

단백질분해효소의 분리정제 및 Skin turn-over에 대한 영향

강현옥, 정민석, 최종완
(한국화장품 기술개발연구소)

The purification of Protease and its effect of skin turn-over

Hyun-ok kang, Min-seok Juong, Jong-oan Choi
(Han-Kook Cosmetics co., Ltd., R&D Center)

요 약

단백질 또는 peptide bond를 가수분해하는 protease는 현재 산업의 각 분야에서 널리 응용되고 있으며, 사용범위가 점차 확산되고 있는 추세이다. 따라서 본 실험에서는 미생물이 생산하는 단백질분해효소를 분리 정제하여 그의 성질을 규명 및 skin turn-over효과를 조사하였다.

I. 서 론

일반적으로 Protease는 동물, 식물, 미생물 기원성으로 세별되며, 특히 이들은 단백질에 작용하는 Protease를 proteinase로 명명하였고, oligopeptide에 작용하는 protease를 peptidase라 명명하였다(1). 또한, 1936년 Bergman과 Ross등에 의해 엄밀한 용어의 구분 없이 일반적인 " peptide bond hydrolase "로 exopeptidase와 endopeptidase로 구분되어(2) 현재까지 이르고 있다. 그리고, Hartley의 기질특이성과 기질촉매 기작의 차이에 의하여 분류하면 serine protease, thiol protease, metal protease, none-metal protease등으로 구분되며 또한 작용 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 protease로 나누기도 하며 이들 이외에도 각기 특이한 기질에 따라서 collagenase, elastase, keratinase, gelatinase (3)로 세분하고 있다.

이러한 각종 protease의 용도는 식품공업, 화학공업, 피혁가공 및 제지공업, 세제, 농수산물 가공, 맥주나 청주의 혼탁방지, 식육의 연화, 소화제등의 약품공업, 화장품제조, 환경정화등 그 이용범위가 확장되고 있는 추세이다(4-7).

상업적으로 생산되기 위한 조건으로는 알칼리에 내성이 있으며, 내열성, detergent에 내성을 가지며 allergic reaction이 없어야 하며, 무엇보다도 값싼 기질로부터 높은 수율을 얻을 수 있어야 한다(8,9).

본 실험은 미생물이 생산하는 단백질 분해효소의 일반적인 성질을 조사함과 동시에 화장품 원료로 사용되고 있는 AHA, Vitamin A Palmitate와의 Skin turn-over 효과를 비교 조사하였으며 향후 단백 분해 효소가 화장품에 이용될 가능성을 검토하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 균주 분리

단백질 분해효소를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 Table 1과 같은 분리용 배지를 이용하였고 효소 생산배지는 Table 2와 같았다.

2) 균주동정

선별된 균주의 형태학적 및 생리학적 실험결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology(10)에 따라 분류동정하였다.

3) Tanning Cream의 조제

DHA(Dihydroxy acetone)와 Mahakanni extract를 전체 volume의 각각 5%가 되도록 Glyceryl Polymethacrylate and Propylene Glycol에 혼합하고 pH 5가 되도록 조정하였다.

4) 시료의 조제

분리정제한 Protease는 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 0.05%, 0.1%, 0.5%가 되도록 각각 희석하고, Vitamin A Palmitate(vitamin A content : 1.0×10^6 I.U./gr. USP)를 1.0%, 5.0% 10.0%가 되도록 각각 Cyclomethicone에 녹였다. 또한 AHA는 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 1.0%, 5.0%, 10.0%가 되도록 각각 녹여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 조효소 용액의 조제

효소를 생산하기 위하여 전배양액을 효소 생산용 배지에 5%(v/v)되게 접종하여 37°C에서 72시간 진탕배양하고 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

2) 효소 활성 측정

단백질 분해효소의 역가는 Takami등(11)의 방법을 약간 변형하여 측정하였으며, 그 실험 방법은 Fig. 1과 같고 효소의 활성은 37°C에서 분당 기질로부터 $1\mu\text{g}$ 의 tyrosine을 생성하는 효소활성을 1unit로 정하였다.

