

콜레스테롤 이용 박테리아의 분리 및 분해 특성

최민호 · 조도현 · 박연희*

아주대학교 생물공학과

Isolation of Cholesterol Utilizing Bacteria and Their Degradation Pattern

Choi, Min-Ho, Do-Hyun Jo and Yun-Hee Park*

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Abstract — Six bacterial strains capable to grow on medium containing cholesterol as sole carbon source were isolated from soil, pork fat and cheese. Three of them were tentatively identified as *Rhodococcus* species, *Rhodococcus* sp. CD-1, *R. sp.* CD-2, and *R. sp.* CD-3. All the isolates showed a varying amount of cholest-4-en-3-one as the degradation product, and three strains of *Rhodococcus* spp. showed rapid degradation of cholesterol. Radioisotopic studies revealed that cholesterol was degraded to non-sterol hydrophilic compounds via cholest-4-en-3-one, and presumably to CO₂. These strains showed two distinct patterns in further degradation of cholest-4-en-3-one. By one group, *R. sp.* CD-1 and *R. sp.* CD-3, cholest-4-en-3-one was rapidly converted to non-sterol intermediates without significant accumulation of sterol derivatives in the culture broth. In contrast, by another group, *R. sp.* CD-2, the substantial amount of cholest-4-en-3-one was accumulated indicating a lower conversion of the compound to the next metabolites.

Cholesterol은 고등 동물에서 매우 중요한 sterol로서, 이를 분해하여 유일 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물은 1913년에 최초로 Söhngen(1)에 의해서 보고되었으며, Turfitt(2, 3)는 토양으로부터 cholesterol을 유일탄소원으로 이용하는 *Proactinomyces*, *Mycobacterium* 등을 분리하였다. 그 후, Horvath(4)는 *Azotobacter*가 cholesterol을 cholest-4-en-3-one과 7-dehydrocholesterol로 전환할 수 있으며 side chain의 절단에 의해서 생성되는 분해산물을 분리하였다. Schatz 등(5)도 Gram 음성균을 포함한 다양한 미생물들이 cholesterol을 분해할 수 있음을 보고하였다. Arima 등(6)은 1500 여종의 미생물 균주에 대하여 cholesterol 분해능력을 조사한 결과, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Serratia* 등이 cholesterol을 완전히 분해하였으며, 그 밖의 다양한 박테리아, 방선균, 곰팡이 그리고 효모 등이 cholesterol을 cholest-4-en-3-one으로 전환시킨다고 보고하였다. 미생물이

cholesterol을 분해하는 과정의 주요 분해산물로는 cholest-4-en-3-one, androstendione(AD), androstadienedione(ADD), 그리고 side chain이나 steroid nucleus가 일부 분해된 구조의 분해물도 검출되었다(7-16). 또한, 효소 저해제나 동위원소로 표시된 기질을 사용하여 side chain의 분해과정(8-10)과 고리 구조의 분해과정(11-13)에 대한 연구도 보고되었다.

미생물의 cholesterol 분해 연구를 기초로 한 응용 범위는 매우 다양하여, 소염제, 피임제, 갱년기 장애 조절제 등으로 널리 쓰이고 있는 steroid계 의약품 생산을 위한 전구체의 생산에 응용될 수 있으며(16), 미생물이 생산하는 cholesterol oxidase (EC 1.1.3.6)는 혈청 cholesterol의 효소학적 정량법에 사용되고 있다(17). 또한 최근에는 미생물을 이용하여 식품 원료에서 cholesterol을 제거하여 저 cholesterol 함유 식품을 제조하려는 연구도 보고되었다(18, 19).

본 실험에서는 cholesterol의 미생물학적 분해 연구의 기초 자료로서 토양 및 동물 유래 분리원으로부터 cholesterol을 유일탄소원으로 이용, 생육하는 균주를 분리하여 cholesterol 분해능력을 비교하고, 분해산물의 검출 및 분해대사의 특성을 조사하였다.

Key words: Cholesterol, *Rhodococcus* spp., cholesterol degradation, cholest-4-en-3-one

*Corresponding author

재료 및 방법

사용 시약

Cholesterol은 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였고, 동위 원소로 표지된 [4-¹⁴C]-cholesterol은 Amersham사(USA)의 제품을, cholest-4-ene-3-one과 androsta-1,4-diene-3,17-dione의 표준품으로는 Steraloids사(USA)의 제품을 사용하였다. Ethyl acetate, chloroform 등의 유기용매는 Junsei사(Japan)와 Merck사(Germany)의 특급 및 1급 시약을 사용하였다. TLC 분석을 위하여 사용한 TLC plate는 Sigma사(USA)의 precoated silica gel TLC plate(20×20 cm)을 사용하였다. 동위원소 측정시에 증폭을 시키기 위해 넣어드는 scintillation cocktail solution은 2,5-diphenyloxazole(PPO) 5 g, *p*-bis-(*o*-methylstyryl)-benzene (bis-MSB) 0.125 g, aqueous solubilizer로 Beckman사(USA)의 Bio-solv™ 160 ml 등을 toluene에 녹여 1l가 되도록 한 용액을 사용하였다. 배지 제조에는 Difco사(USA)와 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였다.

