

토양 미생물로부터 생산된 Extracellular Cholesterol Oxidase의 특성

박정수 · 정종문[†]
수원대학교 생명과학과

Characterization of Extracellular Cholesterol Oxidase Produced from Soil Microorganism

Jeong-Su Park and Jong-Moon Jeong[†]

Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea

Abstract

Cholesterol oxidase catalyses the conversion of cholesterol to 4-cholesten-3-one. This enzyme has been used for clinical assay of human serum cholesterol and for reduction of cholesterol level in foods and feeds. In order to search the microorganism which has a high extracellular and stable activity of cholesterol oxidase, soil microorganisms were screened. As a result, the one with the highest extracellular cholesterol oxidase activity was obtained and named as the BEN 115. The BEN 115 strain was identified as one of the *Nocardia* species based on our taxonomic studies. The cholesterol oxidase from this strain was shown to have two bands of extracellular proteins on SDS-PAGE and Western blot. Their molecular masses were estimated to be about 55 and 57 kDa, respectively. In addition, this cholesterol oxidase was considerably stable at the broad range of pH 3.5~9.5 and at the temperature of 25~55°C. The optimum pH and temperature of this cholesterol oxidase were pH 5.5 and 35°C, respectively. The activity of extracellular cholesterol oxidase could be enhanced 1.6 to 2.0 folds by the addition of nonionic detergent such as Triton X-114, Triton X-100, or Tween-80 into the culturing broth. The substrate specificities against campesterol, sitosterol and stigmasterol were measured to be 50%, 50%, and 27%, respectively, compared to the cholesterol. These results suggest that *Nocardia* sp. BEN 115 may be useful as a microbial source of cholesterol oxidase production.

Key words: cholesterol oxidase, cholesterol, 4-cholesten-3-one, campesterol, sitosterol, stigmasterol

서 론

Cholesterol은 동물 세포의 세포막을 구성하는 주요 성분이며 불포화지방산의 운반체 역할과 testosterone, estrogen과 같은 다양한 스테로이드 호르몬의 전구체 역할을 한다. Cholesterol이 체내에서 이런 중요한 역할을 하지만 다른 한편으로 동맥경화증, 동맥협착증, 고혈압과 같은 대표적 성인병 질환과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려지면서 혈중 cholesterol 농도가 성인병 질환의 지침이 되고 있다(1).

Cholesterol oxidase(3 β -hydroxysteroid oxidase, EC 1. 1. 3. 6)는 cholesterol(5-cholesten-3 β -ol)을 cholestenone(4-cholesten-3-one)으로 산화시키고 이때 동량의 과산화수소를 생성시키는 반응을 촉매하는 효소이다(2). Cholesterol oxidase는 *Pseudomonas*속(3), *Nocardia*속(4), *Arthrobacter*속(5,6), *Streptomyces*속(7,8), *Brevibacterium*속(9,10) 등 다양한 미생물에서 생산되고 있다. 이러한 미생물에 의해 생성되는 cholesterol oxidase는 세포내(intracellular) 효소와 세포외(extracellular) 효소로 구별된다(3-10). 세포내 효

소는 미생물 균체 내에 효소가 존재하므로 세포를 파괴하여 효소를 얻는 반면, 세포외 효소는 세포를 파괴시키는 과정 없이 배양액을 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용할 수 있어 상업적으로 이용 시 원가가 절감되며 높은 수율을 얻을 수 있는 장점이 있다.

Cholestenone은 cholesterol oxidase가 cholesterol을 산화시켰을 때 만들어진 생성물로 무색, 무미, 무취로서 체지방의 축적을 억제하며, 혈중 리포단백질(lipoprotein)의 농도를 저하시키는 기능이 발견되었다. 이런 기능을 이용하여 식품 분야에서는 치즈, 햄, 소시지 및 각종 유제품에 cholesterol oxidase를 첨가하여 cholesterol을 저감시키는 다이어트 식품, 비만의 예방제, 비만증의 치료제 등으로 이용할 수 있는 가능성이 있어 산업적으로 넓은 응용면이 예상되고 있다(11). 그 외에도 cholesterol oxidase의 새로운 기능면을 이용하기 위하여 효소 대량생산 기술개발 및 안정화 방법 등이 연구되고 있으며, 특히 효소의 활성과 안정성을 위한 micro-encapsulation 등의 연구도 이루어지고 있다(12). 그러나 국내에서는 실용화를 위한 연구가 미흡하고 임상진단용 시약

[†]Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

으로만 일부 이용되고 있으며 고가에 수입되고 있어 산업적으로 사용함에 있어 어려움이 많은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 cholesterol oxidase를 산업적으로 대량생산할 수 있는 연구의 초기 단계로 cholesterol oxidase를 생산하는 균주를 토양 미생물로부터 선별하였다. 선별된 균주를 대상으로 대량생산 등을 감안해 세포의 효소 활성을 측정하였으며 그 중 가장 높은 활성을 나타내는 균주가 생산하는 cholesterol oxidase의 다양한 효소학적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

