



난각막 분해를 위한 *Bacillus licheniformis*로 부터 Keratinase의 정제 및 특성

전 태 욱 · 박 기 문

성균관대학교 식품·생명자원학과

Purification and Characterization of a Keratinase from *Bacillus licheniformis* Strain for Degradation of Egg Shell Membrane

Tae-Woog Jeon and Ki-Moon Park

Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University

Abstract

The egg shell membrane degrading isolated from soil was identified as *Bacillus licheniformis* by 16S rDNA identification method. A keratinase was isolated from the *Bacillus licheniformis* culture. DEAE-cellulose ion-exchange and Sephadex G-75 gel chromatographies were used to purify the enzyme. The specific activity was increased 17.3-fold by the purification procedures. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis and Sephadex G-75 chromatography indicated that the purified keratinase was monomeric and had a molecular weight of 65 kDa. The enzyme showed optimum activity at pH 9.0, and was stable above pH 9.0. The optimum temperature was 50°C and the enzyme was stable in the temperature ranges from 20°C to 50°C. By the addition of 1mM and 10 mM FeSO₄, the activities of the enzyme were increased to 111±4.6% and 133±3.79%, respectively. The keratinase was an alkaline serine protease because it was inhibited only by phenylmethylsulfonylfluorice (PMSF).

Key words : egg shell membrane, keratinase, *Bacillus licheniformis*.

서 론

계란은 난각 그리고 난백, 난황으로 구성되어 있으며, 난백과 난각 사이에 난각막(egg shell membrane, ESM)이 존재한다. ESM은 내막과 외막의 이중구조로 실이 얽혀있거나 불규칙적인 망처럼 되어 있다. 이러한 불용성 섬유층 단백질인 keratin으로 구성된 외막과 내막의 두께는 각각 약 50 μm와 15 μm이고, ESM의 성분 중 70%는 유기물, 10%는 무기물 그리고 나머지 20%는 수분으로 구성되어 있다. 또한 유기물 중 80%가 주성분인 단백질로 되어 있으며 그 외에 지방 2.3%, 탄수화물 3.4% 등으로 이루어져 있다(Okubo et al., 1997; Arias et al., 1991). 이러한 keratin은 주로 깃털과 양모, 뿔, 비늘, 머리카락, 손톱 등 피부 각질층에 분포되어 있으며 물리,

화학적 그리고 생물학적 반응에도 강한 저항력을 가지는 것으로 알려져 있다.(Vignardet et al., 1999). Keratin은 구조상 수소 결합, 소수성 결합 이외에도 다른 cross-linkage로 연결되어 있어 단백질 분해효소에도 저항력을 가지고 있으며, ESM의 경우도 단백질에 포함된 cystine 및 hydroxylysino-norleucine, desmosine 중 많은 부분이 cross-linkage로 되어 있어 수용화가 어렵다(Kaluzewska et al., 1991; Friedrich and Antranikian, 1996; Leach et al., 1981). 이와 같은 keratin을 수용화 하는 방법으로는 산화, 환원방법을 사용하여 이화황 결합을 절단하고 불용성을 감소시킨 후, 이화황 결합이 절단된 단백질에 pepsin을 처리하여 수용화 할 수 있다고 보고하였다.(Williams and Shih, 1989; Williams et al., 1990; Xiang et al., 1992). 그리고, 미생물 효소를 이용하여 분해하는 방법으로 *Trichophyton mentagrophytes* (Yu et al., 1968; Tsuboi et al., 1989), *Trichophyton schoenleinii*(Qin et al., 1992), *Streptomyces* sp. 및 *B. licheniformis*, *Tritirachium album*에서 분비하는 proteinase에 의해 keratin이 분해되는 것으로 알려져

Corresponding author : Ki-Moon Park, Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do. 440-746, Korea. Tel : 82-331-290-7806, Fax : 82-331-290-7816, E-mail : kimoon@yurim.skku.ac.kr

있으며, 사람의 피부 각질층과 손톱을 수용성 단백질로 분해하는 *Doratomyces microsporus*에서 keratinase를 정제한 후 그 활성을 보고하였다(Nickerson et al., 1963; Xiang et al., 1992; Bockle et al., 1995; Cheng ET AL., 1995; Gradišar et al., 2000). 또한 머리카락, 깃털, 양모 그리고 실크 등을 분해하는 keratinase을 *Streptomyces* sp.(Mukhopadhyay et al. and Chandra, 1990) 및 *Bacillus licheniformis* PWD-1(Cheng et al., 1995)에서 정제하였고, 동물의 생체에서 분리한 *Trichophyton mentagrophytes*에서 keratinase를 생산하였다고 보고하였다(Ute and Bohn, 1995).

