

## Keratinolytic protease 생산균, *Pseudomonas* sp. KP-364의 분리 및 배양

전동호 · 권태종\*

건국대학교 공과대학 미생물공학과

**Isolation of Keratinolytic Protease Producing Microorganism and Its Cultivation Condition.** Chon, Dong-Ho and Tae-Jong Kwon\*. Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – A bacterial strain KP-364 producing extracellular keratinolytic protease was isolated from the soil of the poultry factory. It was identified as *Pseudomonas* sp. based on its morphological and physiological characteristics. The optimal culture conditions for the production of keratinolytic protease by *Pseudomonas* sp. KP-364 were investigated. The composition of optimal medium for the keratinolytic protease was 2.0% glucose, 0.5% soybean meal, 0.5% NaNO<sub>3</sub>, and 0.2% KCl. Optimal initial pH for the production of keratinolytic protease production were 6.5 and 37°C, respectively. The keratinolytic protease production reached a maximum of 1,270 U/ml/hr after 48 hours cultivation under the optimal culture conditions.

**Key words:** Keratinolytic protease, isolation, keratin

Keratin은 척추동물의 표피와 그 부속기관의 주된 구조 단백질이며, 고도의 섬유질 화된 표피, 즉, 피부, 두발, 손발톱, 깃털, 뿔 등의 주된 성분이다. 보통 표피성분의 85%가 완전히 분화된 keratinocyte로 구성되어 있다. 또한 actin microfilament와 microtubules와 함께 keratin filaments는 척추동물 상피세포의 골격을 형성하며 피부 단백질이 외부환경의 stress에 대하여 특수한 안정성을 부여하는 disulfide 결합으로 구성되어 있다는 것이 커다란 특징 중에 하나이다[3].

Keratin은 그 구조 내에 cystein disulfide 결합과 수소결합, 그리고 hydrophobic interaction으로 강한 사슬결합을 하고 있기 때문에 자연상태에서 불용성이며 trypsin, pepsin, papain같은 일반적인 단백질 분해효소로는 거의 분해가 되지 않는다[26].

미생물이 생산하는 keratinolytic protease에 관한 연구는 1968년 피부, 두발, 손발톱에 감염하는 *Trichophyton mentagrophytes*의 keratinolytic protease를 분리 정제한 것이 최초이며 이들 진균은 피부, 두발, 손발톱 등의 각질화 된 층에 부착하여 증식한다[17,18,29]. 또한 *Tritirachium album*의 keratinase는 Protease K라는 이름으로 상용화되고 있는 효소로 그 최적 pH가 7.5에서 12.0이며 1992년 호알칼리성 *Bacillus* sp. AH-101의 alkaline protease는 protease K보다 keratinolytic activity가 3배정도 높다고 보고된 바 있다[23].

1990년 가금류 폐기물에서 깃털 분해 세균을 분리하여

*Bacillus licheniformis*라고 동정하였으며 그것의 keratinolytic protease를 분리하여 정제하고, 이 효소를 encoding 하는 DNA가 깃털 가루만을 탄소원 및 질소원으로 첨가하였을 때만 전사된다는 것을 밝혔다[25-27].

Keratinase의 가장 특징적인 성질로는 일반적인 protease로는 분해되지 않는 가금류 폐기물을 가수분해하여 그 산물인 각종 아미노산을 첨가에 이용할 수 있다. 때문에 지금까지 보고된 미생물 기원의 keratinase는 거의 50°C-70°C의 최적 온도를 가지는 고온성 효소이었다. 또한 다른 keratinase에 관한 연구로는 동물의 피부에 기생하는 미생물의 상피세포에 대한 침투기작을 밝히기 위하여 이미 알려진 trypsin, papain, pepsin등의 protease와 비교한 것들이다[8,16,25,28].

지금까지 보고된 keratinase들은 구조적으로 serine protease의 특성을 나타내는 고온성 keratinolytic protease이 대부분을 차지하며 이러한 효소는 *B. licheniformis*, *B. subtilis* 등과[23,27] *Streptomyces pactum*등[1], *Trichophyton rubrum* 등이 생산하며, 이밖에 trypsin-like keratinase와 subtilisin-like keratinase등이 보고되어 있다[2,10,11,12,20,21].