Cholesterol oxidase 생산 균주 분리 및 동정

Cholesterol oxidase를 생산하는 토양 미생물을 분리하기 위해 수원대학교 주변에서 45점의 토양시료를 채취하였다. 채취한 토양 시료 1 g을 멸균 생리식염수 10 mL에 충분히 현탁하고 상등액은 10^{-3} ~ 10^{-8} 로 생리식염수를 사용하여 희석하였다. 희석된 sample은 방선균 분리 배지인 Humic acid-Vitamin(HV) agar(13) 배지에 도말하여 30°C에서 5~7일간 배양하였다. 생성된 단일 colony는 yeast malt extract broth(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, pH 7.0)에 계대 배양하였다. 계대 배양한 균주는 30°C에서 200 rpm으로 7일간 배양하면서 매일 같은 시각에 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균체량의 변화를 조사하였고, 배양액을 12,000×g에서 2분간 원심분리(Hanil Micro-12, Incheon, Korea)한 다음 상등액을 취하여 세포의 cholesterol oxidase 활성도를 측정하였다. 균 동정은 Holt 등(14)의 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 형태학적 그리고 생리학적 특성을 조사하였다. Yeast malt extract agar에서 생육한 colony의 색, 균사체 유무를 확인하였고 배지 내에 탄소원으로 glucose, arabinose, mannitol, galactose, sorbitol, inositol, raffinose, sodium acetate, sodium citrate를 각기 첨가하여 2주간 배양하여 생육 상태를 조사하였으며, DNA내에 G+C의 함량 분석은 Marmur와 Doty(15)의 방법에 따라 확인하였다.

효소 활성 측정을 위한 조효소액 제조 및 농축

조효소액의 제조는 cholesterol oxidase 활성이 가장 높은 균주를 선택하여 15일간 30°C, 200 rpm으로 배양한 후 세포 배양액을 12,000×g에서 2분간 원심분리 하여 세포와 배양액을 따로 분리하였다. 세포가 제거된 배양액은 cholesterol oxidase 활성을 측정하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 또한 효소의 분자량 측정과 안정성 및 반응 최적 조건을 알아보기 위한 농축 조효소액은 molecularporous membrane tubing(Spectrum Medical Industries사, M.W. cutoff: 12,000~14,000)에 담겨 4°C에서 24시간 동안 polyethylene glycol #8,000(Yakuri Pure Chemical Co., Osaka, Japan)을 이용하여 물과 작은 분자들을 제거하여 얻었다.

효소 활성 측정

Cholesterol oxidase 활성은 cholesterol이 분해되면서 생성되는 과산화수소를 측정하여 cholesterol이 4-cholesten-3-one으로 전환되는 것을 간접적으로 측정하는 방법을 사용하였다(16). 먼저 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 녹인 0.01% o-dianisidine(Sigma, St. Louis, MO, USA) 2.7 mL에 100 units/mL peroxidase(from horseradish, Sigma) 0.1 mL를 첨가한다. 기질로는 10% Triton X-100(Sigma) 용액 100 mL에 0.5 g cholesterol(Sigma)을 녹인 용액을 0.1 mL 첨가하였다. 균이 제거된 배양액 0.1 mL를 첨가한 다음 30분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cholesterol oxidase 활성은 pH 7.5, 25°C에서 1분간 1 μmole cholesterol이 1 μmole 4-cholesten-3-one으로 전환되는데 사용되는 효소량을 1 unit로 산출하였다.

최적 효소 생산 조건

효소 생산에 있어서 질소원의 영향을 검토하기 위하여 yeast malt extract broth에 질소원인 yeast extract 이외에 peptone(Duchefa, Haarlem, Netherlands), tryptone(Difco, Detroit, MI, USA), meat extract(Difco), urea(Duchefa), casamino acid(Sigma), beef extract(Difco), soytone(Difco)를 각각 0.4% 첨가하여 균 접종 후 30°C, 250 rpm으로 배양하여 효소 활성을 측정하였다. 또한 실험 결과에서 나온 최적 질소원은 0.2%, 0.4%, 1%, 2% 첨가하여 최적 농도를 결정하였다. 탄소원의 경우 yeast malt extract broth에 탄소원인 glucose를 제외한 glycerol(Duchefa), maltose(Sigma), soluble starch(Duchefa), fructose(Duchefa), mannose(Sigma), sucrose(Sigma), lactose(Sigma), xylose(Sigma), raffinose(Sigma)를 각각 0.4% 첨가한 후 질소원과 마찬가지로 배양하여 효소 활성을 측정하였고 높은 활성을 보인 탄소원은 0.2%, 0.4%, 1%, 2% 첨가하여 최적 농도를 조사하였다.

분자량 측정

배양액내 효소의 분자량을 확인하기 위하여 Mini-PROTEAN 3(Bio-Rad)을 사용하여 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다(17). 또한 상대적인 분자량 측정을 위해 분자량 표준 단백질들(10~250 kDa, Bio-Rad사)과 positive control로 *Nocardia erythropolis*에서 정제된 cholesterol oxidase(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)를 같이 전개하였다. 전기영동 수행 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 염색과 Western blot을 수행하였다. Western blot은 전기영동 후 gel을 PVDF membrane(pore size 0.45 μm, Millipore, Billerica, MA, USA)에 100 mA의 전류로 4°C에서 2시간 membrane으로 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 PVDF membrane은 비특이적 항체 결합을 막기 위해 blocking buffer(5% skim milk/Tris-buffered saline buffer(TBS))와 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 일차항체(goat anti-cholesterol oxidase IgG, Rockland, Gilberts-

ville, PA, USA)는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 blocking buffer에 1:5,000으로 희석하여 사용하였고 상온에서 24시간 반응 후 TBS-T(TBS plus 0.01% Tween 20)로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후 TBS-T로 1:5,000 희석된 이차항체 (mouse anti-goat IgG-conjugated alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology)를 상온에서 1시간 반응시킨 후 다시 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 발색은 membrane을 이차항체에 결합한 alkaline phosphatase의 기질인 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Amresco Inc., Solon, OH, USA)/NBT(nitrotetrazolium Blue chloride, Sigma)에 담구고 실온에서 짙은 갈색의 band가 나타날 때까지 반응하였다.

