(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0092671
(43) 공개일자 2006년08월23일

(21) 출원번호 10-2005-0013742
(22) 출원일자 2005년02월18일

(71) 출원인 씨.에프. 주식회사
인천광역시 남구 도화1동 592-5 대림빌딩 인천정보산업진흥원 506호
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 장정순
서울특별시 영등포구 여의도동 광장아파트 8동 806호
주한승
서울특별시 양천구 신정4동 957-34
임지훈
경기 부천시 소사구 범박동 현대홈타운아파트 204동1604호
최선애
인천광역시 서구 신현동 280-10
서유림
경기도 부천시 소사구 소사본2동 54-16
방선이
인천 남구 도화동 534-3
이승진
서울 양천구 신월2동 470-22 부강연립4동 102호

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 바실러스 서브틸리스 균주 P L-1 및 상기 균주로부터 생산되는 케라틴 분해활성을 갖는 단백질 분해 효소

요약

본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 및 상기 균주로부터 생산되는 단백질 분해효소에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 흰이빨 참갯지렁이(*Periserrula leucophryna*)의 체액으로부터 분리한 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 PL-1, 상기 균주로부터 단백질 분해효소를 대량 생산하는 방법 및 상기 균주로부터 생산되는 단백질 분해효소에 관한 것이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 균주 PL-1으로부터 생산한 단백질 분해효소는 높은 농도의 계면활성제 및 산화제에 안정하며, 케라틴 분해 활성을 가지고 있어 의류용 세제, 식품, 사료, 천연 가죽 등의 가공, 유기 폐기물 처리 및 케라틴이 주성분인 깃털의 분해에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 11

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 닭털로부터 우모분을 제조하는 제조 공정을 나타낸 그림이고,

도 2은 pH의 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 3는 온도의 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 4는 음이온성 계면 활성제(SDS)의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 5은 과산화수소수의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 6은 소디움 퍼보레이트의 농도에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 7은 본 발명의 바실러스 서브틸리스 균주 PL-1에 의한 닭털의 분해 결과를 나타낸 사진이고,

1: 닭털,

2: 닭털에 본 발명의 바실러스 서브틸리스 균주 PL-1를 넣어 4 일간 배양

도 8은 본 발명의 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소에 의해 닭털이 분해되는 결과를 나타낸 사진이고,

1: 닭털,

2: 닭털에 본 발명의 단백질 분해효소를 4 일간 처리

도 9은 케라틴-아주르를 분해할 때 pH의 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 10는 케라틴-아주르를 분해할 때 온도의 변화에 따른 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성을 나타낸 그래프이고,

도 11은 본 발명의 프로테아제로 SDS-PAGE를 수행한 결과를 나타낸 그림이다.

M: 표준 단백질

1: 씨엠-세파로즈(CM-sepharose) 단계, 피크 1

2: 씨엠-세파로즈 단계, 피크 2

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주 및 상기 균주로부터 생산되는 단백질 분해효소에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 흰이빨 참갯지렁이(*Periserrula leucophryna*)의 체액으로부터 분리한 신규한 바실러스 서브틸리스 균주 PL-1, 상기 균주로부터 단백질 분해효소를 대량 생산하는 방법 및 상기 균주로부터 생산되는 단백질 분해효소에 관한 것이다.

단백질 분해효소(protease)는 생체 내에서 소화, 흡수 및 방어 등의 다양한 기능을 하고 있으며 활성 부위의 구조에 따라 세린 계열, 시스테인 계열, 아스파르트산 계열 및 메탈로 계열 단백질 분해효소로 구분된다. 단백질 분해효소는 그 용도가

다양하여 혈전의 용해 등과 같은 사람의 질병 치료용 이외에도 의류용 세제의 성분, 콘택트 렌즈 세정제의 성분으로 이용될 뿐만 아니라 우유 단백질의 변형, 견 섬유의 고무질 제거(silk degumming), 사료의 개선, 가죽의 침지(soaking), 제모(dehairing), 엑스선 필름(X-ray)으로부터 은의 회수 및 단백질 용액 농축을 위한 한외 여과막의 재생 등에서 다양하게 이용되고 있다. 뿐만 아니라 단백질 분해효소는 가금 산업으로부터 발생되는 깃털을 분해하여 사료를 제조하는 등의 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

우리나라에서 닭은 연간 150 백만 마리 정도가 도계되어(미국의 경우는 약 85억 마리) 상업적으로 가공 처리되고 있으며, 닭 무게의 5-7%에 해당되는 닭털은 년간 약 18만 kg(미국의 경우 약 10억 kg) 정도가 방출되고 있다. 닭털의 주성분인 케라틴(keratin)은 생물체의 보호기능을 하는 피부, 손톱, 머리털, 양모, 말발굽, 뿔, 깃털 등을 구성하는 섬유상 구조 단백질로서 β-구조를 형성하는 펩타이드 결합과 사슬 내의 수많은 수소 결합 및 이황화결합(disulfide 결합)에 의하여 결합되어 있어 물리적, 화학적으로 매우 안정하다. 이러한 구조적인 안정성 때문에 산이나 알카리 등의 화학적인 처리 또는 동물의 소화기관 내의 펩신, 트립신 및 키모트립신과 같은 단백질 분해효소에 의해서 쉽게 분해되지 않아 그 활용도가 낮은 부산물이다. 이러한 이유로 배출된 닭털의 극히 일부만이 보온재, 쿠션의 충진 물질로 사용되며 대부분의 많은 양이 폐기물로 배출되어 이를 처리하기 위해 소각이나 매립을 하고 있으나, 소각 시 많은 매연이 발생하고, 매립 시에도 난분해성으로 많은 문제를 가지고 있어 환경오염의 주요 요인 중 하나로 대두되고 있는 실정이다.

그러나 케라틴은 다양한 아미노산 조성을 가지고 있고 저가이므로 최근 동물 영양학자들에 의해 동물용 단백질 사료로 사용할 수 있는 가능성이 활발히 연구되어 왔다(Korean J. Anim. Science 1998, 40, 103-110; Korean J. Poult. Sci, 24, 185-191, 1997). 케라틴의 구조적 안정성과 단백질 분해효소에 대한 저항성 때문에 닭털을 사료화 하는 공정은 현재까지 가압가열 처리에 의존하여 왔으며 실제로 닭 사육 시 좋은 결과를 나타냈다는 보고도 있다. 그러나 이러한 공정 중에 적지 않은 양의 아미노산이 파괴되고 과도한 에너지가 소요되므로, 가열처리 공정의 에너지 효율 및 경제성을 고려해 볼 때 케라틴 분해효소를 이용한 효율적인 처리기술에 대한 연구가 필요한 실정이다. **도 1**에서 보듯이 닭털로부터 우모분(hydrolyzed feather meal)을 제조하는 공정은 매우 복잡하여 다양한 시설이 필요할 뿐만 아니라 우모 처리 시 142-153℃, 40-60 psi 로 30-60 분간 가압, 가열 처리하는 고 에너지 요구 공정이며 제조 공정 동안 오염원 발생의 문제점을 지니고 있다. 이러한 물리학적 공정을 거쳐 제조한 우모분은 생체 내에서 소화율이 매우 낮은 약점을 가지고 있어 물리적 처리 기술은 여러 가지 측면에서 적절치 않음을 알 수 있다. 따라서 현재 우모의 생물학적 처리 방법이 많이 연구되어 왔으며, 지금까지 닭털의 생물학적인 처리방법, 즉 케라틴 분해효소(keratinase)를 이용한 방법에 대한 연구는 우선적으로 자연계에서 케라틴 분해효소를 생산하는 균을 분리하는데 집중되어 왔다. 그 결과 분리된 균은 주로 구조단백질에 기생하는 균주로, 이에 대해 피부의학 연구진에 의한 발표가 주를 이루어 왔고 근래에 들어서야 *Bacillus* sp. 및 *Strptomyces* sp.에서의 케라티나아제(keratinase) 생산에 대한 보고가 이루어지고 있는 실정이다(Biotechnol. Bioproc. Eng. 9, 17-22, 2004; Sangali. S. et al., J. Appl. Microbiol. 89, 735-743, 2000; Riffel. A. et al., Arch. Microbiol. 179, 258-265, 2003). 국내에서도 케라틴 분해효소를 고효율로 생산하는 균주를 탐색하여 닭털을 사료화하기 위한 연구가 진행되어 왔지만 아직 그 결과가 미미한 실정이다.