사용 균주

토양 및 동물 유래 분리원으로부터 cholesterol을 유일탄소원으로 이용하는 박테리아 6균주를 분리하여 본 실험에 사용하였으며, 이중 3균주는 *Rhodococcus* sp.로 부분동정하였고, 나머지 3균주는 동정하지 못하였다. 이 *Rhodococcus*의 특성을 비교하기 위한 대조 균주로는 한국과학기술원 유전공학연구소 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양 받은 *Rhodococcus equi* KCTC 9082, *Rhodococcus rhodochrous* KCTC 9086, 그리고 *Rhodococcus erythropolis* KCTC 1062를 사용하였다.

Cholesterol 분해 균주의 분리 및 동정

Cholesterol 분해 능력이 있는 균주를 분리하기 위해 젓소 목장의 토양, 돼지 비계, 치즈 및 원유 등의 시료를 채취하였다.

토양시료는 3 g씩 취하여 100 ml의 mineral salt medium(MSM, NH₄NO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, D.W 1l, pH=7.0)에서 12시간 동안 진탕한 후 정지시키고 그 상등액을 유일 탄소원으로 0.1% cholesterol이 함유된 MSM에 접종하여 진탕배양(30°C, 150 rpm)하였다. 돼지 비계와 치즈 및 원유 시료는 0.3~0.5 g을 5 ml의 0.1% cholesterol 함유 MSM에 접종하여 배양하였다. 5일 후에 균체 성장을 나타낸 배양액은 동일 배지에 1%씩 3회 반복하여 계대 배양한 후 최종적으로 trypti-

case soy agar에 평판 배양하여 colony를 얻었다. 대표적인 colony들을 선택하여 순수 분리하고 실험에 사용하였다.

분리 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20), Chemical Methods in Bacterial Systematics(21), Methods in Microbiology(22), 그리고 Stanek(23)의 방법 등을 기초로 하여, 분리한 cholesterol 분해균주의 형태, Gram-stain, colony 색깔, cell wall sugars, diaminopimelic acid isomer 분석, mycolic acid 분석, casein, tyrosine, xanthine 분해력, catalase test 등의 실험을 통해 동정하였다.

Cholesterol 분해 능력 및 분해 대사의 특성 조사

배양 : 분리 균주의 cholesterol 분해능력, 분해 산물 및 분해 특성을 조사하기 위하여 대조 균주와 함께 0.1% cholesterol이 함유된 yeast extract mineral salt medium(YEM, Yeast extract 5.0 g, NH₄NO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, D.W 1l, pH=7.0)(6)에 각각 1% 접종한 후 3일간 진탕배양(30°C, 150 rpm)하였다. 이때 동위 원소 분석을 위하여 약 50,000 dpm의 동위 원소로 표지된 [4-¹⁴C]-cholesterol을 접종 전에 첨가하였다.

용매 추출에 의한 분획화 : 배양액을 추출방법을 달리하여 free sterols, conjugate sterols, non-sterol hydrophilic compounds로 분획화하였다. Free sterols는 배양액에 동량의 ethyl acetate를 넣고 진탕한 후 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 총분리를 시키고 pasteur pipette으로 ethyl acetate 층을 분리하는 과정을 3회 반복 실시하여 추출하였다. Conjugate sterols는 free sterols를 추출한 배양액에 20~25%(w/v)의 NaCl을 가하여 포화시킨 후 H₂SO₄를 한두방울을 가하여 pH를 1 이하로 낮추고, ethyl acetate를 첨가하여 진탕한 후 원심분리하여 총 분리를 시키고 그 상등액을 pasteur pipette으로 분리하는 과정을 3회 반복 실시하여 추출하였다. Non-sterol hydrophilic compounds는 free sterols 추출과 conjugate sterols 추출 과정을 거친 남은 배양액을 non-sterol hydrophilic compounds로 사용하였다. 배양 후 잔여 radioactivity는 배양액을 일정량 취하여 측정하였다.

Thin layer chromatography(TLC) : Free sterols 추출액은 감압 건조한 후 0.5 ml의 ethyl acetate에 녹이고 50°C 건조기에서 활성화시킨 silica gel TLC plate에서 cholesterol, cholest-4-ene-3-one, androsta-1,4-diene-3,17-dione(ADD)의 표준품과 함께 전개하였다. 전개 용매는 chloroform : ethyl acetate를 95 : 5로 혼합한 용매를 사용하였고, iodine 증기로 발색시

켰다. 분해 산물은 표준 시료의 R_f 값과 비교하여 동정하였다.

