

Keratinase 생산균 *Bacillus subtilis* SMMJ-2의 변이주 분리와 효소학적 특성 비교

고희선 · 김현수*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation of Mutant Strains from Keratinase Producing *Bacillus subtilis* SMMJ-2 and Comparision of Their Enzymatic Properties

Hee-Sun Ko and Hyun-Soo Kim*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract Keratinase is widely used in certain industrial applications. The present study sought to improve the culture conditions of *Bacillus subtilis* SMMJ-2 to facilitate mass production of keratinase. Strain SMMJ-2 was irradiated by ultraviolet light and the resulting isolates were tested for keratinase activity. Isolates displaying elevated keratinase activity were selected and used to determine the optimum temperature (24, 30, 37, 45, 55°C) for bacterial keratinase production during a 4 day incubation period. The highest enzyme activity (55 units/mL/min), from a *Bacillus subtilis* SMMJ-2 mutant (mutant No. 2) was demonstrated following incubation at 30°C. The effects of carbon and nitrogen sources on keratinase production were confirmed by measuring the enzyme activity from the culture broth of the mutant strain cultured in various media containing different carbon source and nitrogen sources during a 4 day period. The optimal medium composition for producing keratinase consisted of 1% glucose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, and 1.2% soybean meal. Optimal initial pH and temperature for producing keratinase were 7.0 and 30°C, respectively. Keratinases produced by *B. subtilis* SMMJ-2 and the mutant No. 2 were purified from the culture broth which used soybean meal as a nitrogen source. Membrane ultrafiltration, DEAE-sephacel ion exchange and Sephadex G-100 gel chromatography were used to purify the enzymes. The purified keratinases from both *B. subtilis* SMMJ-2 and the mutant No. 2 showed single bands and their molecular weights were estimated as 28 kDa and 42 kDa, respectively on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Keywords: Keratinase, mutant, *Bacillus subtilis* SMMJ-2, ultraviolet irradiation, purification

서 론

Keratin 단백질은 척추동물의 표피의 주된 구조 단백질로 keratinocyte로 구성되어 있으며 머리털·양털·깃털·뿔·손톱 등을 구성하는 진성 keratin과 피부 및 신경조직 등에 존재하는 유사 keratin으로 구별된다 [1]. 주요 구성 성분은 glutamic acid, arginine, cystine 등의 amino acid이며,

그 중에서도 cystine의 함유량이 많으며 [2], 진성 keratin의 cystine의 함유량은 11~12%, 유사 keratin의 cystine의 함유량은 4~8%이다. Cystine의 함유량이 많기 때문에 선상구조를 가지는 것으로 생각되며, 가금류의 keratin 단백질은 물리, 화학적인 특징으로 인하여 불용성을 나타내어 papain, pepsin, 그리고 trypsin과 같은 일반적인 단백질 분해효소는 거의 분해가 되지 않는다고 알려져 있다 [3].

Keratin은 구조상 수소결합, 소수성결합 이외에도 다른 cross-linkage로 연결되어 있어서 단백질 분해효소에도 저항력을 가지고 있으며 단백질에 포함된 cystine 및 hydroxylysionorleucine, desmosine 중 많은 부분이 cross-

*Corresponding author

Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-5509

e-mail: hskim@kmu.ac.kr

linkage로 되어 수용화가 어렵다 [4,5]. 이러한 keratin을 수용화 하는 방법으로는 산화, 환원방법을 사용하여 이화황 결합을 절단하고 불용성을 감소시킨 후, 이화황 결합이 절단된 단백질에 pepsin을 처리하면 수용화 할 수 있다고 보고된 바 있다 [6,7].

Keratinase는 진균류나 세균 같은 미생물로부터 정제되어 왔다 [8-13]. 본 연구는 선행연구 [1]을 바탕으로 하여 미생물 균주에서 keratinase 효소의 활성이 높은 균주 *Bacillus subtilis* SMMJ-2를 개량하여 개량된 균주에서 keratinase의 대량생산조건을 검토하고자 하였다. 이는 노화된 피부 각질의 대부분을 차지하는 keratin을 keratinase를 이용하여 제거해 줌으로써 원활한 피부 대사 및 미백효과 등 화장품분야에서의 이용성을 목적으로 대량생산을 꾀하고자 한 것으로, 효소의 대량생산을 위한 최적 배양조건, 탐색, 효소 활성 및 생산능이 높은 균주의 개량과 검색, 야생균주와 돌연변이균주의 keratinase 효소를 분리 정제를 하여, 효소화학적 특성을 비교, 검토하였다.

