Bacillus sp. KN-517에 의한 keratinase의 생산 최적 조건과 모발분해에 적용

김혜숙[1] · 심규남[2] · 강상모[1,2]*

[1]건국대학교 생물공학과, [2]건국대학교 미생물공학과

Optimum Conditions for the Production of Keratinase by *Bacillus* sp. KN-517 and Application to the Degradation of Hair

Kim Hye Sook[1], Kyu Nam Shim[2], and Sang-Mo Kang[1,2]*

[1]Department of Bioengineering at the Postgraduate School, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
[2]Department of Microbiological Engineering, Konkuk University 143-701, Seoul, Korea

Abstract A microbial strain having high keratinase activity was isolated from the soil of poultry factories of Gyeonggi or Chungcheong-do. The isolated strain was identified as *Bacillus* sp. based on its morphological and biochemical characteristics. In this study, the optimal conditions for the production of keratinase by this strain were investigated. The optimal medium composition for the keratinase production was determined to be 3.5% chicken feather as carbon source, 1.0% tryptone as organic nitrogen source, 1.0% KNO_3 as inorganic nitrogen source and 0.05% KCl, 0.05% KH_2PO_4, 0.03% K_2HPO_4 as mineral source and 0.01% yeast extract as growth factor. The optimal temperature and pH was 40℃ and 8.5 with shaking culture (200 rpm), respectively. The maximum keratinase production reached to 123 units/ml after 42 hr of cultivation under the optimal condition. When the hair was used as the sole carbon source, the maximum enzyme activity was 88 units/ml after 120 hr and in this case, the hair added in the medium was not degraded completely but got thinner than the control by 20%.

Keywords: Karatinase, *Bacillus* sp, Production optimization, hair

서 론

Keratin은 불용성의 단백질로 사람의 머리카락과 손톱 및 조류의 feather를 구성하는 대표적인 물질이다. 이러한 keratin은 물리적, 화학적으로 강하여 보통의 단백질과는 달리 부패되지 않고 여러 가지 화학약품에 대하여 저항력이 있으며 물리적 강도 또한 높다. Keratin의 물리 화학적 안정성은 keratin의 구조적인 특이성에서 기인한다. Keratin은 cysteine 함량에 따라서 soft keratin과 hard keratin으로 구분되며, soft keratin은 cysteine 함량이 약 10%이하이며 피부 등의 keratin이 여기에 포함되며, hard keratin은 cysteine이 약 10～14%로 disulfide 결합이 많은 머리카락, 손발톱, 뿔, 발굽, 양털, 깃털 등이 이에 속한다 [1]. Keratin은 구조적으로 polypeptide chain이 supercoiled된 상태에서 α-helix (α-keratin)나 β-sheet (β-keratin)의 구조로 단백질 사슬이 매우 단단하게 쌓여있으며, polypeptide chain사이에 수많은 disulfide 결합과 수소결합 및 소수성결합 등이 존재하기 때문에 매우 안정하며 [2], 단백질 분해 효소에 대한 저항성이 매우 크다 [3]. Chicken feather를 분해하는 미생물이 생산하는 특이적인 protease를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하는데, 이 효소들은 매우 compact한 기질을 분해한다는 측면에서 다른 protease 또는 peptidase와 구별되어 진다 [4]. 그리고 유도효소인 keratinases를 생산 시 대부분 탄소원으로 chicken feather를 사용한다 [5].

***Corresponding author**
Tel: +82-2-450-3524, Fax: +82-2-3437-8360
e-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

가금류의 feather는 생물학적으로 난 분해성 단백질인 keratin으로 구성되어 있다 [6]. 가금류 도축과정의 부산물로 발생되는 가금류 폐기물은 국내의 고압, 가열처리하여 건조, 분쇄한 후 우모분 사료로 사용되고 있다. 그러나 공정상 에너지의 소모가 많고 처리 과정에서 필수 아미노산의 손실을 야기하며 사료로 사용 시 동물의 소화관 내에서 낮은 소화율을 나타내는 단점이 있다 [7,8]. 이러한 단점을 극복하기 위하여 미생물이 생산하는 keratinase를 산업적으로 이용하고자 하는 많은 노력들이 시도되고 있다 [9,10].

모발은 모표피, 모피질, 모수질의 3층으로 구성되어 있고 대부분 (80~90%)이 keratin으로 되어 있으며 나머지는 지질, 수분, melanin색소, 미량원소 (trace elements)로 이루어져 있고 [9,4,10], 14~18%의 cystine 아미노산을 함유하고 있는데 cystine의 이황화 결합은 모발에 유연성을 부여한다. 모표피는 약 5~10개의 cuticle cell로 구성되어 있으며 모발의 장축에 따라 납작하게 뻗어 있다. Cuticle cell은 외측으로부터 epicuticle, exocuticle, endocuticle으로 되어 있고, 큐티클 층의 기능은 피질을 둘러싸서 물리적 자극으로부터 모피질의 손상을 방지하는 역할을 하고, 손상되지 않은 큐티클 표면은 빛을 굴절시키고 모발의 마찰력을 줄여준다 [11]. Epicuticle는 큐티클세포의 세포막으로서 모발에 윤기를 갖게 해준다. Epicuticle와 exocuticle은 cysteine 성분이 많이 존재하고 있고 높은 교차결합으로 물리적으로 강한 부위이다 [12]. Endocuticle은 모표피의 가장 안쪽에 위치하고 있는 부분으로 양면 접착테이프와 같은 세포막복합체 (cell memberance complex, CMC)로 한쪽은 인접한 모피질을 밀착시키고 다른 한쪽은 외표피의 틈과 중첩되어 있다 [13]. 모피질 (cortex)은 모발에서 가장 중요한 부분으로 모발의 약 85~90%를 차지하고 있으며 모발섬유 방향과 평행한 원통형의 macrofibril이 다수 모여 모피질 세포를 이룬 결정영역과 세포 간 결합물질인 비 결정영역으로 구성되어 있다 [14]. 모발 시술 시 환원제와 염모제와 같은 화학약품은 세포막복합체의 틈으로 침투하게 되어 모발의 단백질 구조를 변화시키는데 이로 인해 모발은 윤기가 없고, 내부의 수분과 간충 물질의 유출로 인해 건조하고 푸석푸석하며, 탄력성이 떨어진다 [15]. 그런 상태에서 반복 화학적 시술을 할 경우 손상은 더욱 가속화되어 퍼머넌트 시술 시 컬의 탄력성이 떨어지고 염색 시 색상의 유지력이 짧으며 염착력이 저하된다. 또한 환경오염에서 오는 공해와 스타일링 제품 속 화학약품의 잔류는 모발을 오염시켜 큐티클을 들뜨게 하고 윤기를 상실시키며 질감을 거칠게 하는 문제를 발생시킨다 [16]. 또한 정상모발이라 할지라도 오구가 붙어있으면 매끄럽지 못하다. 이러한 모발의 문제점을 해결하기 위하여 keratinase를 모발에 처리하면 오구가 제거되며, 이때 모피질까지는 손상시키지 않으면서 모발 표피부분을 부분 분해함으로 퍼머넌트 시술의 효율을 높이는 것을 예비실험에서 확인하였다. 따라서 모발을 매끄럽게 하거나 퍼머넌트와 같은 모발 시술 전처리제로 keratinase를 사용하여 모표피를 부분 분해할 경우 모발의 손상을 줄이면서 원하는 퍼머넌트 시술을 효과적으로 수행할 수 있겠다.