Liquid-scintillation counting(LSC) : 추출 전 배양액, non-sterol hydrophilic compounds는 배지를 일정량 취하였고, free sterols, conjugate sterols는 ethyl acetate로 추출 후 일정부피로 한 다음 일정량을 취하여 scintillation cocktail solution과 섞고 liquid scintillation counter(Packard 1600TR, USA)로 5분간 측정하여 dpm(disintegration per min)으로 radioactivity를 측정하였다. Iodine vapor로 발색시킨 TLC plate로부터 얻은 각 band 부분은 면도칼로 긁은 후, counting vial에 담고 동일한 방법으로 radioactivity를 측정하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol 분해 균주의 분리 및 동정

젓소 목장의 토양, 돼지 비계, 치즈 및 원유 등으로부터 cholesterol enrichment culture technique를 사용하여 cholesterol을 유일 탄소원으로하여 생육하는 박테리아를 분리하였다. 젓소목장의 토양으로부터 4균주, 돼지 비계로부터 1균주, 치즈로부터 1균주 등의 총 6균주를 순수분리하여 동정을 위한 특성을 조사하였다.

분리 균주 6균주에 대하여 대조 균주와 함께 분류학적 특징을 조사한 결과 3균주를 *Rhodococcus* 속 (Genus)으로 부분 동정하고, *Rhodococcus* sp. CD-1, *R. sp. CD-2*, *R. sp. CD-3*로 각각 명명하였다. 나머지 3균주는 동정하지 못하였다(UI-1, UI-2, UI-3). *Rhodococcus* sp. CD-1, CD-2, CD-3와 대조 균주로 사용한

R. equi KCTC 9082의 분류학적 특징은 Table 1에 나타내었다.

분리 균주의 cholesterol 분해 능력 비교

분리한 균주의 cholesterol 분해 능력을 알아보기 위하여 대조 균주 *Rhodococcus equi* KCTC 9082, *R. rhodochrous* KCTC 9086, *R. erythropolis* KCTC 1062와 함께 0.1% cholesterol이 함유된 YEM에서 배양한 후 cholesterol 분해 정도를 측정하였다. 30°C에서 3일간 배양 후 유기용매 추출과 동위원소 분석법으로 분석한 결과 *R. sp. CD-1*, *R. sp. CD-2*, *R. sp. CD-3*는 각각 3일 이내에 배양액에 첨가한 cholesterol의 97%, 100%, 100%를 분해하여 분해 능력이 우수하였으나, UI-1, UI-2, UI-3의 경우는 각각 52%, 78%, 43%를 분해하여 분해 능력이 훨씬 낮은 것으로 나타났다. 또한, 대조 균주로 사용한 *R. equi*, *R. rhodochrous* 그리고, *R. erythropolis*는 각각 94%, 85%, 100%를 분해하였다(Table 2, Fig. 1).

박테리아의 cholesterol 분해 능력에 대한 보고를 보면 Watanabe 등(24)은 버터, 베이컨 등의 동물유래 식품으로부터 *Rhodococcus* spp.의 균주를 분리하여 여러가지 대조 균주와 함께 cholesterol 분해 능력을 측정한 결과 16균주중 10균주가 100%에 가까운 분해능력을 가지고 있음을 보고하였다. Arima 등(6)의 경우는 1500여 종류의 미생물에 대하여 본 실험과 동일한 배지를 사용하여 7일간 배양시에, 첨가된 cholesterol의 20% 이상 분해한 균주는 286균주였으며 이 중 18균주가 50% 이상 분해하였다고 보고하였다. Peterson(1)의 연구에서는 cholesterol이 0.1% 첨가된 mineral salt medium에서 *Streptomyces* 3균

Table 1. Taxonomic characteristics of the isolates and reference strains

| characteristics | <i>R. equi</i> KCTC 9082 | <i>R. sp. CD-1</i> | <i>R. sp. CD-2</i> | <i>R. sp. CD-3</i> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Gram stain | positive | positive | positive | positive |
| Color of colony | orange | orange | orange | pink |
| Aerial mycelium | - | - | - | - |
| Substrate mycelium | - | - | - | - |
| Acid from glucose | - | - | - | - |
| Cell wall sugars | Ara, Gal, Rib | Ara, Gal, Rib | Ara, Gal, Rib | Ara, Gal, Rib |
| Diaminopimelic acid | meso- | meso- | meso- | meso- |
| Mycolic acid | + | + | + | + |
| Decomposition of casein | - | - | - | - |
| tyrosine | - | + | - | + |
| xanthine | - | - | - | - |
| Catalase | + | + | + | + |

+: positive, -: negative, Ara: arabinose, Gal: galactose, Rib: ribose, Glc: glucose, Rham: rhamnose.