온도 안정성

효소의 온도 안정성은 농축된 조효소액(30 mU/mL)을 25°C, 35°C, 45°C, 55°C 그리고 65°C 각각의 온도에서 1시간 동안 반응시킨 후 남아 있는 효소 활성을 측정하였다.

pH 안정성

효소의 pH 안정성에 사용된 완충용액은 50 mM sodium acetate buffer(pH 3.5와 pH 5.5), 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5), 50 mM glycine-NaOH buffer(pH 9.5와 pH 11.5)를 사용하였다. 각각의 pH 완충용액에 농축된 조효소액(30 mU/mL)을 첨가한 후 온도의 영향을 고려하여 4°C에서 24시간 반응시킨 후 남아 있는 효소 활성을 측정하였다.

효소 반응의 최적 온도

효소반응의 최적 온도 검토는 효소 활성 측정 온도를 25°C, 35°C, 45°C, 55°C 그리고 65°C에서 농축된 조효소액(30 mU/mL)을 사용하여 각 온도의 효소활성을 측정하였다.

효소 반응의 최적 pH

효소반응의 최적 pH 검토에 사용된 완충용액은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5), 50 mM sodium acetate buffer(pH 3.5와 pH 5.5), 50 mM glycine-NaOH buffer(pH 9.5와 pH 11.5)를 사용하여 각 pH에 농축된 조효소액(30 mU/mL)을 이용하여 효소활성을 측정하였다.

비이온성 detergent 첨가에 따른 효소 활성의 변화

15일간 배양한 균 배양액에 각각 Triton X-100(Sigma), Triton X-114(Sigma) 그리고 Tween-80(Yakuri)을 0.1%, 0.2%, 0.5% 그리고 1%가 되도록 각각 첨가한 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 12,000×g에서 2분간 원심분리 하여 균을 제거한 다음 상등액을 취하여 효소 활성을 측정하였다.

기질특이성

Cholesterol oxidase가 각종 기질을 분해시키는 정도를 측정하기 위하여 cholesterol, campesterol, sitosterol 그리고

stigmasterol을 기질로 하여 Richmond 방법으로 반응시킨 후 HPLC를 이용하여 기질이 분해되는 양을 분석하였다(18). 먼저, 에탄올에 용해한 각각의 0.5%(w/v) 기질 50 µL에 0.5 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 200 µL를 첨가하고 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 반응액에 조효소액을 250 µL를 첨가하여 혼합한 뒤 37°C에서 2시간동안 반응시키고 에탄올 1500 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 분석에 사용된 HPLC는 Waters 시스템(600 controller, Delta 600 pump 그리고 2487 UV detector)을 사용하였고, 칼럼은 Symmetry C₁₈(5 µm, 4.6×250 mm, Waters)을 사용하였다. 이동상은 0.03% acetic acid와 메탄올을 4:96(v/v) 비율로 혼합한 용매를 사용하였고, 이동상 유속을 1.0 mL/min로 하여 종결된 반응액 20 µL 주입한 뒤 UV 210 nm에서 각각의 기질이 분해된 양과 생성물의 양을 분석하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol oxidase 활성 균주 분리 및 동정

Cholesterol oxidase를 생산하는 토양 미생물을 분리하기 위해서 수원대학교 주변에서 얻은 45점의 토양을 멸균 생리 식염수로 희석하였다. 희석된 토양은 방선균 분리용 배지인 Humic acid-Vitamin(HV) agar 배지에 도말하여 30°C에서 5~7일간 배양하였다. 분리용 배지에서 성장한 150 균주의 방선균을 우선 분리하였고 생성된 단일 colony는 yeast malt extract broth에 현탁 배양하였다. 30°C에서 10일간 배양 후 세포의 효소 활성을 측정하기 위해서 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거한 다음 상등액으로부터 cholesterol oxidase 활성을 측정하였다. 그 결과 유일하게 효소 활성을 보이는 BEN 115 균주를 얻었다. BEN 115 균주의 형태적, 생리적 특성과 배양 조건을 조사한 결과 Table 1에서 보인 바와 같이 yeast malt extract agar에서 베이지색을 띄었고 균사체를 형성하였다. 그람 염색에서 양성균으로 나타났고 탄소원으로 glucose, mannitol, galactose, raffinose, sodium citrate, sodium acetate를 활용하였다. DNA에서 G+C 함량은 67%로 나타났다. 이들 결과를 종합하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(14)와 Li 등(19)의 실험을 참조하였을 때 BEN 115 균주는 *Nocardia*속으로 확인하였다. Li 등(19)의 실험에 의하면 *Nocardia salmonicida*의 G+C 함량이 67%로 본 균주와 같은 함량을 나타냈다. 또한 당 대사능에서도 Li 등(19)은 glucose, mannitol, galactose, raffinose에서 분해능을 보인 반면 arabinose, sorbitol, inositol은 분해하지 못한다고 보고하여 Ben 115와 같은 결과를 나타냈다. 이 결과는 또한 Isik 등(20)의 실험에서 *Nocardia salmonicida*와 생육 조건 및 당 대사능 그리고 G+C 함량이 매우 유사하여 본 균주가 *Nocardia salmonicida*와 동종 또는 유사 균으로 사료되지만 추후의 16s rRNA gene 서열 결정 등의 실험을 통하여 보다 정확한 동정이 요구된

Table 1. Morphological, physiological, and chemotaxonomic characterization of BEN 115

Characteristics	Ben 115
Colony morphology on yeast-malt extract agar	
Color	Bagie
Aerial hyphae	+
Filamentous margins	-
Wrinkled	+
Staining properties	
Acid-fast	+
Gram	+
Growth at 37°C	-
Carbon utilization	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannitol	+
Galactose	+
Sorbitol	-
Inositol	-
Raffinose	+
Sodium acetate	+
Sodium citrate	+
Mol% G+C of DNA	67

+, positive; -, negative.