이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 인식하여 한국의 서해 연안 갯벌에 서식하는 흰이빨 참갯지렁이로부터 여러 가지 균주를 탐색하고, 이들 균주 중에서 중금속에 의하여 활성이 억제되지 않고 광범위한 pH, 계면활성제, 산화제(예; 과산화수소 등)에 매우 뛰어난 안정성을 나타내며 강력한 케라틴 분해활성을 갖는 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 분리·동정하고, 상기 균주로부터 케라틴 분해활성 갖는 단백질 분해효소를 대량 생산하는 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 높은 농도의 계면활성제 및 산화제에 안정하며, 케라틴 분해 활성을 가지고 있어 의류용 세제, 식품, 사료 등 산업적으로 이용 가치가 높은 단백질 분해효소를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) PL-1 균주(수탁번호 : KCTC 10764BP)를 제공한다.

또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCTC 10764BP의 배양에 의해 얻어지고, 하기 (a) 내지 (e)의 특징을 가지는 단백질 분해효소를 제공한다.

(a) 비이온성 및 음이온성 계면 활성제의 존재 하에서 안정;

(b) 산화제의 존재 하에서 안정;

(c) 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리 및 망간 등 중금속의 존재 하에서 안정;

(d) 최적산도 pH 9.5 내지 pH 12.0;

(e) 최적온도 50 내지 65℃.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소를 포함하는 콘택트 렌즈용 또는 의류용 세제를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 이용하여 유기 폐기물을 분해하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 이용하여 가금류 깃털을 분해하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주를 이용하여 가금류 깃털을 분해하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생성된 깃털 분해 산물을 함유하는 가축 사료를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생성된 깃털 분해 산물을 함유하는 비료를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) PL-1 균주(수탁번호 : KCTC 10764BP)를 제공한다.

본 발명자들은 서해 특산 흰이빨 참갯지렁이의 체액으로부터 신규한 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주를 분리하였다. 구체적으로 갯지렁이의 체액을 회수하여 단백질 분해효소의 기질인 탈지분유(skim milk)를 포함하는 배지에 배양한 후, 생성된 군락(colony) 주위에 전지분유의 분해에 의한 투명환의 생성을 관찰하였다. 군락으로부터 투명환의 크기가 2 ㎜ 이상되는 군락을 선택한 후, 선택된 균주들 중 단백질 분해효소 활성이 뛰어난 균인 서열번호 1로 기재되는 16S 리보소말 DNA를 갖는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주를 선별하였다. 이를 "바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) PL-1"으로 명명하여, 2005년 1월 19일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 10764BP).

또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 의 배양에 의해 얻어지고, 하기 (a) 내지 (e)의 특징을 가지는 단백질 분해효소를 제공한다.

(a) 비이온성 및 음이온성 계면 활성제의 존재 하에서 안정;

(b) 산화제의 존재 하에서 안정;

(c) 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리 및 망간 등 중금속의 존재 하에서 안정;

(d) 최적산도 pH 9.5 내지 pH 12.0;

(e) 최적온도 50 내지 65℃.

본 발명의 단백질 분해효소는 높은 pH, 계면활성제, 산화제, 유기용매 및 중금속 등의 다양한 물리 화학적 조건하에서도 활성을 유지하고 케라틴 분해활성을 갖는 효소이다.

본 발명의 단백질 분해효소는 비이온성 계면활성제 뿐만 아니라 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 같은 강한 음이온성 계면 활성제의 존재 하에서도 높은 단백질 분해 활성을 유지하고(**도 5 참조**), 특히 5%의 SDS로 2일 동안 처리하여도 80% 이상의 효소 활성을 유지한다. 이는 여타 발명의 단백질 분해효소보다 안정성이 매우 뛰어난 효소임을 알 수 있다(출원번호 1996-019826; 출원번호 2000-0044047; 출원번호 1996-008674 참조). 또한, 본 발명의 단백질 분해효소는 강력한

산화제로 알려진 과산화수소 및 소디움 퍼보레이트(sodium perborate)의 존재 하에서도 활성을 거의 잃지 않는 매우 안정한 효소이다(**도 6 및 7 참조**). 2.5% 과산화 수소수 및 소디움 퍼보레이트로 2일 동안 처리하여도 그 활성의 80% 이상을 유지하는 효소학적 안정성이 매우 뛰어난 효소임을 알 수 있다. 이와 더불어, 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리 및 망간 등의 중금속의 존재 하에서도 효소 활성이 영향을 받지 않는다(**표 9**).

한편, 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1이 생산하는 단백질 분해효소가 일반적으로 케라틴 분해효소의 기질로 사용되는 케라틴-아주르(keratin-azure)를 분해하는지를 측정한 결과, 본 발명의 단백질 분해효소가 케라틴-아주르를 효율적으로 분해하는 것을 확인함으로써 상기 분해효소의 케라틴 분해활성을 확인하였다(**표 11**).

본 발명의 단백질 분해효소는 pH 8.0내지 pH 12.0의 넓은 pH 영역에서 단백질 분해활성을 나타내고, 최대 활성을 나타내기 위해서는 pH 9.5 내지 pH 12.0 인 것이 바람직하며, pH 10.0 내지 pH 11.0 인 것이 더욱 바람직하고, pH 11.0인 것이 가장 바람직하다(**도 3 참조**). 30 내지 80℃에서도 단백질 분해활성을 나타내고, 최대 활성을 나타내기 위해서는 50 내지 65℃인 것이 바람직하고, 55 내지 65℃인 것이 더욱 바람직하고, 60 내지 65℃인 것이 가장 바람직하다(**도 4 참조**).

또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스로부터 단백질 분해효소를 대량생산하는 방법을 제공한다.

본 발명은 바실러스 서브틸리스로부터 단백질 분해효소를 대량생산하기 위한 바실러스 서브틸리스의 배지 조성 및 최적 배양조건을 제공한다. 최적 배양 배지의 조성은 하기와 같다.

단백질 분해효소를 생산하기 위한 유기 질소원으로는 오리털, 닭털, 우모분, 카제인, 탈지분유, 유청, 면실박, 대두박 및 펩톤 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용하는 것이 바람직하고, 그 공급 농도는 0.1 내지 5% 인 것이 바람직하고, 0.2 내지 2.5% 로 공급하는 것이 더욱 바람직하다.

케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소를 생산하기 위한 케라틴으로는 우모분 및 깃털로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 성분을 사용하는 것이 바람직하고, 그 공급 농도는 0.1 내지 5% 인 것이 바람직하고, 0.2 내지 2.5% 로 공급하는 것이 더욱 바람직하다.

탄소원으로는 고구마 전분, 옥수수 전분 및 밀가루 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 성분을 사용하는 것이 바람직하고, 그 공급 농도는 0.1 내지 5%로 하는 것이 바람직하고, 0.2 내지 2.5%로 공급하는 것이 더욱 바람직하다. 작은 분자량을 갖는 탄소원으로는 물엿, 말토스, 구연산 나트륨, 초산 나트륨 및 숙신산 나트륨 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 성분을 사용하는 것이 바람직하고, 그 공급 농도는 0.1 내지 5%로 하는 것이 바람직하고, 0.1 내지 2.5%로 공급하는 것이 더욱 바람직하다.

배양 배지의 pH는 탄산나트륨으로 조절하며, 그 공급 농도는 0.1 내지 1.0%로 하는 것이 바람직하고, 0.1 내지 0.4%로 공급하는 것이 더욱 바람직하며, 이 때 배지의 pH 는 pH 7.0 내지 pH 11.0 인 것이 바람직하고, pH 9.0 내지 pH 10.5 인 것이 더욱 바람직하다.

최적 배양조건은 하기와 같다. 상기의 배지 조성물을 이용하여 미리 배양한 종균 배양액을 0.5 내지 10% 범위에서 접종하고, 특히 1 내지 5%로 접종하는 것이 바람직하며, 종균 배양액을 접종한 후 20 내지 96 시간 동안 배양하는 것이 바람직하고, 24 내지72 시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하다. 배양 온도 범위는 25 내지 45℃인 것이 바람직하고, 30 내지 40℃가 더욱 바람직하다. 배양 중 공급되는 공기의 양은 0.1 내지5.0 vvm 이 바람직하고, 0.5 내지1.5 vvm 이 더욱 바람직하다. 배양 중 교반 속도는 150 내지1000 rpm 이 바람직하고, 400 내지800 rpm 인 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 포함하는 콘택트 렌즈용 또는 의류용 세제를 제공한다.