재료 및 방법

변이주의 분리 및 배양

공시균주는 Park 등 [1]의 연구결과에서 분리된 *Bacillus subtilis* SMMJ-2를 사용하였으며, keratinase 대량생산을 위하여 UV처리 후 균주를 개량하였다. 공시균주는 LB broth (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH 7.0)에 접종하여 30°C, 180 rpm으로 12시간 배양하였다. 배양된 균을 평판배지 LB agar (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, 1.8% agar)에 도말하여, UV 처리를 수행하였다. Plate 위의 20 cm거리에서 과장 254 nm로 20 sec, 40 sec, 60 sec, 80 sec, 100 sec 처리 후 28°C에서 이틀간 배양하였다. Keratinase의 생산은 LB 배지 (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH 7.0)에 접종하여 30°C, 180 rpm에서 12시간 배양한 후 본 배양 배지 (1.0% glucose, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 1.2% soybean meal pH 7.0)에 2% 되게 접종하여 4일간 배양하였다 (Table 1).

Keratinase activity 및 protease assay

Keratinase의 활성측정은 기질로서 azocasein을 사용하는 Sangali [14]의 방법을 이용하여 측정하였으며 조효소액은 배양액을 10,000 × g, 4°C에서 10분간 원심분리 후 사용하였다. 조효소액 150 μL에 2% azocasein (500 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)을 500 μL 첨가하여 50°C에서 15분간 반응시킨 다음, 효소의 반응을 정지시키기 위하여 10.0% trichloroacetic acid (TCA)를 1.2 mL 첨가하여 실온에서 15분간 방치하였다. 불용성의 기질을 제거하기 위하여 10,000 × g,

4°C에서 10분간 원심분리를 하여 기질에서 유리된 sulphanic acid 발색단의 정도를 spectrophotometer를 이용하여 440 nm에서 측정하였다. 대조구는 기질만 첨가하여 50°C에서 15분간 반응시킨 후에 조효소액 150 μL를 첨가하고 같은 방법으로 실험하였으며 효소활성은 동일한 실험을 3회 이상 반복한 값의 평균 수치로 나타내었다. Keratinase 활성은 50°C에서 1분간 기질과 반응하여 흡광도 값 0.01을 증가시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Protease assay는 Lowry [15]의 방법을 변형하여 사용한 Kim [16]의 방법을 이용하였다. 조효소액 250 μL에 0.5% hammarsten casein milk (200 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)를 1.2 mL 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후에, 효소의 반응을 정지시키기 위하여 5.0% trichloroacetic acid (TCA)를 3.0 mL 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 10,000 × g, 4°C에서 10분간 원심분리를 하여 얻은 상등액 1.0 mL에 550 mM Na₂CO₃ 2.5 mL를 첨가하고 3배 희석한 folin reagent를 0.5 mL 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후에 660 nm에서 측정하였으며, tyrosine standard curve를 이용하여 유리된 tyrosine량으로 환산하였다. Protease 활성은 37°C에서 1분간 기질과 반응하여 1 μg의 tyrosine을 유리하는 효소의 총량을 1 unit로 하였다.

Keratinase의 생산에 대한 탄소원의 영향

공시균의 keratinase의 생산에 미치는 탄소원의 영향과 변이주의 탄소원의 영향을 비교하기 위하여 기본배지 (Table 1)의 탄소원인 glucose를 비롯하여 fructose, lactose, maltose, sucrose, soluble starch 등의 탄소원을 각각 1.0% 농도로 첨가하여 keratinase의 생산배지를 제조하였다. 제조된 효소 생산배지에 공시균을 접종하여 30°C에서 4일간 배양하여 효소활성의 변화를 비교 측정하였다.

Keratinase의 생산에 대한 질소원의 영향

공시균의 keratinase의 생산에 미치는 질소원의 영향과 변이주의 질소원의 영향을 비교하기 위하여 기본배지의 조성은 효소생산에 있어 최적 탄소원을 적용하여, 기본배지 (Table 1)의 질소원인 soybean meal을 비롯하여 malt extract, peptone, polypeptone, tryptone, yeast extract, tryptic soy broth (TSB), soytone, casitone 등의 질소원을 각각 1.2% 농도로 첨가하여 keratinase의 생산배지를 제조하였다. 제조된 효소 생산배지에 공시균을 접종하여 30°C에서 4일간 배양하여 효소활성의 변화를 비교 측정하였다.