따라서 본 연구에서는 ESM을 미생물 효소를 사용하여 분해하고자 ESM 분해 미생물을 토양에서 분리하고, 그 미생물이 분비하는 keratinase의 정제 및 일반적인 특성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 난각막은 계란 알란후 폐기물로 발생되는 난각막이 부착된 난각에서 난각막을 회수한 후 흐르는 물로 5회 이상 세척하여 난각 및 난백을 제거하고 50℃의 열풍 건조기로 건조하여 분쇄한 후 사용하였다.

미생물 분리 및 동정

난각막을 분해할 수 있는 Keratinase을 생산하는 균을 분리하기 위해 계란 껍질과 깃털이 쌓여 있는 장소의 토양을 채취하여, 50℃에서 TS broth에 배양한 후 내열성 균을 선택하였고, 분리한 미생물은 16S rDNA sequencing 과 phylogenetic analysis을 하였다. Yoon등(1996)의 방법에 따라 DNA를 분리 및 정제하였고 분리 정제된 16S rDNA는 universal primer (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGT-GATCCAGCC-3')를 사용하여 PCR을 통해 증폭하였다(Yoon 등, 1997). 증폭된 16S rDNA는 PCR product purification kit(Qiagen사)를 이용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였다. 염기서열 결정은 genetic analyzer 377(Perkin-Elmer 사)을 사용하였으며 염기서열은 주로 CLUSTAL W 프로그램(Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램(Felsenstein, 1993)으로 분석하였다.

난각막의 분해 및 배양 조건

분쇄한 난각막 3%를 Nitrobacter 203 배지에 0.5% Dextrose를 넣고 121℃에서 15분간 멸균한 후, mL 당 7.8×10^7 까지 성장시킨 미생물 1%를 접종하여 50℃에서 1주일동안 175 rpm으로 진탕 배양하면서 난각막을 분해하였다.

미생물 생장에 따른 ESM 분해량 측정

Nitrobacter 203 배지에 분쇄한 난각막 3%와 0.5% dextrose를 넣고 121℃에서 15분간 멸균한 후, 약 3×10^7 /ml까지 성장시킨 미생물을 1% 접종하여 50℃에서 1주일동안 175rpm으로 진탕 배양하면서 난각막을 분해하였다. 12시간 간격으로 SPC 배지를 이용하여 미생물수를 측정하였고, ESM분해 정도는 배양액을 8,000rpm에서 30분간 원심분리한 후, 상등액에 존재하는 수용성 단백질 함량을 UV spectrophotometer (Pharmacia, Ultrospec 1000)로 280nm에서 측정하였다.

효소의 정제

1) 조효소액 제조

배양액을 규조토 여과 후, 원심분리(8,000rpm, 30min)하여 얻은 여액을 조효소로 사용하였다.

2) Ammonium sulfate 분획

조효소에 ammonium sulfate를 30~80%의 농도로 처리한 후, 8,000rpm(4℃)에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 회수하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)으로 현탁한 후, dialysis tubing(cut off M.W: 5,000~8,000, USA)을 사용하여 4℃에서 16시간동안 dialysis한 후, 동결 건조하였다.

3) Ion-exchange chromatography

Ammonium sulfate처리 후, 동결 건조한 단백질을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 용해하고, DEAE-cellulose가 충전된 column($\phi 2.3 \times 30$ cm)을 사용하여 단계 별로 0.1M, 0.3M, 0.5M의 NaCl을 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 각 100ml를 1.0ml/min의 유속으로 흘려주면서 10ml/tube의 양으로 분획하였다. 분취된 각 fraction은 UV spectrophotometer (Pharmacia, Ultrospec 1000)로 280nm에서 흡광도를 측정하였고 분획한 효소는 동결 건조하였다.

4) Gel filtration chromatography

1차 정제된 효소를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 녹여, Sephadex G-75(Pharmacia, Sweden) 수지가 충전된 column($\phi 1.2 \text{cm} \times 60 \text{cm}$)에 loading 시키고, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 48ml/hr의 유속으로 흘려주면서 10ml/tube의 양으로 분획한 후 UV spectrophotometer (Pharmacia, Ultrospec 1000)로 280nm에서 측정하였고, 각 분획한 효소는 탈염 후 동결 건조하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 확인

SDS-PAGE로 15% acrylamide gel을 이용하여 정제된 효

소의 분자량을 결정하였다(Laemmli, 1970). Molecular weight markers(Sigma Co.)는 phosphorylase b (94,000), albumin (66,000), ovalbumin (45,000), pepsin (34,700), β -lactoglobulin (18,400)을 사용하였다.