본 연구에서는 whole chicken feather를 분해할 수 있는 높은 keratinolytic protease를 생산하는 균주를 screening 하고 keratinase의 생산을 최적화하고 모발의 개선효과 및 모발 화장품으로 응용 가능성을 보고자 모발과 배양 시 모발이 분해되는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

Chicken feather의 전처리

양계장에서 수집한 chicken feather에서 이물질들을 분리해낸 후, 증류수를 이용하여 10회 세척하였다. 세척한 chicken feather를 60℃ dry oven에서 완전 건조가 되도록 3일 동안 건조하고, 가위를 이용하여 약 5 mm의 길이로 절단하여 배지 성분 및 activity test를 위한 기질로서 사용하였다.

Keratin azure의 전처리

Keratin azure를 기질로 사용하기 위하여 다음과 같이 전처리하였다. Keratin azure를 1~2 mm로 절단한 후 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 급랭시킨 후 미세하게 분쇄하여 분말화하였다.

시험 균주의 분리 및 배양

Keratinase 생산균주를 분리하기 위하여 경기도 일대의 가금류 처리공장과 폐기물 처리장 부근의 토양에서 채취하여 균원 시료로 사용하였다. Keratinase 생산 균주는 5.0% skim milk, 1.7% agar (pH 7.0)로 하는 1차 선별 배지를 이용하여 균원시료 희석액을 도말하고 37℃에서 36시간 배양하여 clear zone이 큰 균주를 1차 분리하였다. 이들 균주 중에서 feather keratin에 대한 분해능이 우수한지 확인하기 위하여 분리된 각 균주를 0.5% chicken feather, 0.05% NH_4Cl, 0.05% NaCl, 0.03% K_2HPO_4 0.04% KH_2PO_4, 0.01% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01% yeast extract (pH 7.0)로 하는 2차 선별 배지에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 48시간 배양하였다. 배양 후 원심분리한 상층액을 37℃에서 keratin azure를 이용하여 keratinase 활성을 측정하였다. 여기에서 활성이 가장 우수한 균주를 분리하여 KN-517라 명명하였다. 최종 선별된 균주는 NB (Nutrient Broth) 100 mL을 300 ml Erlenmeyer flask에 넣어 배양 한 후 30% glycerol 현탁액과 1 : 1로 혼합하여 -70℃ deep freezer에서 보관하였다. 그리고 효소 생산 조건을 검토하기 위한 배양은 2차 선별 배지를 500 mL Erlenmeyer flask에 100 mL을 분주하여 121℃에서 20 min동안 가압 살균 한 후 2차 선별배지에서 활성화시킨 전 배양액 1 mL을 접종하여 37℃ 200 rpm에서 48시간 동안 진탕 배양하였다.

균체량의 측정

균체량의 측정은 직물을 이용하여 잔여 깃털을 제거한 후 8,000 rpm으로 15 min동안 원심분리하여 얻은 균체를 105℃에서 항량이 되도록 건조한 후 건조중량 (D.C.W. dry cell weight)을 측정하였다.

Chicken feather 분해균의 동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 Bergey' manual of systematic bacteriology를 기준으로 하여 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하였다 [17].

효소 활성 측정

Keratin azure를 이용한 Assay - 배양조건 검토를 위하여 효소의 활성은 Suntornsuk 등 [18],의 방법을 변형하여 조사하였다. 조효소액 (원심분리액) 1 mL을 keratin azure 현탁액 (0.01 M Tris-HCl buffer pH 7.5, 4 mg/mL) 1 mL에 첨가하여 water bath에서 37℃, 150 rpm으로 1시간 반응시킨 후 10분간 끓여서 반응을 정지시키고 8,000 rpm에서 원심분리하여 기질에서 유리된 발색단을 595 nm에서 측정하였다. 대조군은 조효소액과 keratin azure현탁액의 혼합액을 반응 전에 10분간 끓인 것으로 하였다. 그리고 효소의 units는 37℃에서 1분 동안 기질과 반응한 반응액의 흡광도를 0.01 증가시키는 효소량을 1 unit라고 하였다.

깃털을 이용한 Assay - 깃털을 이용한 효소활성의 측정은 Farag 등 [6]의 keratin을 이용한 효소활성 측정 방법을 변형하여 사용하였다. 조효소액 5 mL을 0.1 g의 절단된 깃털에 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 8,000 rpm으로 원심분리하여 잔여 깃털을 제거한 후 Lowry method [19]를 이용하여 770 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료 모발

본 연구에서 이용된 모발은 염색, 퍼머넌트, 탈색 등의 화학적 처리를 전혀 하지 않고, 특정한 질병이나 약물 복용, 흡연이나 다이어트 등을 실시한 적이 없는 건강한 20대 여성의 모발을 사용하였다. 시료 모발은 모근으로부터 약 10 cm 길이로 잘라 시료로 이용하였다.