Table 1. Composition of basic medium for keratinase production

Glucose	1.0%
K ₂ HPO ₄	0.7%
KH ₂ PO ₄	0.2%
Soybean meal	1.2%

Keratinase의 생산에 대한 온도의 영향

공시균의 keratinase의 생산에 미치는 온도의 영향과 변이주의 온도의 영향을 비교하기 위하여 24, 30, 37, 45, 55°C의 배양온도 상에서 180 rpm으로 4일간 배양하면서 효소활성의 변화를 비교 측정하였다.

Keratinase의 생산에 대한 pH의 영향

공시균의 keratinase의 생산에 미치는 pH의 영향과 변이주의 pH의 영향을 비교하기 위하여 효소 생산배지의 pH를 4.0에서 11.0으로 pH 1.0 정도씩 변화시켜 적용하여, 공시균 접종 후 180 rpm에서 4일간 배양하면서 효소활성의 변화를 비교 측정하였다.

단백질의 정량

Bradford [17] 방법을 이용하고 Protein assay kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 표준 단백질로 bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA)을 사용하였고, 효소 정제과정 중의 단백질 양은 280 nm에서 측정하였다.

Keratinase의 정제

공시균주와 변이주로 부터 keratinase의 분리 및 정제를 위한 배양액의 농축은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 사용한 염색법과 acetone을 이용한 유기용매 침전법을 수행하였다. 각각 조효소액 500 mL를 천천히 교반시키면서 70% 포화되게 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 넣고, 동량의 ice-cooled acetone (-70°C)을 넣은 후, 2시간 교반하여 원심분리 (14,000 × g, 30 min, 4°C)하였다. 각각의 침전물을 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 용해한 다음 동일한 완충액으로 4°C에서 24시간 투석하여 투석된 효소액을 회수하였다. 회수한 효소액을 amicon centriprep (MWCO 10,000, Millipore co, USA)을 이용하여 농축하였다. 농축한 효소액을 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 DEAE-sephacel (Ø 3.6 × 30 cm, GE Healthcare Bio-science AB, Sweden)에 충전시킨 후 분획채집기로 4 mL씩 분획하였다. 단백질의 용출은 먼저 동일 buffer로 비결합 단백질을 씻어낸 후 0~1 M NaCl을 함유한 buffer를 이용하여 농도구배법으로 회수하였다. 이와 같이 음이온교환수지에서 얻어진 효소활성 부분을 모아 농축한 시료를 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (Ø 1.8 × 100 cm, Amersham bioscience Co., USA)에 적용한 다음 시간당 4 mL 유속으로 4 mL씩 분획하였다.

Keratinase의 분자량 측정

본 효소의 분자량을 측정하기 위하여 14% SDS-

polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시하였으며 [18], 전기영동 후에 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 destaining solution (methanol : acetic acid : water = 1 : 1 : 8)으로 탈색하여 나타난 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

Keratinase생산 변이주의 분리

Keratinase의 활성이 우수해진 변이주를 분리하기 위하여 *Bacillus subtilis* SMMJ-2에 UV를 조사하여 배양한 결과는, 야생균주와 비교하여 형태 변화된 균주를 포함하여, 무작위로 선발하였고, 그 중 효소생산성이 나타난 균주로 5개의 변이주를 획득하였다. 또한 그 중에서 가장 높은 효소활성을 나타내는 2번 균주를 최종 선발하여, mutant No. 2로 명명하였다 (Table 2). Protease 활성을 측정한 결과는 야생균주의 질소원이 soybean meal 일 때 3일째 121 units/mL/min의 활성이 나타난 것에 비해, mutant No. 2는 질소원이 soybean meal일때 3일째 147 units/mL/min로 활성이 비교적 더 높은 것으로 조사되었다 (Table 3).

Table 2. Keratinase activity of *Bacillus subtilis* SMMJ-2 mutants

Mutant No.	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
No. 1	18	31	43	29
No. 2	22	42	55	34
No. 3	15	21	26	14
No. 4	20	35	39	33
No. 5	12	15	17	14

Table 3. Protease activity of *B. subtilis* SMMJ-2 and mutant No. 2 grown in culture media containing soybean meal or malt extract

Nitrogen source	Protease activity (units/mL/min)							
	<i>B. subtilis</i> SMMJ-2				mutant No. 2			
	Incubation time (day)				Incubation time (day)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Soybean meal	67	108	121	98	110	120	147	115
Malt extract	54	99	119	60	92	102	131	88