3) 효소의 농축

조효소액을 ammonium sulfate로 35-80%되게 분별침전 시키고 원심분리하여 회수한 후 침전물을 소량의 50mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹여서 4°C에서 투석하여 실험에 이용하였다.

4) Skin turn-over test

Skin turn-over test를 하기 위한 전처리로 tanning을 할 때 사용되는 DHA는 일반적으로 pH 4~6에서 안정하기 때문에(12,13,14) 본 실험에서는 tanning cream의 pH에 따라 tanning에 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위하여 원료별 pH 5~9까지 조제하여 실험하였다.

Tanning cream을 발라주기 전에 처리구 부위를 spectrophotometer(Minolta type CM-1000)를 이용하여 피부색을 미리 측정하였다. 그 다음에 직경 2 cm의 크기로 tanning cream을 6시간 동안 3회, 각각 300 μ l씩 분주하여 골고루 발라주었으며 tanning이 된 다음날부터 매일 처리구 부위를 측정하였다. Sample 적용시는 한팔에 test solution을 하루에 2회 씩 각각 100 μ l씩 분주하여 골고루 발라주고 측정하였다. 측정된 skin turn-over는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Skin turn-over(\%)} = \frac{rT_0 - rT_n}{rT_0 - ms} \times 100$$

rT_0 : Tanning cream처리 후의 skin coloration

rT_n : Sample 처리 후 n일이 경과한 날의 skin coloration

ms : Tanning cream을 처리하지 않은 곳의 skin coloration

III. 결 과

1. 효소 활성의 확인

5% skim milk powder와 agar를 혼합한 배지에 구멍을 내어 protease 용액을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치후 효소의 활성을 Clear zone으로 확인하였다(Fig. 2).

2. 분리균주의 동정

분리균주의 형태학 및 생리학적 특성을 검토한 결과 Bacillus pumilus HK로 확인되었고, 전자현미경 사진은 Fig. 3과 같다.

3. 효소의 농축

Ammonium sulfate로 농축한 결과는 Table 3과 같이 수율은 70.5%였고 효소의 활성은 약 1.45배가 증가되었다.

4. 효소의 일반적 성질

4-1. 효소의 최적 pH

단백질 분해 효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 pH 4.0 에서 pH 13.0까지 50 mM농도의 각 buffer로 37℃에서 30분간 반응시켜 그 활성도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같이 pH 8.5에서 최적이었다

4-2. 효소의 pH 안정성

단백질 분해 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.0에서 pH 13.0 까지 농도 50mM의 각 buffer에 3시간 처리시킨 후 잔존 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같이 본 효소는 pH 6.0-11.0까지 비교적 안정하였다.

4-3. 최적 활성 온도

단백질 분해 효소의 최적 반응 온도를 조사하기 위하여 pH 8.5에서 온도를 30℃ 부터 90℃까지 변화시켜 30분간 반응 후 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같은 결과를 보였다.

4-4. 열 안정성 및 calcium ion에 대한 영향

단백질 분해효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 5mM CaCl₂첨가, 또는 무첨가 하여 30℃에서 90℃까지 각각의 온도에서 30분간 열처리 후 그 잔존 활성을 37℃에서 측정한 결과는 Fig. 7과 같았다.

4-5. 금속 이온의 영향

본 효소의 활성에 미치는 금속 이온의 영향을 조사하기 위하여 금속이온을 최종 농도가 1mM과 5mM이 되게 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 잔존활성을 조사한 결과는 Table 4와 같았다.

4-6. 효소 활성에 미치는 계면활성제의 영향

계면활성제가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 계면활성제와

함께 37℃에서 30분간 반응시킨 후 단백질 분해효소의 잔존 활성을 조사한 결과는 Table 5와 같았다.

4-7. 저해제의 영향

각종 저해제가 효소 활성도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 저해제를 최소농도가 1mM, 5mM이 되도록 효소액에 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 그 잔존활성을 측정한 결과는 Table 6과 같았다.