효소 활성 측정

효소 활성 측정은 0.5% casein을 함유한 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)에 정제 단계별로 획득한 배양액 또는 enzyme solution을 100 μ l씩 첨가하여, 50 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨 후, 10% TCA solution 500 μ l 넣어 반응을 중지시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 냉장한 후, 반응액을 15,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 280nm에서 측정하였다. 1 Unit은 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후, A₂₈₀에서 0.01을 증가시키는 효소의 양으로 정의하였다.

효소의 일반적인 성질

1) 최적 pH

단백질 분해 효소의 반응 최적 pH는 4에서 12까지 측정하였다. 효소 반응은 50 mM potassium phosphate(pH 4.0~7.0), 50mM Tris-HCl(7.0~9.0), 50 mM glycine-NaOH(pH 9.0~11.0)과 50 mM phosphate-NaOH(pH 11.0~12.0)로 pH를 조절하여 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 280nm에서 측정하였다.

2) 최적 활성 온도와 열 안정성 측정

단백질 분해 효소의 최적 온도 측정은 20 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C까지 10 $^{\circ}$ C 간격으로 하였다. 50mM Tris-HCl buffer를 사용하여 pH 9.0에서 각 온도별로 30분간 처리한 후, 효소 활성을 280 nm에서 측정하였다. 열 안정성은 20 $^{\circ}$ C부터 80 $^{\circ}$ C까지 각각 0~2시간동안 20분 간격으로 반응시켰으며 반응 후, 효소 잔존 활성은 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 280nm에서 측정하였다.

3) 금속이온의 영향

효소 활성에 미치는 금속이온(CaCl₂, CuCl₂, MgSO₄, MnCl₂, ZnCl₂와 FeSO₄)의 영향을 확인하기 위하여 각 금속이온을 최종 농도가 1 mM과 10 mM이 되게 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 잔존 활성을 280nm에서 측정하였다.

4) 저해제에 대한 영향

N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N- α -p-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone (TLCK), ethylenediamine-tetra acetic acid (EDTA)와 dithiothreitol (DTT)에 의한 keratinase의 활성저해를 실험하였다. 각 저해제는 1 mM과 10 mM의 농도로 첨가

하여 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 280nm에서 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

분리균의 동정

난각막 분해 능력이 있는 선별균 중에서 활성이 가장 강한 것으로 밝혀진 strain 109의 분리 동정 결과는 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자 계통 분류학적 분석에서 *Bacillus* 속 에 속하는 균주로 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*를 포함하는 계통학적 그룹에 가장 가까운 유연관계로 보여주었으며, Table 1에서 보는 바와 같이 99.9%(1bp 차이)의 16S rDNA 상동성으로 *B. licheniformis*의 균주에 가장 높은 유연관계를 보여주었다. 즉, Cheng 등(1995)이 보고한 깃털을 강하게 분해하는 keratinase를 생성하는 *B. licheniformis* PWD-1과 같은 종으로 나타났다.

난각막 분해

분쇄한 난각막 3%와 carbon source로 dextrose를 0.5% 첨가한 nitrovector 203배지를 이용하여 배양시간에 따른 균주 성장 및 단백질 분해력을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 미생물수는 접종시 3.2 $\times 10^5$ CFU/ml에서 배양 1일째 약 3.2 $\times 10^8$ CFU/ml, 2일째 1.0 $\times 10^9$ CFU/ml까지 증식하였으며, 60시간 이후 배양 10일째까지 1.0 $\times 10^9$ CFU/ml를 일정하게 유지하였다. 또한 *B. licheniformis* 109에 의해 분해된 ESM 단백질은 24시간부터 분해량이 점차적으로 증가하기 시작하여 108시간만에 가장 높았으며 그 이후 단백질함량이 일정하게 나타났다. ESM을 분해 후 회수된 단백질의 수율은 약 15%였다. 배양액의 pH는 배양 초기 7.5에서 24시간 후부터 9.5로 증가하여 배양이 완료될 때까지 유지되었으며, pH 상승에 따른 단백질 분해량 변화를 확인하기 위해 12시간 간격으로 pH를 7.5로 조절하여도 단백질 분해량에는 영향을 미치지 못하였다.