따라서 본 실험에서는 상온에서 활성이 높은 keratinolytic protease를 생산하는 균주를 선별하여 동정하고 그 최적 배양조건을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

Keratinolytic protease를 분리하기 위하여 실험실 보관 균주 및 경기도 일대의 가금류 가공공장 부근의 토양에서 시료를 채취하여 균원시료로 사용하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 02-450-3519, Fax. 02-455-0158  
E-mail: tjkwon@kkucc.konkuk.ac.kr

### 사용배지

본 실험에 이용한 배지는 세균을 분리하기 위하여 세균 분리용 배지(Table 1A)를 이용하여 균을 분리한 후 깃털 keratin에 대한 분해능이 높은 균주를 최종 선별하기 위하여 Table 1B와 같은 배지를 이용하였다[25]. 또한 종균배지는 Table 1C와 같고 효소 생산용 배지는 Table 1D와 같다.

### 사용시약

본 실험에 사용한 시약은 Sigma사의 keratin azure와 AJAX Laboratory Chemicals사의 Folin & Clocalteus reagent를 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급시약 내지 1급 시약을 사용하였다.

### 닭 깃털 keratin의 조제

닭 깃털 keratin을 배지와 keratinolytic activity 측정에 이용하기 위하여 Krystyna[9]등의 방법에 따라 조정제하였다. 즉 10.0 g의 닭 깃털에 500ml Dimethyl sulfoxide를 첨가하여 100°C에서 2시간 가열하여 용해시킨 후 2배의 cold acetone(-90°C)으로 keratin 단백질을 침전시키고 6,000 × g에서 원심 분리하였다. 원심 분리한 침전물을 증류수로 4회 세척하고 다시 원심 분리한 후 상온에서 건조하였다.

### 균주선별

Keratinolytic protease를 분비하는 균주를 선별하기 위하여 실험실 보관균주 및 토양에서 채취한 시료를 Table 1A와 같은 세균 분리용 배지에 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 clear zone이 크고 생육이 우수한 균주를 1차 선별하고 각 균주를 Table 1B와 같은 배지에 액체 배양하여 원심 분리한 상등액을 37°C에서 닭 깃털 keratin에 대한 분해능을 측정하여 활성이 가장 높은 균주를 최종 선별하여 KP-364라고 명명하고 이후의 실험에 이용하였다.

### 균주동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 The Prokaryotes[22]와 Bergey's manual of systematic bacteriology[7]에 기술된 방법에 따라 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사 관찰하였다.

### 조효소액의 조제와 효소 활성 측정

닭 깃털 keratin을 이용한 keratinolytic protease의 활성측정은 Ryoji[19]등과 Esteban [4]등의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.6%의 깃털 keratin 현탁액 0.8 ml에 조효소액 0.2 ml를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 10% TCA용액 0.2 ml를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응을 중지시켰다. TCA용액에 의하여 침전이 되지 않는 저분자의 peptide 및 아미노산 잔기들을 분리하기 위하여 10,000 × g에서 원심분리하고 그 상등액 1.0 ml에 0.1M NaOH

**Table 1A. The composition of isolation medium A**

Component	Concentration (g/L)
Skim milk	50.0
Peptone	1.0
Agar	15.0
pH	6.5

Skim milk was mixed after separately sterilization.

**Table 1B. The composition of isolation medium B**

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Yeast extract	1.0
NH <sub>4</sub> Cl	5.0
NaCl	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0
Keratin*	1.0
pH	6.5

\*Keratin was isolated from chicken feather.

**Table 1C. The composition of seed medium (Tryptic soy medium)**

Component	Concentration (g/L)
Bacto tryptone	17.0
Bacto peptone	3.0
Bacto dextrose	2.5
NaCl	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
Keratin*	1.0
pH	6.5

\* Keratin was isolated from chicken feather.

**Table 1D. The composition of enzyme production medium**

Component	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Soybean meal	5.0
NaNO <sub>3</sub>	5.0
KCl	2.0
H <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0
Keratin*	1.0
pH	6.5

\*Keratin was isolated from chicken feather.

1.0 ml, 3배 희석한 Folin 시약 0.5 ml를 각각 첨가하여 발색을 안정시키기 위하여 20분간 상온에 방치 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 Unit는 37°C에서 1시간동안 기질로부터 1 μg의 tyrosine을 생성하는 효소량을 1 unit로 정하였다.