5. Skin turn-over test

5-1. pH에 따른 tanning effect

Skin self-tanning test에 사용되는 tanning cream의 최적 pH를 알아보기 위한 실험의 결과는 Fig. 8과 같다. 그리고 실험결과는 tanning하기 전의 skin coloration에서 tanning후의 skin coloration을 뺀 값의 평균값이다.

5-2. Tanning cream의 처리 회수에 따른 skin turn-over의 영향

Tanning cream의 처리 회수에 따라서 tanning 및 skin turn-over에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 3개의 처리구에 각각 1회, 2회, 3회씩 tanning 처리한 실험 결과는 Fig. 9와 같다.

5-3. Sample 적용시 skin turn-over의 영향

실험에서 분리정제한 Protease가 skin turn-over에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 5-1의 결과를 토대로 DHA와 Mahakanni extract를 전체 volume의 각각 5%가 되도록 혼합하여 tanning한 후 이튿날부터 Protease, AHA, Vitamin A Palmitate를 처리하였고, 그 결과는 Fig. 10과 같다.

IV. 결 론

-. 본 효소활성의 최적 pH는 8.5이었고, pH 6에서 pH 11사이의 넓은 pH 안정성을

보였다.

- 본 효소는 65℃까지 온도 안정성이 있었으며, 특히 CaCl₂를 첨가하였을 시 온도 안정성이 향상되었다.
- 본 효소는 Mn⁺², Ca⁺², Zn⁺² 등의 금속이온에 의하여 활성이 촉진되었고 Ag⁺², Hg⁺²에 의하여 강력히 저해를 받았다.
- PMSF에 의하여 강력히 저해를 받은 것으로 보아 활성부위에 serine기가 존재하는 것으로 사료된다.
- 각종 계면활성제에 대하여 대체로 안정성이 있는 것으로 보아 화장품 및 세정제등에 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.
- Tanning 효과가 가장 좋은 것은 pH 5이며, 5% DHA와 5% Mahakanni extract가 혼합되었을 때(pH 5)이었다.
- Skin turn-over 측면에서는 Protease가 AHA, Vitamin A Palmitate보다 효과가 있었다.

참 고 문 헌

1. Grassman, W. and Dycherhoff, H. "Uber die proteinase und die polypeptidase der hefe", *Z. Physiol. Chem.*, **1928**, *179*, 41-78.
2. Bergmann, M. and W. F. Ross. "On proteolytic enzyme X. The enzyme of papain and their activation", *J. Biol. Chem.*, **1936**, *114*, 717-726.
3. Hartley, B. S. "Proteolytic enzymes", *Annu. Rev. Biochem.*, **1960**, *29*, 45-72.
4. Crueger, W. "Biotechnology", *Science Tech. Inc. U.S.A.*, **1982**, 161-175.
5. Tobe, S., Takami, T. Hirose, Y. and Mitsugi. "Purification and some properties of alkaline proteinase from *Bacillus. sp.*", *Agric. Biol. Chem.*, **1975**, *39*, 1749-1755.

6. Zamost, B. L. and Nielsen, H. K. "Industrial utilization of thermostable enzymes", *J. Ind. Microbiol.*, **1991**, 8, 75-82.
7. 鶴 大典, 村尾澤夫, 芳本 忠, 高木 博史, 小卷 利章. "Bacillus屬 細菌か 生産する 蛋白質加水分解酵素における最近の話題", *Nipp. Nogei. Kai.*, **1991**, 65, 49-70.
8. 생명공학 연구소 기술정보실, "효소에 관한 연구 및 시장동향과 특허추세 분석", **1995**, 12-25.
9. Horikoshi, K., and Akiba T. In " Alkalophilic Microorganisms " *Japan Scientific Societies Press, Tokyo*, 1982
10. Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, **1986**, vol. II, 1104-1139
11. Takami, H. and Akiba, T., Horikoshi, K. "Production of extremely thermostable alkaline protease from Bacillus sp. no. AH-101", *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, **1989**, 30, 120-124.
12. Stanley B. Levy. "dihydroxyacetone-containing sunless or self-tanning lotions", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1992**, 27, 989-993.
13. Goldman L, Barkoff J, Blaney D, et al., "Investigative studies with the skin coloring agents dihydroxyacetone and glyoxal", *J. Invest. Dermatol.*, **1960**, 35, 161-164.
14. Goldman L, Barkoff J, Blaney D, et al., "The skin coloring agent dihydroxyacetone", *GP* **1960**, 12, 96-98.