Table 2. Cholesterol degradation and composition of degradation products of the isolates and reference strains (%)

| Strains | Residual Radio-activity | Chole-sterol | Chole-stenone | Uniden-tified sterols | Conjugate sterols | Non-sterol hydrophilic compounds | Degra-dation | Recovery |
|------------------------|-------------------------|--------------|---------------|-----------------------|-------------------|----------------------------------|--------------|----------|
| Blank | 97.0 | 95.3 | 0.0 | 0.0 | 2.8 | 1.7 | 4.7 | 103.0 |
| <i>R. equi</i> | 81.3 | 6.1 | 48.5 | 3.5 | 4.9 | 15.3 | 93.9 | 93.8 |
| <i>R. rhodochrous</i> | 43.3 | 15.2 | 7.8 | 3.0 | 3.5 | 12.6 | 84.8 | 93.3 |
| <i>R. erythropolis</i> | 21.4 | 0.0 | 6.4 | 0.0 | 3.8 | 9.3 | 100.0 | 91.1 |
| <i>R. sp. CD-1</i> | 25.0 | 2.9 | 2.1 | 0.0 | 3.0 | 15.5 | 97.1 | 94.0 |
| <i>R. sp. CD-2</i> | 60.9 | 0.0 | 31.5 | 0.0 | 3.5 | 17.2 | 100.0 | 85.7 |
| <i>R. sp. CD-3</i> | 36.9 | 0.0 | 13.5 | 3.6 | 3.6 | 8.3 | 100.0 | 78.6 |
| UI-1 | 71.5 | 47.7 | 2.0 | 0.0 | 3.3 | 10.9 | 52.3 | 88.6 |
| UI-2 | 61.0 | 22.4 | 2.5 | 0.0 | 3.7 | 26.7 | 77.6 | 89.1 |
| UI-3 | 89.9 | 57.3 | 1.5 | 0.0 | 10.5 | 25.8 | 42.7 | 105.8 |