모발의 굵기 측정

모발 시료를 24～25℃, 상대습도 50～55%의 환경에서 24시간 동안 실온에서 방치한 후 자연 건조하였다. 시료 당 20 가닥을 취하여 digital micrometer (Mitutoyo model no. IP 65)로 모발 굵기를 10회 반복 측정 후 그 평균값을 구하였으며 측정지점은 모근 부위 쪽으로부터 5 cm 지점으로 하였다. 모발 굵기의 오차를 최소화하고 실험의 신뢰성을 부여하기 위하여 같은 방법으로 10회 측정하여 SPSS program을 이용하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

사용 기기 및 시약

본 실험에 사용한 spectrophotometer는 Hitachi model 2000을 사용하였다. 본 실험에 사용한 시약은 Sigma 사의 keratin azure를 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급 내지 1급 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

본 실험에 사용한 분리된 KN-517 균주의 형태학적 특성 및 각종 배지를 이용한 배양상의 특성을 조사한 결과 본 균주는 Gram 양성의 호기성 간균이며 내생포자를 형성하며 운동성이 있고 catalase는 양성이고 oxidase는 음성이었다 (data not shown). Glucose를 이용하여 산을 형성하였으며 가스 발생은 음성이었다. Gelatin, casein, starch의 가수분해능이 있으며 indole 생성능에서는 음성이었다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 본 실험에 사용한 균주는 *Bacillus licheniformis*와 가장 가까운 특성을 보였으나 정확한 균종을 확인할 수 없었으며 *Bacillus* sp. KN-517로 명명하였다.

탄소원의 영향

동정한 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 chicken feather 0.5%를 첨가하고 탄소원을 배제한 2차 선별 배지에 각종 탄소원을 0.5% 되도록 첨가하여 37℃에서 48시간 진탕배양 (200 rpm)한 후 균체량과 효소활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 D-sorbose, dextrin, mannitol, sorbitol 등이 chicken feather만을 유일 에너지원으로 하였을 때와 거의 같은 효소활성을 나타내었다.

본 연구에서 glucose는 효소활성에 영향을 미쳐 효소활성이 41%로 나타났다. 이와 같은 결과는 Kim [20]의 1.0% glucose를 첨가 시 효소활성 및 균체생성을 촉진하였다는 결과와는 상이하였다. 또한 Bang 등 [21]의 결과와 비교하였을 때 D-sorbose, dextrin, mannitol, sorbitol에서 활성이 높게 나왔다는 결과와도 상의하였다. 그리고 Wang 등은 *B. licheniformis* PWD-1와 재조합 *B. subtilis* FDB-29에 의한 keratinase 생산은 탄수화물들에 의해 저해를 받는다고 하였다 [22]. 이렇게 keratinase 생산을 저해 하는 glucose와 달리 D-sorbose, dextrin, mannitol, sorbitol 등의 탄소원에서는 효소활성이 chicken feather만 0.5% 첨가 시와 거와 같게 나타난 것은 효소생산에 이들 탄소원들은 거의 영향을 미치지 않는다는 것이다. 이것은 아마도 이들 탄소원을 자화

하는 능력이 떨어져 나타난 결과로 보인다.

Table 1. Effect of C-source on the production of keratinase produced by *Bacillus* sp. KN-517

C-source[1)]	D.C.W. (g/L)[2)]	Final pH	Relative activity (%)
None	0.75	6.68	100
Xylose	0.34	4.81	69.34
Glucose	0.27	4.35	41.39
Galactose	0.37	6.52	69.76
D-Sorbose	0.84	6.09	100.31
Lactose	0.81	4.79	98.55
Sucrose	0.75	4.38	83.10
Maltose	0.86	4.67	96.14
Dextrin	0.88	4.98	102.02
Mannitol	0.93	4.29	103.09
Sorbitol	0.91	4.26	101.53
Soluble starch	0.45	4.68	66.01

1) All carbon sources were added to 0.5%.
2) Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h in the 2nd isolation medium.

Table 1에서 keratinase 효소활성에 특별히 도움이 되는 탄소원이 없어 chicken feather만을 유일 에너지원으로 다음 실험을 진행하였다. Fig. 1은 chicken feather 첨가에 따른 효소생산의 결과이다. Fig. 1에 의하면 chicken feather 3%, 3.5% 첨가에서 효소활성이 급격히 증가하였다. 배양액의 pH의 변화는 초기의 pH 7.0에서 최고 활성을 나타낸 3.5% chicken feather의 농도까지 꾸준히 증가하는 경향을 보였으며 최대 pH 7.8까지 증가하였다가 효소활성과 더불어 chicken feather 농도 4.0%에서는 다시 감소하는 경향을 보였다.

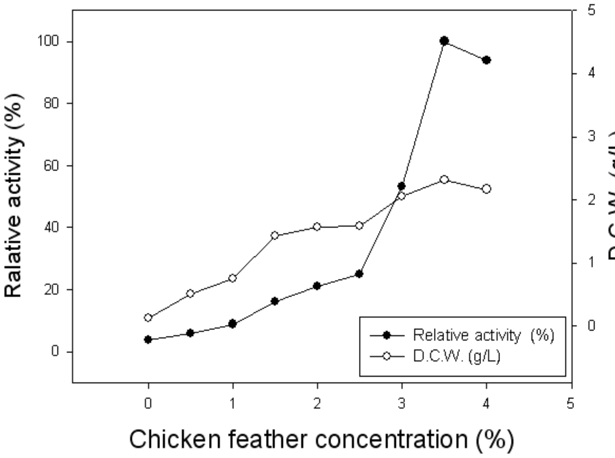


Fig. 1. Effect of feather concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h in each concentration of chicken feather using 2nd isolation medium with shaking culture (200 rpm/min).