Mutant No. 2의 Keratinase 생산성에 대한 탄소원과 질소원의 영향

Mutant No. 2의 배양학적인 특성을 조사하기 위하여 LB broth에서 12시간 동안 전배양하였고, 다양한 탄소원과 질소원을 이용한 효소생산배지에 2%되게 접종하여, 4일간 배양하면서 효소활성을 측정하였다. 공시균주보다 mutant No. 2에서 대부분 높은 활성을 나타내었으며, 그 중에서도 공시

Table 4. Keratinase productivity of *Bacillus subtilis* SMMJ-2 and mutant No. 2 by various carbon sources**(A) *Bacillus subtilis* SMMJ-2**

Carbon source	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Fructose	10	15	17	15
Lactose	8	7	5	5
Maltose	11	12	8	7
Sucrose	5	7	8	5
Soluble starch	6	7	7	7
Glucose	10	24	34	28

(B) mutant No. 2

Carbon source	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Fructose	20	21	20	20
Lactose	15	17	17	17
Maltose	8	7	7	7
Sucrose	6	6	5	4
Soluble starch	11	12	12	13
Glucose	22	43	54	38

Table 5. Keratinase productivity of *Bacillus subtilis* SMMJ-2 and mutant No. 2 by various nitrogen sources**(A) *Bacillus subtilis* SMMJ-2**

Nitrogen source	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Soybean meal	10	23	33	28
Malt extract	15	31	37	24
Peptone	2	3	5	7
Polypeptone	3	5	5	5
Tryptone	10	15	20	14
Yeast extract	4	5	5	5
TSB	3	7	10	4
Soytone	6	6	5	4
Casitone	3	6	4	2

(B) mutant No. 2

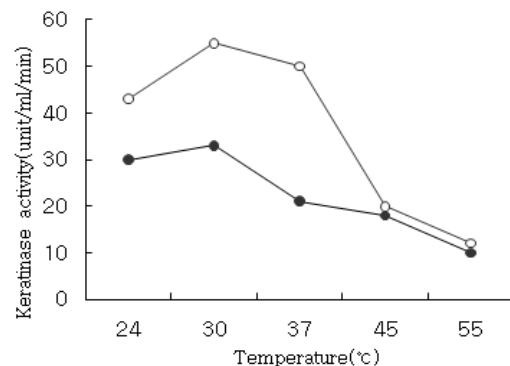
Nitrogen source	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Soybean meal	22	42	55	34
Malt extract	18	31	43	29
Peptone	4	6	8	7
Polypeptone	3	5	5	5
Tryptone	17	27	31	24
Yeast extract	8	10	13	13
TSB	12	23	30	22
Soytone	5	4	4	4
Casitone	5	8	11	5

균주의 탄소원의 영향 (Table 4)과 비교하였을 때 glucose를 함유한 생산배지에서 3일째 54 units/mL/min로 가장 높은 효소활성을 나타내었고, fructose를 첨가하였을 때 3일째 17 units/mL/min의 효소활성을 나타내어 양호한 결과를 보

였으며, maltose나 sucrose를 첨가하였을 때는 야생주와 마찬가지로 keratinase 효소활성을 상승시키지 못하였다. 또한 최적 탄소원을 glucose로 하여 질소원의 영향 (Table 5)을 공시균주와 비교하였을 때 soybean meal을 질소원으로 함유한 생산배지에서 배양 3일째 55 units/mL/min로 가장 높은 효소활성을 나타내었고, 이는 같은 탄소원과 질소원을 사용한 조건의 야생주보다 40% 상승된 효소활성이었다. 또한 malt extract를 첨가하였을 때는 야생주의 결과와 유사한 패턴이었는데 3일째 43 units/mL/min로 비교적 양호한 효소활성을 나타내었다. 그 외 다른 질소원으로 tryptone의 경우 배양 3일째 31 units/mL/min, yeast extract의 경우 3일째 30 units/mL/min으로 나타났다.

