(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0130837
(43) 공개일자 2009년12월24일

(51) Int. Cl.
C12P 21/00 (2006.01) *C12N 9/50* (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0053605
(22) 출원일자 2009년06월16일
심사청구일자 2009년06월18일
(30) 우선권주장
1020080056176 2008년06월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
김현수
대구 달성군 다사읍 죽곡리 강창하이츠 101동 1702호
박성민
대구광역시 수성구 사월동 시지푸르지오 105동 806호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

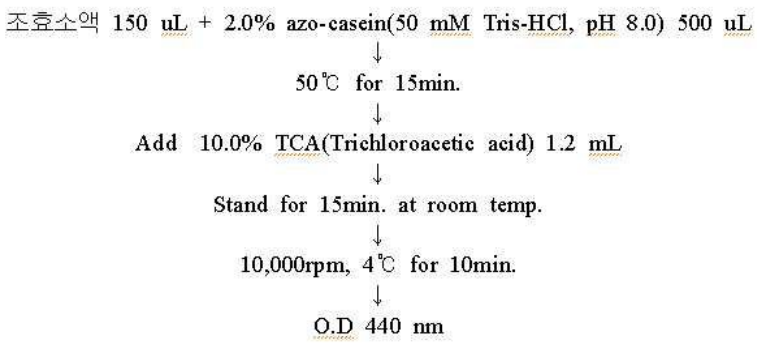
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 케라틴 분해 효소의 생산방법 및 그 효소의 각질 제거제로서의 용도

(57) 요 약

본 발명은 *Bacillus subtilis (B. subtilis)* 유래의 케라틴분해효소의 대량 생산방법과 그 효소의 각질 제거제로서의 용도를 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김민희

경상북도 상주시 청리면 삼괴2리 524

고희선

대구광역시 달성군 다사읍 서재리 화진금봉타운 103동 1402호

정혁준

대구광역시 달성군 화원읍 구라리 1650번지 대곡역 래미안아파트 108동 403호

조성복

대구광역시 달서구 호산동 711번지 대구테크노파크 벤처공장 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R-12-2001-044
부처명	산업자원부 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터
연구사업명	지역혁신센터사업
연구과제명	단백질 분해 효소를 함유하는 각질 제거제의 개발
주관기관	계명대학교
연구기간	2007년 5월 1일 ~ 2008년 2월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

글루코스 1.0g/L, K_2HPO_4 7.0g/L, KH_2PO_4 2.0g/L, Soybean meal 12.0g/L의 증류수에 용해하고 pH 7.0으로 조정한 다음 *Bacillus subtilis* SMMJ-2(KACC 91390P)의 전배양물 2중량%를 소포제와 함께 접종하여 30℃, 200rpm 통기량 2L/min에서 5일간 배양하여 분자량 17.8 kDa의 케라틴분해 효소(keratinase)의 대량생산방법.

청구항 2

제1항의 기재의 방법으로 얻은 케라틴분해 효소(keratinase)의 화장품의 각질제거제로서의 용도.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 케라틴분해효소의 대량생산방법 및 그 효소의 각질제거제로서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 인간의 삶의 질이 향상됨에 따라 피부 미용에 관한 관심은 남녀노소의 기본적인 욕구가 되어가고 있다. 이 같은 시대적 요구에 부응하여 다양한 기능성을 함유하는 많은 종류의 화장품이 제조되고 있으며 그 중에서도 보편적으로 사용되고 있는 각질제거제는 합성화학제품만이 아니라 천연의 효소를 함유시킨 기능성 제품의 개발 및 판매도 증가하고 있다.

<3> 최근 웰빙 생활을 위한 소비 패턴이 점차적으로 친환경적인 천연추출물 내지 효소를 첨가한 효소제품으로 바뀌면서 그 수요가 증가하고 있으나 천연추출물의 경우 효소의 역가가 낮은 파파인 추출물 또는 파인애플 추출물을 사용하고 있어 소비자의 높은 기대치에 부응하기에는 부족한 점들이 많다.