Adigüzel 등 [23]은 *B. cereus*에 의한 keratinase 분비는 peptide가 배지에서 고갈되어야 분비된다고 하였다. 또한 Wang 등 [22]은 *Bacillus licheniformis* PWD-1과 재조합 *B. subtilis* FDB-29균주에서 keratinase는 단백질 배지에서만 유도된다고 하였다 [22]. 그리고 본 *Bacillus* sp. KN-517를 casamino acids 함유 배지에서 배양 시 효소활성은 45% 정도이며, glucose 함유배지에서 효소활성이 41%이었다 (Table 1). 이와 같이 casamino acids와 glucose 존재 하에서 chicken feather 배지에 비해 효소활성이 떨어지는 것으로 보아 본 *Bacillus* sp. KN-517 균주는 keratinase 유도 효소인 것으로 판단된다. 따라서 Fig. 1에서 chicken feather 3%부터 효소활성이 급격히 증가한 것은 keratinase 분비 유도에 적정 농도의 chicken feather가 있어야 급격히 유도되기 시작하는 것으로 생각되었다. 그리고 적정 농도 초과 시는 catabolite repression [24,25]와 같은 어떤 기작으로 chicken feather의 분해 산물 등에 의해 저해를 받는 것으로 생각되었다.

질소원의 영향

본 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 균체 증식과 효소활성에 영향을 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 유일 에너지원으로 chicken feather을 3.5% 첨가한 2차 선별배지에 각 질소원을 0.1%가 되도록 첨가하여 37℃에서 48시간 진탕 배양하여 균체량과 효소활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 유기질소원으로 tryptone을 첨가하였을 때 효소활성 및 균체 증식이 가장 우수하였으며 peptone을 첨가하였을 때에도 좋은 결과가 나타났다. 무기질소원으로는 KNO_3를 첨가하였을 때 효소활성과 균체 증식이 뛰어났으며 $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, NH_4NO_3를 사용하였을 때에는 chicken feather을 유일 에너지원으로 사용하였을 때보다 활성과 균체 증식이 낮게 나타났다 (Table 2).

Table 2. Effect of N-source on the production of keratinase produced by *Bacillus* sp. KN-517

N-source[1)]	D.C.W. (g/L)[2)]	Final pH	Relative activity (%)
None	0.48	7.02	100
Beef extract	0.41	6.35	79.15
Yeast extract	0.37	5.94	58.41
Tryptone	1.21	7.41	137.90
Peptone	1.06	7.31	116.05
$NH_4H_2PO_4$	0.23	5.48	10.44
$(NH_4)_2SO_4$	0.34	5.88	53.95
$NaNO_3$	0.47	6.15	82.83
NH_4NO_3	0.29	5.41	30.90
KNO_3	1.23	7.06	105.90

1) All nitrogen sources were added to 0.1%.
2) Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h using 2nd isolation medium containing 3.5% feather.

이는 Rosa [8]의 keratin을 유일한 질소원으로 사용하였다는 보고와는 상이하였다. Table 2에서 NH_4, NO_3 함유 무기태 질소원들에 비해 tryptone, peptone의 유기 질소원에서 효소활성이 우수한 것으로 나타난 것은 이들의 유기 질소 이용이 용이하였기 때문으로 생각된다. 또한 tryptone이 peptone보다 효소활성이 좋은 것은 peptone은 우유, 고기 등을 단백질

분해효소로 분해하여 당 종류가 함유되어 있으나 trypton은 casein을 protease trypsin으로 분해하여 peptides 등이 함유되어 있어 서로 간에 조성차이로 나타난 결과로 생각된다. 그리고 $NaNO_3$에 비해 KNO_3가 효소활성이 높은 것은 NO_3 이온의 질소원이 필요하나 무기이온으로 K이온도 필요한 것으로 해석되었다.

따라서 Table 2의 결과를 바탕으로 유기질소원으로는 tryptone을 사용하여 실험하였고 무기질소원이면서 무기이온인 KNO_3를 사용하여 각각의 최적 농도를 측정한 결과 Fig. 2와 Fig. 3과 같이 tryptone 1%, KNO_3 0.5%에서 최적의 효소활성과 균체 증식을 보였다. 효소의 생산 최대농도에서 최종 pH는 tryptone의 경우 7.28과 KNO_3의 경우 7.58을 나타내었으며 무첨가 이외에 효소활성이 가장 낮은 3% 첨가 시 각각 tryptone의 경우 7.11과 KNO_3의 경우 7.03으로 감소하는 경향을 보였다.

Fig. 2에서 효소활성이 tryptone 1%에서 가장 높고 그 외에는 떨어지는 것으로 나타났는데 이는 유도효소인 keratinase가 tryptone 1%까지는 효소유도에 도움이 되었으나 그 이상의 tryptone 농도에서는 균이 깃털을 분해하는 keratinase 없이도 tryptone에 함유된 저분자 peptide 등을 이용할 수 있으므로 효소활성이 떨어진 것으로 생각되었다 [23].

그리고 Fig. 3에서 보면 균체농도와 효소활성에 비례관계가 나타난다. 이것은 KNO_3가 NO_3 이온과 K 이온으로 균체생육에 직접적인 영향을 미치는 인자로 0.5%까지는 생육을 촉진하나 그 이상에서는 저해하여 생육에 적정 농도가 있는 것으로 보이며 그에 따라 효소활성도 변하는 것으로 생각되었다. 보다 엄밀히 얘기하면 K 이온이 존재 시 NO_3 이온은 0.5%까지는 생육을 촉진하며 효소활성도 그에 따라 증가하는 것으로 생각되었다. 그리고 Bang [21]의 보고에서도 KNO_3에 의한 효소활성과 균체농도 사이의 관계는 Fig. 3과 거의 같은 모양을 보였다.