상기 단백질 분해효소를 포함하는 세제는 일반적인 의류용 또는 콘택트 렌즈용 세제의 제조 방법에 따라 제조될 수 있고 상기 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소는 SDS, 옥틸글루코시드(octylglucoside), Brij-35, Triton 계열 및 Tween 계열등 공지의 합성 계면활성제 또는 천연 계면활성제와 함께 상기 세제의 성분으로 포함될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소를 이용하여 식품, 사료, 직물, 천연 가죽을 가공하는 방법 및 유기 폐기물을 분해하는 방법을 제공한다.

상기 단백질 분해효소는 광범위한 pH, 산화-환원 환경에서도 활성을 유지하므로, 식품, 사료, 직물, 천연가죽 등의 가공 공정에서 폭넓게 사용할 수 있다. 또한, 상기 단백질 분해효소는 중금속의 존재 하에서도 높은 활성을 유지하므로 폐기물 분해에도 사용할 수 있다. 상기에서, 가공 방법 또는 분해 방법에는 특별한 제약은 없으며, 공지의 방법에 본 발명의 단백질 분해효소를 첨가하여 실시하는 모든 방법이 본 발명의 범주에 포함된다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 분해효소 및 상기 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 이용하여 닭털 및 오리털과 같은 가금류의 깃털을 분해하는 방법을 제공한다.

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 균주를 닭털과 함께 배양한 결과 닭털이 완전하게 분해되는 것을 확인하였다(**도 8 참조**). 단백질 분해효소 용액을 넣어준 경우에도 60% 이상 효율적으로 닭털이 분해되는 것을 확인하였으며(**도 9 참조**), 효소의 양이 증가할수록, 효소 처리 시간이 길어질수록 깃털 분해율이 증가하는 것을 알 수 있었다(**표 10**).

아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 생성된 깃털 분해 산물을 함유하는 가축 사료 및 비료를 제공한다.

깃털의 주성분인 케라틴은 구조적인 안정성 때문에 화학적인 처리 또는 단백질 분해효소에 의해서 쉽게 분해되지 않아 그 활용도가 낮은 부산물이다. 그러나 케라틴은 다양한 아미노산 조성을 가지고 있고 저가이므로 동물용 단백질 사료 및 비료로 사용할 수 있다. 닭털을 사료화하는 공정은 현재까지 가압가열처리에 의존하여 왔으나 본 발명의 균주 및 단백질 분해효소를 이용하면 경제적이고 간편하게 사료 및 비료를 생산할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 갯지렁이로부터 단백질 분해효소를 생산하는 균주의 분리

본 발명자들은 서해 특산 흰이빨 참갯지렁이의 체액으로부터 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 다음과 같이 분리하였다. 먼저 갯지렁이 몸통을 70% 알코올에 10분간 침지시켜 표면을 살균한 후, 멸균한 가위로 몸통을 절단한 후 체액을 회수하였다. 회수한 체액을 증류수로 10, 100 및 1000 배 희석하여 단백질 분해효소의 기질인 탈지분유(skim milk)를 포함하는 한천 평판 배지에 균일하게 자라도록 도포하고, 생성된 군락(colony) 주위에 전지분유의 분해에 의해 생성된 투명환의 생성을 관찰하였다. 군락으로부터 투명환의 크기가 2 ㎜ 이상 되는 군락을 선택한 후, 선택된 균주들을 액체 배지를 이용하여 단백질 분해효소 활성이 뛰어난 균을 선별하였다.

균주들의 단백질 분해효소 활성을 분석하기 위하여, 세포 배양 상등액을 회수하여 활성을 측정하였다. 구체적으로, 0.1 M 글리신 완충용액(pH 11.0)에 함마스탄 카제인(Hammerstan casein)을 녹여 최종 농도가 0.5%가 되도록 한 기질 용액(0.5㎖)에 상기의 완충용액으로 10 내지 100배 희석한 효소 용액(0.01㎖)을 가하여 잘 섞어준 후 60℃에서 10분간 반응시키고 반응 중지용액(10% 트리클로르 아세트산) 0.5 ㎖을 가하여 반응을 중단시켰다. 이 용액을 얼음에서 10분간 방치한 후 15,000 rpm 으로 10 분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 생성된 티로신 양을 275 nm에서 측정하였다. 이 때, 단백질 분해효소 1 유니트(Unit)는 1분 동안에 1 마이크로 그람(㎍)의 티로신 생성에 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 이 때, 275 nm에서 티로신의 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻어 유니트 계산에 사용하였다.

그 결과, 단백질 분해효소 활성이 가장 뛰어난 균주는 서열번호 1로 기재되는 16S rDNA를 갖는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주였다. 상기 균주의 특성을 테스트한 결과 그람 양성이고 포자를 형성하며, 카탈라제 활성을 나타내지만, 우레아제 활성은 없으며, 글루코스, 프럭토스, 말토스, 만니톨, 소비톨, 전분과 같은 당으로부터 산 및 가스 생성하는 특성이 있었다(**표 1**).

[표 1]

바실러스 서브틸리스 sp. PL-1의 균학적 성질-형태학적, 생화학적 성질

특성	바실러스 서브틸리스 sp. PL-1
그람염색	+, Rod
포자형성	+
카탈라제(Catalase)	+

우레아제(Urease)	-
질소환원(Nitrate reduction)	+
글리세롤(Glycerol)	+
아세테이트(Acetate)	+
시트레이트(Citrate)	+
아라비노스(Arabinose)	+
리보스(Ribose)	+
글루코스(Glucose)	+
프럭토스(Fructose)	+
갈락토스(Galactose)	-
만노스(Mannose)	-
락토스(Lactose)	-
말토스(Maltose)	+
수크로스(Sucrose)	+
아라비톨(Arabitol)	-
자일리톨(xylitol)	-
이노시톨(Inositol)	+
만니톨(Mannitol)	+
소비톨(Sorbitol)	+
글루탐산(Glutamic acid)	-
α-Methyl-D-glucoside	-
녹말(Starch)	+
카제인(Casein)	+
젤라틴(Gelatin)	+
글리코겐(Glycogen)	+

본 발명자들은 상기에서 선별한 균주를 "바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) PL-1"으로 명명하고, 이를 2005년 1월 19일 자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 10764BP).

<실시예 2> 바실러스 서브틸리스 PL-1 균주의 단백질 분해효소의 생산

<2-1> 탄산나트륨이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1의 배양에서 탄산나트륨이 단백질 분해효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 구체적으로, 기본 배양 배지는 하기 **표 2**와 같은 조성이 되도록 제조하고, 탄산나트륨의 최종 농도를 0 내지 1% 되게 배지에 첨가한 후 24시간 동안 진탕 배양한 바실러스 서브틸리스 종균을 2%가 되게 접종하고, 37℃에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리한 후, 배양 상등액을 회수하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하였다.

[표 2]

기본배양 배지 조성

성분명	농도
닭털	1%
인산제이칼륨	0.2%
황산 마그네슘	0.5 mM

그 결과, 0.1% 이상 농도의 탄산나트륨, 즉 약 알칼리성 pH 배지 조성에서 단백질 분해효소의 생산이 증가되었으며, 0.3% 탄산나트륨을 첨가하였을 때 단백질 분해효소의 생산이 가장 높은 것을 확인하였다(**표 3**).

[표 3]

탄산나트륨이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

탄산나트륨 농도(%)	단백질 분해효소 활성(U/㎖)
0	1059.5
0.1	1205.5
0.2	1431.2
0.3	1568.3
0.4	1419.0
0.5	1294.0
0.6	1240.9
0.7	948.9
0.8	681.1
0.9	550.6
1.0	440.0

<2-2> 유기 질소원이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 유기 질소원이 단백질 분해효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 위의 **표 2**의 기본 배양배지에 각 질소원(1%) 및 탄산나트륨이 0.3% 농도로 포함된 배지를 제조한 후 24 시간 동안 배양한 종균을 2% 되게 접종하고, 37℃ 에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리한 후 배양 상등액을 회수하여 실시예 1과 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 유기 질소원이 첨가된 경우 전체적으로 단백질 분해효소의 생산이 증가하였으며, 특히 면실박 및 대두박을 유기 질소원으로 사용하였을 때 단백질 분해효소의 생산이 크게 증가함을 확인하였다(**표 4**). 상기 결과로부터 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 단백질 분해효소의 최적 생산에는 카제인, 대두박, 면실박, 펩톤, 효모추출물, 탈지분유, 유청, 우모분 및 깃털 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 대두박 또는 카제인을 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 그 사용 범위는 0.2 내지 5%에서 사용하는 것이 바람직함을 확인하였다.