Mutant No. 2의 효소생산 최적온도

분리한 변이주의 온도에 따른 keratinase 효소활성을 조사하기 위하여 24, 30, 37, 45, 55°C에서 각 각 배양하였다. 야생균주가 30°C에서 33 units/mL/min의 활성을 나타내는 것에 비해 mutant No. 2는 30°C에서 55 units/mL/min의 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 야생균주의 경우 24°C와 30°C에서의 효소생산성에 큰 차이를 보이지 않았으나 (Fig. 1), mutant No. 2의 경우에는 24°C에서 44 units/mL/min, 30°C에서 55 units/mL/min로 효소생산에서 있어 같은 온도대의 야생주보다 상승된 효소 활성을 나타냈다. 45°C와 55°C의 경우에는 야생주와 마찬가지로 keratinase의 효소활성이 매우 낮아짐을 알 수 있었다. 이 결과로 볼 때 *B. subtilis* SMMJ-2와 mutant No. 2가 생산하는 keratinase는 고온의 조건보다는 30°C 전후의 좁은 온도범위 상에서 가장 양호한 효소생산성을 나타내지만, 변이주의 경우 효소생산 가능한 온도 범위가 조금 더 넓은 것으로 사료되었다.

**Fig. 1.** Effect of temperature for keratinase production from *B. subtilis* SMMJ-2 and mutant No. 2.

Symbols: ●, *B. subtilis* SMMJ-2; ○, mutant No. 2.

Mutant No. 2의 효소생산 최적 pH

Mutant No. 2가 생산하는 keratinase의 생산에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, 배양 3일째 pH 7.0과 pH 8.0에서

55 units/mL/min로 가장 높은 keratinase 효소활성을 나타내었다. 또한 pH 4.0과 pH 11.0에서는 효소활성의 증가가 거의 없었으며 pH 4.0과 pH 11.0을 제외한 조건에서는 50%에서 80%이상의 keratinase 효소활성을 보였다 (Table 6). 이 결과는 keratinase 생산에 있어 최적 배양 pH를 7.5라고 보고한 Elrefai 등 [19]의 결과와 유사하였으나, pH 8.0~pH 9.0에서 효소활성이 높다고 보고한 Anbu [20], Bang [22]과 Kim [16]의 결과와는 약간 차이를 보이는 결과였다.

조효소액의 농축 효과

B. subtilis SMMJ-2와 mutant No. 2가 생산하는 keratinase를 정제, 비교하기 위하여 각 배양액에 (NH₄)₂SO₄ 또는 acetone을 첨가하여 효소단백질을 침전시킨 후에, 각각의 조효소액을 회수하여 keratinase의 효소활성을 조사한 결과, 70% (NH₄)₂SO₄ 침전에서 *B. subtilis* SMMJ-2가 74 units/mL/min의 효소 활성을 나타내었고, mutant No. 2는 82 units/mL/min의 효소 활성을 보였다 (data not shown). 그러나 acetone을 단백질 침전용 용매로 사용한 경우에 있어서는 침전물이 거의 발생하지 않아, 이후 keratinase 정제 과정 중에서는 (NH₄)₂SO₄ 침전법을 적용하게 되었다.

Table 6. Effect of initial pH for keratinase production from mutant No. 2

Initial pH	Keratinase activity (units/mL/min)			
	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
4.0	13	14	17	14
5.0	18	20	22	10
6.0	23	32	43	31
7.0	22	44	55	32
8.0	20	40	55	30
9.0	18	40	48	30
10.0	13	20	24	20
11.0	9	10	11	10

Buffer 농도에 대한 효소 안정성

조효소액 500 mL를 70% (NH₄)₂SO₄ 침전에 의한 농축 및 투석에 의해 얻어진 효소액을 이용하여 buffer 농도에 따른 안정성을 조사하기 위하여, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 이용하여 효소 안정성을 조사한 결과, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 사용하였을 때 효소활성의 회수율이 100%로 가장 안정한 것으로 확인하였으며, 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 이상의 농도에서는 효소의 활성이 급격히 저하되는 것을 확인하였다 (data not shown).

Keratinase의 정제

B. subtilis SMMJ-2와 mutant No. 2의 각각의 조효소액

500 mL을 70% (NH₄)₂SO₄로 포화시켜 침전물을 얻었고, 얻어진 침전물은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 회수한 후에 dialysis tube에 넣어 동일한 buffer로 4°C에서 24시간 투석하여 염을 제거하였다.

회수한 조효소액의 효소활성을 더 높이기 위하여 amicon centriprep으로 농축하여 음이온 교환수지인 DEAE-sephacel column chromatography로 정제하였다. *B. subtilis* SMMJ-2의 경우에는 이 크로마토그래피 상에서 2 군데에서 keratinase 활성의 피크가 나왔는데, void volume 영역을 약간 벗어난 전반부에서 매우 미약한 피크가 나왔으며 크로마토그래피 후반부에 매우 강한 메인 peak가 나왔다 (Fig. 2(a)). 이중 주된 peak 영역인 fraction No. 85-100번의 fraction을 회수하여 amicon centriprep으로 농축하였고, 농축한 효소활성액은 다시 Sephadex G-100을 이용하여 gel filtration을 시행하여 효소활성이 나타나는 fraction No. 20-30번의 sample을 회수하여 (Fig. 2(b)) amicon centriprep으로 다시 농축하였다.