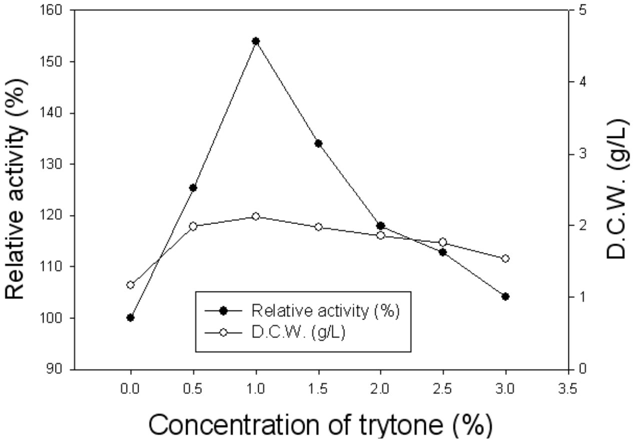


Fig. 2. Effect of tryptone concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h in each concentration of tryptone using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather with shaking culture (200 rpm/min).

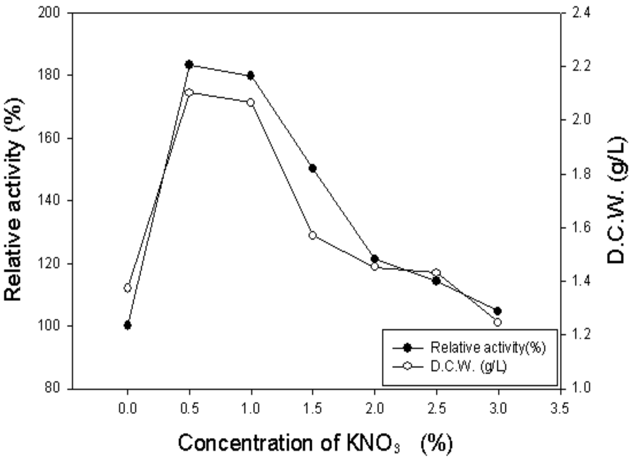


Fig. 3. Effect of KNO_3 concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h in each concentration of KNO_3 using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather and 1.0% tryptone with shaking culture (200 rpm/min).

금속염의 영향

본 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 금속염을 제외하고 chicken feather 3.5%, 1.0% trypton 그리고 0.5% KNO_3를 함유한 2차 선별배지에 각종 금속염을 각각 0.05%가 되도록 첨가하여 37℃에서 48시간 진탕배양한 후 균체량과 효소활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에 의하면 KCl을 첨가하였을 때 효소생산이 가장 우수하였다. KCl의 농도에 대한 영향은 Fig. 4와 같이 KCl을 0.05% 첨가하였을 때 효소활성이 가장 우수하였다. 배양액의 pH 변화는 최저 7.41에서 효소 활성이 가장 우수한 농도에서 최대 7.69까지로 급격한 변화를 보이지는 않았다.

Table 3. Effect of metal ions on the production of keratinase produced by *Bacillus* sp. KN-517

Metal ion[1]	D.C.W. (g/L)[2]	Final pH	Relative activity (%)
None	1.08	7.05	100
$AgNO_3$	0.26	7.12	43.66
NaCl	1.23	6.48	81.16
KCl	1.52	7.34	111.62
$Li_2SO_4 \cdot H_2O$	0.47	6.71	65.74
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.31	6.52	42.20
$CaCl_2$	0.84	6.49	33.16
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.02	6.15	31.81
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.89	6.42	97.07
$HgCl_2$	0.11	6.21	90.74
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.18	7.26	94.28
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.27	6.40	37.17
$ZnSO_4$	1.02	7.03	87.82

[1] All metal ions were added to 0.05%.
[2] Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h using 2nd isolation medium containing 3.5% hair, 1.0% tryptone and 0.5% KNO_3.

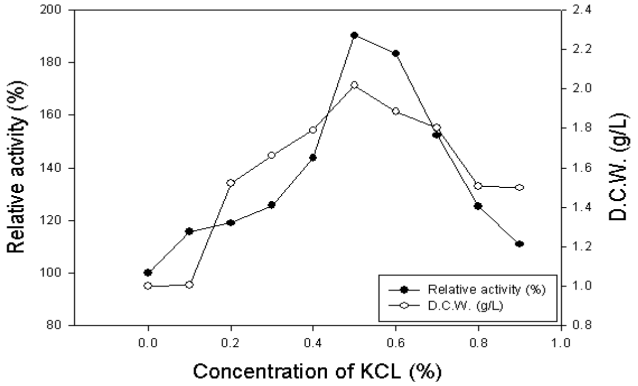


Fig. 4. Effect of KCl concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 37℃ for 48 h in each given KCl concentration with shaking culture (200 rpm/min) using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather, 1.0% tryptone and KNO_3 0.5%.

Table 3에서 KCl 첨가가 효소활성이 가장 우수하였는데 이는 $MgSO_4$와 $FeSO_4$를 첨가하였을 때 활성이 우수했다는 Page 등 [26]의 보고와는 상이한 결과이다. 이는 균주 차이에 의한 것으로 생각되었다. Fig. 4에서 보면, 균체농도와 효소활성이 KCl 0.05% 첨가 시 효소활성이 가장 우수하였고 그 외에는 떨어졌는데 균 농도도 이때가 가장 높았다. 이러한 이유는 균체생육에 K 이온이 더 필요하여 Fig. 3의 0.5%와 Fig. 4의 0.05%를 합한 0.55%의 K 이온이 균체생육과 효소활성에 최적이어서 나타난 결과라고 생각되었다. 그리고 KCl 0.06%이상에서는 균체농도가 떨어지면서 효소활성은 더욱 급속히 떨어졌는데 이는 유도효소인 keratinase 유도에 적정 농도의 K이온이 매우 중요한 역할을 할 것으로 보였다. 또한 Table 3에서 Ca, Mn, Cu, Ag 이온의 경우에 효소활성이 30-40%대로 떨어졌는데 이러한 이온들은 효소유도를 저해하여 나타난 결과로 생각되었다. Bang [21]의 보고에서도 KCl 농도에 따른 *Bacillus*의 ketatinase 활성은 Fig. 4와 유사한 형태를 보였으나 Ag 이온의 경우 효소활성이 10% 대였고, Ca, Mn, Cu 이온의 경우는 50%-80%대의 효소활성을 보여 이온 종류에 따라 본 논문과는 약간 다른 경향을 보여 이는 균주 차이로 생각되었다.