[표 4]

유기 질소원이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

유기질소원	효소 활성(U/㎖)
무첨가	31
대두박	15319
카제인	695
탈지분유	441
유청	573
효모추출물	938
펩톤	772
면실박	10065
젤라틴	551
우모분	5363
닭털	1536
오리털	1403

<2-3> 케라틴이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소 생산에 미치는 케라틴의 영향을 조사하였다. 이 때 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소 생산을 위한 질소원은 우모분 및 닭털을 사용하였으며 기본배지에 상기 질소원의 농도가 0.5-5%이 되도록하여 조사하였다. 탄산나트륨이 0.3% 농도로 포함된 배지를 제조한 후 24 시간 동안 진탕 배양한 종균을 2% 되게 접종하고, 37℃에서 48 시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리한 후 배양 상등액을 회수하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 질소원으로 우모분, 닭털 및 오리털의 농도를 증가하여 첨가하였을 경우 전체적으로 단백질 분해효소의 생산이 증가하였다. 상기 결과로부터 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소의 최적 생산에는 우모분, 닭털 및 오리털을 포함하는 배지를 사용하는 경우에도 효율적으로 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소가 생산되었으며 그 사용 범위는 0.5 내지 3%에서 사용하는 것이 바람직함을 확인하였다(**표 5**).

[표 5]

케라틴이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

질소원	단백질 분해효소 활성(U/㎖)
우모분	
0.5	2561
1.0	4158
1.5	5366
2.0	5561
2.5	6915
3.0	5464
5.0	4950
닭털	
0.5	683
1.0	1466
1.5	1687
2.0	1833
2.5	2475
3.0	1736
5.0	1015
오리털	
0.5	630
1.0	1391
2.0	1853
3.0	1712
5.0	973

<2-4> 전분이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 전분이 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 닭털(2.5%) 및 탄산나트륨(0.3%)을 포함하는 기본 배지에 각 전분을 1% 되게 가하여 배지를 제조한 후 24시간 동안 배양한 종균을 2% 되게 접종하고, 37℃에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 배양 상등액을 회수하여 실시예 1의 효소 측정 방법으로 생산된 효소 활성을 측정하였다.

일반적으로 전분은 단백질 분해효소의 생산을 증가시키는 것으로 보고되어 있다(Feng Y. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57, 153-160; J. Appl. Microbiol. 2003, 95, 265-272). 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주도 밀가루(wheat flour) 및 옥수수 전분을 첨가하였을 때에 생산이 증가하였다. 상기 결과로부터 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소의 최적 생산을 위해 밀가루 혹은 옥수수 전분을 첨가하여 주는 것이 바람직하며, 밀가루를 첨가하여 주는 것이 더욱 바람직하고 그 사용 범위는 0.5 내지 5%이 바람직함을 확인하였다(**표 6**).

[표 6]
전분이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

탄소원	단백질 분해효소 활성(U/㎖)
무첨가	2075
고구마 전분	977
옥수수 전분	3446
밀기울	1340
밀가루	3871

<2-5> 저 분자량 탄소원이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소 활성에 미치는 저분자량을 갖는 탄소원의 영향을 조사하였다. 기본배지에 닭털(2.5%), 밀가루(1%) 및 탄산나트륨(0.3%)을 포함하는 기본 배지에 이당류인 말토즈, 설탕과 단당류인 포도당, 갈락토즈, 그 외 초산 나트륨구연산 나트륨과 같은 저분자량의 탄소원을 0.5% 되게 가하여 배지를 제조하였다. 이 때, 각 탄소원은 각각 멸균한 후 종균을 접종하기 직전에 배지에 첨가하였다. 24시간 동안 배양한 종균을 2% 되게 접종하고, 37℃에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하고 상등액을 회수하여 실시예 1의 효소 측정 방법으로 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 물엿을 첨가하였을 때 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소의 생산이 가장 많이 증가하였다. 또한 구연산 나트륨, 초산 나트륨 및 숙신산 나트륨 등을 첨가하였을 때에도 단백질 분해효소의 생산이 증가하였다. 상기 결과로부터 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주에서 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소의 최적 생산에는 물엿, 구연산 나트륨, 초산 나트륨, 숙신산 나트륨 및 글루탐산 나트륨를 포함하는 배지를 사용하는 것이 바람직하며, 그 사용 범위는 0.5 내지 5%에서 사용하는 것이 바람직함을 확인하였다(**표 7**).

[표 7]
저 분자량 탄소원이 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향

저분자량 탄소원	단백질 분해효소 활성(U/㎖)
대조군	3915
포도당	3367
프럭토즈	3782
갈라토즈	1155
락토스	1570
말토스	4197
설탕	3566
물엿	5884
구연산 나트륨	4772
초산 나트륨	4590
숙신산 나트륨	4219
굴루탐산 나트륨	4595

<실시예 3> 단백질 분해효소의 생산

<3-1> 단백질 분해효소의 생산 1

본 발명자들은 실시예 1에서 선별한 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주로부터 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소를 생산하였다. 구체적으로, 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주를 배양하기 위한 배지는 닭털 2.5%, 인산제이칼륨 0.2%, 구연산나트륨 0.5%, 황산마그네슘 0.5 mM, 물엿 1% 및 밀가루 1%를 함유하는 액체 배지 3 L 와 20% 탄산나트륨 용액을 각각 121℃에서 20 분간 고압 멸균하여 제조하였다. 상기 배지를 배양 직전에 탄산나트륨의 농도가 0.3% 되게 가

한 후 동일한 배지 조성으로 미리 37℃에서 24 시간 동안 플라스크에서 배양한 배양액을 100 ml을 접종하여 37℃에서 48 시간 동안 5 L 발효배양기(한국 발효기기 사)를 사용하여 배양하였다. 이때 공기의 공급 속도는 1 vvm이었고, 교반속도는 500 rpm 이었다. 12,000 g 로 20분간 원심분리하여 배양 상층액을 회수하였으며, 단백질 분해효소의 활성을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

그 결과, 상기와 같이 배양한 바실러스 서브틸리스 배양액 1 ㎖ 당 6,320 U의 단백질 분해효소 역가를 가지는 것으로 나타났다.

<3-2> 단백질 분해효소의 생산 2

상기의 실시예 <3-1>과 동일한 배지의 조성으로 바실러스 서브틸리스 균주를 48시간 동안 배양하였다. 이때 공기의 공급 속도는 1.5 vvm 이었고, 교반 속도는 500 rpm 이었다. 배양 상층액을 회수하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 상기와 같이 배양한 바실러스 서브틸리스 배양액 1 ㎖ 당 7,150 U의 단백질 분해효소 역가를 가지는 것으로 나타났다.

<3-3> 단백질 분해효소의 생산 3

상기의 실시예 <3-1>과 동일한 배지의 조성으로 48시간 동안 배양하였다. 이때 공기의 공급속도는 1.5 vvm 이었고, 교반 속도는 700 rpm 이었다. 배양 상층액을 회수하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 상기와 같이 배양한 바실러스 서브틸리스 배양액 1 ㎖ 당 8,320 U의 단백질 분해효소 역가를 가지는 것으로 나타났다.

<3-4> 단백질 분해효소의 생산 4

상기의 실시예 <3-1>의 배양 배지의 조성 중에서 닭털을 제외시키고 같은 농도의 오리털을 공급한 후 상기의 실시예 <3-3>과 같은 배양 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 회수하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 상기와 같이 배양한 바실러스 서브틸리스 배양액 1 ㎖ 당 7,780 U의 단백질 분해효소 역가를 가지는 것으로 나타났다.

