

Bacillus sp. HB-5 균주가 생산하는 단백질 분해 효소의 분리. 정제 및 화장품에의 응용

이범천, 윤은정, 이동환, 표형배

한불화장품 기술연구소

Purification and Identification of protease from *Bacillus* sp. HB-5 and its application of cosmetic product

Bum-Chun Lee, Eun-Jeong Yoon, Dong-Hwan. Lee, and Hyeong-Bae Pyo

HANBUL Cosmetics Co., R&D center,

Abstract

A bacterial strain No. HB-5, which was capable of producing a protease in the culture conditions, was isolated from the soil. The protease was purified from cultural filtrate of *Bacillus* sp. HB-5 by membrane ultrafiltration and DEAE-cellulose chromatography, gel filtration on Sephadex G-100. The molecular weight was estimated to be 60Kda. The optimal pH and temperature for the activity of the purified protease pH were 11 and 50°C, respectively. The enzyme was stable within a pH range 8-12 and up to 60°C. The enzyme activity was highly inhibited by PMSF at 1mM. The proteolytic actions of protease and papain on human epidermis keratins

which are major protein impurities on the skin, were compared. The bacterial protease degraded more effectively than papain. Product containing 2% protease exhibited 21% increase on the skin coloration index. These results suggest that cosmetic product containing protease produced by *Bacillus* sp. HB-5 could remove the adherent keratin layer and then make a softer skin.

서 론

최근 기능성 화장품이 중시되고 있는 가운데 효소류에 대한 관심도 높아지고 있다. 그 중 단백질 분해효소는 많은 연구가 진행되었고 화장품 원료로 사용하기 위한 노력들이 이루어 지고 있다. 단백질 분해 효소란 단백질 또는 아미노산의 결합인 Peptide 에 작용하여 peptide 결합을 가수분해 하는 효소로서 다양한 생명체로부터 생산되며 현재 전 세계적으로 생산되는 효소 생산량의 약 60% 차지할 만큼 이용분야가 넓다. 기질 특이성으로 단백질의 특정 아미노산 서열을 인식하여 작용하는 경우와 단백질의 3 차원구조를 인식하여 작용하는 경우 등 그 정도와 기작이 다양하다. 예로 trypsin 의 경우 단백질의 아미노산 서열 중 lysine 과 arginine 의 amino 말단의 pepetide 결합만을 자른다. 기질 특이성과 기질 촉매 기작의 차이에 의해 serine protease, thiol protease, metal protease, none-metal protease 등으로 구분되며 작용 최적 pH 에 따라 산성, 중성, 알칼리성 Protease 로 나누기도 하며 이들 이외에도 각기 특이한 기질에 따라서 콜라게나아제, 엘라스타아제, 케라티네이즈, 젤라티네이즈 등으로 세분하고 있다.

사람의 신체로부터 1 일 6-14g 의 피지와 함께 케라틴이 떨어져 나가지만 단백질 불순물 가운데 케라틴이 죽은 세포의 주성분이며 세포가 죽고 난 후에도 피부 표면에 남아

있게 된다. 케라틴은 표피에 가장 풍부하게 존재하는 세포간 섬유상 연결 단백질로서 인간의 표피에는 약 20 여종의 케라틴이 발견되어 지고 있다. 이 케라틴은 분자량이 크며 cystine disulfide bonds 에 의해서 연결되어 있기에 불용성이며 잘 분해되지 않는다.

그러므로 세정제 단독으로는 쉽게 제거되지 않기에 이러한 단백질 불순물들을 단백질 분해효소가 분해함으로써 효과적으로 제거할 수 있다. 안정한 단백질 분해효소를 응용함으로써 피부 표면에 부착된 케라틴층을 제거하고 더 부드러운 피부로 만들어 준다고 보고하였으며 최근에는 각질을 효과적으로 제거하여 여드름 유발을 감소시킨 제품도 출하되고 있다. 이번 研究에서는 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 발견하고 그 효소의 분리, 정제를 통한 특성 파악과 피부색 개선효과 및 화장품 응용 가능성을 보고자 하였다.

실험재료 및 방법

균주

실험에 사용한 분리 균주는 강원도 지역 일대의 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. 균주를 동정하여 사용하였다.