배양조건을 검토하기 위한 효소의 활성은 keratin azure를 이용하는 Heinz[6]와 Mignon[13]등의 방법을 약간 변형하여 조사하였다. 즉 조효소액 1.0ml을 예열시킨 keratin azure 현탁액(7.0mg/ml) 0.5 ml 에 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 6,000×g에서 원심 분리하여 불용성의 기질에서 유리된 발색단을 595 nm에서 측정하였다. 이때 효소의 unit는 상기의 조건에서 반응 후 595 nm에서 효소액의 OD값 0.01증가를 1 unit(U)로 정하였다.

**효소 생산 조건 검토**

효소 생산조건을 검토하기 위한 배양은 100 ml 삼각 플라스크에 종균 배지 20 ml을 분주하여 121°C에서 15분간 가압살균한 후 동일한 배지에 37°C에서 48시간 전배양한 배양액 0.1 ml을 접종하여 37°C에서 48시간 진탕 배양하였으며 효소생산용 배지는 1.0 L 삼각 플라스크에 200 ml을 분주하여 멸균하고 전배양액을 1.0 ml을 접종하여 37°C, 60시간 진탕 배양하면서 4시간마다 균체량과 효소활성을 측정하였다.

**균체량 측정**

균체량의 측정은 배양액을 10,000×g로 15분간 원심분리 후 증류수로 10배 희석하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도에 해당하는 건조균체중량(dry cell weight; DCW)은 배양액을 원심 분리하여 얻은 균체를 105°C에서 항량이 되도록 건조한 후 중량을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 선별**

Keratinolytic protease를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 실험실에 보관하고 있는 균주 와 토양에서 채취한 균원시료를 분리용 배지(Table 1A)에 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 투명환이 크고 생육이 우수한 균주를 선별한 결과 5균주를 선별하였다. 1차선별된 각각의 균주를 Table 1B와 같은 배지에 액체 배양하여 원심 분리한 상등액을 37 °C에서 keratinolytic activity를 측정하여 활성이 가장 높은 균주인 KP-364를 선별하여(Table 2) 이후의 실험에 이용하였다.

**Table 2. Final selection of keratinolytic protease producing bacteria by activity assay**

Strain No.	keratinolytic activity (unit/ml/hr)		
	1st	2nd	average
KP-2	502.4	459.0	475.1
KP-15	503.2	530.6	515.3
KP-16	576.5	540.3	555.6
KP-19	554.8	554.0	547.5
KP-364	605.5	649.8	620.0

**균주의 동정**

분리된 KP-364균주의 형태학적 특성 및 각종 배지를 이용한 배양상의 특성은 Table 3과 같이 중성 및 알칼리성의 nutrient agar plate에서는 청록색의 colony를 나타내었으며 약산성의 pH에서는 갈색의 colony를 나타내었다. 본 균주는 Gram(-) 간균으로 single flagella에 의한 운동성이 있으며 포자는 형성하지 않았다.

또한 본 균주의 생리학적, 생화학적 특성은 41°C 이상에서 생육이 가능하고 Gelatin을 가수분해하나 Starch는 가수분해하지 않으며 Oxidase reaction에 양성을 보였다. 이상의 결과를 조사해 본 결과 본 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*와 유사한 성질을 나타내어 *Pseudomonas* sp. KP-364로 명명하였다.

**Keratinolytic Protease 생산을 위한 배지 최적화**

**탄소원의 영향:** 본 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 탄소원을 제외한 종균배지(Table 1C)에 각종 탄소원을 각각 1.0%되게 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양한 후 균체량과 keratin azure에 대한 분해능을 조사한 결과는 Table 4와 같이 glucose,