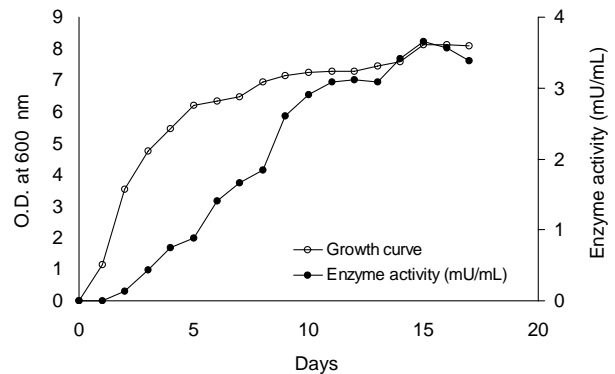
다. Richmond(4)는 본 실험에 사용한 균주와 유사한 *Nocardia* sp.에서 생산한 cholesterol oxidase로 혈청 내 cholesterol의 양을 측정하는 연구를 하였다. *Nocardia*속뿐만 아니라 다른 토양 방선균에서도 cholesterol oxidase를 생산하는데 Chen 등(5)과 MacLachlan 등(21)의 보고에 의하면 *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Streptomyces* sp. 그리고 *Nocardioides simplex*와 같은 방선균에서 세포와 효소를 분비한다고 보고되어 있다. 본 실험에서는 cholesterol oxidase 활성을 갖는 균주 탐색에서 유일하게 활성을 보인 *Nocardia* sp. BEN 115 균주를 본 실험의 대표균주로 사용하였다.

배양 시간에 따른 균수 변화 및 효소 생산

BEN 115에 대하여 배양시간에 따른 균체량과 효소생산의 변화를 알아보기 위하여 3일간 미리 키워 놓은 배양액에서 1 mL(약 10^7 cells/mL)을 100 mL yeast malt extract broth 배지에 접종하였다. 접종 후 24시간 간격으로 균 배양액을 뽑아 균체량과 효소 활성을 측정하였다. 시간에 따른 균수의 변화는 7일간 배양 시 균체량이 증가하다가 그 이후 증가폭이 줄어드는 경향을 나타내었다. 또한 cholesterol oxidase 활성도는 배양 15일째에 3.5 mU/mL로 가장 높은 활성도를 나타냈다(Fig. 1).

최적 효소 생산 조건

효소 생산에 있어서 질소원의 영향을 검토하기 위하여 yeast extract, peptone, tryptone, meat extract, urea, casamino acid, beef extract, soytone을 첨가하여 균을 배양한 결과 yeast extract로 배양하였을 때 가장 높은 활성을 보였

**Fig. 1. Cell growth and extracellular cholesterol oxidase production in BEN 115.****Table 2. Effect of nitrogen sources on the production of the cholesterol oxidase**

Nitrogen sources	Relative activity (%)
Yeast extract	100
Peptone	53
Tryptone	15
Meat extract	64
Urea	-
Casamino acid	23
Beef extract	75
Soytone	22

Ben 115 was incubated with shaking in the medium containing 0.4% glucose, 1% malt extract, and 0.4% of different nitrogen sources for 10 days at 30°C. The enzyme unit of the cholesterol oxidase activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μ mole of cholesterol per min at 25°C under the condition of this study (16).

다(Table 2). 또한 최적 질소원인 yeast extract의 농도에 따른 효소 활성에서도 기존 yeast malt extract broth의 농도인 0.4% 첨가하였을 때 효소 활성이 가장 높게 나타났다(Table 3). Lee 등(22)의 실험에서 토양 미생물 HSL 613이 yeast extract를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 보인 것과 같은 결과를 보였다. 탄소원으로는 glucose 첨가균에서 가장 높은 효소 활성을 보였다(Table 4). 최적 농도는 0.4%로 기존 배지 조성에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Table 5). Lee 등(22)은 galactose와 glucose에서 가장 높은 활성을 보였다

Table 3. Effect of various concentrations of yeast extract on the production of cholesterol oxidase

Concentration of yeast extract	Relative activity (%)
0.2%	98
0.4%	100
1%	93
2%	87

Ben 115 was incubated with shaking in the medium containing 0.4% glucose, 1% malt extract, and yeast extract of various concentrations for 10 days at 30°C. The enzyme unit of the cholesterol oxidase activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μ mole of cholesterol per min at 25°C under the condition of this study (16).

Table 4. Effect of carbon sources on the production of the cholesterol oxidase

Carbon sources	Relative activity (%)
Glucose	100
Glycerol	86
Maltose	43
Galactose	96
Soluble starch	64
Fructose	32
Mannose	23
Sucrose	12
Lactose	65
Xylose	27
Raffinose	75

Ben 115 was incubated with shaking in the medium containing 0.4% yeast extract, 1% malt extract, and 0.4% of different carbon sources for 10 days at 30°C. The enzyme unit of the cholesterol oxidase activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmole of cholesterol per min at 25°C under the condition of this study (16).

Table 5. Effect of various concentrations of glucose on the production of cholesterol oxidase

Concentration of glucose	Relative activity (%)
0.2%	92
0.4%	100
1%	76
2%	52

Ben 115 was incubated with shaking in the medium containing 0.4% yeast extract, 1% malt extract, and glucose of various concentrations for 10 days at 30°C. The enzyme unit of the cholesterol oxidase activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmole of cholesterol per min at 25°C under the condition of this study (16).