<실시예 4> 단백질 분해효소 활성의 최적 조건 분석

<4-1> 단백질 분해효소 활성의 최적 pH

본 발명자들은 상기 실시예 3 에서 회수한 단백질 분해효소가 최대의 활성을 낼 수 있는 최적 pH를 알아보고자 하였다. 구체적으로, 기질 카제인을 다양한 pH를 갖는 완충제를 사용하여 제조하였으며, pH 7.5 완충용액으로는 0.1 M 인산 나트륨 완충액을, pH 8.0 내지 9.0 범위에서는 0.1 M 트리스-염산 완충액을, pH 9.5 내지 pH 12.0 범위에서는 0.1 M 글리신-NaOH 완충액을 사용하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 단백질 분해효소는 pH 8.0 내지 12.0 범위의 넓은 pH 영역에서 높은 활성을 나타냈으며, pH 9 내지 11.5에서 더 높은 효소 활성을 나타내는 광범위한 최적 활성 pH를 가지므로 전형적인 알카리성 단백질 분해효소임을 확인하였다(**도 3 참조**).

<4-2> 단백질 분해효소 활성의 최적 온도

본 발명자들은 단백질 분해효소가 활성을 나타내는 최적 온도를 알아보았다. 구체적으로, 카제인(0.5%) 을 0.1 M 글리신-NaOH 완충용액(pH 11.0)을 사용하여 제조하였으며, 온도 30 내지 80℃ 범위에서 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 단백질 분해효소 활성은 50 내지 65℃에서 활성이 높았으며 최적 온도는 60 내지 65℃ 임을 알 수 있었다(**도 4 참조**).

<실시예 5> 단백질 분해효소의 안정성 분석

<5-1> 단백질 분해효소의 계면활성제에 대한 안정성

본 발명자들은 상기 실시예 3에서 회수한 단백질 분해효소의 계면활성제에 대한 안정성을 알아보기 위하여 여러 가지 계면활성제로 처리한 후 효소의 안정성을 측정하였다. 구체적으로 트윈 및 트리톤 계열의 비온성 계면활성제와 강력한 음이온성 계면활성제인 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 1%, 2.5% 또는 5%로 처리하였을 때의 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 비이온성 계면활성제에 의해서 효소의 활성이 증가할 뿐만 아니라(**표 8**), 5%의 SDS로 48 시간 동안 처리하여도 그 활성을 80% 이상 유지하므로 SDS에 매우 안정한 효소임을 확인하였다(**도 5 참조**).

[표 8]

단백질 분해효소의 비이온성 계면활성제에 대한 안정성

비이온성	상대 활성(%)
Brij 35 1%	173.3
5%	145.2
Tween 20 1%	159.1
5%	120.1
Triton X-100 1%	166.0
5%	124.8

<5-2> 단백질 분해효소의 산화제에 대한 안정성

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스가 생산하는 단백질 분해효소가 산화제에 대해 안정성을 갖는지 알아보기 위하여, 산화제로 처리한 후 각 시간별로 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다. 구체적으로, 산화제로는 강력한 산화제로 알려진 과산화수소수(hydrogen peroxide) 및 소디움 퍼보레이트(sodium perborate)를 0.5%, 1% 또는 2.5%로 처리하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소는 5% 의 과산화수소수 또는 2.5%의 소디움 퍼보레이트로 48시간 동안 처리하여도 그 활성을 80% 이상 유지하므로 산화제에 매우 안정한 효소임을 알 수 있었다(**도 6 및 7 참조**).

<5-3> 금속이온이 단백질 분해효소 활성에 미치는 영향

본 발명자들은 바실러스 서브틸리스가 생산하는 단백질 분해효소의 금속이온에 대한 안정성을 알아보기 위하여, 다양한 금속이온을 처리한 후 효소활성을 측정하였다. 구체적으로, 단백질 분해효소에 1mM의 칼슘, 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리, 마그네슘 또는 망간을 처리한 후 효소의 활성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소의 효소 활성은 금속 이온에 의하여 영향을 받지 않음을 알 수 있었다(**표 9**).

[표 9]

금속이온이 단백질 분해효소 활성에 미치는 영향

금속이온	잔존 활성(%)
Co^{2+}	114.2
Zn^{2+}	81.3
Cr^{3+}	95.6
Mn^{2+}	92.9

Cu^{2+}	97.4
Ca^{2+}	
Mg^{2+}	97.3

<실시예 6> 바실러스 서브틸리스 균주의 배양에 의한 깃털의 분해

본 발명자들은 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조성의 배지를 제조한 후 24시간 동안 진탕 배양한 바실러스 서브틸리스 종균을 2%가 되게 접종하고, 37℃에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 이 때, 대조군으로는 동일한 배지에 균을 접종하지 않고 진탕 배양한 배양액을 사용하였다.

그 결과, 본 발명의 바실러스 서브틸리스로 접종하여 2 일간 배양한 결과 닭털이 완전하게 분해되는 것을 확인하였다(**도 8 참조**).

<실시예 7> 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소에 의한 깃털의 분해

본 발명자들은 상기 실시예 3 에서 회수한 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소의 깃털 분해 능력을 알아보기 위하여 닭털을 사용하여 닭털 분해 활성을 측정하였다. 닭털에 상기 실시예 3에서 회수한 단백질 분해효소 용액을 1 ml 당 2000 유니트로 희석한 후 37℃에서 서서히 저어 주면서 반응을 진행하였다.

그 결과, 본 발명의 단백질 분해효소로 4 일간 처리하였을 때, 효율적으로 닭털이 분해되는 것을 알 수 있었으며(**도 9 참조**), 반응 후 건조 중량을 측정한 결과 효소로 처리전의 중량과 비교하여 60% 이상의 분해율을 보였다. 이는 효소의 양이 증가할수록, 효소 처리 시간이 길어질수록 깃털 분해율이 증가하여 닭털이 효율적으로 분해됨을 나타낸다(**표 10**).

[표 10]

케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소에 의한 깃털의 분해

처리 효소 양	잔류율(%)		분해율(%)
	2 일	4 일	(4 일 간 처리)
1000 U/ml	40.3	35.3	64.7
2000 U/ml	32.2	24.7	75.3

<실시예 8> 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소에 의한 케라틴-아주르의 분해

<8-1>케라틴-아주르의 분해

본 발명자들은 상기 실시예 3 에서 회수한 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소가 일반적으로 케라틴 분해효소의 기질로 사용되는 케라틴-아주르(keratin-azure, Sigma-Aldrich 사)를 효율적으로 분해하는지를 측정하였다. 케라틴-아주르 20 mg을 2 ml 의 0.1 M 글리신-NaOH(pH 11.0) 완충용액에 가한 후 각 농도의 효소 용액 0.2 ml을 첨가하고 60℃에서 서서히 저어 주면서 반응을 진행하였다. 30 분간 반응한 후 15000 rpm에서 5 분간 원심분리하고, 상층액을 회수하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 케라틴-아주르 분해활성을 측정하였다. 이 때, 케라틴 분해효소 1 유니트(Unit, KU)는 1 분 동안에 595 nm에서 흡광도 0.01 증가에 필요한 효소의 양으로 정의하였으며, 대조군 단백질 효소로는 알칼라제(Alcalase)를 사용하였다.

그 결과, 본 발명의 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소는 케라틴 분해효소의 기질로 사용되는 케라틴-아주르를 효율적으로 분해하는 것을 알 수 있었다(**표 11**).

[표 11]
케라틴-아주르의 분해

처리 효소 양 (카제인 분해활성)	케라틴-아주르 분해활성(KU/ml)
20 U/ml	0.45
100 U/ml	1.45
200 U/ml	2.52
500 U/ml	4.27
1000 U/ml	11.53

<8-2>케라틴-아주르의 분해시 최적 활성 pH

본 발명자들은 상기 실시예 3 에서 회수한 단백질 분해효소가 케라틴 아주르를 분해할 때 최대의 활성을 낼 수 있는 pH를 알아보고자 하였다. 구체적으로, 케라틴-아주르 20 mg을 2 ml 의 0.1 M 글리신-NaOH(pH 11.0) 완충용액에 가한 후 효소 용액 0.2 ml을 첨가하고 40-70℃ 범위에서 서서히 저어 주면서 반응을 진행하였다.

그 결과, 케라틴 분해 활성은 pH 10.0 내지 11.5 범위의 pH 영역에서 높은 활성을 나타냈으며, pH 10.5 내지 11.5에서 더 높은 효소 활성을 나타내었다(**도 10 참조**).