Table 1. The composition of isolation media

Skim milk	10 g
Peptone	1 g
Yeast extract	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
Agar	15 g
Distilled water	1 L
pH	7.5

Table 2. The composition of enzyme production media

Soluble starch	1.0%
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.15%
Soybean meal	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.3%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02%
NaCl	0.1%
pH	7.5

Table 3. Purification steps of the protease.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield(%)
Crude broth	3,196,912	8,756	365	100.0
Ammonium sulfate precipitation (35-80%)	2,253,823	4,257	529	70.5

Table 4. The effect of metal ion on protease activity

Metal	Relative activity(%)	
	1mM	5mM
None	100.0	100.0
Al ₂ O ₃	82.9	87.0
AgSO ₄	70.4	33.8
BaCl ₂	71.6	69.3
CaCl ₂ . 2H ₂ O	114.8	155.7
CdSO ₄	69.6	61.8
CoCl ₂ 6H ₂ O	72.8	77.8
CuCl ₂ 2H ₂ O	80.0	85.1
FeSO ₄ . 7H ₂ O	76.5	78.8
HgCl ₂	47.1	28.6
KCl	84.2	92.8
LiCl	84.9	96.3
MgSO ₄ . 7H ₂ O	100.8	105.8
MnCl ₂ 4H ₂ O	116.6	146.4
NaCl	91.3	107.2
ZnCl ₂	87.4	135.2

Table 5. The effect of surfactants on protease activity

Surfactant	Relative activity(%)	
	0.5%	1.0%
None	100.0	100.0
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	88.5	80.5
LAS (Linear alkylbenzene sulfonate)	89.3	87.1
Triton X-100	114.0	121.4
Tween 80	106.0	144.7
60	103.6	114.0
40	101.8	115.6
20	92.3	110.3
Span #80	100.5	82.3
*시판 세제	90.2	78.6

The enzyme was incubated with the surfactant for 30 min at 37°C and residual activity was measured.

* : without protease activity

Table 6. The effect of inhibitor on the protease activity

Inhibitor	Residual activity(%)	
	1mM	5mM
None	100.0	100.0
EDTA	98.7	89.4
EGTA	73.8	65.4
SDS	90.0	84.8
<i>o</i> -phenanthroline	85.4	74.2
KCN	101.8	92.3
<i>L</i> -cysteine	100.7	95.8
PMSF	2.3	0.0
Iodoacetic acid	98.0	89.3
<i>p</i> CMB	101.0	92.9
NaN ₃	98.6	90.5
Oxalic acid	78.0	4.1
KMnO ₄	19.7	8.9

The enzyme was incubated with the inhibitor at 37°C for 30 min and residual activity was measured.

EDTA ; Ethylene diamine tetraacetic acid, EGTA ; Ethyleneglycol tetraacetic acid, PMSF ; Phenylmethyl sulfonyl fluoride, *p*CMB ; *p*-chloromecuric benzoic acid.

* *Substrate* : Commercial Hammarsten casein(MERCK) was dissolved as a 0.6%(w/v) solution in 50mM phosphate buffer(pH 7.5)