배지 및 배양 방법

단백질분해효소를 생산하는 균주를 분리하기 위한 선택배지는 Chicken feather 1.5%, Pancreatic digest of casein 0.5%, Skim milk solution 0.1% 함유 배지를 사용하였고, 분리된 균주는 효소 생산배지(dextrose 1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.02%, Human hair 0.25%, NaCl 0.05%, Yeast extract 1%)에서 37°C 180 rpm 으로 72 시간 진탕 배양하였다.

효소액의 부분정제 및 조제

효소최적생산조건에서 배양된 배지로부터 얻은 조효소액을 ion exchange chromatography 와 gel filtration 을 이용하여 부분 정제한 후 조효소액으로 사용하였다

효소활성 측정법

단백질분해 효소 활성측정은 일장원규 방법에 따라 측정하였다. 시험용액은 완충액을 사용하여 효소활성이 10~20 unit/ml 정도 되게 조제한다. 시험용액 1 ml을 정확히 취하고, 37± 1℃에서 3 분간 방치한 후 보온하여 둔 카제인 용액 5.0 ml을 가하여 즉각 진탕 혼합한다. 이 용액을 37℃에서 10 분간 방치한 후, TCA 용액 5.0 ml을 가하여 즉각 진탕 혼합한다. 이 용액을 다시 37℃에서 30 분간 방치한 후 여지를 이용하여 여과하거나 원심분리(10min, × 10,000g)하여, 여액 1 ml을 정확히 취하고 0.55M Sodium carbonate anhydrous 용액 2.5 ml 및 희석한 folin`s 용액(3 배 희석) 0.5 ml을 가하여 30℃에서 30 분간 방치한 후, 그 액을 흡광도 측정법에 의해 660 nm에 흡광도 A1 을 측정한다. 효소의 활성은 37℃에서 분당 기질로부터 1ug 의 tyrosine 을 생성하는 효소활성을 1unit 로 정하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 bovine serum albumin(Sigma co.)을 표준단백질로 하여 Lowry 등의 방법에 의하여 측정하였다.

분자량측정

전기영동은 Laemmli 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel 에서 실시하였으며

coomassie brilliant blue 로 염색하여 관찰하였다.

단백질 분해효소의 특이성조사

인간 상피세포 유래의 케라틴을 기질로 단백질 분해효소의 기질 특이성을 조사하였다. Takuji 등의 방법에 따라 인간 상피세포 유래 케라틴을 활성화시킨 후 케라틴 (4mg/ml) 450 μ l 과 단백질 분해효소액 4.5 μ l 혼합물을 37 $^{\circ}$ C 0-30 분간 반응시킨 후 반응액을 12% SDS-polyacrylamide gel 로 전기 영동한 후 Silver staining 으로 염색하여 관찰하였다. 파파인은 케라틴과 반응하기 전 활성화시켜 동일하게 실험하였다.

색차계를 이용한 Skin-Turn Over(%) Test

Dihydroxy acetone(DHA) 5%, 2-propenamide, homopolymer (polyacrylamide) 1.8%, pH 6.0 의 Tanning gel 제조하여 skin turn-over 를 실험하였다. Tanning cream 을 바르기 전에 실험부위의 피부색을 측정하였다(L0, a0, b0). 제조된 tanning gel 을 실험부위에 Φ 2 cm 되게 0.05 g 씩 2 시간 간격으로 3 회 도말하여 tanning 을 통한 각질을 착색하였다. Tanning gel 도말 24 시간 경과 후 피부색 측정하였다(Lt, at, bt). 위에서 준비한 시료를 0.05 g 씩 하루에 2 회 실험부위에 적용하였다. 시료 처리 3 일후 피부색 측정을 측정하였다(Ln, an, bn).

이미지 영상분석기를 이용한 각질제거 확인실험

피검자의 안면을 깨끗이 닦아내고 효소함유 제품 사용 전에 직경 2cm 크기 부위의 replica 를 만들고 카제인 분해활성이 45unit 되게 20mM Tris-HCl 완충액(pH8.0)에 희석하여 색차계 응용실험에 쓰인 gel base 에 10%되게 첨가하여 매일 2 회 도포하였다. 14 일 경과 후 실험부위의 replica 를 만들어 영상분석기를 이용하여 sample 사용전과 후를

비교한다.