**Table 3. Taxonomical characteristic of isolated strain KP-364**

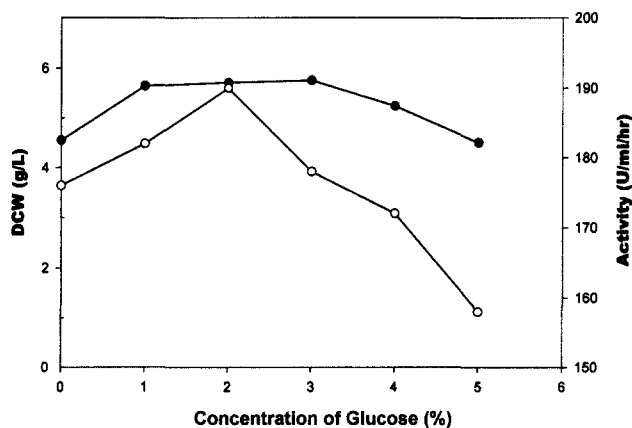
Characteristics	Strain KP-364	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram staining	-	-
Shape	Rod	Rod
Color of colony on alkaline and neutral pH	Blue-green	Blue-green
on weak acid pH	Redish brown	Redish brown
Motility	+	+
Spore formation	-	-
Growth at 4°C	-	-
at 41°C	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Urease	-	-
Gelatin Liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	-	-
Utilization of:		
Glucose	+	+
Trehalose	-	-
Inositol	-	-
Arabinose	-	-
Maltose	-	-
Inulin	-	-
Cellobiose	-	-
Ribose	+	+
Xylose	-	-
Fructose	+	+
Sucrose	-	-
Mannitol	-	-

raffinose, galactose를 첨가하였을 때 균체중식 및 효소활성이 우수하였으며 soluble starch, dextrin등의 다당류를 첨가하였을 때 균체 중식 및 효소활성이 현저히 떨어졌다. 이는 Yu[29]와 Page[15]의 보고와 일치하나 깃털 가루를 첨가하였다는 Rosa[16]의 보고와는 상이하였다.

본 균주는 배양 중에 amylase계통의 효소를 분비하지 않거나 활성이 낮아 세포막을 비교적 쉽게 투과할 수 있는

**Table 4. Effect of carbon source on the production of keratinolytic protease by *Pseudomonas* sp. KP-364**

C-source	DCW (g/L)	Final pH	Activity (U/ml/hr)
None	4.7	7.0	170.0
Arabinose	5.4	6.7	109.3
Raffinose	5.0	7.1	175.1
Rhamnose	4.9	6.8	99.8
Ribose	3.6	6.3	138.9
Xylose	4.5	6.5	86.7
Fructose	4.6	7.0	137.4
Galactose	5.7	6.5	167.6
Glucose	5.5	6.3	193.1
Mannose	4.4	6.4	151.6
Trehalose	4.6	6.9	159.6
Lactose	4.4	7.1	117.5
Sucrose	4.9	6.8	130.9
Maltose	4.9	6.7	117.5
Dextrin	4.0	6.7	98.3
Cellobiose	5.2	6.8	141.1
Mannitol	4.8	6.8	85.3
Sorbitol	4.5	7.0	151.6
Cellulose	3.7	7.0	117.3
Soluble starch	3.6	6.9	104.9



**Fig. 1. Effect of glucose concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.** Keratinolytic protease activity and dry cell weight (DCW) were measured after the cultivation for 3 days at 37°C. Symbol: -●-, DCW; -○-, activity (unit/ml/hr)

단당류만을 주로 이용하기 때문이라고 추정된다.

또한 탄소원을 첨가하지 않은 대조구의 경우 배지의 질소원에 의하여 균체중식과 효소가 생산되었다고 판단한다.

Glucose의 농도가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 glucose를 2.0%첨가하였을 때 효소활성이 가장 높았다.

**질소원의 영향:** 본 균주의 균체 중식과 효소활성에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 glucose를 2.0%첨가한 기본배지에 각종 유기 질소원을 각각 0.5%되게 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕 배양한 후 균체량과 keratin azure에 대한 분해능을 조사한 결과는 유기질소원으로는 Table 5A와 같이 soybean meal, malt extract, yeast extract등을 질소원으로 첨가하였을 때 효소활성 및 균체중식이 우수하였으며 무기질소원으로는 Table 5B와 같이 NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>를 첨가하였을 때 균체중식 및 효소활성이 우수하였다.

이는 Rosa[16]의 keratin을 유일한 질소원으로 첨가하였다는 보고와는 상이하나 yeast extract를 첨가한 Tideto[23]와 NH<sub>4</sub>Cl을 첨가하여 배양초기에 균체중식을 향상시켰다는 Williams[25]의 보고와는 유사하였다. 본 실험에서도 keratin과 질소원을 함께 첨가하였을 시 keratin을 유일한 질소원으로 첨가하였을 때보다 균체량은 대부분 향상되었다.