배양 온도의 영향

본 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 배양 온도에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 각 온도에서 48시간 배양하여 각각의 균체량과 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같이 40℃에서 균체증식 및 효소 활성이 가장 우수하였고 35℃~42℃까지 90% 이상의 효소활성을 보였다. 이는 *Streptomyces* 속을 사용하여 30℃에서 효소활성이 가장 우수했다는 Brigitle [27]과 50℃의 Young [16]의 보고와는 상이하였고, *Streptomyces* 속을 사용한 Kim [20]과의 보고와는 일치하였다. 또한 같은 *Bacillus* sp 속을 사용한 Kang 등 [28]의 결과와 일치하였다.

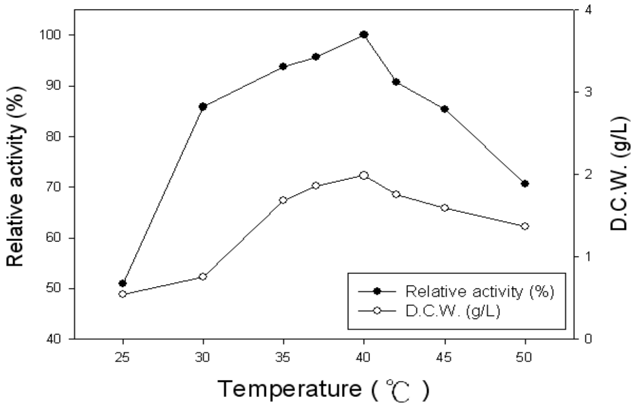


Fig. 5. Effect of temperature on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at each temperature for 48 h using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather, 1.0% tryptone, 0.5% KNO_3 0.05% KCl with shaking culture (200 rpm/min).

초기 pH의 영향

본 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 초기 pH에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 탄소원으로 chicken feather 3,5%, 질소원으로 tryptone 1%, KNO_3 0.5%, 금속염으로 KCl을 0.05%를 첨가한 선별배지를 pH 3.5에서 pH 10까지 조절한 후 48시간 배양하여 pH에 따른 균체량과 효소활성을 측정하였다. 결과는 Fig. 6과 같이 pH 8.5에서 가장 효소활성이 우수하였으며, pH 8.0에서 균체생산이 가장 많았다. 또한 pH 6.5에서부터 pH 9.0까지의 넓은 범위에 걸쳐 균체생산과 효소활성이 우수하였다. 이는 pH 9.0에서 가장 높은 효소 활성을 보였다는 Suntornsuk 등 [18], Kim [20] 및 Giongo 등 [29]의 결과와 유사하였다. 하지만 pH 7.5에서 가장 높은 효소 활성을 내었다는 Lee 등 [30] 등의 결과와는 상의하였다.

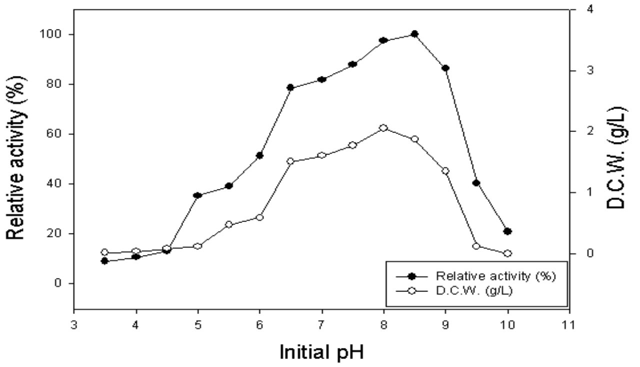


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 40℃ for 48 h in each pH using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather, 1.0% tryptone, 0.5% KNO_3 0.05% KCl with shaking culture (200 rpm/min).

배양시간의 영향

본 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 배양 시간에 따른 keratinase 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 지금까지 조사된 효소 최적 활성조건인 탄소원으로 chicken feather 3.5%, 질소원으로 tryptone 1%, KNO_3 0.5%, 금속염으로 KCl을 0.05%를 첨가한 효소생산 배지에 전배양한 종균을 1% (v/v)되게 접종한 후 pH 8.5, 40℃에서 배양하며 6시간 간격으로 균주의 생장과 효소활성을 조사하였다. 결과는 Fig. 7과 같이 접종 후 18시간 후부터 효소활성이 급격하게 증가하여 42시간에서 가장 높은 분당 123 units/mL 효소활성을 보였으며 균체증식은 24시간부터 약간씩 감소하는 경향을 보였다. 이는 Williams 등 [31]와 Yu 등 [23]의 5일보다 효소활성이 증가하는 시간이 매우 빠름을 알 수 있었다. 현재 산업적으로 미생물이 생산하는 keratinase의 실용화가 활발하지 않은 이유 중 가장 큰 이유는 chicken feather의 분해를 위하여 많은 시간을 요구하기 때문인데 본 균주의 경우 산업적 이용성이 매우 높을 것으로 사료된다.

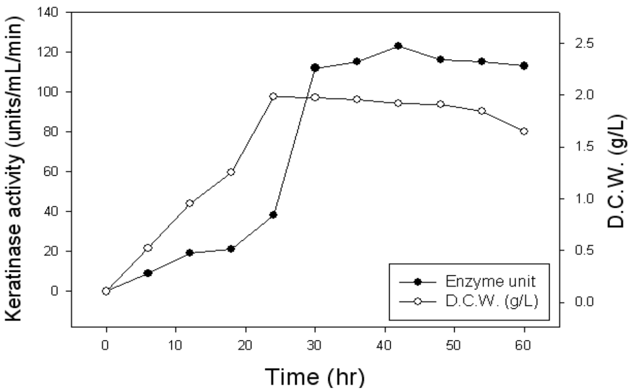


Fig. 7. Effect of concentration with time in the culture of *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 40℃ for each given time using 2nd isolation medium containing 3.5% chicken feather, 1.0% tryptone, 0.5% KNO_3 0.05% KCl (pH 8.5) with shaking culture (200 rpm/min).