Keratinase의 분리 및 정제

0.5% dextrose가 포함된 nitrovector 203배지에서 3%의 ESM을 기질로 *B. licheniformis* 109에 의해 생산된 keratinase는 anion-exchange column과 gel filtration column으로 다음과 같이 분리 정제하였다. 배양액에 30~80%의 ammonium sulfate를 처리하여 침전된 단백질을 회수하여 투석하였다. 투석 후 Fig. 2에서 보는 바와 같이 DEAE-cellulose column을 통해 1차 정제하였고, 정제 결과 0.3M NaCl 부근에서 용출된 fraction에서 단백질 함량이 높았으며 단백질분해 효소활성도

Table 1. Levels of 16S rDNA similarity for strain 109, the strain types of *Bacillus* species and the representatives of other related taxa

| Strain | % Similarity in : | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| 1 Strain 109 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T | 99.9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 <i>Bacillus subtilis</i> DSM 10T | 98.3 | 98.4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 <i>Bacillus mojavensis</i> IFO 15718T | 98.3 | 98.4 | 99.7 | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 <i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031T | 98.3 | 98.2 | 99.7 | 99.5 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350T | 98.2 | 98.2 | 99.5 | 99.4 | 99.6 | | | | | | | | | | | | |
| 7 <i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070T | 98.4 | 98.3 | 99.3 | 99.3 | 99.5 | 99.4 | | | | | | | | | | | |
| 8 <i>Bacillus pumilus</i> NCDO 1766T | 96.3 | 96.3 | 97.2 | 97.0 | 97.3 | 97.1 | 97.4 | | | | | | | | | | |
| 9 <i>Bacillus circulans</i> IAM 12462T | 93.7 | 93.8 | 93.7 | 93.8 | 93.5 | 93.8 | 93.3 | 94.0 | | | | | | | | | |
| 10 <i>Bacillus firmus</i> IAM 12464T | 95.3 | 95.4 | 95.1 | 95.3 | 94.9 | 94.9 | 95.1 | 95.0 | 96.4 | | | | | | | | |
| 11 <i>Bacillus methanolicus</i> NCIMB 13113T | 94.8 | 95.0 | 95.4 | 95.5 | 95.2 | 95.3 | 95.0 | 94.4 | 95.3 | 96.3 | | | | | | | |
| 12 <i>Bacillus cereus</i> IAM 12605T | 93.9 | 93.9 | 94.0 | 94.0 | 94.0 | 93.8 | 94.3 | 93.8 | 93.9 | 94.2 | 93.5 | | | | | | |
| 13 <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257T | 92.8 | 92.9 | 93.0 | 92.8 | 93.0 | 92.8 | 93.1 | 92.4 | 92.3 | 93.5 | 94.1 | 92.7 | | | | | |
| 14 <i>Halobacillus halophilus</i> NCIMB 2269T | 91.8 | 92.0 | 91.9 | 92.1 | 91.8 | 91.9 | 91.8 | 91.9 | 92.2 | 93.2 | 93.3 | 90.8 | 90.6 | | | | |
| 15 <i>Brevibacillus brevis</i> JCM 2503T | 88.7 | 88.9 | 89.0 | 88.9 | 88.7 | 88.8 | 88.8 | 88.3 | 88.3 | 88.9 | 89.8 | 88.8 | 88.5 | 88.7 | | | |
| 16 <i>Paenibacillus polymyxa</i> NCDO 1774T | 88.1 | 88.3 | 88.3 | 88.3 | 88.4 | 88.4 | 88.2 | 89.4 | 89.7 | 89.3 | 89.2 | 88.9 | 87.8 | 87.8 | 88.5 | | |
| 17 <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446T | 85.6 | 85.6 | 85.2 | 85.2 | 85.5 | 85.1 | 85.5 | 84.9 | 84.6 | 85.0 | 86.6 | 84.9 | 85.1 | 85.9 | 85.1 | 85.7 | |
| 18 <i>Escherichia coli</i> | 78.4 | 78.6 | 78.9 | 78.8 | 78.9 | 79.5 | 78.9 | 79.0 | 78.7 | 79.4 | 79.5 | 78.5 | 79.4 | 78.5 | 79.6 | 79.8 | 77.3 |

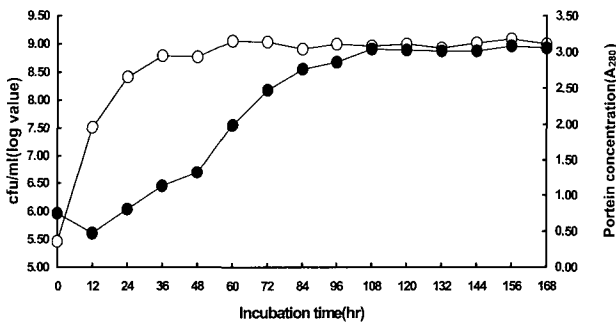


Fig. 1. Growth of *Bacillus licheniformis* 109 in Nitrobacter 203 medium and soluble protein concentration. Symbols represent soluble protein concentration (●) and *Bacillus licheniformis* growth (○).