<4> 미생물이 생산하는 효소 및 천연추출물의 효소를 분리 정제하여 직접 효소를 첨가하여 제조한 제품의 경우 수입 화장품이 주를 이루고 있으며 이들의 가격은 정제되지 않은 천연추출물을 사용하여 제품화한 국내 제품과 비교할 때 고가를 형성함으로써 필요 이상의 외화의 유출이 발생되고 있다.

<5> 본 발명은 미생물이 생산하는 높은 활성의 케라틴 분해효소를 첨가한 각질첨가제를 개발함으로써 소비자들의 기대치에 부응하는 제품을 제조하고자한다.

<6> 또한 본 발명은 지난 수년간 케라틴(keratin) 분해에 대하여 높은 효소 역가를 나타내는 균주를 검색하여 특성 및 생산조건을 검토한 결과(Park, et al., 2006, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34 : 7-14 ; Park, et al., *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34 : 150-157)를 바탕으로 하여 케라틴 분해효소를 대량생산하였다.

<7> 효소의 대량생산은 효소의 특성에 관한 선행 연구를 기반으로 대량생산 기술을 개발하고, 산업화를 위한 제품개발은 제조된 효소를 이용하여 각질을 제거하는 peeling gel을 제조함으로 파파인 또는 파인애플 추출물을 이용하여 제조하는 기존의 국내 제품과 차별화 된 제품의 생산을 유도하고 더불어 고가의 수입화장품을 대체할 수 있는 제품을 생산할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명은 종래의 연구결과에서 공지된 케라틴 분해효소를 생합성하는 미생물의 대량 배양방법 및 그 효소의 분리, 정제를 기초로 하여 산업화를 위한 상기 효소의 최적 생산 조건을 규명하고 대량배양에서의 효소 역가를 확인하는 것을 그 목적으로 한다.

과제 해결수단

<9> 본 발명의 상기 목적은 최적 생산배지에서 효소역가에 대한 전배양의 접종량과 통기량의 영향을 검토하

였고 5 L용량의 jar-fermentor를 이용하여 대량생산에서의 효소역가를 확인하므로써 달성하였다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 산업화를 위한 효소의 최적 대량생산 조건을 확립하고 5 L 및 70 L fermentor를 사용하여 대량배양을 한 후 Keratinase의 회수와 농축을 위해 연속 원심분리기와 ultrafiltration을 사용하여 효소활성을 확인하므로서 달성 하였다.

<11> 본 발명의 또 다른 목적은 ultrafiltration과 동결건조를 이용하여 농축방법에 따른 효소의 잔존활성을 확인하는 데 있다.

<12> 본 발명의 또 다른 목적은 제품화를 위한 베이스물질을 탐색하고 효소를 함유한 베이스의 각질제거 효과와 효소의 안정성에 대하여 조사하고 각질제거제에 첨가할 조정제 효소액의 적정 함량을 결정하여 Test용 각질제거제를 제조한 다음 시험함으로써 달성하였다.

효 과

<13> 본 발명은 일정 수준 이상의 케라틴분해 효소 활성을 나타내는 제품을 생산하는 효과가 있고 소비자는 자신이 원하는 효과를 얻을 수 있으며 또한 국내에서 생산되는 기존제품을 대체 할 수 있어 수입품 사용에 따른 불필요한 외화의 유출을 방지 할 수 있다. 또 케라틴분해 효소의 생산을 위한 배양학적 연구와 효소의 특성에 관한 연구가 완료된 기술을 사용함으로 개발 시 소요되어지는 금전적 그리고 시간적 낭비를 줄일 수 있으며 확립되어진 기술을 이용하여 사업화 할 수 있는 기회도 제공할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 화장품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<14> 본 발명의 구체적인 내용은 하기 실험 및 실시예에 따라 상세히 설명하였다.