<8-3> 케라틴-아주르의 분해시 최적 활성 온도

본 발명자들은 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소가 활성을 나타내는 최적 온도를 알아보았다. 구체적으로, 카제인(0.5%) 을 0.1 M 글리신-NaOH 완충용액(pH 11.0)을 사용하여 제조하였으며, 온도 30 내지 80℃ 범위에서 효소 활성을 측정하였다.

그 결과, 단백질 분해효소 활성은 55 내지 65℃에서 활성이 높았으며 최적 온도는 60℃ 임을 알 수 있었다(**도 11 참조**).

<실시예 9> 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 로부터 단백질 분해효소 분리 및 정제

(단계 1) 조단백질 제조

상기 실시예 <3-4>의 배양 배지의 조성으로 48 시간 동안 배양하고 배양 상층액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. 위의 조효소액에 2 배 부피의 차가운 아세톤을 서서히 가하여 준 후 4℃에서 2 시간 방치하였다. 10,000 g 로 20 분간 원심 분리하여 침전물을 회수하고 침전물을 100 ml 의 증류수에 용해하였다. 이 단백질용액을 10 kDa 의 분자량 컷오프를 갖는 투석막에 넣고 10 mM 인산 나트륨 완충용액 (pH 7.5) 에 하루 동안 투석한 후 염을 제거하고 투석액을 단계 2 에 사용하였다.

(단계 2) 디이에이이-세파로즈 이온교환 크로마토그래피

디이에이이-세파로즈 칼럼(2.5× 10 cm, 아머샴-파마시아 사)을 10 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)으로 평형시킨 후, 상기의 투석 용액을 칼럼에 부가하였다. 280 nm의 흡광도가 거의 0 이 될 때까지 동일 완충액으로 세척하였다. 디이에이이-세파로즈에 결합하지 않은 분획 중 활성 분획을 수집하여 단계 3 에 사용하였다.

(단계 3) 씨엠-세파로즈 이온교환 크로마토그래피

씨엠-세파로즈 칼럼(2.5× 5 cm, 아머샴-파마시아 사)을 20 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0)으로 평형시킨 후, 상기의 디이에이이-세파로즈 칼럼 크로마토그래피에서 얻은 분획을 칼럼에 부가하였다. 280 nm의 흡광도가 거의 0 이 될 때까지 동일 완충액으로 세척하고 20 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.5) 및 250 mM 소금을 포함하는 50 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.5) 100 ㎖ 씩을 사용하여 직선 구배 방법으로 활성 분획을 용출하고 활성도를 측정하였다.

(단계 5) SDS-PAGE를 통한 단백질 분해효소의 순수 분리 및 분자량 결정

상기와 같이 분리된 단백질 분해효소가 순수 분리되었는지 확인하고 그 분자량을 결정하기 위해, 상기에서 분리된 친화 크로마토그래피 분획을 사용하여 15% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였다. 분자량 측정용 표준단백질로는 97 kDa 크기의 포스포릴라제 b(phosphorylase b), 66 kDa 크기의 우혈청알부민(BSA), 45 kDa 크기의 난알부민(ovalbumin), 30 kDa 크기의 탄산 무수효소(carbonic anhydrase), 20.1 kDa 크기의 트립신 저해제(trypsin inhibitor) 및 14.4 kDa 크기의 알파-락트알부민(α-lactalbumin)을 이용하였다. 분자량에 대한 상대적 이동도(Rf)는 반로그(Semi-log) 좌표를 그려서 직선식을 얻고, 이 직선식으로부터 정제한 단백질 분해효소 소단위의 분자량을 측정하였다.

그 결과, 약 28-30 kDa 위치에서 순수한 밴드를 나타냄으로써 단백질 분해효소 활성을 갖는 단백질이 순수하게 정제되었음을 확인하였다(**도 11** 참조).

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 신규한 바실러스 서브틸리스 sp. PL-1 균주 및 상기 균주로부터 생산되는 케라틴 분해 활성을 갖는 단백질 분해효소는 비이온성 및 음이온성 계면활성제, 산화제 및 중금속에 매우 안정한 효소로서, 의류용 또는 콘택트 렌즈용 세제의 성분, 식품, 사료, 직물, 천연가죽 등의 가공 및 유기 폐기물의 처리 등 다양한 산업적 용도로 유용하게 사용될 수 있고 닭털, 오리털을 포함하는 가금류의 깃털을 완전하게 분해함으로써, 가금 산업으로부터 발생되는 깃털을 편리하고 낮은 비용으로 처리하는 데 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) PL-1 균주(수탁번호 : KCTC 10764BP).

청구항 2.

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 의 배양에 의해 얻어지고, 하기 (a) 내지 (e)의 특징을 가지는 단백질 분해효소.

(a) 비이온성 및 음이온성 계면 활성제의 존재 하에서 안정;

(b) 산화제의 존재 하에서 안정;

(c) 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리 및 망간 등 중금속의 존재 하에서 안정;

(d) 최적산도 pH 9.5 내지 pH 12.0;

(e) 최적온도 50 내지 65℃.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 케라틴을 분해하는 것을 특징으로 하는 분해효소.

청구항 4.

제 1항의 균주를 배양하여 단백질 분해효소를 대량으로 생산하는 방법.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 방법은 i) pH 7.0 내지 pH 12.0의 산도, ii) 25 내지 45℃의 배양온도, iii) 20 내지 96 시간의 배양시간, iv) 0.5 내지 1.5 vvm의 통기조건, v) 0.1 내지 5%의 유기 질소원, vi) 0.1 내지 5%의 탄소원 조건 하에서 제 1항의 균주를 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 유기 질소원은 깃털, 우모분, 카제인, 탈지분유, 유청, 면실박, 대두박 및 펩톤 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 깃털은 우모분, 오리털 및 닭털 등으로 구성되는 가금류 깃털 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 유기 질소원.

청구항 8.

제 5항에 있어서, 탄소원은 물엿, 말토스, 고구마 전분, 옥수수 전분, 밀가루, 구연산 나트륨, 초산 나트륨 및 숙신산 나트륨으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 2항의 단백질 분해효소를 포함하는 의류용 또는 콘택트 렌즈용 세제.

청구항 10.

제 2항의 단백질 분해효소를 이용하여 식품, 사료, 직물, 천연 가죽을 가공하는 방법.

청구항 11.

제 2항의 단백질 분해효소를 이용하여 유기 폐기물을 분해하는 방법.

청구항 12.

제 2항의 단백질 분해효소를 이용하여 가금류 깃털을 분해하는 방법.

청구항 13.

제 1항의 균주를 이용하여 가금류 깃털을 분해하는 방법.

청구항 14.

제 12항 또는 13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 가금류 깃털은 오리털 및 닭털인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