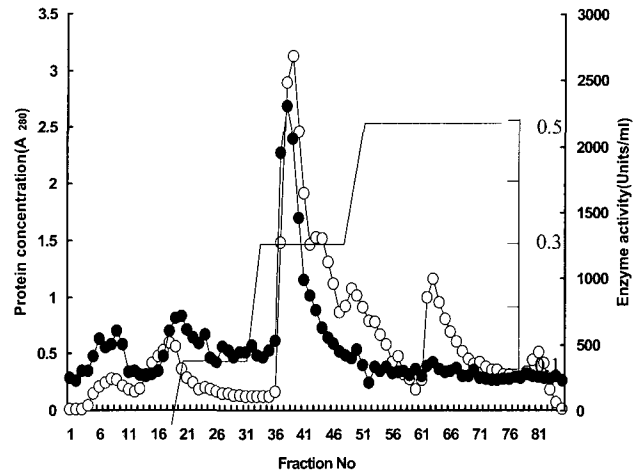


Fig. 2. Elution of keratinase on DEAE-cellulose column chromatography. Proteins were eluted with a stepwise gradient by NaCl (0.1M~0.5M). Symbols represent protein concentration (○), proteolytic activity (●) and NaCl concentration (—).

가장 높았다. 따라서 효소 활성이 높은 fraction을 회수하고 80% ammonium sulfate 처리하여 농축하였으며 gel filtration (Sephadex G-75)를 통해 Fig. 3와 같이 단일물질임을 확인하였다. Fig. 4에서는 gel filtration을 통해 정제하여 획득한 keratinase를 15% SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 분자량은 약 65KDa이었다. Gradišar 등(2000)와 Xiang 등(1992)의 결과와 비교해 보면 *Doratomyces microsporus*와 *B. licheniformis*에서 생산된 keratinase의 분자량은 모두 약 33KDa으로 본 실험에서 정제한 keratinase의 분자량 65KDa과는 차이를 나타냈다. 그러나 Ute와 Bohn(1995)은 *Trichophyton mentagrophytes* 균

주에서 생산된 keratinase의 분자량이 28KDa과 38KDa, 46 KDa, 65KDa 등으로 보고하였는데, *B. licheniformis* 109가 생성하는 keratinase는 그중 65KDa의 분자량을 가지는 keratinase과 유사한 것으로 판단되었다. Table 2에서 보는 바와 같이 정제된 효소의 specific activity는 crude extract보다 17.3 배가 높았으며, 효소의 회수율은 3.5%였다.

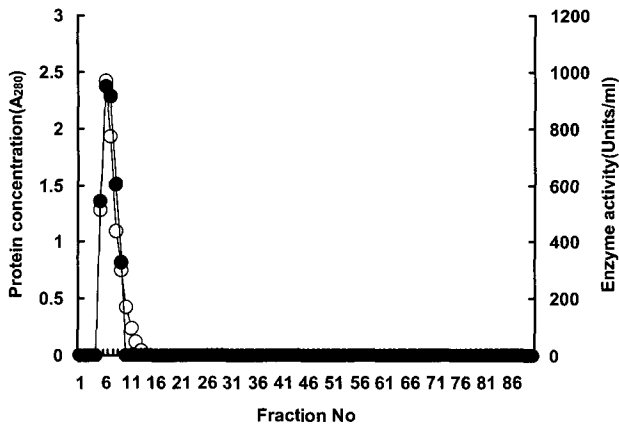


Fig. 3. Elution of keratinase on a Sephadex G-75 gel filtration chromatography. Symbols represent protein concentration (○) and proteolytic activity (●).

Table 2. Purification procedure of keratinase from *Bacillus licheniformis*

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (unit)1 | Specific activity (unit/mg) | Fold | Yield (%) |
|--|--------------------|------------------------|-----------------------------|------|-----------|
| Crude extract | 7,121 | 264,000 | 37 | 1 | 100 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 30~80% | 1,425 | 96,900 | 68 | 1.8 | 36 |
| DEAE-Cellulose Ion-exchange | 89.9 | 12,586 | 140 | 3.8 | 4.8 |
| Sephadex G-75 Gel filtration | 14.8 | 9,472 | 640 | 17.3 | 3.5 |

1) One proteolytic unit is defined as the amount of enzyme that increased an A₂₈₀ of 0.01 under this reaction condition.