주영양원으로 모발 사용

Keratinase 생산을 위해서는 거의 대부분 chicken feather를 사용하며 사람 모발의 경우 모발의 powder를 사용한 경우가 있다 [5].

여기에서는 keratinase를 이용한 모발 화장품 개발을 목적으로 하므로 모발을 직접 그대로 탄소원으로 사용하여 *Bacillus* sp. KN-517 균주의 keratinase 생산능을 보았다. 본 균주의 배양 시간에 따른 keratinase 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 Fig. 7의 배지 조성에서 탄소원으로 chicken feather 3.5% 대신에 사람 모발을 3.5% 첨가하였다. 그 결과는 Fig. 8과 같이 접종 후 40시간 후부터 효소활성이 급격하게 증가하여 120 시간에서 가장 높은 효소활성을 보여 분당 88 units/mL에 도달하였다. 균체증식은 급격히 증가하다가 40시간부터 약간씩 증가하였다.

이는 chicken feather를 탄소원으로 사용하는 경우보다 효소 생산이 매우 느리게 증가하였으며 그 활성 또한 Fig. 7의 분당 123 units/mL에 비해 분당 88 units/mL로 28% 떨어졌다. 이러한 이유는 모발은 chicken feather에 비하여 매우 굵어 효소의 분해가 쉽지 않았기 때문으로 보인다. 그것은 모발 단백질의 주성분이 cysteine으로서 약 14~18%의 함유량을 나타내고 있는 반면 [32], chicken feather는 cysteine을 6.8~7.3%를 함유하고 있기 때문이다 [33]. 그러나 모발 powder가 아닌 모발을 직접 첨가한 배지에서 keratinase가 활성을 보였고 본 효소는 모발을 분해할 수 있으며 *Bacillus* sp. KN-517 균주에 의해 생산되는 keratinase는 모발화장품으로의 가능성을 보였다.

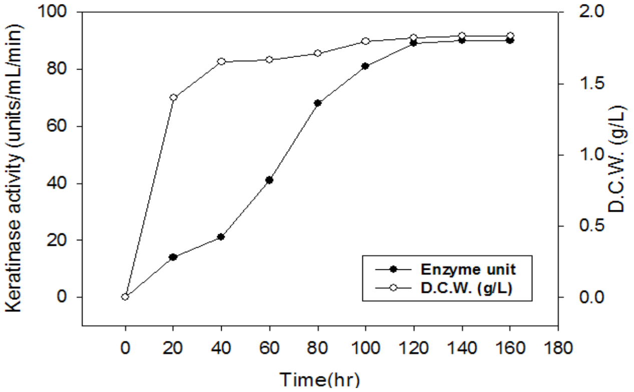


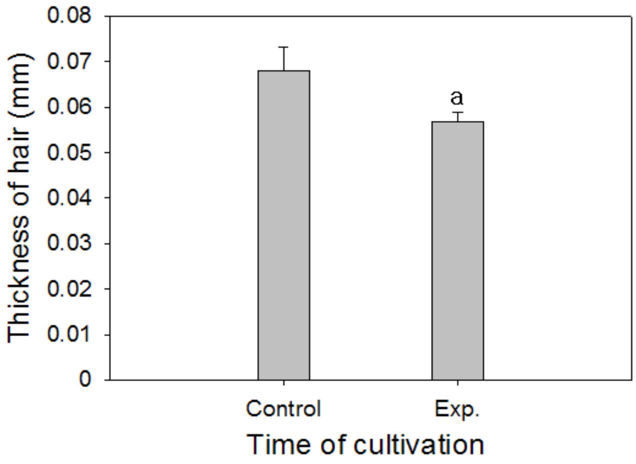
Fig. 8. Effect of cultivation time on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. KN-517. Cultivation was carried out at 40℃ for each given time using 2nd isolation medium containing 3.5% human hair, 1.0% tryptone, 0.5% KNO_3 and 0.05% KCl (pH 8.5) with shaking culture (200 rpm/min).

모발의 굵기

Fig. 8과 같이 모발을 탄소원으로 keratinase 생산 시 사용하였는데 이 때 배양시작 5일 후 모발을 sampling하여 모발의 굵기 변화를 보았다. 모발의 굵기를 측정하여 평균값과 표준편차를 구한 결과는 Fig. 9와 같다. 균주 접종 전의 배지에 함유된 대조군 모발의 굵기는 0.06880 ± 0.00673 mm이며, 120시간 배양 시 분해된 시험군 (Exp.) 모발은 0.050.5 ± 0.003955 mm로 20% 정도 굵기가 줄어들었다. 따라서 *Bacillus* sp. KN-517 균주는 모발을 탄소원으로 사용 시 keratinase를 생산하며 이 효소에 의해 모발이 분해되어 모발이 가늘어지는 것을 알 수 있었다.

따라서 keratinase 생산균주를 분리 동정하여 *Bacillus* sp. KN-517 균주를 얻었고 탄소원으로 chicken feater를 사용하여 효소생산 최적화를 하였다. 그리고 탄소원으로 chicken feather 대신에 모발을 사용한 경우도 keratinase 생산과 이 효소에 의해 모발이 분해되어 굵기가 가늘어지는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 모발보다 keratinase 분비 유도가 빠

르고 분비율이 높은 chicken feather를 이용하여 생산된 keratinase를 이용하여 모발의 오구제거, 퍼머넌트 전처리제 등 모발 화장품을 개발하고자 한다.



a: was significant difference from the control group p<0.001.

Fig. 9. Change of hair thickness by the enzyme produced from the cultivation for 5 days.