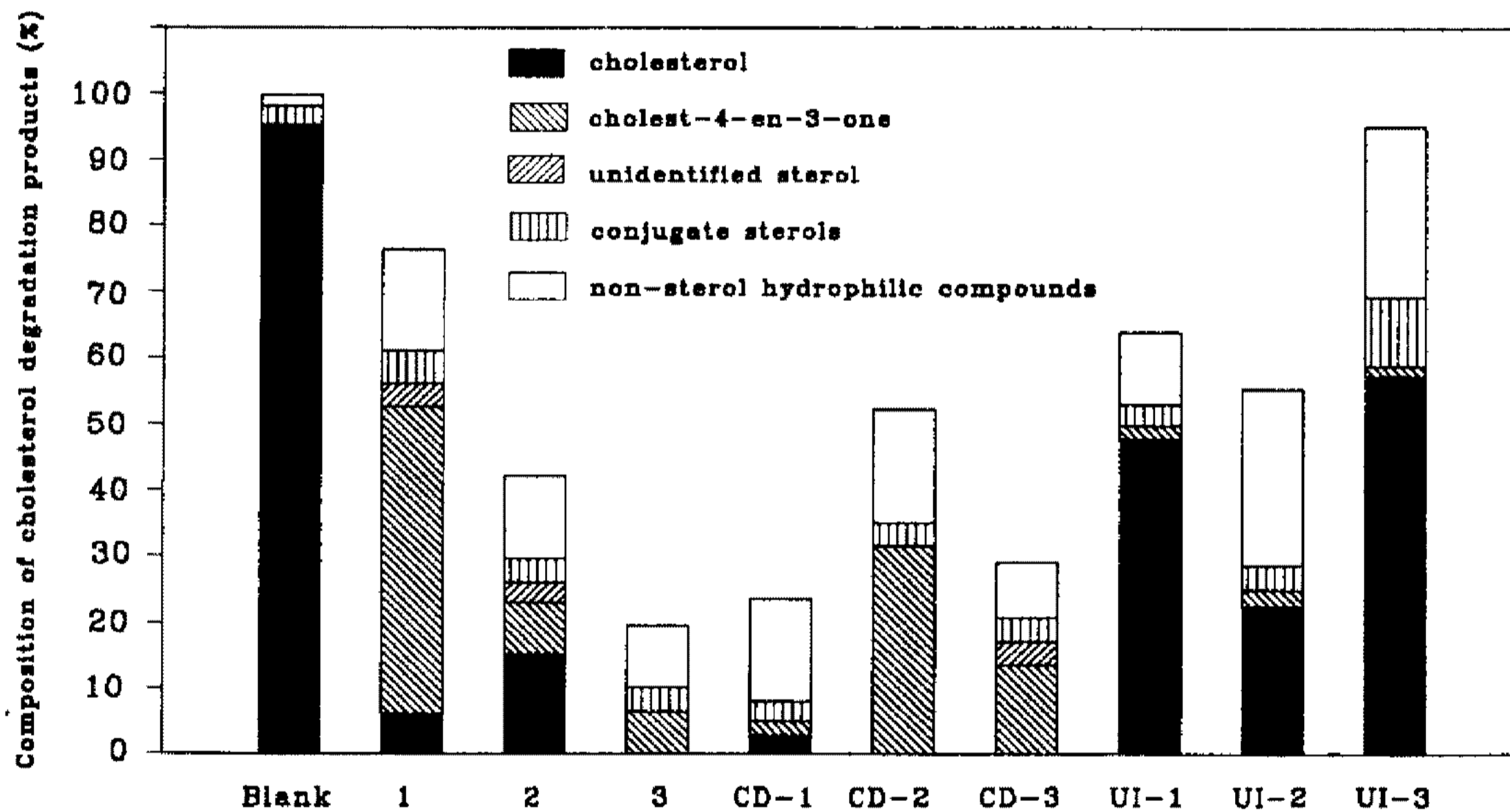


Fig. 1. Composition of Cholesterol degradation products by the isolates and reference strains. Each strain was incubated in yeast extract medium with 0.1% cholesterol at 30°C for 3 days
 1: *Rhodococcus equi* KCTC 9082, 2: *Rhodococcus rhodochrous* KCTC 9086, 3: *Rhodococcus erythropolis* KCTC 1062

주를 6일간 배양하여 각각 32%, 81%, 100%가 분해되었다고 보고하였다. 이들의 결과와 비교해 볼 때 본 실험에서 분리한 *Rhodococcus* sp. CD-1, *R. sp. CD-2*, *R. sp. CD-3*는 매우 높은 cholesterol 분해 능력을 가진 균주로서, cholesterol의 분해 목적에 이용 가능성이 있는 균주로 볼 수 있다.

Cholesterol 분해 대사 산물의 동정

각 균주의 배양액을 ethyl acetate로 추출한 free sterols를 TLC로 분석한 결과 균체를 접종하지 않은 blank에서는 분해산물이 나타나지 않았고 cholesterol만이 확인되었으나, 균주를 배양한 경우에는

모두 cholest-4-en-3-one을 생성하였으며 또한, *R. sp. CD-3*, *R. equi*, *R. rhodochrous*는 동일한 것으로 보이는 분해산물을 생성하였으나 이 물질을 동정하지는 못하였다(Fig. 2).

Cholest-4-en-3-one 이외의 이전의 보고(12, 14)에 의하여 알려진 cholesta-1,4-dien-3-one, androsta-1,4-dien-3,17-dione, androst-4-en-3-one 등의 분해산물은 검출되지 않았다. 효소 저해제를 사용하지 않은 실험에서는 통상 cholest-4-en-3-one를 비롯한 1~2가지 정도의 분해산물들만 검출되었으며(6, 7, 18, 19), 본 실험에서 분해산물로 cholest-4-en-3-one만이 동정된 것은 이 균주들의 cholest-4-en-3-one 이후의 분해속