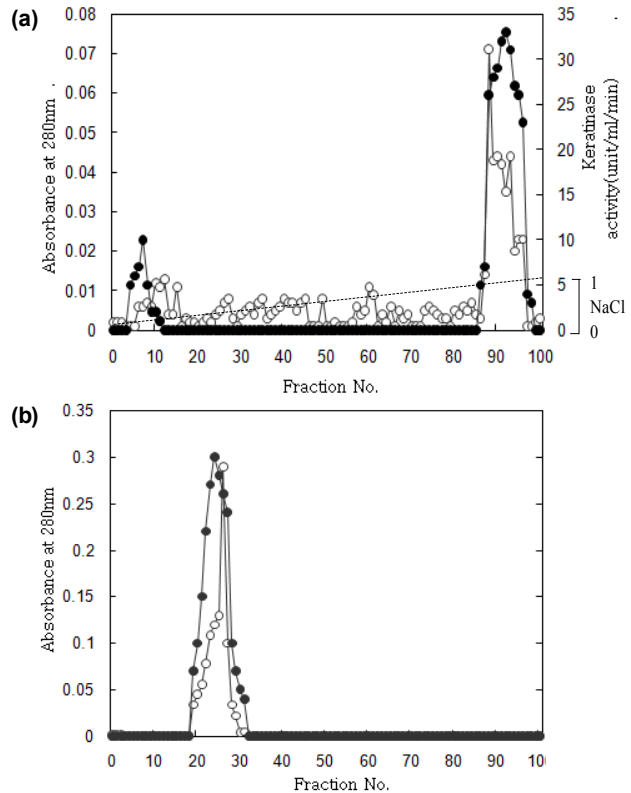


Fig. 2. Elution profile of keratinase form *B. subtilis* SMMJ-2 on DEAE-Sephacel (A) and Sephadex G-100 (B) column chromatography. Symbols: ●, Absorbance at 280 nm; ○, Keratinase activity.

Mutant No. 2의 경우에도 DEAE-sephacel column chromatography에서 keratinase 효소활성을 나타내는 영역이 2군데로 나타났는데, 야생주의 경우와 반대로 메인 peak가 전반부에서 매우 강하게 나왔으며, 중반부 이후 미약한 효소활성피크가 잠시 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3(a)). 그

중 효소활성의 대부분을 나타내는 메인 peak 영역의 fraction No. 12-30번 fraction을 회수하여 amicon centriprep으로 농축하였다. 또한 농축한 효소활성액은 Sephadex G-100에 적용되어 gel filtration 하였으며, 효소활성이 나타나는 fraction No. 20-30번의 sample을 회수하여 (Fig. 3(b)), amicon centriprep으로 다시 농축하였다.

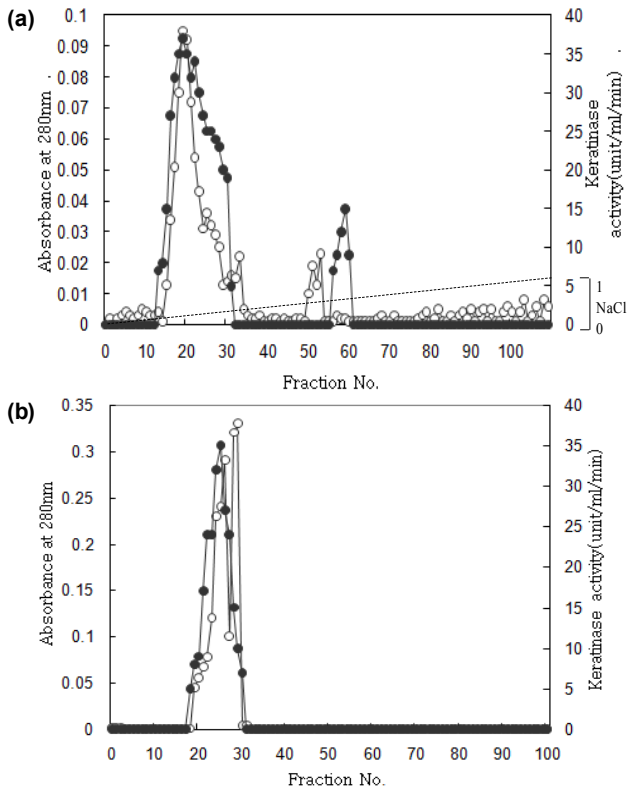


Fig. 3. Elution profile of mutant No. 2 on DEAE-Sephacel (A) and Sephadex G-100 (B) column chromatography. Symbols: ●, Absorbance at 280 nm; ○, Keratinase activity

