 영향은 Table 7에 나타난 바와 같이 mercaptoethanol에 의해 91%, dithiothreitol의 존재시 거의 100%, p-Chloromercuribenzoic acid, Isonicotinic acid 존재시 각각 30%, 78%의 저해를 받는 것으로 나타났으며, 다른 저해제는 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 이 결과에서 본 효소의 활성부위에는 disulfide bond가 존재하는 것으로 추정되며, chelating agent에는 저해가 나타나지 않은 점은 Shirokane 등[24]의 보고와 유사하나 cholesterol oxidase가 EDTA에 다소 저해를 받는다는 이 등[14]의 보고나 iodine에 민감하게 저해 받는다는 Inouye[8]의 보고와 비교시 효소학적 특성이 다른 성질의 효소라고 추정되었다.

요 약

Cholesterol oxidase(EC 1.1.3.6)는 cholesterol을 산화 또는 이성화시키는 효소로, 혈중 cholesterol 측정 등의 임상진단용 시약에 이용되고 있으며, 여러 종류의 미생물에서 분리, 연구되어 왔다. 현재에는 농업 및 식품 등에도 응용이 기대되고 있는 매우 유용한 효소이다. 본 실험은 공시균인 *Streptomyces polychromogenes* IFO 13072의 효소 생산 조건과 cholesterol oxidase의 정제 및 효소학적 특성을 조사하였다.

효소 생산 조건을 검토한 결과, 탄소원으로 1% dextrin, 유기 질소원으로는 0.5% casamino acid, 무기 질소원으로는 0.5% sodium nitrate가 효소생산에 우수하였으며, 이들 탄소원, 질소원 이외 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O가 함유된 배지를 생산 최적 배지로 사용하였다.

본 효소의 정제는 30-80% 포화의 (NH₄)₂SO₄ 침전 및 cholesterol affinity column chromatography를 통하여 23.2%의 수율로 정제되었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드를 보였으며, 분자량은 약 52,000 Da으로 추정되었다. 본 효소의 특성을 검토한 결과, 최적 온도와 최적 pH는 각각 37°C, pH 7.0이었으며, 효소의 안정성은 온도 25°C, pH 6.0~7.0의 범위까지 안정한 것으로 나타났다. 또한 본 효소는 금속이온으로 Hg와 Fe 이온의 존재시 크게 저해를 받았고, dithiothreitol과 mercaptoethanol, Isonicotinic acid와 같은 저해제에 의해서 상당히 실패 되었다. 본 cholesterol oxidase의 Michaelis 상수는 cholesterol을 기질로 하여 Lineweaver-Burk plot 분석에서 25 mM로 추산되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 계명대학교

전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 일부지원에 의한 것입니다.

REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- Flegg, H. M. 1973. An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* **10**: 79-84.
- 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 viascens*. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 2057-2060.
- 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.
- Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid - vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomyces. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509.
- Inouye, Y., K. Taguchi, A. Fujii, K. Ishimaru, S. Nakamura, and R. Nomi. 1982. Purification and characterization of extracellular 3 β -hydroxysteroid oxidase produced by *Streptoverticillium cholesterolicum*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 951-958.
- Kamei, T., Y. Takiguchi, M. Matsuzaki, and S. Nakamura. 1978. Purification of 3 β -hydroxysteroid oxidase of *Streptomyces violascens* origin by affinity chromatography on cholesterol. *Chem. Pharm. Bull.* **26**: 2799-2804.
- Kim, H. S., H. S. Ko, 1999. Production and Characterization of Cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. No. 4. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 174-180.
- Kim, H. S., H. S. Ko, 1999. Purification and Characterization of Cholesterol oxidase by *Streptomyces* sp. No. 4. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 322-327.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Latillot, S. and P. Kedziora. 1990. Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. *Preparative Biochem.* **20**: 51-62.
- 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.
- Lee, I. A., Y. K. Choe, H. S. Lee, I. S. Choe, and T. W. Chung. 1992. Cholesterol oxidase 를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소생산에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 395-400.
- 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 strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 542-546.
- Liu, W., M. H. Meng, and K. S. Chem. 1985. Purification and some properties of cholesterol oxidase produced by an inducible and a constitutive mutant. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 413-418.
- Lolekha, P. H. and Y. Teerajetkul. 1996. Optimization studies of components in enzymatic cholesterol reagents containing cholesterol oxidase from *Nocardia erythropolis*, *Streptomyces* sp. or *Pseudomonas fluorescens*. *J. Clin. Lab. Anal.* **10**: 167-176.
- 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.
- Murooka, Y., T. Ishizaki, O. Nimi, 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.
- Murooka Yoshikatsu. 1996. Cholesterol oxidase. *Bioscience and Industry* **54**: 16-22.
- 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.
- Richmond, W. 1973. Properation 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.
- Shirokane, Y., K. Nakamura, and K. Mizusawa. 1977. Purification and some properties of an extracellular 3 β -hydroxysteroid oxidase produced by *Corynebacterium cholesterolicum*. *J. Ferment. Technol.* **55**: 337-346.
- Stadtman, T. C., A. Cherkes, and C. B. Anfinsen. 1954. Studies on the microbial degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **206**: 511-523.
- Suh, H. J., T. W. Kim, and H. S. Son. 1993. Purification and Characterization of Cholesterol Oxidase from *Bacillus sphaericus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 446-452.
- Tolalay, P. and M. M. Dobson. 1953. Purification and properties of 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **205**: 823-837.
- Toyobo Enzymes. 1985. Japan, Toyobo Co. Ltd.
- Turfit, G. E. 1944. The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**: 49-62.
- Uwajima, T., H. Yagi, S. Nagamura, and O. Terada. 1973. Isolation and crystallization of extracellular 3 β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum* nov. sp. *Agric.*

Biol. Chem. **37**: 2345–2350.

31. Watanabe, K., H. Aihara, Y. Nakagawa, R. Nakamura, and K. Susaki. 1989. Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 13. *J. Agric.*

Food Chem. **37**: 1178–1182.

32. Weyman, A. E. 1974. Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.* **56**: 13–21.

(Received Feb. 27, 2002/Accepted Apr. 19, 2002)