결과 및 고찰

단백질분해효소 분비 균주의 분리 및 동정

Chicken feather가 포함되어 있는 토양으로부터 단백질분해효소를 생산하는 새로운 균주를 분리하였다. 이 균주는 skim milk가 첨가된 한천 배지위에서 투명한 크기가 큰 것을 찾아서 단백질분해효소 분비 균주를 1차 탐색한 후 casein과 keratin 분해능이 우수한 균주를 분리하였다. Fig. 1과 같이 투명한이 형성되는 것을 볼 수 있었다. 본 균주의 형태적 특성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 바실러스속의 간형이고 호기성이며 포자를 형성하였고 그람양성이며 운동성이 있었다.

효소의 부분정제

DEAE-cellulose column에 흡착된 단백질은 0.1M 및 1M NaCl을 포함한 20mM Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 순차적으로 용출시킨 결과 0.5M NaCl 농도에서 활성단백질이 용출되었다 (Fig.3). 이 중에서 활성이 높은 분획을 모아 농축한 후 Sephadex G-100 gel chromatography한 결과는 Fig.4와 같다. 이 결과에서 활성 부위만 모아 농축하였다.

분자량 측정

부분 정제된 단백질분해효소의 분자량을 측정하기 위해 Laemmli방법에 의한 SDS-PAGE을 이용하여 표준단백질과 분자량을 비교한 결과(Fig.5) 60kDa이었다.

단백질 분해효소의 특이성조사

인간 상피세포유래의 keratin은 73, 56, 51, 45Kd의 분자량을 갖는 주요 네 개의 polypeptides를 지니고 있다. 케라틴 분해능은 SDS-PAGE에 의해 분해된 펩타이드 절편을 분석함으로써 확인하였다. 5분 반응시킨 단백질분해효소의 경우 35, 33, 30, 28kD의 주요 네 개 fragments가 새롭게 생기고 20분 반응시키면 그들의 원래 있던 분자량의 bands는 사라지고 20kD보다 더 작은 bands가 생긴다. 30분 반응시킨 후에는 거의 모든 케라틴이 더 작은 분자량의 절편으로 분해되었다. 이러한 결과를 통해 단백질분해효소가 효과적으로 케라틴을 가수분해한다는 것을 얻을 수 있다. 파파인도 동일하게 실험한 결과 30분 반응후에도 케라틴은 여전히 남아 있었다.(Fig.6)

효소적 특성

pH의 영향

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 기질이 첨가된 반응액의 pH를 4에서 12가 되도록 조절한 후 효소활성을 측정한 결과 반응의 최적 pH는 11이었고 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 여러 pH의 반응액과 효소를 동량 혼합한 후 25℃ 2시간 경과 후 잔존하는 효소활성을 측정한 결과 pH8에서 12까지 비교적 안정하였다. (Fig .7)

온도의 영향

효소활성에 대한 최적온도를 조사하기 위하여 최적 pH로 반응액을 조절한 후 반응온도만 30-70℃까지 달리하여 효소활성을 측정한 결과 최적 온도는 50℃이었다. 또한 안정성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 최적 pH의 반응액과 효소를 동량 혼합한 후 30-70℃ 각 반응온도에서 30분간 처리한 후 잔존하는 효소활성을 측정하였다. 50℃

까지는 비교적 안정하였으나 60℃에서는 40% 활성이 잔존하였고, 70℃이상의 온도에서는 활성이 실패되었다. (Fig.8)

저해제의 영향

각종 저해제가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 저해제를 해당농도가 되도록 용해한 후 효소와 37℃에서 15 분간 반응시킨 후 잔존하는 효소활성을 측정하였다. Serine 말단과 작용하는 PMSF 에 강한 저해작용을 받기 때문에 serine 잔기를 갖고 있음을 알 수 있다. Cysteine 잔기와 결합하는 NEM 에 의해서는 저해되지 않았다. 그 결과는 Table 1 과 같다.

고분자화합물(polyols)류에 대한 효소의 안정성 실험

효소액을 50% Glycerin, 50%1,3-BG, 50%PG, 1,3-BG:PG(30:20%)이 첨가된 고분자화합물에 첨가한 후 시간경과에 의한 잔존하는 효소활성을 측정하였다. Control 은 완충액에 고분자화합물을 첨가하지 않은 효소액을 기준으로 삼았다. 그 결과는 Fig. 9 와 같다. 완충액에 비해 대부분의 고분자화합물에서 수 주 이상 효소활성이 60% 이상 잔존하였다.