B. subtilis SMMJ-2와 mutant No. 2의 배양액 중의 keratinase 정제의 결과는 모두 마지막의 겔 여과 단계에서 잔상의 peak가 나타나지 않는 것으로 보아 일정 수준 이상으로 정제되었다고 사료되었다.

Keratinase의 분자량 측정

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 상에서 표준 단백질의 영동 거리를 이용하여 정제효소의 분자량을 측정된 결과, *B. subtilis* SMMJ-2가 생산하는 keratinase의 분자량은 28 kDa로, mutant No. 2의 keratinase의 분자량은 42 kDa로 추산되었다. (Fig. 4). SDS-PAGE 상에서 두 효소 모두 단일한 밴드로 나타나 각 효소가 순수정제 되었음을 재확인할 수 있었다.

기존에 보고된 keratinase의 분자량은 *Pseudomonas* sp. KP-364의 keratinase 분자량은 36 kDa [21], *ASP. oryzae*의

keratinase 분자량은 60 kDa [23]이며, *Kocuria rosea*의 keratinase 분자량은 240 kDa [24]로 보고된 바 있다. 또한 Bang [25]의 *Bacillus* sp. SH-517이 생산하는 keratinase의 분자량은 51 kDa로 보고되어 있는데, 같은 *Bacillus* 속 유래의 같은 효소이지만 분자량에 있어서 큰 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 *B. subtilis* SMMJ-2가 주로 생산하는 keratinase의 분자량은 기존의 보고된 다른 균주가 생산하는 효소의 분자량과 비교할 때 좀 더 작은 분자량을 나타내며, UV 처리로 얻어진 mutant No. 2의 keratinase에서 주로 생산되는 keratinase의 분자량은 그보다는 더 큰 분자량으로 나타났다.

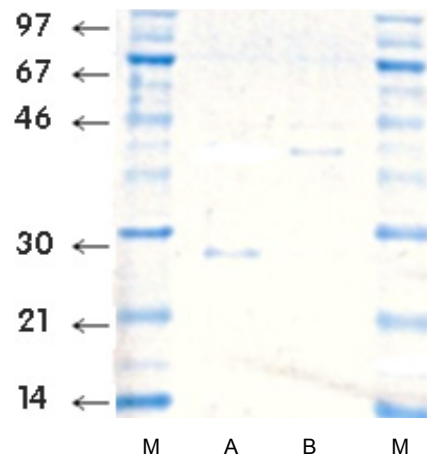


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel (14.0%) electrophoresis of the purified keratinases A: *B. subtilis* SMMJ-2, B: Mutant No. 2, M, standard protein: phosphorylase b (97 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (46 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa).

음이온교환수지 DEAE-sephacel 크로마토그래피에서 나타난 *B. subtilis* SMMJ-2의 keratinase peak가 2가지 형태 (main peak와 minor peak)로 나온 것을 고려해 볼 때, UV 조사로 얻어진 mutant No. 2의 keratinase 생산 양상은 야생주의 효소용출 peak와는 반대 양상으로 나타나 있다. 이는 UV 조사로 인한 *B. subtilis* SMMJ-2의 keratinase 효소생산 메커니즘에 전환이 일어난 것으로 사료된다. 이와 관련된 상세한 설명은 차후의 유전학적인 접근법으로 보다 명확한 근거를 제시할 수 있으리라 본다.

요 약

본 연구는 선행연구에서 얻은 keratinase 효소의 활성이 높은 균주 *Bacillus subtilis* SMMJ-2를 UV 조사에 의해 개량하여 mutant No. 2를 얻었으며, keratinase의 생산성 향상을 위한 최적 탄소원, 최적 질소원의 조건 하에서 본 효소를 대량생산하여 정제하고, 야생주와 변이주 간의 효소활성의 변화 및 정제된 효소 간의 효소화학적 성질을 비교하였다.