Soybean meal의 농도가 효소생산에 미치는 영향을 조사

**Table 5A. Effect of organic nitrogen source on the production of keratinolytic protease by *Pseudomonas* sp. KP-364**

N-source	DCW (g/L)	Final pH	Activity (U/ml/hr)
None	0.5	4.4	210
Peptone	2.4	5.5	529
Urea	1.1	8.1	260
Beef extract	0.9	5.9	439
Malt extract	2.5	5.1	712
Milk casein	1.1	4.3	382
Tryptone	1.8	5.7	624
Yeast extract	2.5	4.4	674
Soybean meal	2.4	5.0	1125

**Table 5B. Effect of inorganic nitrogen source on the production of keratinolytic protease by *Pseudomonas* sp. KP-364**

N-source	DCW (g/L)	Final pH	Activity (U/ml/hr)
None	0.45	4.4	210
NaNO <sub>3</sub>	1.0	6.6	283
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9	3.8	36
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.6	3.3	36
NH <sub>4</sub> Cl	0.5	3.4	6
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.1	3.9	41
KNO <sub>3</sub>	0.7	4.8	266
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.6	3.5	12
NaNO <sub>2</sub>	0.1	6.6	178

한 결과는 Fig. 2과 같이 soybean meal을 0.5% 첨가하였을 때 효소의 생산이 가장 우수하였다.

또한 NaNO<sub>3</sub>의 농도에 대한 영향은 Fig. 3와 같이 NaNO<sub>3</sub>를 0.5% 첨가하였을 때 효소의 생산이 가장 우수하였다.

**금속염의 영향:** 본 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 금속염을 제외한 기본배지에 각종 금속염을 각각 1.0 mM되게 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕 배양한 후 균체량과 keratin azure에 대한 분해능을 조사한 결과는 Table 6과 같이 KCl을 첨가하였을 때 효소생산이 가장 우수하였다. 이는 MgSO<sub>4</sub>와 FeSO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때 활성이 우수하였다는 Tideto[23], Page

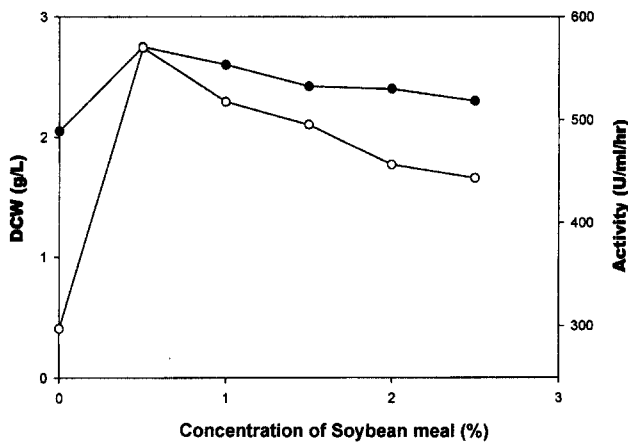


Fig. 2. Effect of Soybean meal concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

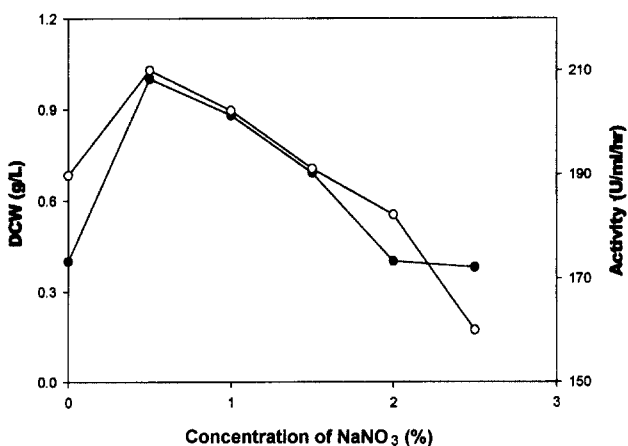


Fig. 3. Effect of NaNO<sub>3</sub> concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

[15], Lee[10]의 보고와는 상이하였다.