계면활성제(surfactants)류에 대한 효소의 안정성 실험

효소액을 1%의 계면활성제와 18%의 1,3-BG 가 첨가된 반응액에 첨가한 후 1 일 경과 후 잔존하는 효소활성을 측정하였다. Control 은 반응액에 계면활성제가 첨가되지 않은 효소액을 기준으로 삼는다. 대부분의 계면활성제류에 대해 1 일 경과후에도 효소활성이 잔존하였다. 그 결과는 Table 2 와 같다.

색차계를 이용한 Skin-Turn Over(%) Test

Dihydroxy acetone(DHA)가 5% 첨가된 pH 6.0 의 Tanning gel 을 제조하여 skin turn-

over 를 실험하였다. 동일한 카제인 분해활성을 가지는 원료인 파파인, AHA 와 분리된 단백질 분해효소를 함유한 gel 을 사용하여 시간경과에 의한 피부색 변화를 색차계를 이용하여 coloration index 를 측정된 결과 Fig. 10 과 같이 분리된 효소가 다른 단백질 분해효소 비해 21% skin coloration index 가 증가하여 각질 분해능이 우수한 것으로 나타났다.

이미지영상분석기를 이용한 각질제거 확인실험

영상분석기를 이용한 실험에서는 분리된 효소를 함유한 gel을 계속적으로 사용할 때 피부표면의 각질을 분해하여 피부 유연화 효과를 가지는 것으로 나타났다.

얼굴의 왼쪽 뺨에 사용하기 전과 사용 14일 후를 관찰하였다. Fig.11에서 보듯이 단백질 분해효소가 함유한 gel을 계속적으로 사용한 후 거친 피부가 깨끗해진 것을 알 수 있다.

결 론

알카리성 단백질 분해효소를 분비하는 호알카리성 세균을 분리하여 *Bacillus* sp.로 동정하였다. 이 균이 생산하는 단백질 분해효소의 최적 pH는 11이었고, pH는 7-12사이의 넓은 pH 안정성을 보였다. 70℃까지 온도 안정성이 있었으며 serine 단백질저해제인 PMSF에 의해 강력하게 효소활성이 저해되어 활성부위에 serine기가 존재하는 serine protease였음을 알 수 있었다. 고분자화합물 첨가시 수 주이상 그 효소활성을 유지하였으며 각종 계면활성제에 대하여 안정성이 있었다. 인간 상피세포유래의 케라틴을 파파인 보다 훨씬 효과적으로 분해하였으며 tanning gel을 함유한 피부색 변화 관찰인 skin turn-over도 2% 단백질분해효소를 함유한 제품이 coloration index가 21% 증가하여 기존

의 원료들보다 효과적이었다. 영상분석기를 이용한 실험에서도 사용 수일 후 피부표면의 각질을 분해하여 피부색을 밝게하고 유연화 효과를 가지는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Gerhardt. P., et al., 1981. Manual of methods for general bacteriology. America Soc. for microbial. USA.
2. Harris, E. L. V. and S. Angal., 1989. Protein purification methods: a practical approach. Pp.1-137, IRL Press, Oxford, England.
3. Bollag, D.M., M.D. Rozycki and S.J.Edelstein. 1996. Protein methods: gelelectrophoresis under denaturing conditions. Pp. 107-155. Wiley-Liss. New York.
4. Rao, M.B., et al, 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. Microbial and Mol. Biol. Rev. 62:597-635
5. Takuji M., Tohru Y., Midori H., Kumi A., and Katsura A., 1993. The protease as a clenansing agent its stabilization by chemical modification, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, 27: 276-288.
6. Lowry. O. H., N. J. Rose brough, A.I. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenl reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
7. Choi, C., Kim, T. w., Ahn, B. J., and Kim, Y. H., 1992. Production and Purification of alkaline protease from Strenptomycetes sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 169-177.
8. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the

head of bacteriophage T4. *Nature*(London). 227: 680-685

9. Xiang Lin, Lee. C., Ellen. S., and Jason. C., and H. Shih., 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain, *J. App. Env. Micro*, 58: 3271-3275.

10. Jorma, E. Fraki., 1976. Human skin proteases. *Arch. Derm. Res.* 255: 317-330.

11. Tesuo. M., Yomi. Y., and Yoshio. T., 1995. Purification and some properties of a protease from *Streptomyces limosus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59:474-478.