는 점에서 본 실험 결과와 유사성을 보였으나 2% 농도에서 가장 높은 활성을 보였다는 점에서는 차이가 있었다. 또한 Park 등(23)의 실험에서는 *Rhodococcus*속의 균주에서 탄소 원으로 glucose를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 보였다는 점과 일치하였다.

분자량 측정

BEN 115 배양액 안에 cholesterol oxidase의 분자량을 확인하기 위하여 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 Western blot을 수행하였다. Fig. 2에서 BEN 115 균주와 *N. erythropolis*에서 정제된 cholesterol oxidase에서 단일 band가 아닌 2개의 band가 나타났다. Sojo 등(24)의 실험에서 *Rhodococcus erythropolis* 배양액에 Triton X-100을 처리하여 cell-linked type과 extracellular type의 두 가지 cholesterol oxidase를 정제하였다고 하였다. 또한 Rhee 등(25)의 실험에서는 *Bacillus* sp.로부터 두 종류의 extracellular cholesterol oxidase를 정제하였고 두 효소의 분자량이 각각 36, 37 kDa으로 약간의 차이를 나타냈다. 본 실험에서는 별도의 non-ionic detergent를 사용하지 않아 세포벽에 결합되어 있던 cholesterol oxidase가 분리되어 나왔을 가능성은 낮으나 배양 기간이 15일로 길었기 때문에 자연적으로 분리되어 검출되었을 수 있다. 또한, Rhee 등(25)의 실험에서와 같이 애초에 서로 다른 분자량을 갖는 cholesterol oxidase가 생산되었을 것으로도 추측되지만 이 부분에 대해선 좀 더 자세한 분자생물학적 연구가 진행되어야 할 것이다. BEN 115에서 생산된 두 종류의 효소의 분자량은 각각 55, 57 kDa으로 이는 Sojo 등(24)의 실험에서 cholesterol oxidase의 분

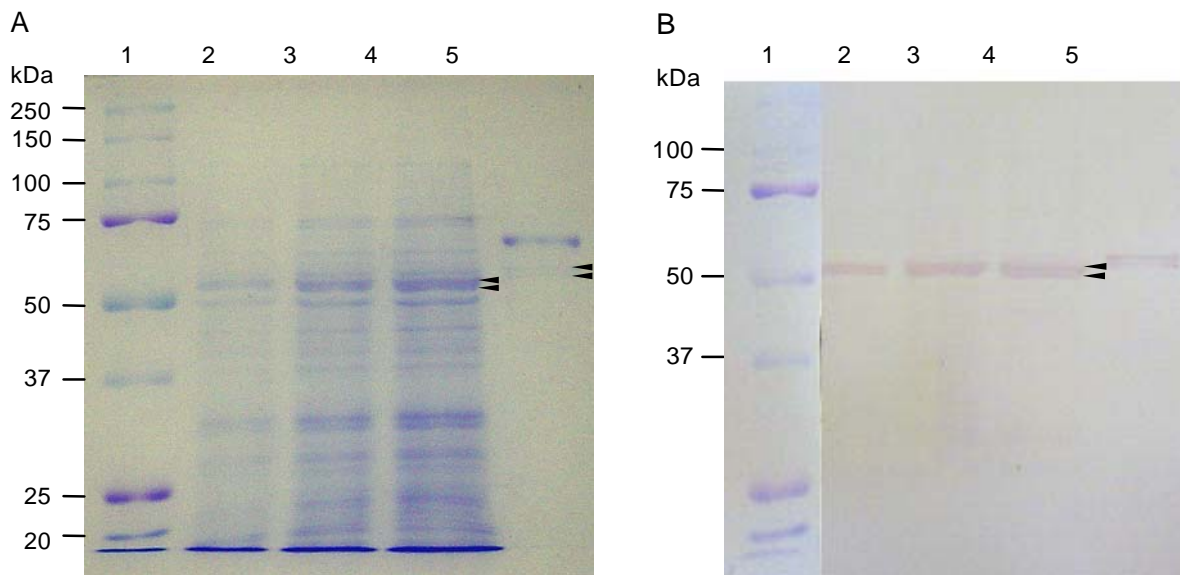


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot of the concentrated culture broth of Ben 115. (A) The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. (B) Immunological assay of cholesterol oxidase. Lane 1, standard protein; lane 2-4, concentrated culture broth 5 μL, 10 μL, and 15 μL, respectively; lane 5, purified cholesterol oxidase from *Nocardia erythropolis*.

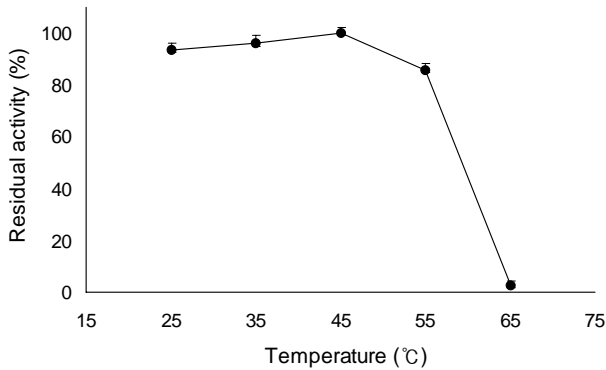


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of cholesterol oxidase.