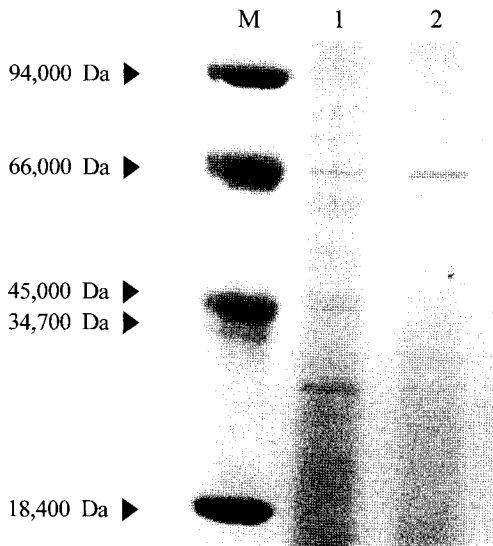


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of keratinase from *Bacillus licheniformis* 109. The samples of each purification step were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel. Lane M, protein standard marker; 1, DEAE-cellulose column; 2, Sephadex G-75 column.

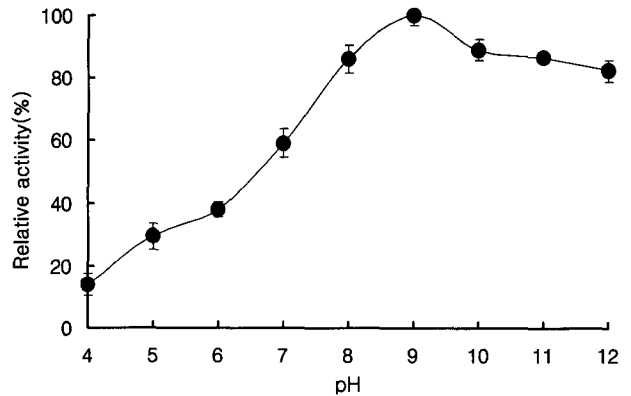


Fig. 5. Optimum pH of the keratinase from *Bacillus licheniformis* 109.

에서 효소구조에 영향을 미쳐 활성이 저하되는 것으로 보인다.

효소의 일반적 특성

1) 최적 pH

pH에 따른 효소 활성을 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소 활성은 pH 9에서 가장 높았고, Ignatova(1999)과 Cheng 등(1995)이 보고한 keratinase의 최적 pH 8.6과 유사한 결과를 나타냈으며, pH 8에서 12까지는 비교적 안정한 활성을 보여주었다. 그러나 Cheng 등(1995)에 의해 보고된 pH 5.0 ~12.0 범위와는 다소 차이를 나타내 *B. licheniformis* 109가 생성하는 keratinase의 경우 pH 7이하의 중성 및 산성영역

2) 최적 온도 및 열 안정성

온도에 따른 효소활성과 안정성은 pH 9인 50mM Tris-HCl buffer를 사용하여 실험하였다. 즉, 10℃간격으로 20~80℃에서 30분 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정된 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 50℃에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 60℃에서도 95% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 Cheng 등(1995)과 Xiang 등(1992)이 보고한 *B. licheniformis*에서 정제한 keratinase의 최적 반응 온도 50℃와 동일하였으며, thermostable enzyme으로 확인되었으나, Ignatova 등(1999)이 보고한 *Thermoactinomyces candidus*의 keratinase 적정 온도인 70℃와는 차이가 있었다. 또한 *B. licheniformis* 109가 생성하는 keratinase의 온도에 따른 안정성을 확인한 결과 Fig. 7과 같이 20~50℃까지는 효소 활성에는 영향을 미

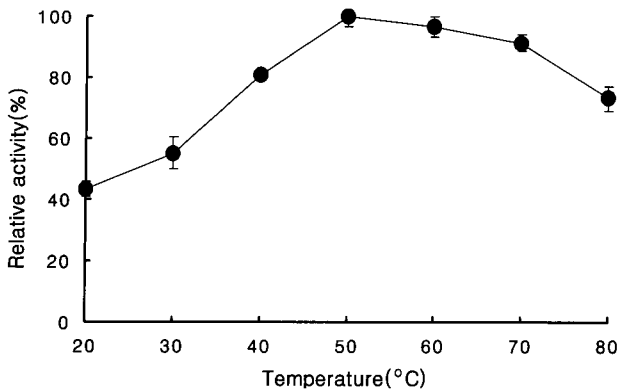


Fig. 6. Optimum temperature of the keratinase from *Bacillus licheniformis* 109.

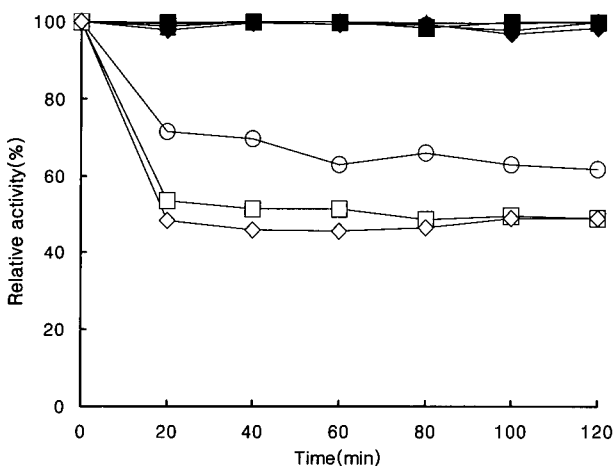


Fig. 7. Heat stability of the keratinase from *Bacillus licheniformis* 109. After incubation of enzyme solution at 20°C (◆), 30°C (■), 40°C (●), 50°C (▲), 60°C (○), 70°C (□) and 80°C (◇) for indicated time, the remaining activity was measured.