12. Brifitte. B., Boris. G., and Rudolf M., 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Env. Micro.* 61: 3605-3710.



Fig.1 Scanning electron micrographs of the isolated *Bacillus* sp. HB-5

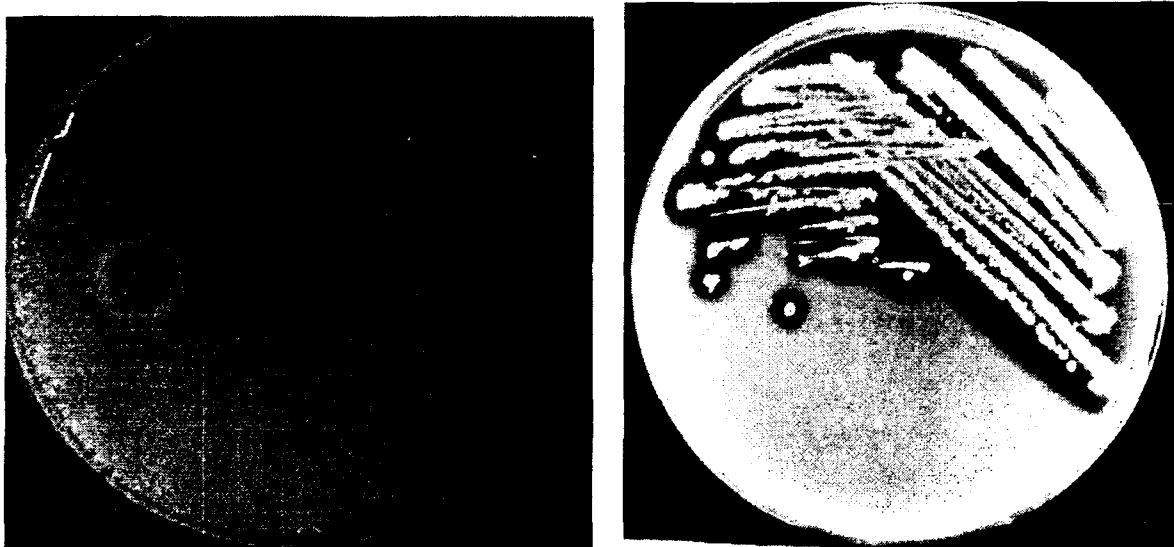


Fig. 2 Formation of clear zone in the agar contained 2% skim milk

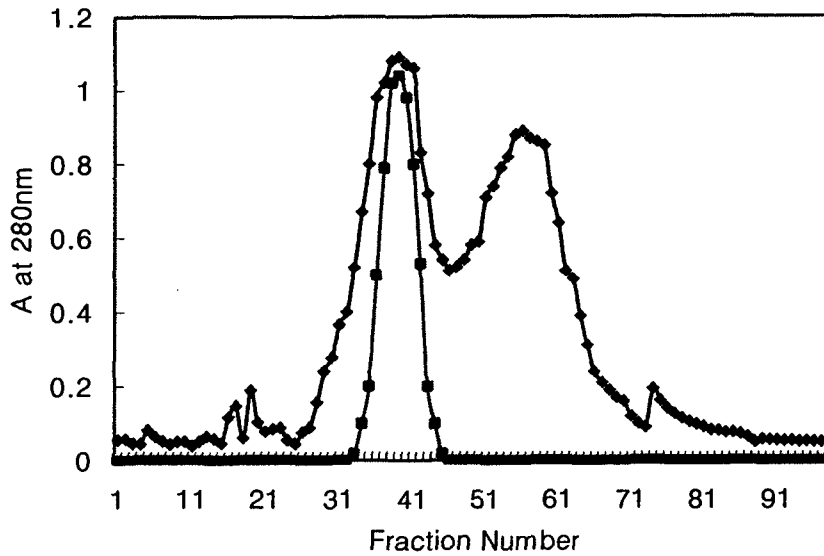


Fig. 3 DEAE-cellulose column chromatography of protease from *Bacillus* sp
 (\diamond) protein, (\square) activity
 column size : 2.8 X 30cm, flow rate : 15ml/hr., fraction : 5ml/fraction