자량이 약 55 kDa인 것과 비교하여 매우 유사한 결과를 나타냈다. Lee 등(26)과 Doukyu와 Aono(2) 그리고 Yazdi 등(27)의 연구에선 cholesterol oxidase의 분자량은 대략 60 kDa으로 보고하여 본 실험 결과보다 분자량이 더 큰 반면 Rhee 등(25)은 36, 37 kDa으로 그리고 Kim 등(28)은 52 kDa으로 보고하여 본 실험결과보다 분자량이 작은 것으로 나타났다.

온도 안정성

효소를 25~65°C까지 각각의 온도 조건에서 조효소액을 1시간 동안 열처리한 후 잔존 효소 활성도를 측정된 결과 55°C까지 효소 활성이 상당히 유지되었고 65°C에서는 효소 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 Lee 등(26)이 실험한 *Microbacterium* sp. CJ-11에서 생산된 cholesterol oxidase가 70°C까지 안정하다는 결과에 비해 온도 안정성이 다소 낮았지만 Kim과 Ko(29)가 실험한 *Streptomyces* sp. No.4가 50°C에서 10분간 열처리를 하였을 때 효소 활성이 80% 떨어진다는 보고보다는 안정한 것으로 확인되었다.

pH 안정성

조효소액의 pH 안정성을 검토하기 위하여 pH 3.5, 5.5, 7.5, 9.5 그리고 pH 11.5로 각각 완충용액을 만든 후 조효소액 100 µL에 완충용액 900 µL을 혼합하여 4°C에 24시간 반응시킨 다음 남은 효소 활성도를 측정하였다. 실험 결과 pH 3.5~9.5의 범위까지 효소의 활성도가 상당히 안정함을 보였으나 pH 9.5 이상부터 효소 활성도가 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 BEN 115의 세포외 cholesterol oxidase 활성은 산성 조건에서는 비교적 안정하지만 알칼리 조건에서는 급격히 떨어지는 것으로 보인다. 이것은 Yazdi 등(27)이 실험한 *Streptomyces fradiae*에서는 효소의 활성이 pH 4~10 사이에서 비교적 안정한 것으로 보고되어 본 실험에 사용된 균주와 유사한 결과를 보였다. 그러나 BEN 115의 효소는 Kim과 Ko(29)가 실험한 *Streptomyces* sp. No. 4가 pH 6~9 사이에서 다른 pH 범위보다 효소 활성이 약 20% 감소한다는 보고와 Rita와 Sanjay(8)가 실험한 *Streptomyces lavendulae* NCIM 2421는 pH 5~8 사이에서 다른 pH 범위보다

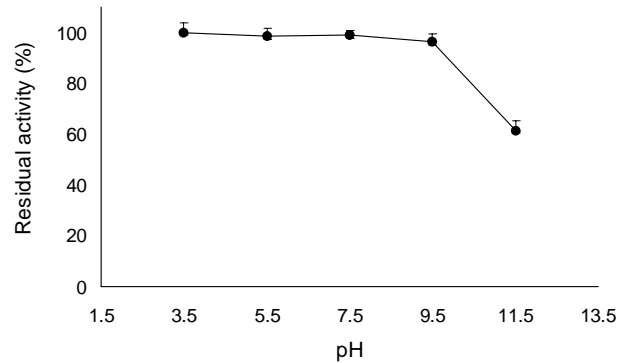


Fig. 4. Effect of pH on the stability of cholesterol oxidase.

효소 활성이 약 40% 활성이 감소한다는 연구와는 다소 차이점이 있었다.

효소 반응의 최적 온도

효소 활성 최적 온도를 조사하기 위하여 25~65°C까지 10°C 간격으로 각각의 온도에서 효소 활성을 측정하였다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 최적 온도는 35°C인 것으로 나타났고, 55°C부터는 효소 활성이 급격히 감소되는 것으로 나타났다. 이것은 효소의 온도 안정성과 관련하여 볼 때 55°C부터 효소 활성이 많이 소실되면서 나타난 결과로 보인다. 이 결과는 Kim과 Ko(29)가 실험한 *Streptomyces* sp. No. 4에서 생성된 cholesterol oxidase가 37°C에서 최적 활성을 나타낸 것과 비교해 볼 때 본 실험에서 얻어낸 균주가 생성한 효소와 비슷한 최적 온도를 나타내었다. 그러나 Lee 등(26)과 Lee 등(30)의 실험에서는 최적 온도가 각각 55°C와 50°C인 것으로 나타나 본 실험에 사용된 균주와는 큰 차이점을 나타내었다.

효소 반응의 최적 pH

pH 3.5, 5.5, 7.5, 9.5 그리고 pH 11.5에서 효소 활성도를 측정된 결과 pH 5.5에서 가장 높은 효소활성을 나타냈고 pH 3.5~5.5와 pH 7.5~11.5에서는 효소 활성이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 6). 이것은 비록 조효소가 pH 3.5~9.5까지 매우

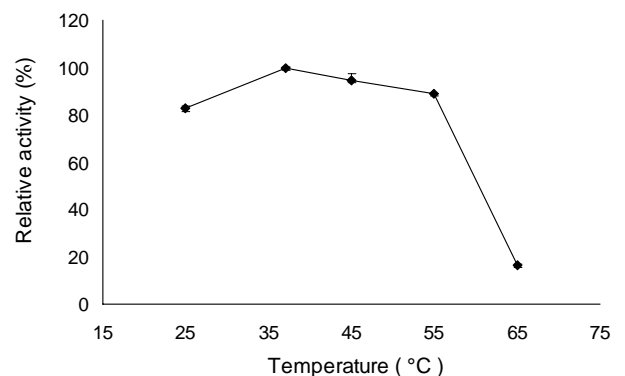


Fig. 5. Effect of temperature on the cholesterol oxidase activity.