<15> **사용균주**

<16> 본 실험의 공시균주는 기존의 연구에서 keratinolytic protease(이하 keratinase) 생산균으로 분리되어 API 20E와 CHB 50kit로 동정된 *Bacillus subtilis* SMMJ-2를 LB (tryptone 1 g, yeast extract 0.5 g, sodium chloride 1 g, agar 15 g/L, pH 7.0)배지에 2주마다 계대하여 4℃에 보관하며 사용하였다.

<17> **Keratinase 및 protease 생산능 조사**

<18> 상기 공시균주의 keratinase 및 protease 생산능을 조사하기 위해 2% whole chicken feather keratin agar plate와 5% skim milk agar plate에 획선접종하고 30℃에서 1일간 배양하여 clear zone의 형성을 관찰하였다.

<19> **Keratinase의 측정 방법**

<20> Keratinase의 활성측정은 azo-casein을 기질로 이용하는 Sangali 등 (2000)의 방법을 이용하였다(도 1).

<21> **실시예 1. : 5 L Jar-fermentor에서 keratinase의 대량 생산**

<22> 산업화를 위한 효소의 대량생산을 목표로 jar-fermentor(Korea Fermentor Co., LTD)를 이용하여 대량배양을 시도하였다.

<23> 효소생산을 위한 전배양은 LB broth(tryptone 1 g, yeast extract 0.5 g, sodium chloride 1 g/L, pH 7.0)에 공시균을 1 백금이 접종하고 30℃에서 180rpm으로 12hr 배양하였다.

<24> 선행연구 결과에 따라 전배양 5%를 2.5 L의 본배양 배지(표 1)에 접종하고 30℃, 200rpm, 1 L/min의 aeration에서 5일 동안 배양하였다. 1, 2, 3, 4, 5일 각 sampling하여 효소의 역가를 측정하고 삼각플라스크에서 100 mL의 본배양과 효소활성을 비교하였다.

<25> **표 1. 케라틴분해효소의 생산배지조성**

Fructose	1.0 g
K_2HPO_4	7.0 g
KH_2PO_4	2.0 g
Soybean meal	12.0 g
Distilled water	1,000 ml
pH	7.0

<26>

<27> **[실험 1] Keratinase의 대량 생산에 미치는 통기량(aeration)의 영향**

<28> 본 발명의 대량배양에서의 효소활성을 높이기 위한 조건을 조사하기위해 다른 형태의 배양플라스크를 이용하여 배양함으로써 통기량의 영향을 검토하였다(도 2참조).

<29> 실험방법은 본배양(100 mL)에 전배양물 5%를 접종하여 30℃, 200rpm에서 4일간 배양하면서 효소활성을 조사하였다.

<30> **[실험 2] Keratinase의 대량 생산에 미치는 접종량의 영향**

<31> 본 발명 대량배양에서의 효소활성을 높이기 위한 조건을 조사하기 위해 전배양물의 접종량을 달리하여 배양함으로써 Jar-fermenter배양시 최적접종량을 검토하였다.

<32> 본배양 100 mL에 전배양물 2%를 접종하여 30℃, 200rpm에서 4일간 배양하면서 효소활성을 조사하였다.

<33> 배양플라스크는 상기 실험예 1에서 사용한 3가지의 다른 형태의 플라스크를 모두 사용하였다.

<34> **[실험 3] 5 L Jar-fermentor배양에서 keratinase생합성에 미치는 접종량과**

<35> **통기량의 영향**

<36> 본 발명의 산업화를 위한 효소의 대량생산공정에서 생산배지의 조성을 fructose에서 glucose로 대체하여 배지원료의 비용을 절감하였다.(표 2). 선행연구에서 glucose와 fructose의 효소활성 차이가 크지 않았으므로 대체조성으로 적절하다고 판단하였다.