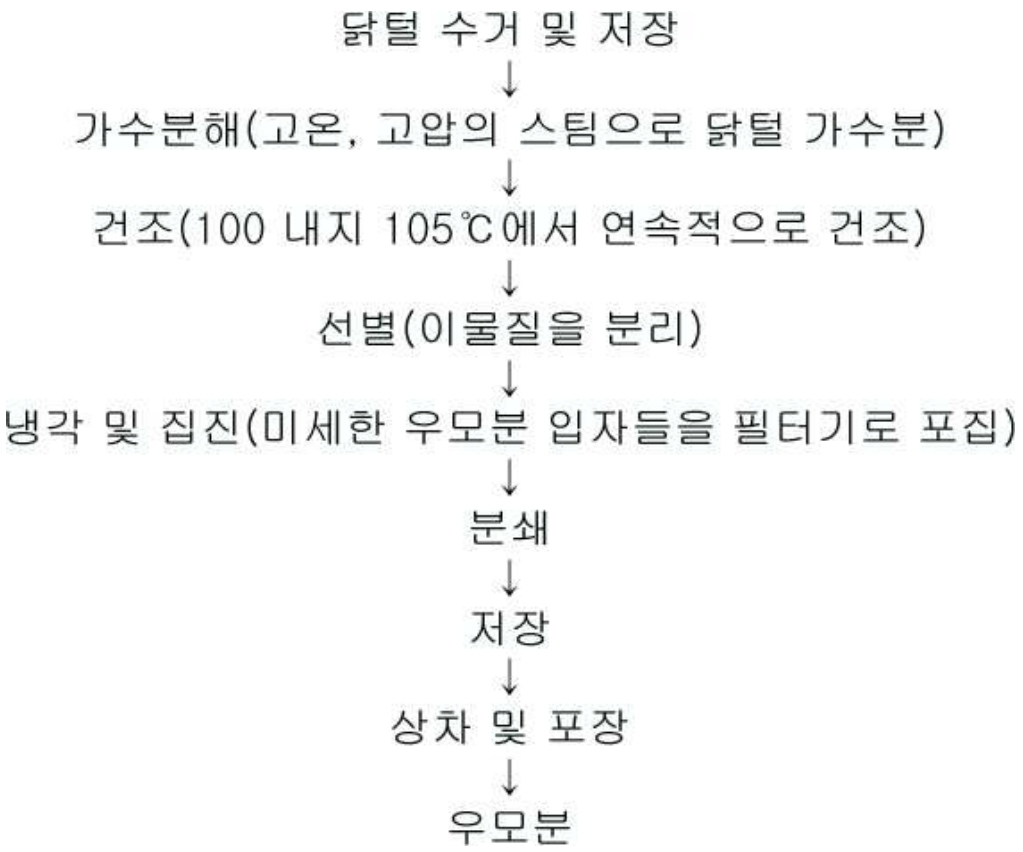
제 12항 또는 13항 중 어느 하나의 항의 방법에 의하여 생성된 깃털 분해 산물을 함유하는 가축 사료.

청구항 16.

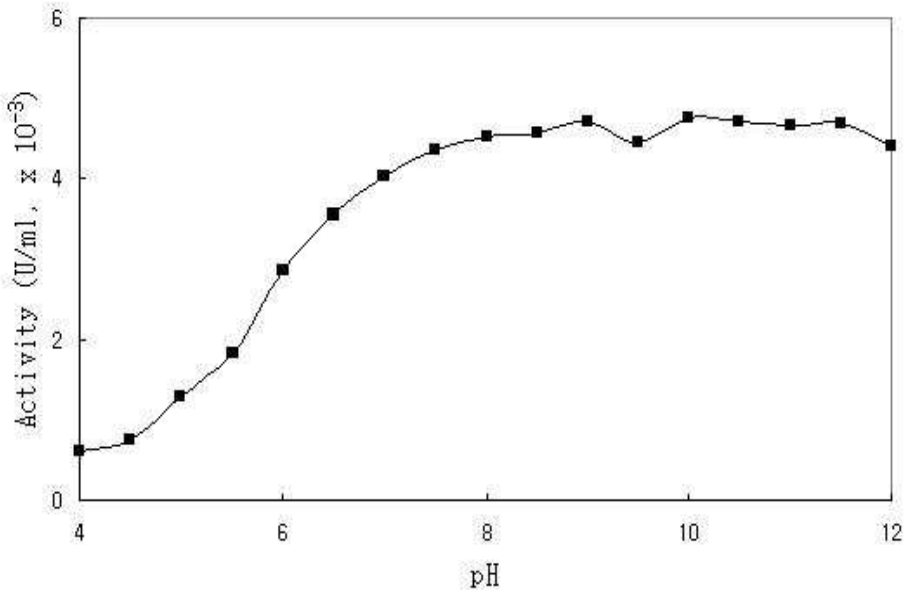
제 12항 또는 13항 중 어느 하나의 항의 방법에 의하여 생성된 깃털 분해 산물을 함유하는 비료.

도면

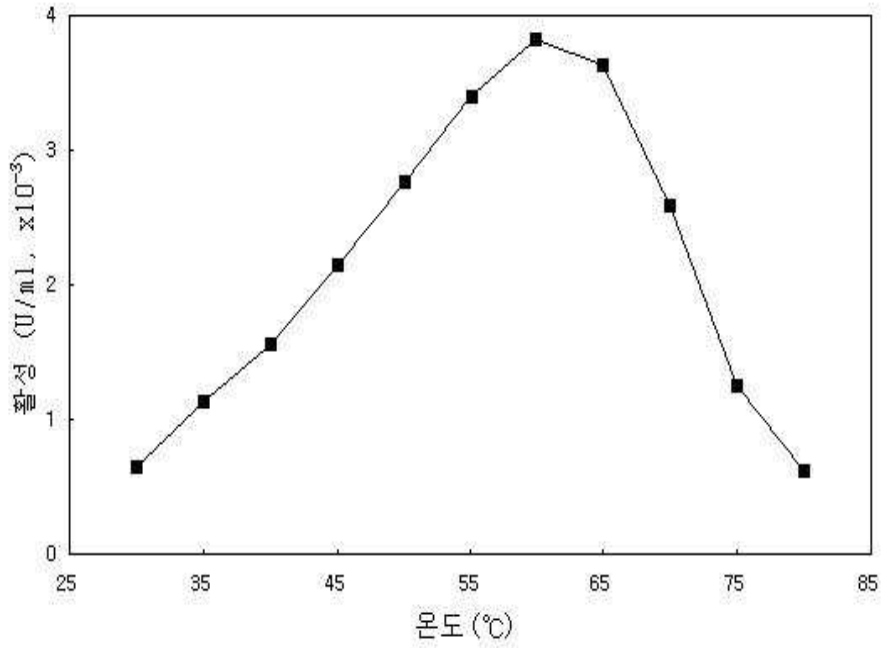
도면1



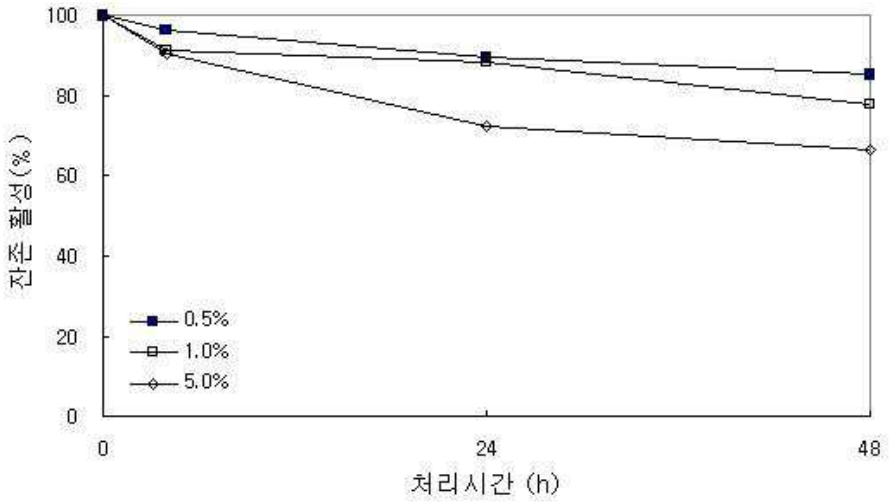
도면2


Activity (U/ml, x 10-3)
0
2
4
6
4
6
8
10
12
pH

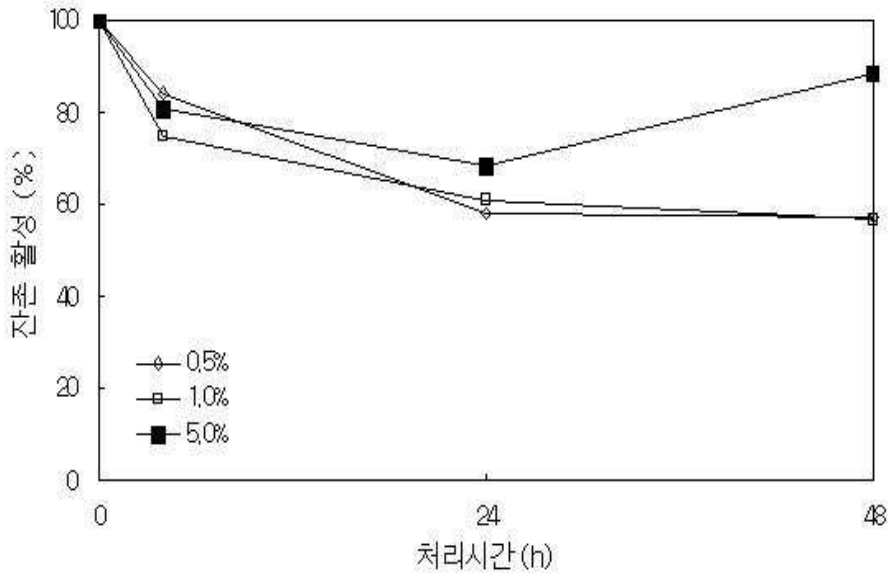
도면3


활성 (U/ml, x10-3)
0
1
2
3
4
25
35
45
55
65
75
85
온도 (℃)