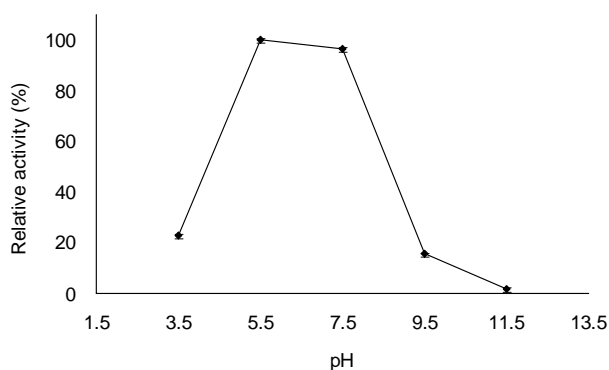


Fig. 6. Effect of pH on the cholesterol oxidase activity.

안정한 것으로 나타났지만 효소가 가장 활발하게 활동할 수 있는 pH 영역은 pH 5.5~7.5로 상당히 제한되어 있는 것으로 나타났다. Kim과 Ko(29)가 실험한 *Streptomyces* sp. No. 4와 Salva Terezinha 등(9)이 실험한 *Brevibacterium* sp.의 최적 pH가 각각 pH 6.5~7.5와 pH 7.5로 본 실험 결과와 비슷한 최적 pH를 나타내었다.

배양액에 detergent 첨가 시 효소 활성의 변화

Sojo 등(24,31)과 Minuth 등(32)의 실험에 의하면 *R. erythropolis*는 세포외 cholesterol oxidase 뿐만 아니라 세포막에 결합된 형태의 cholesterol oxidase도 생산한다고 보고하였다. 이에 본 실험에서도 non-ionic detergent인 Triton X-100, Triton X-114 그리고 Tween 80을 농도별로 균 배양액에 첨가하여 37°C에서 하루 동안 배양하여 균체에 결합되어 있는 효소를 분리하였다. 실험 결과 균이 자라고 있는 배양액에 detergent를 첨가했을 경우는 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 약 1.6~2.0배 효소 활성이 증가하는 것으로 나타나 세포벽에 있는 cholesterol oxidase가 detergent에 의해 세포 밖으로 분비된 것으로 사료된다(Fig. 7). 그러나 detergent 농도가 증가됨에 따라 효소 활성이 농도 의존적으로 증가하지는 않았다.

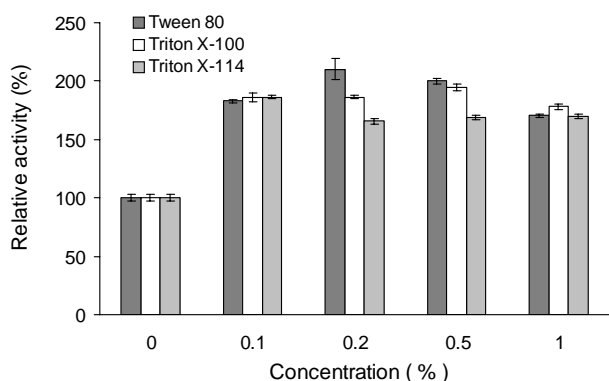


Fig. 7. Effect of detergents (Triton X-114, Triton X-100, and Tween 80) on the cholesterol oxidase activity produced from BEN 115.

Table 6. Substrate specificity of cholesterol oxidase produced from BEN 115

Substrate	Relative activity (%)
Cholesterol	100
Campesterol	50
Sitosterol	50
Stigmasterol	27

Rates of enzymatic oxidation were measured by substituting the sterols for cholesterol in the assay of cholesterol oxidase. The production of each compound was followed by HPLC analysis.

기질특이성

Cholesterol을 비롯하여 campesterol, sitosterol 그리고 stigmasterol에 대한 기질 특이성을 조사한 결과 cholesterol(100%)과 상대적으로 비교 시 campesterol, sitosterol 그리고 stigmasterol이 각각 50%, 50% 그리고 27%의 기질 특이성을 나타내었다(Table 6). 토양 미생물 HSL613이 생산하는 cholesterol oxidase와 *Bacillus sphaericus*에서 분리한 cholesterol oxidase에 대한 stigmasterol의 기질 특이성이 각각 71%와 84%로 나타나 BEN 115에서 생산되는 cholesterol oxidase보다 상대적으로 stigmasterol에 대한 기질 특이성이 높은 것으로 나타났다(29,33). 따라서 cholesterol oxidase를 생산하는 균주의 종류에 따라서 기질특이성에 상당한 차이점이 있는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 산업적으로 사용될 수 있는 안정하고 활성이 높은 cholesterol oxidase를 생산하는 균주를 얻기 위해 토양 미생물로부터 균주를 선별하였다. 선별된 균주에 대하여 세포외 효소 활성을 측정된 결과 BEN 115로 명명한 균주가 가장 높은 효소 활성도를 나타내었다. 이 균주는 형태학적, 생리학적 특성과 배양형태 및 G+C 함량을 분석한 결과 *Nocardia*속으로 확인되었다. 최적 효소 생산 조건을 조사한 결과 기존 yeast malt extract broth 조성인 0.4% yeast extract, 0.4% glucose, 1% malt extract에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 본 균주에서 생산된 extracellular cholesterol oxidase는 SDS-PAGE와 Western blot 결과 분자량이 55, 57 kDa인 두 종류의 효소가 존재하는 것으로 나타났다. BEN 115에 대한 효소학적 특성을 연구한 결과 온도 안정성은 55°C까지 효소 활성이 유지되었고, pH 안정성은 pH 3.5~9.5의 범위까지 안정한 것으로 나타났으며 최적 온도와 최적 pH는 각각 35°C와 pH 5.5인 것으로 나타났다. 또한 detergent(Triton X-100, Triton X-114 그리고 Tween 80) 첨가 시 효소 활성이 첨가하지 않은 대조군보다 약 1.6~2.0배 증가하는 것으로 나타났다. Campesterol, sitosterol 그리고 stigmasterol에 대한 기질 특이성은 cholesterol(100%)과 상대적으로 비교 시 각각 50%, 50% 그리고 27%의 기질 특이

성을 나타내었다.