<37> 본배양 2.5 L에 전배양물의 최적 접종량을 접종하고 효소생산에 대한 통기량의 영향을 검토한 결과를 바탕으로 공기주입량을 1 L/min 또는 2 L/min으로 조절하여 30℃, 200rpm에서 5일간 배양하며 효소활성을 조사하였다.

<38> 사용기기는 5 L jar-fermentor(Korea Fermentor Co., LTD)를 사용하였다.

<39> **표 2. 케라틴분해효소의 변경된 생산배지조성**

Glucose	1.0 g
K_2HPO_4	7.0 g
KH_2PO_4	2.0 g
Soybean meal	12.0 g
Distilled water	1,000 mL
pH	7.0

<40>

<41> **[실험 4] Ultrafiltration을 이용한 keratinase 회수**

<42> 본 발명 keratinase의 분자량은 17.8 kDa로 확인되었다.

<43> 5 L Jar-fermentor에서 2.5 L의 keratinase 생산배지에 SMMJ-2 전배양물 2%를 접종하여 180rpm, 30℃, aeration 2 L/min에서 배양하였다. Antifoam emulsion(Dow corning Co. DB-110A, 실리콘소포제)은 5배 희석하여 사용하였다.

<44> 배양 3일후 배양액을 회수하고 buchner funnel과 filter paper(Whatman Co.)를 이용하여 1차 여과한 후, high speed centrifuge(Hanil Science Industries Co., LTD)로 8,000rpm, 20min동안 원심분리하여 잔여균체 및 배지성분을 2차로 제거하였다.

<45> 회수된 배양액으로부터 keratinase를 농축회수하기 위하여 ultrafiltration membrane(NMWL : 10,000, Millipore Co.)을 이용한 stirred ultrafiltration cell(Millipore Co.)을 사용하였다.

<46> **[실험 5] Test용 제품제작 및 blind test**

<47> 본 발명 단백질 분해효소(keratinase)를 첨가한 본 발명에 각질제거제를 개발하기 위하여 test용 제품을 제작하였다. 화장품시료로는 최근 새롭게 개발된 화장품팩 시료인 나노점토입자 NCP(Nano Clay P, (주)WB신소재)를 구입하여 사용하였다.

<48> Test용 제품제작은 NCP 15 mL에 효소 4 mL(950units)를 첨가하여 플라스틱튜브에 담아서 사용하였다. 20명을 대상으로 동량을 한쪽 손등에 고르게 바르고 5분 후 물로 깨끗이 씻어낸 뒤 손등의 촉감을 NCP만 포함되어있는 제품을 바른 다른 한쪽 손등과 비교하게 하였다. 공정성을 위해 각 시료에 peppermint oil 원액을 10배 희석하여 0.5 mL씩을 첨가함으로써 효소 고유의 향을 구분하지 못하게 하였으며 test제품의 설명을 하지 않고 시행하였다.

<49> 또한, 실험에 참가하지 않았던 사람에게 실험참가자들의 손등을 만지게 하고 더 부드러운 손을 결정하게 하였다.

<50> **[실험 6] 각질제거제에 첨가된 효소의 잔존활성 조사**

<51> 본 발명 각질제거제시 제품에서 효소의 존재 상태와 효소활성의 안정성을 확인하기위하여 test용으로 제작된 각질제거제 0.1 mL를 증류수 0.9 mL에 현탁하여 14,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하고 상등액과 침전물을 분리하였다. 분리된 침전물은 다시 증류수 0.9 mL에 현탁하고 동일한 방법으로 상등액을 분리하였다. 분리된 각 상등액으로부터 keratinase의 활성을 확인하였다. 효소가 첨가되지 않은 제품은 동일방법으로 처리하여(control)로 사용하였다.

<52> **실시예 2 : 70 L fermentor에서 keratinased의 대량 생산**

<53> 70 L fermentor(Innobio Co.)에서 SMMJ-2 전배양물 2%를 접종한

<54> 40 L keratinase 생산배지를 배양하였다. 배양조건은 aeration 20 L/min, 100rpm, 30℃이며 antifoam emulsion(Dow corning Co. DB-110A, 실리콘소포제)은 5배 희석하여 사용하였다.