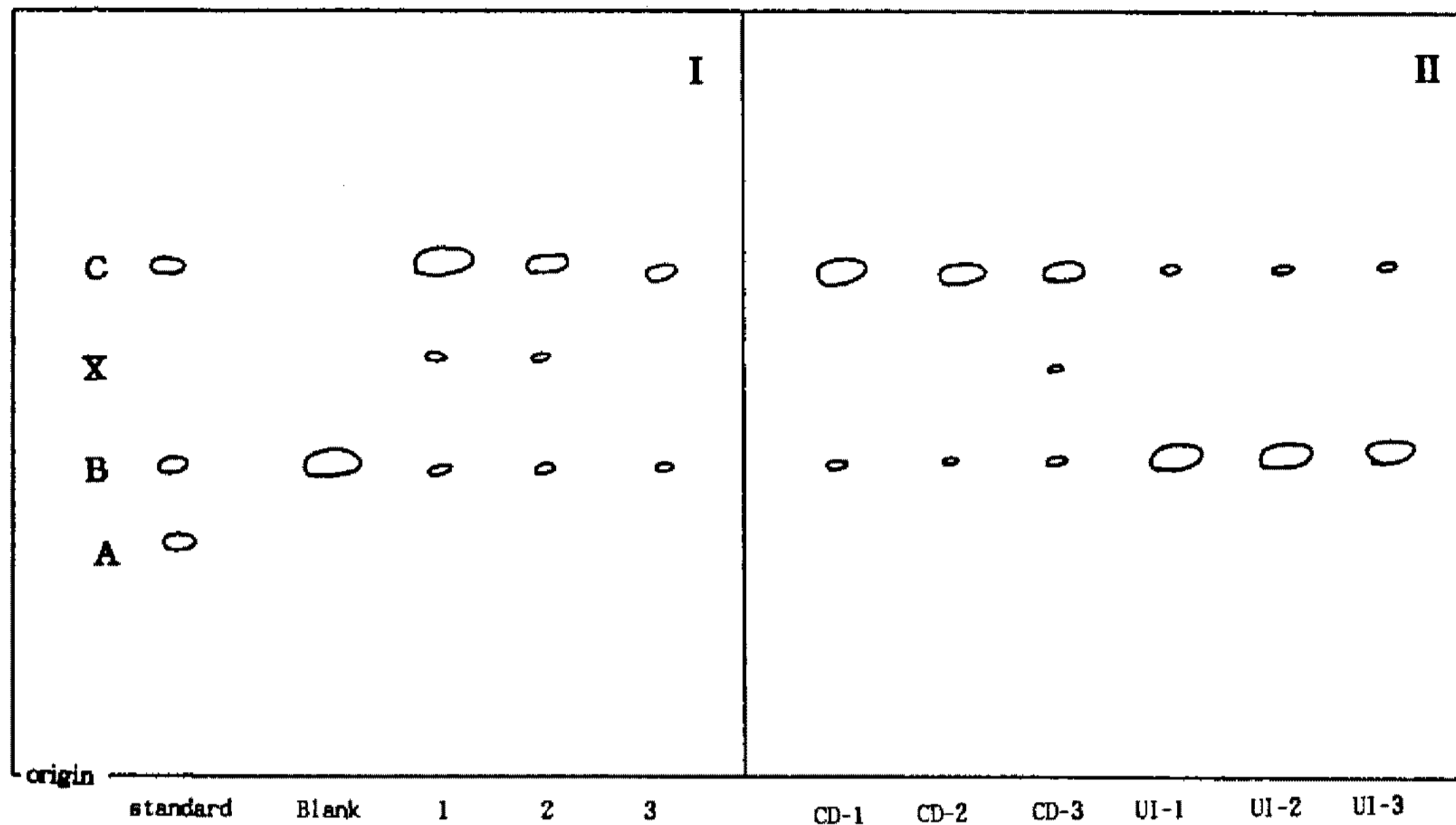


Fig. 2. Thin layer chromatogram of free sterols of cholesterol degradation products.

Separation of degradation products was carried out on silica gel plate using chloroform: ethyl acetate (95:5, v/v) Standard A: androsta-1,4-dien-3,17-dione, B: cholesterol, C: cholest-4-en-3-one, X: unidentified sterol

1: *Rhodococcus equi* KCTC 9082, 2: *Rhodococcus rhodochrous* KCTC 9086, 3: *Rhodococcus erythropolis* KCTC 1062

도가 빨라 3일 배양 후의 배양액을 분석에 사용한 본 실험에서는 검출되지 못한 것으로 추측할 수 있다.

Cholesterol 분해 대사 과정의 비교

각 균주의 cholesterol 분해 대사를 조사하기 위해 0.1%의 cholesterol이 함유된 YEM에 약 50,000 dpm의 [4-¹⁴C]-cholesterol을 첨가하는 동위원소 분석법을 사용하였다. 배양액은 free sterols, conjugate sterols, non-sterol hydrophilic compounds로 용매추출로 분획화하고, free sterols는 다시 TLC를 통해 각 성분으로 분리한 후 각 부분의 radioactivity를 측정하였다.

먼저, 3일간 배양한 배양액을 그대로 사용하여 배양 전후의 radioactivity 변화를 비교하였다(Table 2, Fig. 1). 균주를 접종하지 않은 blank에서는 배양전 첨가한 radioactivity의 97%가 3일 후에도 남아있었으며 유기용매 추출에 의한 분획화와 TLC를 통하여 cholesterol이 분해되지 않고 남아있음을 확인하였다. 또한, conjugate sterols 3%와 non-sterol hydrophilic compounds 2%로 측정된 radioactivity는 추출 과정에서 생기는 background 값으로 하였다. 그러나, 각 균주를 접종한 배양액에서는 *R. sp.* CD-1, *R. erythropolis*의 경우 접종 전에 비하여 총 radioactivity가 각각 25%, 21% 만 남아 있었고, *R. sp.* CD-3, *R. rhodochrous*의 경우는 각각 37%, 43%가 잔여하였으며, 그외의 균주들의 경우는 61% 내지 90%에 해당하는 radio-