치지 않았고 60°C에서는 약 30~40% 정도 활성이 감소하였으며 70°C와 80°C에서는 약 50%의 활성이 감소하였다.

3) 금속이온의 영향

정제한 keratinase는 Table 3에서 보는 바와 같이 금속 이온을 농도별로 첨가한 후 50°C에서 1시간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, ZnCl₂는 1mM과 10mM, CuCl₂의 10mM에서 약 50%의 저해를 나타냈으며 MnCl₂는 10mM에서 약 30%의 저해를 나타내었다. FeSO₄의 효소활성은 1mM과 10mM에서 각각 11%와 33%가 증가하였다. 따라서 FeSO₄는 효소 활성 증가에 영향을 미치는 것으로 생각된다. Mukhopadhyay와 Chandra(1990)는 *Streptomyces*에서 keratinase를 정제하여 실험한 결과, FeSO₄은 효소 활성을 증가시켰고 MnCl₂는 효소 활성을 감소시켰다는 결과와는 유사하였

Table 3. Effect of metal ions on keratinase activity from *Bacillus licheniformis* Strain 109

| Metal | Relative activity(%) | |
|-------------------|-----------------------|----------|
| | 1mM | 10mM |
| None | 100±0.5 ¹⁾ | 100±1.06 |
| CaCl ₂ | 104±2.7 | 92±2.1 |
| CuCl ₂ | 79±3.3 | 51±1.4 |
| FeSO ₄ | 111±4.6 | 133±3.79 |
| MgSO ₄ | 104±1.4 | 103±0.89 |
| MnCl ₂ | 97±0.6 | 70±1.33 |
| ZnCl ₂ | 53±2.7 | 42±0.56 |

¹⁾ The values are mean ± S.D. of 3 replications

Table 4. Effect of protease inhibitors on keratinase activity from *Bacillus licheniformis* Strain 109

| Inhibitor | Residual activity(%) | |
|-----------|-----------------------|---------|
| | 1mM | 10mM |
| None | 100±0.7 ¹⁾ | 100±0.5 |
| EDTA | 102±1.3 | 109±2.1 |
| PMSF | 73±0.9 | 46±0.5 |
| TPCK | 102±2.1 | 94±0.6 |
| TLCK | 114±1.5 | 105±1.4 |
| DTT | 126±2.3 | 140±4.3 |

¹⁾ The values are mean ± S.D. of 3 replications

으나, ZnCl₂가 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다고 보고한 내용과는 차이가 있었다.

4) 저해제의 영향

Keratinase 저해 실험에는 metal-protease을 저해하는 EDTA, serine-protease을 저해하는 PMSF, trypsin과 같은 proteolytic activity을 저해하는 TLCK, chymotrypsin을 저해하는 TPCK 그리고 thiol protease을 저해하는 DTT를 이용하여 실험하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 PMSF는 1mM일 경우 28%를 저해하였고, 10mM일 경우 약 50% 이상을 저해하는 것으로 나타났다. PMSF를 제외한 나머지 저해제는 keratinase 활성에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. *B. licheniformis* 109로부터 정제한 keratinase와 Mukhopadhyay (1990)가 *Streptomyces*에서 정제하여 보고한 keratinase와 비교했을 때 PMSF는 약 60% 정도 저해되어 이들 연구결과와 유사하였지만 EDTA가 효소 활성을 완전히 저해했다는 내용과는 전혀 다르게 나타났다. 따라서 *B. licheniformis* 109에서 분비한 keratinase와 *Streptomyces*에서 분비한 keratinase는 차이가 있음을 알 수 있었고, *B. licheniformis* 109에서 정제한 keratinase는 PMSF에 의해 저해되었

기 때문에 serine-protease로 보인다.

요약

본 연구는 토양으로부터 egg shell membrane(ESM)을 분해하는 미생물 strain 109를 분리·동정하였으며, 분리균이 생성한 keratinase를 정제하고 그 특성을 확인하였다.