<55> 소포제의 투입은 fermentor의 멸균이 종료 된 후 소포제 투입용기에 투입하였다.

<56> 배지를 멸균할 때, soybean meal은 타는 것을 방지하기위해 삼각플라스크에 따로 멸균하여 fermentor의 멸균이 종료 된 후 투입하였다.

<57> 효소활성의 증가를 목적으로 두 번째 70 L fermentor배양은 aeration 35 L/min로 조절하여 수행하였다.

<58> 회수된 총 배양액은 최대 volume 8 L의 front open tubular separator(Hanil Science Medical Equipment Co., LTD)를 이용하여 9,000rpm으로 연속 원심분리하였다. 배양액은 peristaltic pump(BSP-7019)를 사용하여 원심분리기에 연속적으로 주입하였다.

<59> 원심분리 후, 상등액은 20 L플라스틱용기에 담아 4℃에 보관하고, 배양상등액 6 L는 ultrafiltration(superane bus-200, Sunkyong industries)으로 농축하여 첨가효소로써 제품생산을 위한 각질제거제에 사용하였다.

<60> **[실험 7] 배양상등액의 동결건조농축과 활성조사**

<61> 본 발명 효소의 안정성을 높이고 효소농축 시간의 감소를 위하여 동결건조를 하였다.

<62> 배양상등액 100 mL를 라운드플라스크에 담아 입구를 막은 후, 약간 기울인 상태로 80 ℃ ultra-low temperature freezer(Sanyo Co.)에 24시간 동결하고, 진공상태가 된 동결건조기(Eyela Co.)에 연결하여 48시간 동안 동결건조하였다.

<63> 동결건조된 시료의 무게를 측정하고 회수된 시료 0.2 g을 증류수 1 mL에 현탁시켜, keratinase 활성측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

<64> **Keratinase 생산균주의 동정**

<65> 본 발명 공시균주 *Bacillus subtilis* SMMJ-2의 전자현미경(SEM)관찰시 도 3과 같다. 상기 균주는 2008년 8월 20일 농업생명공학연구원에 기탁번호 KACC 91390P로 기탁하였다.

<66> **Keratinase 및 protease 생산능 확인**

<67> 본 발명 공시균주 *Bacillus subtilis* SMMJ-2은 keratinase 및 protease생산능을 확인하기 위한 2% whole chicken feather keratin agar plate와 5% skim milk agar plate에서 뚜렷한 clear zone을 형성하였다(도 4참조).

<68> **5 L Jar-fermentor에서 keratinase의 생산**

<69> Keratinase의 대량생산을 위해 jar-fermentor배양과 삼각플라스크배양의 효소활성을 비교한 결과 jar-fermentor에서의 최대효소활성은 47.4 units/mL이며, 삼각플라스크에서의 최대효소활성 87.3 units/mL로 확인되었다(도 5참조).

<70> 효소활성을 증가시키기 위하여 fermentor배양시 조절 가능한 공기주입량과 최적 접종량의 조절이 필요하다고 판단되었다.

<71> **Keratinase의 생산에 대한 통기량의 영향 확인**

<72> Jar-fermentor 배양시 효소생산에 미치는 공기주입량의 영향을 조사하기위하여 다른 형태의 배양플라스크를 이용하여 배양한 결과, 대체로 배양 3일째 높은 효소활성을 나타내었다. 특히, 배양액과 공기의 접촉이 크게 일어나는 baffle flask에서 93.1 units/mL로 가장 높은 효소활성을 확인하였다(도 6). 따라서 통기량의 증가가 효소활성 증대에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

<73> **Keratinase의 생산에 대한 접종량의 영향**

<74> 본 발명 대량배양에서의 효소활성을 높이기 위해 실험과 다르게 전배양 2%를 위에 언급된 3가지 다른 형태의 플라스크에 접종하여 30℃, 200rpm에서 5일간 배양한 결과 keratinase의 효소활성은 도 7과 같았다. 전배양물 5%를 접종하여 배양한 결과(도 6)와 비교하여 상당히 높은 활성을 나타내었으며, baffle flask에서 배양 2일째 101 units/mL로 가장 높은 효소활성을 확인하였다.