activity가 남아 있어서, 접종 전에 첨가한 radioactivity와 배양 후 잔여 radioactivity의 차이에 해당하는 radioactivity가 배지에서 제거되었음을 알 수 있었다. 그리고, free sterols는 cholesterol, cholest-4-en-3-one 그리고, 하나의 미확인 물질(*R. sp.* CD-2, *R. equi*, *R. rhodochrous*)로 구성됨을 보였다. Conjugate sterols에서는 3% 내지 11%의 radioactivity가 검출되었고, non-sterol hydrophilic compounds에는 8% 내지 27%의 radioactivity가 검출되었다. 이러한 결과로 cholesterol이 cholest-4-en-3-one으로 산화된 후 steroid 모핵 구조를 분해시킬 수 있는 효소계에 의하여 수용성인 non-sterol intermediates로 전환되었고, 계속되는 분해 과정에 의해서 CO₂로 방출된 것으로 추정할 수 있었다. Stadtman 등(7)의 실험에서도 *Mycobacterium*을 [4-¹⁴C]-cholesterol 또는 [26-¹⁴C]-cholesterol과 배양했을 때 [4-¹⁴C]-cholest-4-en-3-one과 ¹⁴CO₂에서 radioactivity가 검출되었음을 보고하였다. 미생물의 cholesterol 대사에 관한 Sih 등(9, 10)의 연구 보고에서는 cholesterol이 cholest-4-en-3-one 등으로 산화된 후 side chain의 분해과정을 거쳐 androst-4-en-3,17-dione이 되고, A ring과 B ring이 열리고 최종적으로 propionaldehyde와 pyruvate로 분해된다고 보고하였다. 이 때 cholesterol의 4번 탄소는 pyruvate의 carboxyl group으로 존재하게 된다. Peterson 등(8)은 cholesterol의 [¹⁴C-]가 표시 위치에 따라 CO₂와 non-sterol hydrophilic compou-

nds에서의 검출을 달리한다고 보고하였다. 따라서, 본 실험에서의 non-sterol hydrophilic compounds는 이들의 보고를 기초로 하여 그 화학구조를 규명해야 할 것이다.

모든 균주들이 공통적으로 앞에서 추정된 일련의 분해과정을 통해 분해한 것으로 볼 수 있으나, 총 잔여 radioactivity, 잔여 cholesterol의 양, 생성된 cholest-4-en-3-one의 양, conjugate sterols와 non-sterol hydrophilic compounds의 양에서는 균주에 따라 차이를 보였으며, 이들 균주의 분해 과정은 cholest-4-ene-3-one 이후의 분해단계에서의 차이에 따라 구별되는 두개의 그룹으로 나눌 수 있었다(Table 2, Fig. 1). *R. sp. CD-1*, *R. sp. CD-2*, *R. sp. CD-3*, *R. equi*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*를 비교해 볼 때, 이들 모두가 cholesterol을 cholest-4-en-3-one으로 산화하였으며, cholesterol의 분해 능력이 거의 100%에 가까운 점에서는 동일하였다. 그러나, *R. sp. CD-1*, *R. sp. CD-3*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*를 포함하는 첫번째 그룹에서는 cholesterol이 cholest-4-en-3-one으로 산화된 후, sterol 모핵 구조의 분해가 이루어지면서 CO₂와 수용성 물질로의 분해가 활발히 이루어져 sterol 계 중간 대사산물이 거의 남지 않았다. 이와는 대조적으로 *R. sp. CD-2*, *R. equi*를 포함하는 두번째 그룹에서는 cholest-4-en-3-one이 생성된 후, 그 이후의 분해 과정이 활발하지 못해 비교적 많은 양의 cholest-4-en-3-one이 배양액에 축적되었다.

이와 유사한 특성이 Arima 등(6)의 연구에서도 관찰되었다. 이들은 cholesterol의 분해 양상에 따라 3가지 그룹으로 분류하였다. 첫번째 그룹은 cholesterol 분해 균주의 대부분에 해당하는데, 분해산물로서 단지 cholest-4-en-3-one만을 축적하였으며 박테리아, 방선균, 곰팡이 그리고 효모에서 일반적으로 나타났다. 두번째 그룹은 cholest-4-en-3-one과 함께 cholesta-1, 4-dien-3-one을 형성하였다. 이들은 주로 *Streptomyces*에 해당하였다. 세번째 그룹은 cholesterol이 상당히 분해되어 sterol 계통의 중간 산물을 남기지 않는 특징을 가지고 있으며, *Arthrobacter simplex*, *Bacillus roseus*, *Bacillus sphaericus*, *Brevibacterium lipolyticum*, *Corynebacterium equi*, *Mycobacterium avium*, *Nocardia erythropolis*, *Streptomyces rubescens* 등이 이 그룹에 해당하였다.

이러한 cholesterol 분해 방식의 차이로 보아 cholesterol 제거 목적으로 사용하기에는 steroid 계의 중간 대사산물이 남지 않는 *R. sp. CD-1*, *R. sp. CD-3*를 사용하는 것이 더 유리하리라고 판단된다.

본 보에서는 실험 결과를 보고하지 않았으나, 이

균주들의 cholesterol oxidase 활성도를 조사한 결과 *R. sp. CD-2*는 상당히 우수한 cholesterol oxidase 활성도를 가진 것으로 나타나 cholesterol oxidase 생산 등에도 이용될 만한 균주로 평가되었으며, 이 균주의 cholesterol oxidase의 특성과 효율적인 효소의 분리, 정제에 관한 연구가 진행 중이다.