결 론

본 연구에서는 경기도와 충청도 일대의 가금류 처리 공장과 폐기물 처리 공장 부근 토양으로부터 keratinase 활성이 높은 단일 균주를 최종 선별하여 동정하고 효소활성이 가장 높은 배양조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 선별된 균주의 형태학적 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp. KN-517으로 판명되었다. 이 균주에 의한 keratinase 활성의 최적 조건을 검토하였는데, 최적 배지 조성은 탄소원으로 chicken feather 3.5%, 유기 질소원으로 tryptone 1.0% 무기 질소원으로 KNO_3 0.5%, 무기염으로 KCl 0.05%, K_2HPO_4 0.03%, KH_2PO_4 0.04%이며, 생육인자로 yeast extract 0.01%였다. 진탕배양 시 (200 rpm/min), 최적 온도와 배지의 초기 pH는 각각 40℃와 8.5로 나타났으며, 위와 같은 최적 조건 하에서 keratinase의 최대 활성은 42시간 만에 분당 123 unit/mL이었다 또한 모발을 탄소원으로 사용 시 120시간 만에 효소활성이 분당 88 unit/mL에 도달하였으며, 이 때 모발은 대조군에 비하여 20% 정도 가늘어졌다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 건국대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

접수 : 2009년 12월 10일, 게재승인 : 2010년 6월 13일

REFERENCES

1. Vignardet, C., Y. C. Guillaume, J. Friedrich, and J. Millet (1999) A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. *Int. J. Pharm.* 191: 95-102.
2. Kaluzewska, M., K. Wawrzkiewicz, and J. Lobarzewski (1991) Microscopic examination of keratin substrates subjected to the action of the enzymes of *Streptomyces fradiae*. Int. *Biodeterior*. 27: 11-26.
3. Farag, A. M. and M. A. Hassan (2004) Purification, characterization and, immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae. Enzyme and, Microbial technol.* 34: 85-93.
4. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande (1998) Molecular and, biotechnological aspects of microbial. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 62: 597-635.
5. Gupta, R. and P. Ramnani (2006) Microbial keratinases and, their prospective application: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 70: 21-33.
6. Farag, A. M. and M. A Hassan (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae. Enzyme and Microbial Technology* 34v 85-93.
7. Baker, D. H., R. C. Blitenthal, K. P. Boebel, G. L. Czarnecki, L. L. Southern, and G. M. Willis (1981) Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. *Poult. Sci*. 60: 1865-1872.
8. Papadopoulose, M. C., A. R. Eiboushy, and E. H. Ketelaars (1985) Effect of different processing condition on amino acid digestibility of feather meal determined by chick assay. *Poult. Sci*. 64: 1729-1742.
9. Kim, H. R. and P. S. O (1991) Isolation of neutral protease Hyperproducing *Bacillus* sp. KN103N and, Some Properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 19: 116-121.
10. Kim, D. S., H. R. Kim, T. J. Nam, and J. H. Pyeun (1999) Medium Composition of *Asperzillus oryzae* PF for the Production of Proteolytic Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bio-technol*. 27: 404-409.
11. Cheo, K. H., S. H. Kim, K. G. Lee, M. J. Kim, and H. S. Gwak (2001) Hair Science, 3rd ed., pp. 164-170, Soo Mun Publishing Company, Seoul, Korea.
12. Wolfram, L. J. (2003) Human Hair: A unique physicochemical composite. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 106-14.
13. Wilkson, J. B. and R. J. Moore (1984) Harry's Cosmiticology, 7th ed., pp. 124-156, Chemical Publishing Company, New York, USA.
14. Brown, A. C. and J. A. Swift (1975) Hair breakage: the scanning electron microscope as a diagnostic tool. *J.*

Soc. Cosmet. Chem. 26: 289-297.
15. Seshadri, I. P. and B. Bhushan (2008) In situ tensile deformation characterization of human hair with atomic force microscopy. *Acta materialial.* 56: 774-781.
16. Young, R. A. and R. E. Smith (1975) Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. *Can. J. Microbiol.* 21: 583-586.
17. Peter, H. A. S., S. M. M. Nicholas, E. Sharpe, and J. G. Holt (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2: 1122-1123.
18. Suntornsuk, W. and L. Suntornsuk (2003) Feather degradation by *Bacillus*-sp. FK46 in sbumerged cultivation. *Bioresource Technol.* 86: 239-243.
19. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Rabdall (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265.
20. Kim, J. D. (2003) Preliminary characterization of keratinolytic enzyme of *Aspergillus* flavus K-03 and, its potential in biodegradation of keratin wastes. *Mycobiology.* 31: 209-213.
21. Bang, B. H., M. S. Rhee, K. H. Lim, and D. H. Yi (2008) Optimal Culture Condition on the keratinase Production by *Bacillus* sp. SH-517. *J. Life Sci.* 18: 839-844.
22. Wang, J. J. and J. C. H. Shih (1999) Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J. Ind. Microbilo. Biotechnol.* 22: 608-616.
23. Adigüzel, A, C., B. O. Bitlis, I. Tasa, and N. T. Eriksen (2009) Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. *J. Appl. Microbilo.* 107: 1264-5072.
24. Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the matabloic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 73: 245-259.
25. Kant, S., R. Kapoor, and N. Banerjee (2009) Identification of a catabolite-responsive element necessary for regulation of the *cry4A* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *J. Bacteriol.* 191: 4687-4692.
26. 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.
27. Brigitte, B, G. Boris, and M. Rudolf (1995) Chaacterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from Sreptomyces pactum DSM 40530. *Applied and Environ. Microbiol.* 61: 3705-3710.
28. Kang, H. J., T. S. Jung, T. G. Kim, Y. J. Eo, and J. H. Kim (2003) Isolation and, characterization of fether-degrading bacterial strains. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 27: 129-134.
29. Giongo, J. L., F. S. Lucas, F. Casarin, P. Heeb, and A. Brandelli (2007) Keratinolytic proteases of *Bacillus species* isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 375-382.
30. Lee, Y. J., J. H. Kim, and J. S. Lee (2004) Production and, characterization of keratinase from *Paracoccus sp.* WJ-98. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9: 17-22.
31. Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Makenzie, and C. H. S. Jason (1990) Isolation, Identification and, characterization of a Feather Degrading Bacterium. Applied and, Environ. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1509-1515.
32. 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.
33. Lee, W. K. (1998) Hair Beauty Culture Learning, pp. 105-116, Chung-ku Public, Company, KOR.
34. Latshaw, J. D., N. Musharaf, and R. Returm (1994) Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed Sci. Technol.* 47: 179-188.