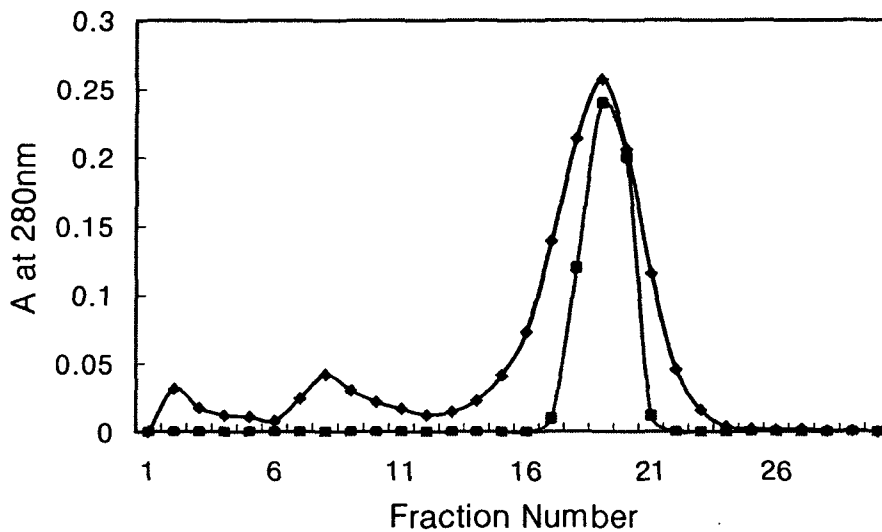


Fig.4 Sephadex G-100 gel chromatography of protease from *Bacillus* sp.
 (\diamond) protein, (\square) activity
 column size : 2.5 X 60cm, flow rate : 15ml/hr., fraction : 5ml/fraction



Fig.5 Identification of purified protease from *Bacillus* sp. By SDS-PAGE.
 Lane 1, 4 ; protein size marker 150, 100, 75, 50, 35, 15Kda Lane 2, 3
 purified protease

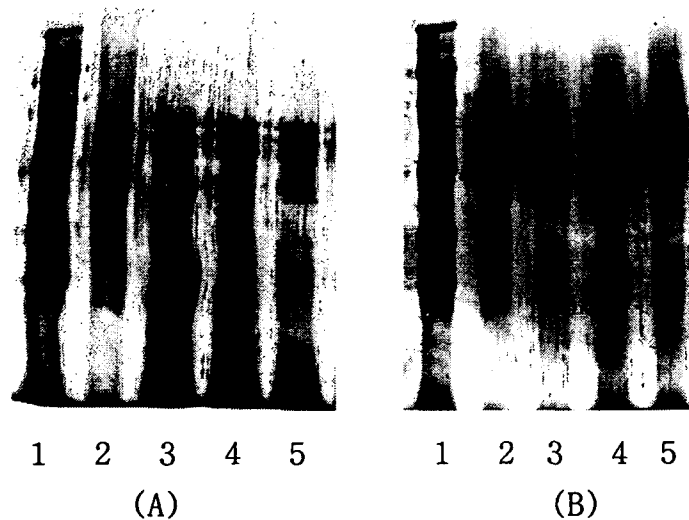


Fig.6 SDS-PAGE of keratin degradation pattern
 (A) Lane 1 : protein size marker 150, 100, 75, 50, 35, 15Kda
 Lane 2 : Keratin, Lane 3 : incubation with Protease and Keratin for 10min
 Lane 4: for 20min., Lane 5 : for 30min.,
 (B) Lane 3 : incubation with papain and Keratin.

Table 1. The effect of protease inhibitors on protease activity

저해제	농도 (mM)	Residual activity(%)
None		100
PMSF	1	5
PMSF	10	0
NEM	1	91
NEM	10	96
L-Cysteine	5	91
L-Cysteine	50	97
EDTA	1	79

PMSF=Phenylmethylsulfonyl Fluoride, NEM=N-ethylmaleimide,
EDTA=Ethylenediamine tetraacetic acid