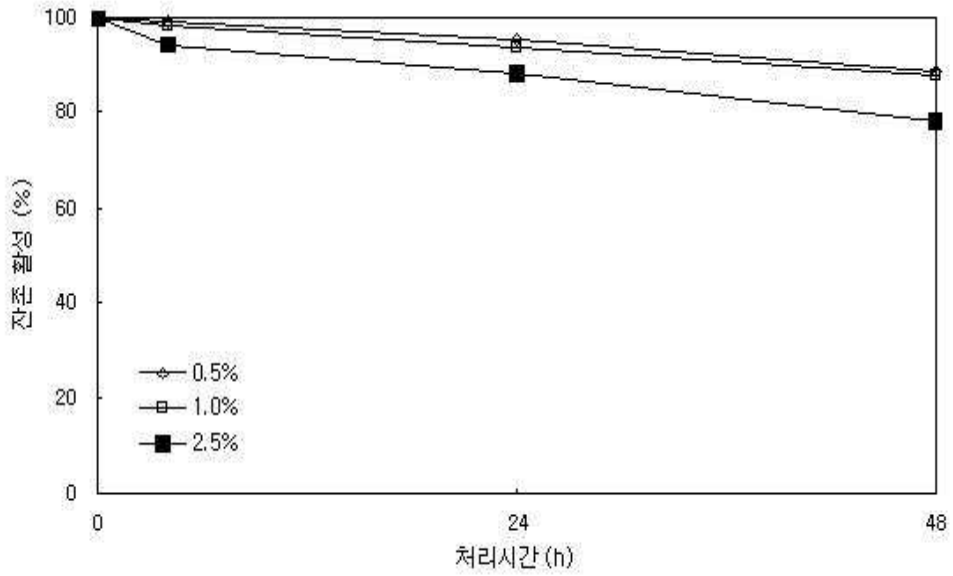
도면4


100
80
60
40
20
0
잔존 활성(%)
0.5%
1.0%
5.0%
0
24
48
처리시간 (h)

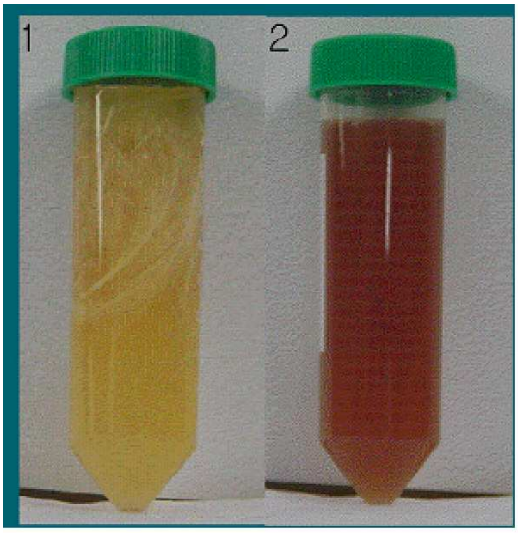
도면5


100
80
60
40
20
0
잔존 활성 (%)
0.5%
1.0%
5.0%
0
24
48
처리시간(h)

도면6



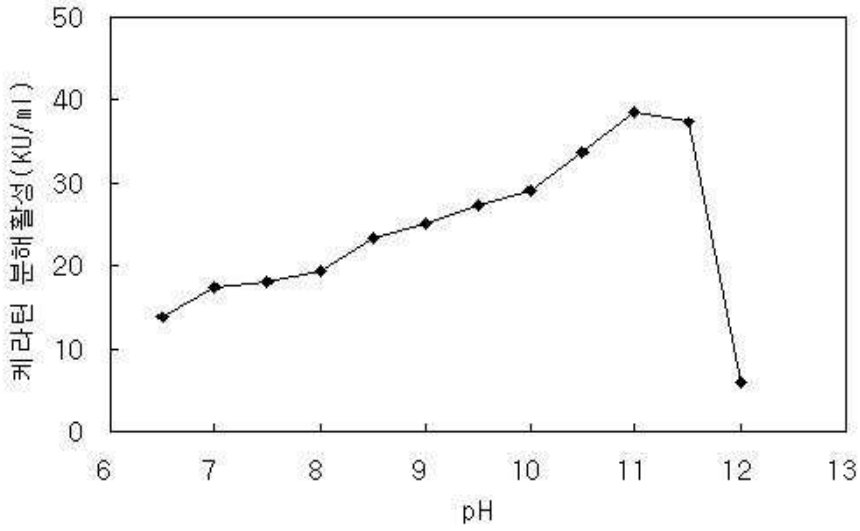
도면7



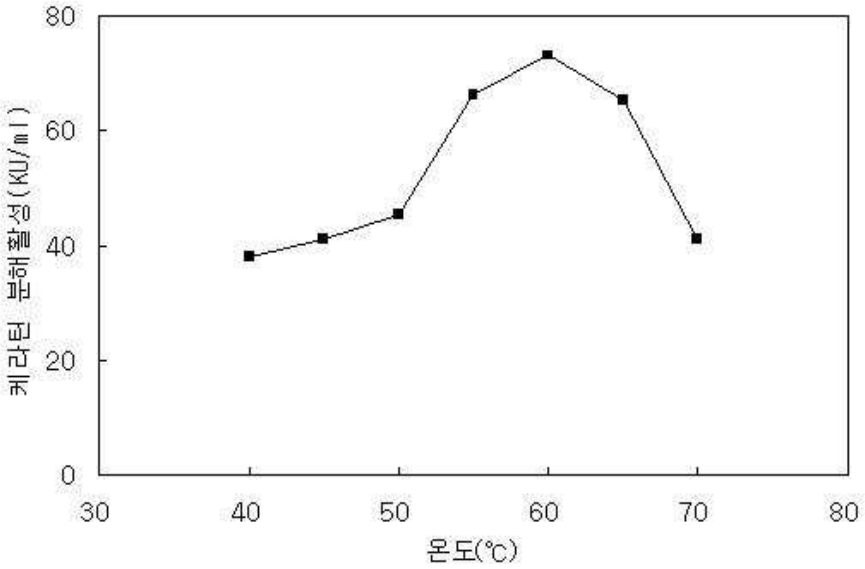
도면8



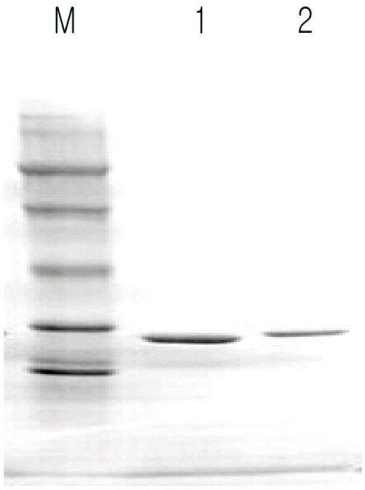
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> INHA UNIVERSITY

<120> Bacillus subtilis PL-1 having keratinolytic activity and the protease therefrom

<130> 4p-12-59

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 804
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis PL-1 16S rDNA

<400> 1
gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcgga cagatgggag cttgctccct 60

gatgttagcg gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga ctgggataac 120

tccgggaaac cggggctaat accggatgct tgtttgaacc gcatggttca aacataaaag 180

gtggcttcgg ctaccactta cagatggacc cgcggcgcat tagctagttg gtgaggtaac 240

ggctcaccaa ggcaacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcggccac actgggactg 300

agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag 360

tctgacggag caacgccgcg tgagtgatga aggttttcgg atcgtaaagc tctgttgtta 420

gggaagaaca agtaccgttc gaatagggcg gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca 480

cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggaatta 540

ttgggcgtaa agggctcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac 600

cggggagggt cattggaaac tggggaactt gagtgcagaa gaggagagtg gaattccacg 660

tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt 720

ctgtaactga cgctgaggag cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag 780

tccacgccgt aaacgatgag tgct 804