요 약

젓소목장의 토양, 돼지 비계, 치즈 등으로부터 cholesterol을 유일 탄소원으로 이용하여 생육하는 박테리아 6균주를 분리하였다. 이 균주들의 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 조사하여 이 중 3균주는 *Rhodococcus* species로 부분 동정하고, 각각 *Rhodococcus sp. CD-1*, *CD-2*, *CD-3*으로 명명하였다.

각 균주의 cholesterol 분해능력을 30°C 에서 배양하면서 조사한 결과 *Rhodococcus spp. CD-1*, *CD-2*, *CD-3*는 3일 후에 거의 100%를 분해하였으며, 모든 균주들이 주요 분해산물로 cholest-4-en-3-one을 형성하였다. 그러나, cholest-4-en-3-one 이후의 분해 단계에서는 균주에 따라 대사방식에 차이가 있어서, *Rhodococcus sp. CD-1*, *CD-3*는 cholesterol이 cholest-4-en-3-one으로 산화된 후 모핵의 분해가 이루어지면서 수용성 물질로의 분해가 활발하여 sterol 계 대사산물을 거의 남기지 않았으나, *Rhodococcus sp. CD-2*는 배양 후 cholest-4-en-3-one이 상당량 남아 있어서 cholest-4-en-3-one 이후의 분해단계가 상대적으로 활발하지 못함을 알 수 있었다.

참고문헌

- Peterson, G.E. and J.R. Davis. 1946. Cholesterol utilization by *Streptomyces* sp. *Steroids* 4: 677-688.
- Turfitt, G.E. 1944. The microbiological degradation of steroids. 2. oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* sp. *Biochem. J.* 38: 49-62.
- Turfitt, G.E. 1947. Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.* 54: 557-562.
- Horvath, T. and A. Kramli. 1947. Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. *Nature* 160: 639.
- Schtz, A., K. Savard, and I.J. Pintner. 1949. The ability of soil microorganisms to decompose steroids. *J. Bacteriol.* 58: 117-125.
- Arima, K., M. Nagasawa, M. Bae, and G. Tamura. 1969. Microbial transformation of Steroids. 1. decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 22: 1636-1643.
- Stadtman, T.C., A. Cherkas, and C.B. Anfinsen.

1954. Studies on the microbiological degradation of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **206**: 511-523.
8. Nagasawa, M., M. Bae, G. Tamura, and K. Arima. 1969. Microbial transformation of sterol. Part II. cleavage of sterol side chains by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 1644-1650.
9. Sih, C.J., K.C. Wang, and H.H. Tai. 1967. C₂₂ acid intermediates in the microbiological cleavage of the cholesterol side chain. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 1956-1957.
10. Sih, C.J., H. Tai, Y.Y. Tsong, S.S. Lee, and R.G. Coombe. 1968. Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. pathway of cholesterol side-chain oxidation. *Biochem.* **7**: 808-818.
11. Gibson, D.T., K.C. Wang, C.J. Sih, and H. Jr. Whitlock. 1966. Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms on the mechanisms of ring a cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. *J. Biol. Chem.* **241**: 551-559.
12. Owen, R.W., A.N. Mason, and R.F. Bilton. 1983. The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* spp. NCIB10590 under aerobic conditions. *J. Lipid. Res.* **24**: 1500-1511.
13. Sih, C.J., S.S. Lee, Y.Y. Tsong, and K.C. Wang. 1965. On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 1386-1387.
14. Nakamatsu, T., T. Beppu, and K. Arima. 1980. Microbial degradation of steroids to hexahydroindanone derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1469-1474.
15. Nakamatsu, T., T. Beppu, and K. Arima. 1983. Microbial production of 3 α -H-4 α -(3'-trans acrylic acid)-5 α -hydroxy-7 $\alpha\beta$ -methylhexahydro-1-indanone- δ -lactone from soybean sterol. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1449-1454.
16. Martin, C.K.A. 1987. Sterols, Pp. 33-77. In *Biotechnology*. Vol 6a. VCH, N.Y.
17. 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.
18. Aihara, H., K. Watanabe, and R. Nakamura. 1988. Degradation of cholesterol in egg yolk by *Rhodococcus equi* No. 23. *J. Food Sci.* **53**: 659-660.
19. Johnson, T.L. and A.S. George. 1990. Properties of cholesterol dissimilation by *Rhodococcus equi*. *J. Food Protec.* **4**: 332-335.
20. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
21. Schaal, K.P. 1985. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques, Pp. 359-381. In Goodfellow, M. and D.E. Minnikin(ed.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, London.
22. Komagata, K. and K. Suzuki. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics, Pp. 161-207. In *Methods in Microbiology*, Vol. 19, Academic Press, London.
23. Staneck, J.L. and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**: 226-231.
24. Watanabe, K., H. Shimizu, and H. Aihara. 1986. Isolation and identification of cholesterol degrading *Rhodococcus* strains from food of animal origin and their cholesterol oxidase activities. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 137-147.

(Received June 20, 1994)