Strain 109는 16S rDNA 결과 99.9%의 상동성을 가지고 *Bacillus licheniformis*로 확인되었고, 3% ESM을 함유한 Nitrobacter 203배지에서 *B. licheniformis* 109를 접종하여 1주일간 배양하였을 때 ESM의 분해율은 약 15%였다. *B. licheniformis* 109가 생성한 keratinase를 정제하여 SDS-PAGE로 분자량을 측정된 결과 약 65,000 Dalton이었으며 0.1% gelatin이 함유된 SDS-PAGE에 의해 효소 활성을 확인할 수 있었다. 정제한 keratinase의 pH에 따른 활성과 안정성은 pH 9.0에서 활성이 가장 높았으며 pH 9.0이상에서 안정하였다. 또한, 50℃에서 효소활성이 가장 높았으며 온도 안정성은 20℃에서 50℃까지 안정하였고, 70℃ 이상에서는 약 50%의 활성을 상실하였다. keratinase 활성에 금속 이온이 미치는 영향은 CuCl_2 와 ZnCl_2 에 의해 약 50% 정도가 저해되었으나 FeSO_4 에 의해서는 1mM일 때 약 11%, 10mM일 때 약 33%가 증가하였다. 그리고 PMSF에 의해 효소활성이 저해되는 것으로 나타나 *B. licheniformis* 109로부터 정제한 keratinase는 serine-protease로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다(KRF-99-005-G00004).

참고문헌

- Arias, J. L., Fernandez, M. S., Dennis, J. E., and Caplan, A. I. (1991) Collagens of the chicken egg shell membrane. *Connect. Tissue Res.*, **26**, 37-43.
- Bockle, B., Galunsky, B. and Muller, R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3705-3710.
- Cheng, S. W., Hu, H. M., Shen, S. W., Hiroshi takagi, Mino Asano, and Tsai, Y.C. (1995) Production and Characterization of Keratinase of a Feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**(12), 2239-2243.
- Felsenstein, J. P. (1993) Phylogenetic Inference Package, version 3.5. Seattle: University of Washington.
- Friedrich, A.B. and Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2875-2882.
- Gradišar, H., Kern, S. and Friedrich, J. (2000) Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 196-200.
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P. (1999) Isolation and partial Characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic *Actinomycete* strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol.*, **45**, 217-222.
- Kaluzewska, M., Wawrzekiewicz, K. and Lobarzewski, J. (1991) Microscopic Examination of keratin substrates subjected to the action of the enzymes of *Streptomyces fradiae*. *Int. Biodeterior.*, **27**, 11-26.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leach, R. M., Rucker, R. B. and Dyke, G. P. V. (1981) Egg shell membrane protein: A non elastin desmosine/iso-desmosine containing protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **207**, 353-359.
- Xiang, L., Lee C. G., Casale, E. S. and Shih J, C, H. (1992) Purification and characterisation of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3271-3275.
- Mukhopadhyay, R. P. and Chandra, A. L. (1990) keratinase of *Streptomyces*. *Indian J. Exp. Bio.*, **28**, 575-577.
- Nickerson, W. J., Noval, J. J. and Robinson, R. S. (1963) Keratinase. I. Properties of the enzyme conjugate elaborated by *Streptomyces fradeae*. *Biochim Biophys Acta*, **77**, 73-86.
- Okubo, T., Akachi, S. and Hatta, H. (1997) Structure of Hen eggs and physiology of egg laying. *Hen eggs*, 1-12.
- Qin, L, M., Dekio, S. and Jidoi, J. (1992) Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. *Zentralbl. Bakteriol.*, **277**, 236-244.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Tsuboi, R., Ko, I. J., Takamori, K. and Ogawa, H. (1989) Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect. Immun.*, **57**, 3479-3483.
- Ute, S. and Bohm, K. H. (1995) comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. *Mycoses.*, **38**, 205-209.
- Vignardet, C, Guillaume, Y. C., Friedrich, J. and Millet, J. (1999) A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrate. *Int. J. Pharm.*, **191**, 95-102.
- Williams, C. M. and Shih, J. C. H. (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., Richter, C. S., Mackenzie Jr., J. M. and Shih, J. C. H. (1990) Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1509-1515.

22. Yoon, J. H., Kim, H., Kim, S. B., Kim, H. J., Kim, W. Y. and Lee, S. T., Goodfellow, M. and Park, Y. H. (1996) Identification of *Saccharomonospora* strains by the use of genomic DNA fragments and rRNA gene probes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 502-505.
23. Yoon, J. H., Lee, S. T., Kim, S. B., Kim, W. Y., Goodfellow, M. and Park, Y. H. (1997) Restriction fragment length polymorphisms analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 111-114.
24. Yu, R. J., Harmon, S. R. and Blank, F. (1968) Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.*, **96**, 1435-1436.
-

(Accepted August 19, 2002)