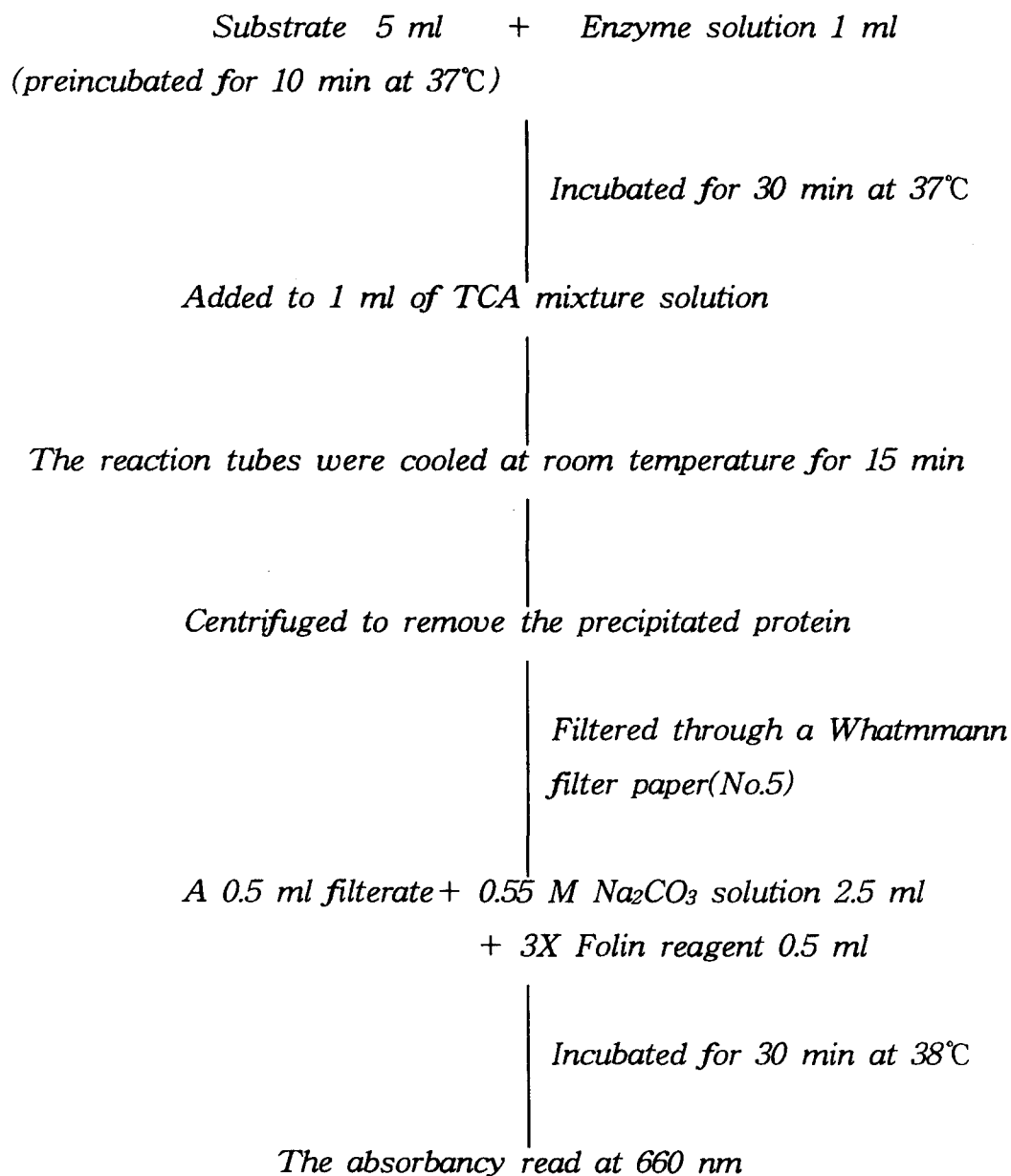


Fig. 1. Procedure of protease activity assay

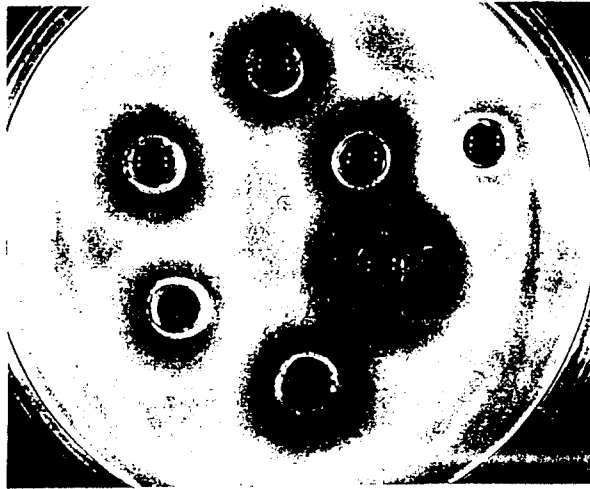


Fig 2. Formation of clearing zone in the screening media contained 5% skim milk powder