KCl의 농도에 대한 영향은 Fig. 4와 같이 KCl을 0.2% 첨가하였을 때 균체증식 및 효소활성이 가장 우수하였다.

이상을 배지 최적화를 통하여 2.0% glucose, 0.5% soybean meal, 0.5% NaNO<sub>3</sub> 및 0.2% KCl을 최적 배지로 선정하였다.

**Keratinolytic Protease 생산을 위한 환경조건 최적화**

선정된 최적배지에서 본 균주의 초기 pH에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 기본배지에 pH 3에서 10까지 조절 한 후 48시간 배양하여 각각의 균체량과 keratinolytic activity를 측정할 결과는 Fig. 5과 같이 pH 6.5에서 효소활성 및 균체증식이 우수하였으며 pH 5~8까지는 비교적 우수하게 증식되었으며 또한 효소생산력도 높았다.

이러한 결과는 pH 7.5에서 최적 활성을 나타내었다는 Williams[25]의 보고와 pH 7~8의 Brigitte[1]의 결과보다는 넓은 범위에서 우수한 활성이 나타났다.

본 균주의 배양 온도에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 각 온도에서 48시간 배양하여 각각의 균체량과 keratinolytic activity를 측정할 결과는 Fig. 6과 같이 37°C에서 균체증식 및 효소생산이 가장 우수하였고 30°C, 35°C, 40°C까지도 효소생산이 90%이상을 유지하였다. 이는 30°C에서 효소활성이 가장 우수하였다는 Brigitte[1]의 보고와 37°C의 Hanel[5]의 보고와는 유사하였으나 43~54 °C의

Table 6. Effect of metal ions on the production of keratinolytic protease by *Pseudomonas* sp. KP-364

Metal ion	DCW (g/L)	Final pH	Activity (U/ml/hr)
None	5.0	5.0	850
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.7	3.8	408
KCl	5.0	4.9	1037
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	4.9	4.9	714
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	4.9	5.4	901
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	4.7	5.1	790
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	4.7	5.0	417
CdCl <sub>2</sub>	5.0	5.3	400
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.9	5.4	420
CuCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4.7	3.9	281
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5.0	3.4	570
HgCl <sub>2</sub>	4.9	2.2	357
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5.0	5.2	590
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4.8	5.0	765
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.9	5.7	357
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.7	5.5	578
SnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4.9	4.3	422
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	4.7	5.2	680
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	5.0	4.7	527