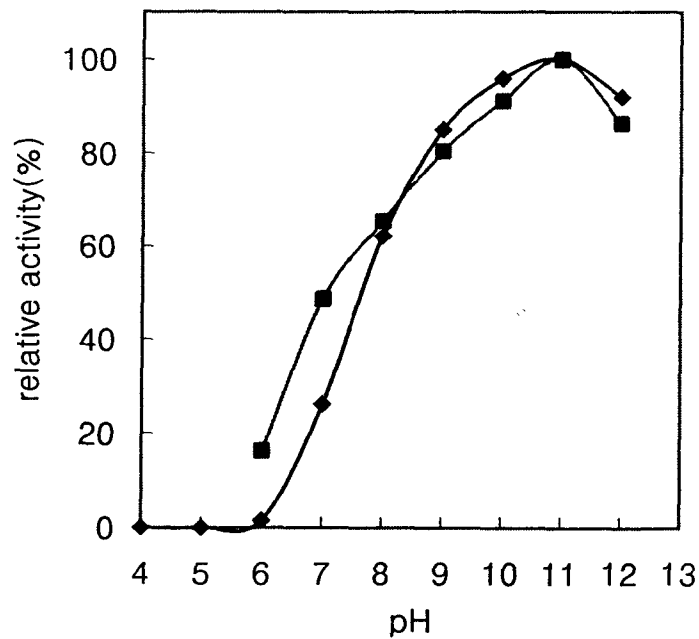


Fig.7 Effect of pH on activity and stability of protease activity
pH 4-7 : phosphate buffer, pH 8-9 : Tris buffer, pH10-12 : sodium bicarbonate buffer

(◇) optimal pH, (□) pH stability

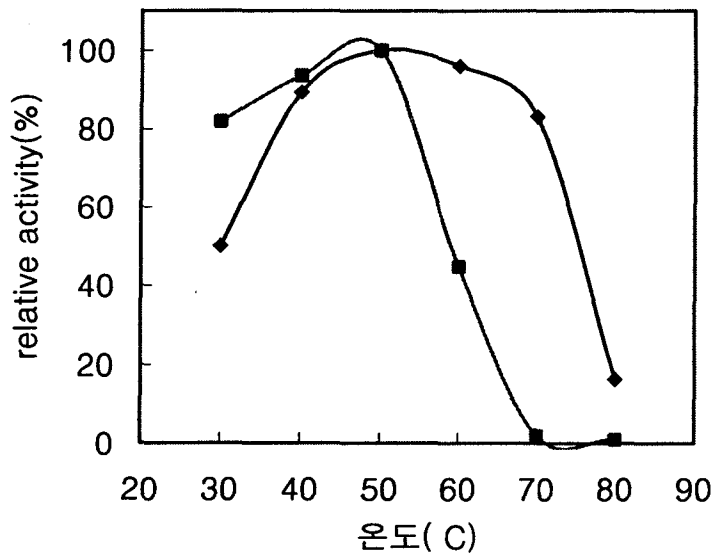


Fig.8 Effect of Temperature on activity and stability of protease activity
 (◇) optimal temperature, (□) temperature stability

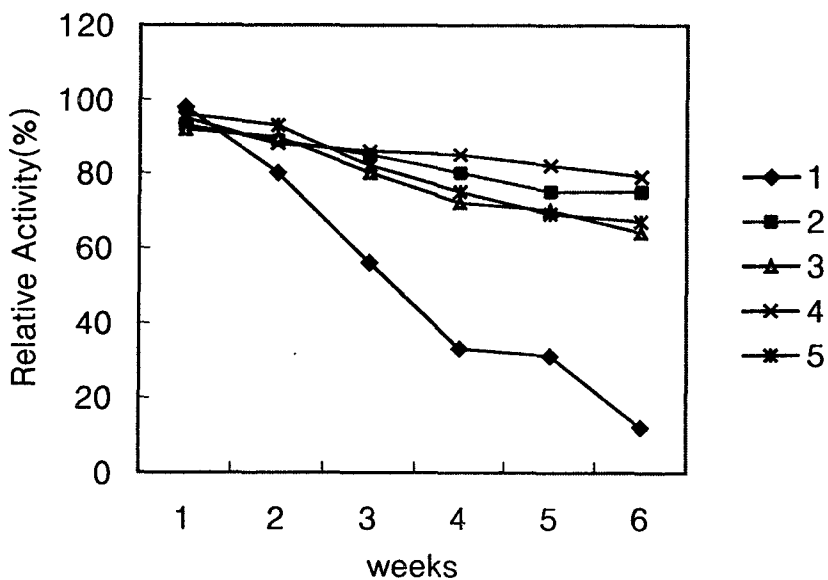


Fig.9 Effect of polyols on activity of protease activity
 1: control(반응액), 2: 50% 1,3-BG, 3: 50%PG, 4: 50% glycerin, 5: 30:20%
 1,3-BG:PG