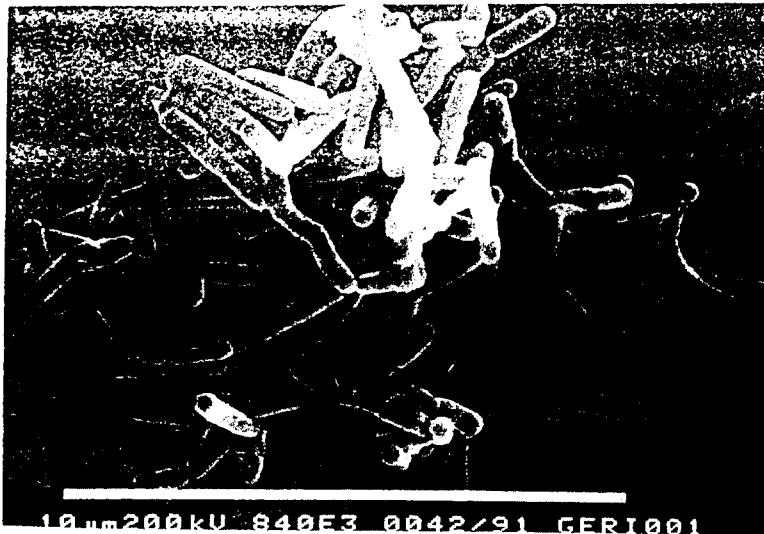


Fig. 3. Electron microscopic photograph of the isolated *Bacillus pumilus* HK

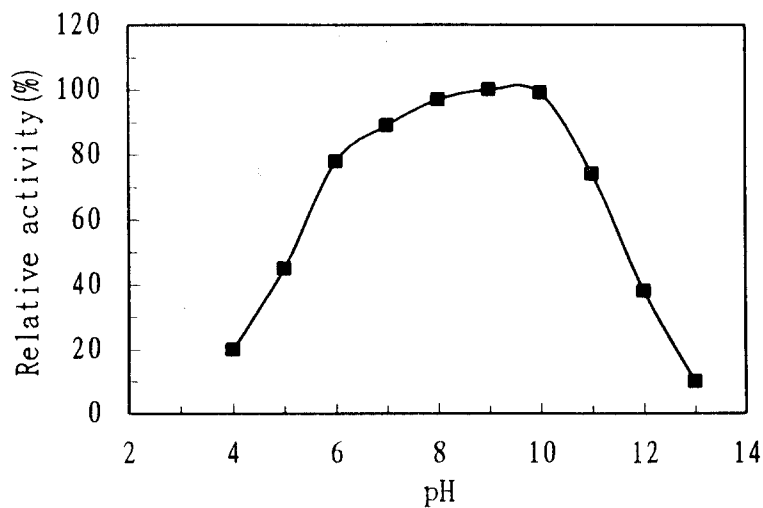


Fig. 4. The effect of pH on the activity of protease.