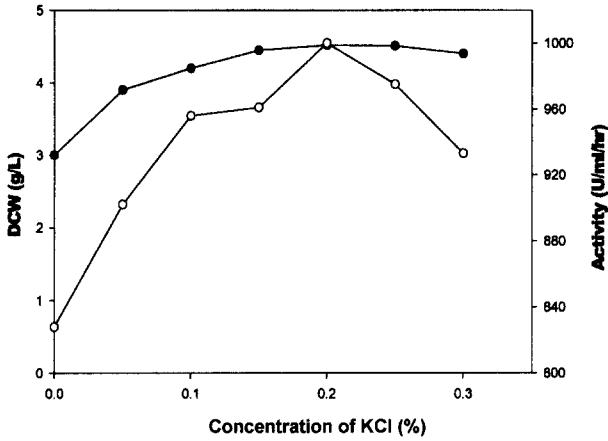


Fig. 4. Effect of KCl concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

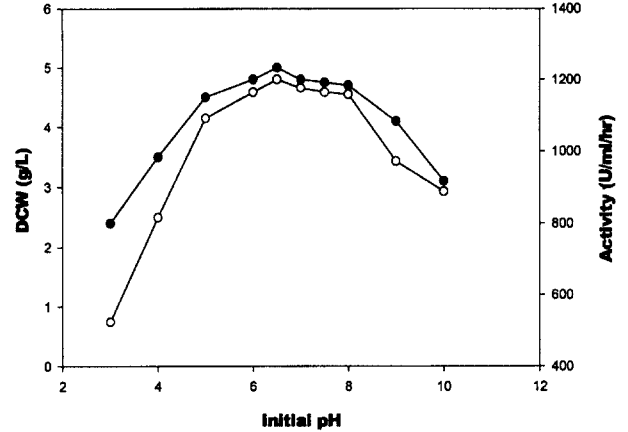


Fig. 6. Effect of pH on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

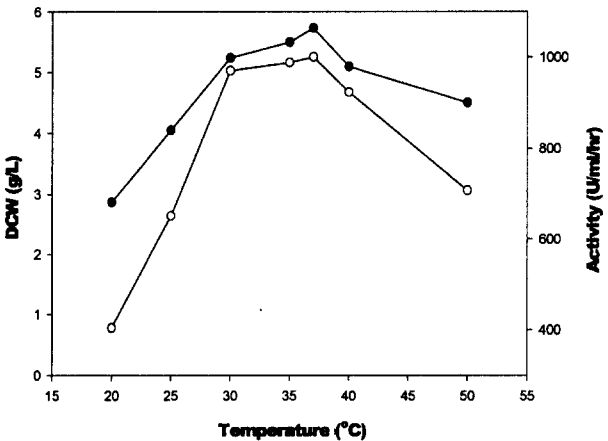


Fig. 5. Effect of temperature on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

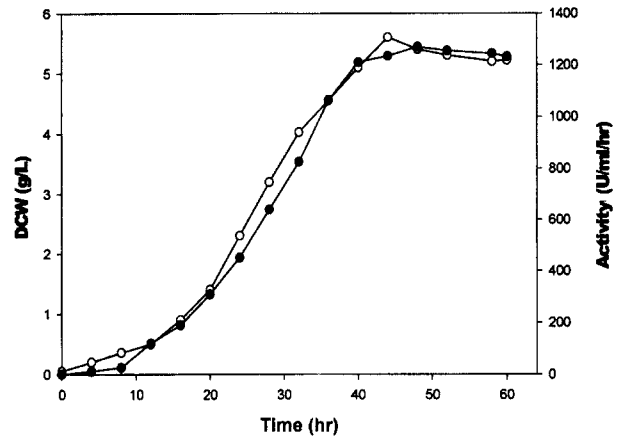


Fig. 7. Time courses of cell growth and Effect of culture time on the production of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. Keratinolytic protease activity and dry cell weight were measured as in Fig. 1. Each symbols are the same as Fig. 1.

Ruey[17], 50°C의 Young[28]의 보고와는 상이하였다. 본 균주의 keratinolytic protease생산에 대한 시간의 영향을 조사하기 위하여 탄소원으로 2.0% glucose를, 질소원으로 0.5% soybean meal을 금속염으로 0.2% KCl을 첨가한 keratinolytic protease생산배지에 전배양한 종균을 5.0%(v/v)되게 첨가한 후 pH 6.5, 37°C에서 배양한 후 4시간 간격으로 균주의 생육과 keratinolytic activity를 조사한 결과는 Fig. 7과 같이 12시간 이후부터 효소생성이 급격히 증가하여 48시간에 효소생성이 가장 높았으며 균체중식은 44시간 전후에 가장 높았다. 이러한 결과는 Williams[25]의 *Bacillus* sp.과 Yu[29]의 *Trychophyton* sp.이 5일, Heinz[6]의 *Dermatophilus* sp.가 12일이라는 것보다 효소생산기간이 훨씬 빨랐다. 특히 Dermato-phytes가 최

고의 효소활성을 나타내는 기간은 약 28일이라는 Ute[24]의 보고와는 비교되는 결과였다.

요 약

경기도 일대의 가금류 공장부근 토양로부터 단백질 분해 활성이 높은 균주를 분리한 후 이것들 가운데 keratinolytic protease생산성이 우수한 균주 KP-364를 선별하여 효소생산을 위한 최적 배양조건을 검토하였다. 선별된 KP-364는 형태학적, 생화학적 특성을 종합한 결과 *Pseudomonas* sp.로 동정되었으며 편의상 *Pseudomonas* sp. KP-364로 명명하였다. 효소생산을 위한 최적 배지조성은 keratin 0.1%, glucose

2.0%, soybean meal 0.5%, NaNO<sub>3</sub> 0.5%, KCl 0.2%이었고 초기 pH 6.5, 배양온도 37°C, 48시간 진탕 배양할 때 효소생산이 가장 우수하였으며 이때의 효소의 역가는 1,270 U/ml/hr이었다.