문 헌

- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 4: 470-475.
- Doukyu N, Aono R. 1998. Purification of extracellular cholesterol oxidase with high activity in the presence of organic solvents from *Pseudomonas* sp. strain ST-200. *Appl Environ Microbiol* 64: 1929-1932.
- Teng JL, Smith LL. 1996. Sterol peroxidation by *Pseudomonas fluorescens* cholesterol oxidase. *Steroids* 61: 627-633.
- Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19: 1350-1356.
- Chen YR, Huang HH, Cheng YF, Tang TY, Liu WH. 2006. Expression of a cholesterol oxidase gene from *Arthrobacter simplex* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 39: 854-860.
- Liu WH, Chen CH, Su YC. 1980. Isolation and identification of a cholesterol oxidase-producing bacterium. *Proc Natl Sci Counc ROC* 4: 433-437.
- Srisawasdi P, Jearanaikoon P, Wetprasit N, Sriwanthana B, Kroll MH, Lolekha PH. 2006. Application of *Streptomyces* and *Brevibacterium* cholesterol oxidase for total serum cholesterol assay by the enzymatic kinetic method. *Clin Chim Acta* 372: 103-111.
- Rita V, Sanjay N. 2003. Biosynthesis of cholesterol oxidase by *Streptomyces lavendulae* NCIM 2421. *Enzyme Microb Technol* 33: 286-291.
- Salva Terezinha JG, Liserre Alcina M, Moretto Aloísia L, Zullo Marco AT, Ventrucci G, Menezes Tobias JB. 2000. Some enzymatic properties of cholesterol oxidase produced by *Brevibacterium* sp. *Revista de Microbiologia* 30: 315-323.
- Lv C, Wang W, Tang Y, Wang L, Yang S. 2002. Effect of cholesterol bioavailability-improving factors on cholesterol oxidase production by a mutant *Brevibacterium* sp. DGCDC-82. *Process Biochemistry* 37: 901-907.
- Murooka Y. 1996. Cholesterol oxidase. *Bioscience and Industry* 54: 16-22.
- Vasudevan PT, Zhou T. 1996. Cholesterol oxidation by microencapsulated cholesterol oxidase. *Appl Biochem Biotechnol* 59: 1-7.
- Hayakawa M, Nonomura H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65: 501-509.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Marmur J, Doty P. 1962. Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its denaturation temperature. *J Mol Biol* 5: 109-118.
- Masurekar PS, Goodhue CT. 1978. Method for producing cholesterol oxidase in the presence of a nonionic surfactant. *United States Patent* 4,093,517.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19: 1350-1356.
- Li WJ, Jiang Y, Kroppenstedt RM, Xu LH, Jiang CL. 2004. *Nocardia alba* sp. nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. *Syst Appl Microbiol* 27: 308-312.
- Isik KM, Chun JS, Hah YC, Goodfellow M. 1999. *Nocardia salmoneicida* nom. rev., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 49: 833-837.
- MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW. 2000. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72: 169-195.
- Lee IA, Choe YK, Lee HS, Choe IS, Chung TW. 1992. 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 Biotechnol* 20: 395-400.
- Park SH, Kwon IB, Hahm YT, Shin DH, Chun UH. 1998. 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. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 4: 343-351.
- Sojo M, Bru R, Lopez-molina D, Garcia-carmona F, Argüelles JC. 1997. Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis*. Isolation and physiological characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 583-589.
- Rhee CH, Kim KP, Park HD. 2002. Two novel extracellular cholesterol oxidases of *Bacillus* sp. isolated from fermented flatfish. *Biotechnol Lett* 24: 1385-1389.
- Lee YY, Choi JH, Chung YJ. 1997. Purification and characterization of thermostable cholesterol oxidase. *Kor J Food Sci Ani Resour* 17: 265-271.
- Yazdi MT, Zahraeib M, Aghaepoura K, Kamranpour N. 2001. Purification and partial characterization of a cholesterol oxidase from *Streptomyces fradiae*. *Enzyme Microb Technol* 28: 410-414.
- Kim HS, Seong RS, Lee GH, Lee YJ, Lee IS. 2002. Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by *Streptomyces polychromogenes* IFO 13072. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 30: 142-142.
- Kim HS, Ko HS. 1999. Production and characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. No.4. *Kor J Biotechnol Bioeng* 14: 174-180.
- Lee HS, Lee SC, Kwon TJ, Chung TW. 1992. Purification and characterization of cholesterol oxidase produced by soil microorganism HSL613. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 20: 401-408.
- Sojo MM, Bru RR, Garcia-Carmona FF. 2002. *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 as a suitable source of cholesterol oxidase: cell-linked and extracellular enzyme synthesis, purification and concentration. *BMC Biotechnol* 2: 3.
- Minuth T, Thömmes J, Kula MR. 2000. Extraction of cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* using a non-ionic surfactant-based aqueous two-phase system. *J Biotechnol* 38: 151-164.
- Suh HJ, Kim TW, Son HS. 1993. Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Bacillus sphaericus*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21: 446-452.

(2008년 9월 3일 접수; 2008년 10월 9일 채택)