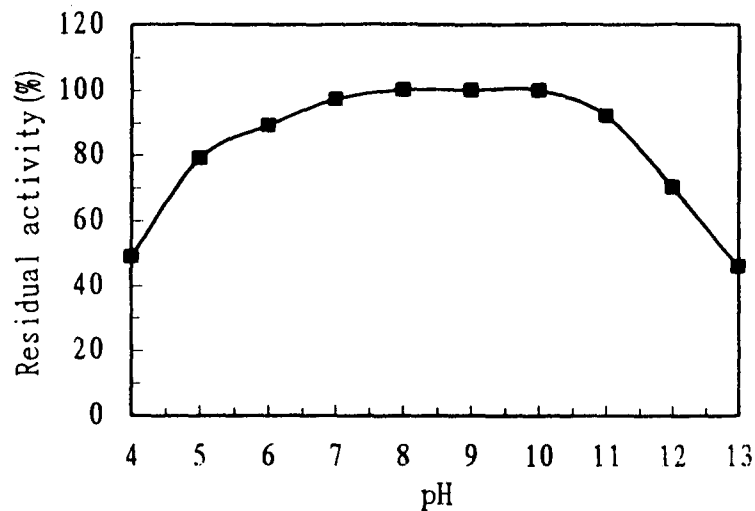


Fig. 5. The effect of pH on the stability of protease.

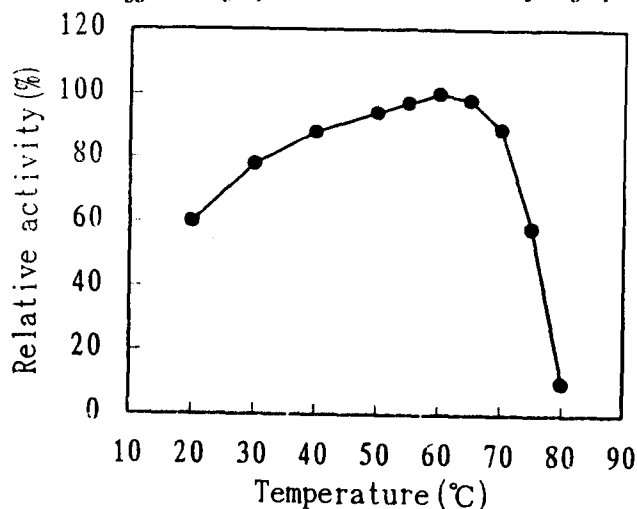


Fig. 6. The effect of temperature on protease activity.
(The reaction carried out at the temperature indicated for 30min at pH 7.5)

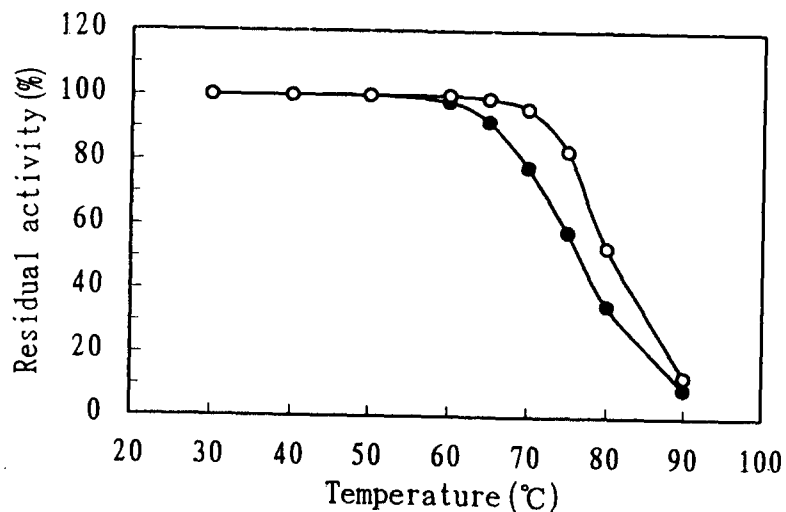


Fig. 7. The effect of temperature on the stability of protease.
The enzyme was incubated at the temperatures indicated for 30min and residual activities were measured.