Table 2. Effect of surfactants on activity of protease activity

Surfactants(1%)		Residual activity(%) 1일
Control	None	100
	POE(polyoxyethylene)sorbitan Monoleate	121
비이온	POE(polyoxyethylene)sorbitan Monostearate	107
	POE(polyoxyethylene)sorbitan Hyderogenated castor oil	113
	Sodium N-acyl-L-glutamate	89
음이온	Sodium methylcocoyl taurate	98
	Sodium lauryl sulfate	88
양성	Cocoamidoprophyl bataine	108

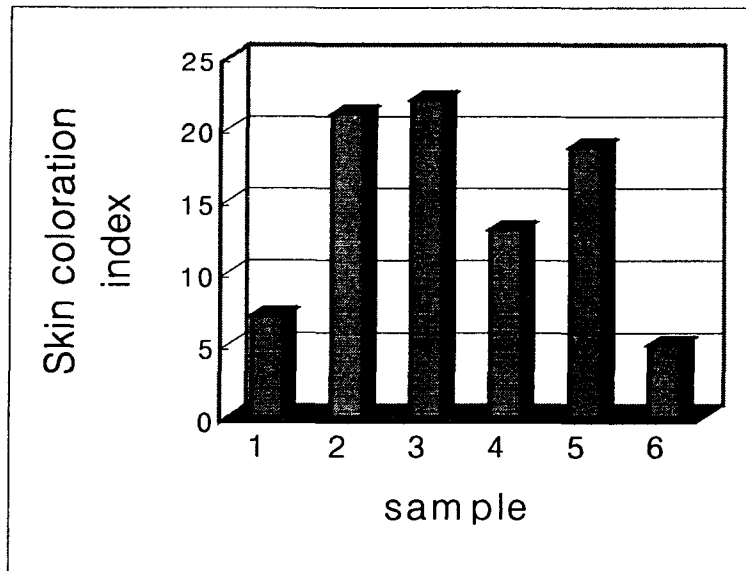


Fig 10. The effect of various protease on skin-coloration index.

1: Gel base, 2: Protease 2% 첨가된 Gel base, 3: Protease 5% 첨가된 Gel base
 4: Papain 2% 첨가된 Gel base, 5: AHA 2% 첨가된 Gel base. 6: 대조군(무처리)

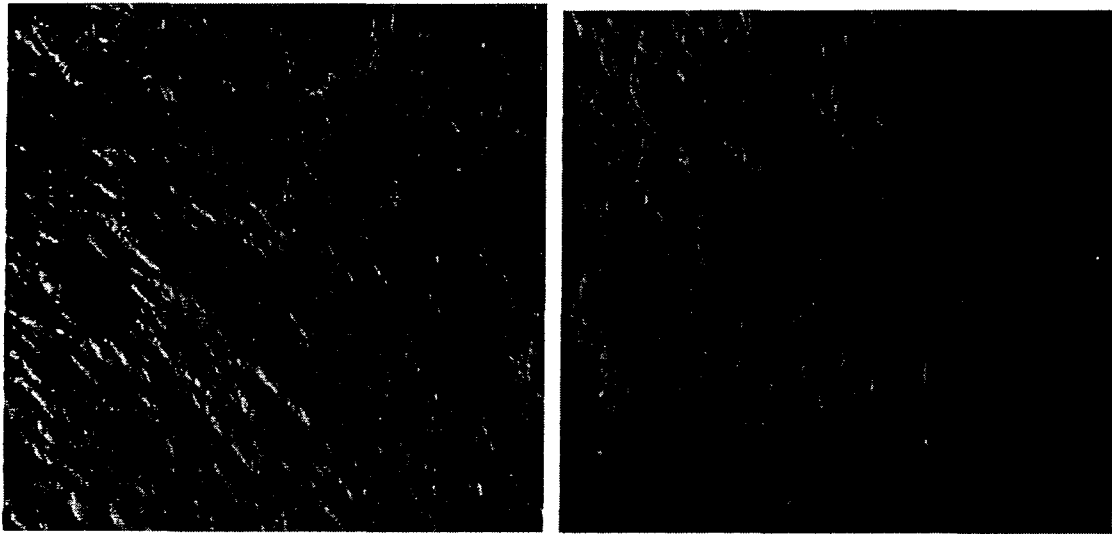


Fig. 11. Skin relics before(day 0) and after (day 14) continual use of cleansing preparation.