Mutant No. 2의 keratinase 생산을 위한 최적 탄소원과 질소원은 각각 glucose와 soybean meal로 나타나, 야생주의 경우와는 최적 질소원을 달리했으며, 효소활성에 있어서는 야생주보다 40% 정도 상승하였다. 변이주의 효소가 야생주의 효소보다 높은 배양온도에 대하여 더 안정적인 활성으로 생산되며, 효소 생산을 위한 최적 pH는 7.0으로, 비교적 효소 생산이 가능한 pH 영역대는 6~9로 나타났다. *Bacillus subtilis* SMMJ-2와 mutant No. 2에서 생산된 keratinase는 DEAE-sephacel 크로마토그래피법과 겔여과 크로마토그래피법으로 최종 정제되었다. 정제과정 중 DEAE-sephacel 크로마토그래피 상에서 나타나는 2개의 효소피크는 *Bacillus subtilis* SMMJ-2의 메인 효소피크의 위치와 mutant No. 2에서의 메인 효소피크의 위치가 전환되어 나타났다. SDS-PAGE 상에서의 각각의 효소 분자량은 *B. subtilis* SMMJ-2의 경우에 28 kDa, mutant No. 2의 경우에 42 kDa 로 추산되었다.

감 사

본 연구는 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화연구센터 (TMR)의 일부 지원에 의해 연구되었음에 감사드립니다.

접수 : 2010년 5월 27일, 게재승인 : 2010년 10월 21일

REFERENCES

- Park, S. M., H. J. Jung, and T. S. Yu (2006) Selection and cultural characteristics of whole chicken feather-degrading bacteria, *Bacillus* sp. SMMJ-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 7-14.
- Riffel, A., F. S. Lucas, P. Heeb, and A. Brandelli (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium capable of completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179: 258-265.
- Xiang, L., C. G. Lee, E. S. Casale, and J. C. H. Shin (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3271-3275.
- Kaluzewska, M., K. Wawrzkiwicz, and J. Lobarzewski (1991) Microscopic examination of keratin substrates subjected to the action of the enzymes of *Streptomyces fradiae*. *Int. Biodeterion.* 27: 11-26.
- Freidrich, A. B. and G. Antranikian (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2875-2882.
- Williams, C. M. and J. C. H. Shin (1989) Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 25-35.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie Jr., and J. C. H. Shin (1990) Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1509-1515.
- Muhsin, T. M. and A. H. Aubaid (2000) Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. *Mycopathologia.* 150: 121-125.
- Brouta, F., F. Descamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday, and B. Mignon (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Medical Mycology.* 39: 269-275.
- Farag, A. M. and M. A. Hassan (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology.* 34: 85-93.
- Gradisar, H., J. Friedrich, I. Krizaj, and R. Jerala (2005) Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsprus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 3420-3426.
- Cheng, S. W., H. M. Ha, S. W. Shen, H. Takagi, M. Asano, and Y. C. Tsai (1995) Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2239-2243.
- Bernal, C., J. Cairo, and N. Coello (2006) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase *Kocuria rosea*. *En. Microbiol. Technol.* 38: 49-54.
- Sangali, S. and A. Brandelli (2000) Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89: 735-743.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Kim, J. D. (2003) Preliminary characterization of keratinolytic enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and its potential in biodegradation of keratin wastes. *Mycology* 31: 209-213.
- 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.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Elrefai, H. A., M. A. Abdelnaby, A. Gaballa, M. H. Elaraby, and A. F. A. Fattah (2005) Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH keratinolytic activity. *Process Biochem.* 40: 2325-2332.
- Anbu, P., S. C. B. Gopinath, A. Hilda, T. LakshmiPriya, and G. Annadurai (2005) Purification and characterization

- of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzymn activity. *Enzymn Microb. Technol.* 36: 639-647.
21. Chon, D. H., S. M. Kang, and T. J. Kwon (2003) Purification and some properties of keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. 364. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 224-229.
 22. Bang, B. H., M. S. Rhee, K. H. Lim, and D. H. Yi (2008) Optimal culture conditions on the keratinase production by *Bacillus* sp. SH-517. *J. Life Sci.* 18: 839-844.
 23. Aida, M. F. and M. A. Hassan (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *En. Microbiol. Technol.* 34: 85-93.
 24. Bernal, C., J. Cairo, and N. Coello (2005) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *En. Microbiol. Technol.* 38: 6-11.
 25. Jeong E. J., M. S. Rhee, G. P. Kim, K. H. Lim, and D. H. Yi, and B. H. Bang (2010) Purification and characterization of a keratinase form a feather-degrading bacterium, *Bacillus* sp. SH-517. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 43-49.