○ : present 5mM CaCl₂, ● : absence 5mM CaCl₂

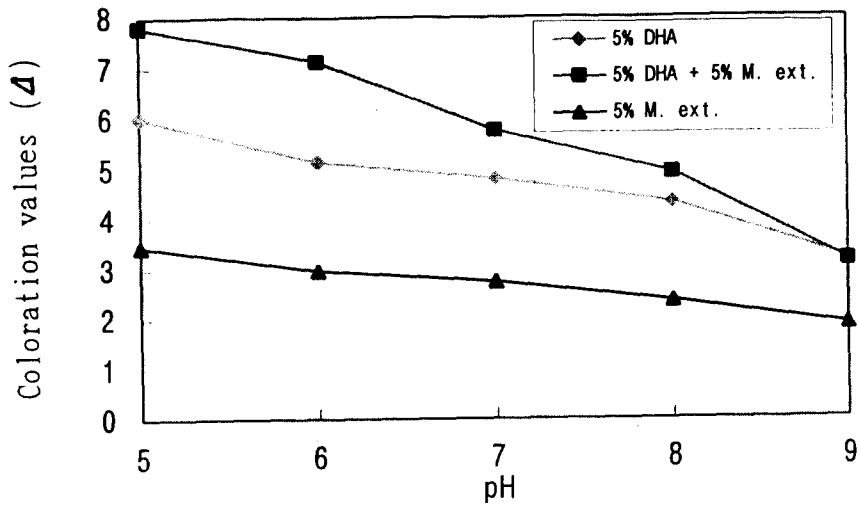


Fig. 8. The Tanning effect at pH

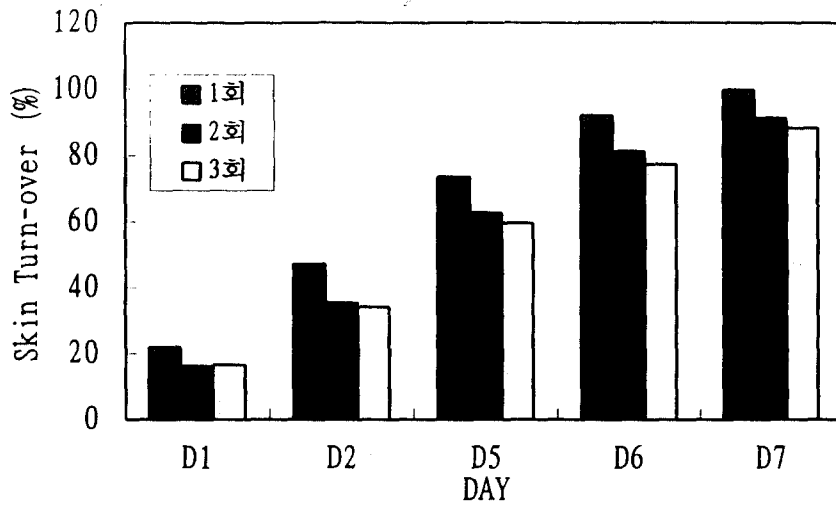


Fig. 9. The effect of skin turn-over by treatment times

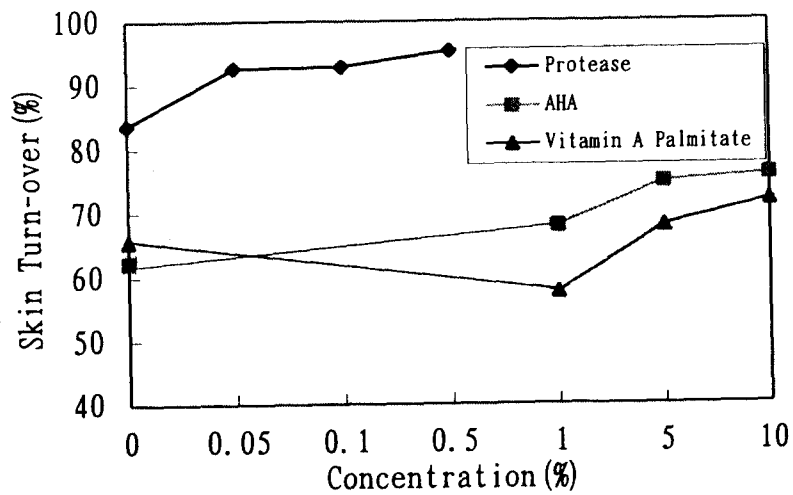


Fig. 10. The effect of skin turn-over in various materials