### 감사의 말

이 논문은 2000학년도 전국대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

### REFERENCES

1. Brigitte, B., B. Galunsky, and R. Muller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3705-3710.
2. Brysk, M. M. and S. Rajaraman. 1992. Cohesion and desquamation of epidermal stratum corneum. *Prog. Histochem. Cytochem.* **25**: 1-53.
3. Elaine, F. 1995. Keratins and the skin. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* **11**: 123-153.
4. Esteban, B. and M. Berta. 1984. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **77**: 599-604.
5. Hanel, H., J. Kalisch, M. Keil, W. C. Marsch, and M. Buslau. 1991. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **180**: 45-51.
6. Heinz, H., J. Kalisch, M. Keil, W. C. Marsch, and M. Buslau. 1991. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol.* **180**: 45-51.
7. John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. *Williams and Wilkins*, Baltimore.
8. Kaul, I. and G. Sumbali. 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathol.* **139**: 137-140.
9. Krystyna, W., J. Lobarzewski, and T. Wolski. 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Veter. Mycol.* **25**: 261-268.
10. Lee, K. H., K. K. Park, S. H. Park, and J. B. Lee. 1987. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum canis*. *Yonsei Med. J.* **28**: 131-138.
11. Lundstrom, A. and T. Egelrud. 1991. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta. Derm. Venereol.* **71**: 471-474.
12. Masakazu, A., R. Lindquist, K. Fukuyama, G. Apodaca, W. L. Epstein, and J. H. McKerrow. 1992. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* **232**: 139-144.
13. Mignon, B. R., A. F. Nikkels, G. E. Pierard, and B. J. Lосson. 1998. The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kd keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatol.* **196**: 438-441.
14. Muhsin, T. M., A. H. Aubaid, and A. H. Al-Duboon. 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses.* **40**: 465-469.
15. Page, W. J. and J. J. Stock. 1974. Phosphate-mediated alteration of the *Microsporum gypseum* germination protease specificity for substrate: Enhanced keratinase activity. *J. Bacteriol.* **117**: 422-431.
16. Rosa, S. P., F. Bicca, P. C. Santos, S. K. Ferrao, H. Dewes, C. C. Gaylarde, C. Termignoni, and R. W. S. P. Thomas. 1996. Digestion of keratin by *Pseudomonas sp.* *Inter. Biodeter. Biodegr.* **37**: 1-2.
17. Ruey, J. Y., S. R. Harmon, F. Blank, S. Nat, and S. Techn. 1969. Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Dermatol.* **53**: 166-171.
18. Ruey, J. Y., S. R. Harmon, P. E. Wachter, and F. Blank. 1969. Amino acid composition and specificity of a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Arch. Biochem. Biophys.* **135**: 363-390.
19. Ryoji, T., I. J. Ko, K. Matsuda, and H. Ogawa. 1987. A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Dermatol.* **14**: 506-508.
20. Suzuki, Y., J. Koyama, O. Moro, I. Horii, K. Kikuchi, M. Tanida, and H. Tagami. 1996. The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br. J. Dermatol.* **134**: 460-464.
21. Suzuki Y., J. Nomura, J. Hori, J. Koyama, M. Takahashi, and I. Horri. 1993. Detection and characterization of endogenous protease associated with desquamation of stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* **285**: 372-377.
22. Mortimer P. S. 1992. The prokaryotes A: handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. *Microbial ecology*. New York, Springer-Verlag, pp. 3071-3131.
23. Tideto, T., S. Nakamura, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Degradation of Human Hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus sp.* No. AH-101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1667-1669.
24. Ute, S. and K. H. Bohm. 1995. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. *Mycoses.* **38**: 205-209.
25. Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie, and J. C. H. Shih. 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1509-1515.
26. Xiang, L., C. G. Lee, E. S. Casale, and J. C. H. Shih. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3271-3275.
27. Xing, L., D. W. Kelemen, E. S. Miller, and J. C. H. Shih. 1995. Nucleotide sequence and expressing of *KerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1469-1474.

28. Young, R. A. and R. E. Smith. 1975. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 583–586.
29. Yu, R. J., S. R. Harmon, and F. Blank. 1968. Isolation and

Purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* **96**: 1435–1436.

**(Received Jun. 25, 2001/Accepted Jul. 30, 2001)**