<75> 따라서 전배양의 최적접종량은 2%로 결정하였다.

<76> **5 L Jar-fermentor배양에서 keratinase에 대한 접종량과 통기량의 영향 확인**

<77> 본 발명 본배양 2.5 L에 전배양 최적접종량 2%를 접종하고 30℃, 200rpm, aeration 2 L/min로 조절하여 jar-fermentor에서 배양하고, 전배양 접종량 5%, aeration 1 L/min조건에서의 배양과 비교하였다.

<78> 5 L fermentor에서 접종량과 통기량의 영향을 확인한 결과, 접종량 2%, aeration 2 L/min의 조건에서 배양 5일째 93.2 units/mL의 가장 높은 효소활성을 확인하였다(도 8).

<79> Keratinase의 대량생산을 위한 최적배지의 재확인을 위하여 전배양 최적 접종량 2%, aeration 2 L/min의 조건으로 jar-fermentor에서 7일 동안 대량배양을 한 결과 배양 5일째 93 units/mL 로 가장 높은 효소활성을 보였다(도 9).

<80> 배양 4일째의 효소활성은 소포제가 첨가된 직후, sampling되어 효소활성의 저해가 확인되었다.

<81> **Ultrafiltration을 이용한 keratinase 회수**

<82> 5 L Jar-fementor에서 3일간 배양된 2.5 L keratinase배양액을 여과한 후 17.5 kDa의 keratinase를 농축하기 위하여 ultrafiltration membrane(NMWL : 10,000, Millipore Co.)을 이용한 stirred ultrafiltration cell(Millipore Co.)을 사용하여 100 mL의 농축액을 회수하였다(표 3).

<83> 2.5 L배양의 총효소활성은 158,750 units이며, 농축된 배양액 100 mL의 총효소활성은 41,760 units로 26.3%의 효소잔존활성을 나타내었다.

<84> **표 3. Keratinase activity of concentrated enzyme solution and culture broth.**

Culture / Values	Incubation time(days)			Ultrafiltration (M.W. 10,000cut)
	1	2	3	
Keratinase activity (Units/mL)	12.5[a]	59	63.5	417.6[b]

<85>

<86> [주] a ; Total quantity - 2.5 L., b ; Total quantity - 100 mL

<87> **본 발명 Test용 제품제작 및 blind test 결과**

<88> 단백질 분해효소(keratinase)를 첨가하여 본 발명 각질제거제의 개발을 위해 50 units/mL의 농도로 test용 제품을 제작하여 20명에게 blind test한 결과 효소가 첨가된 제품을 바른 손등에서 더 부드러움을 느낀다고 답하였다. 또한 물로 씻은 후 매끈함과 부드러움이 조금 더 오래 지속된다는 의견을 내었다.

<89> 피실험 참가자가 효소를 첨가한 제품을 바른 실험참가자의 손을 선택한 것으로 보아 단백질 분해 효소를 첨가한 각질제거제의 효과를 확실히 알 수 있었다.

<90> **본 발명 각질제거제에 첨가된 효소의 잔존활성 확인**

<91> 본 발명 각질제거제 시제품에서 0.1 mL를 조효소로써 사용하고 keratinase 활성을 측정한 결과, 효소를 첨가했던 test용의 상등액에서만

<92> 5 units/mL의 활성이 확인되었다.

<93> Test sample로 제작한 제품의 NCP 1 mL당 첨가된 효소활성은 50 units이므로 NCP 0.1 mL에서 측정된 keratinase 5 units의 활성은 그 자체로 안정하게 존재하는 것을 확인하였다(표 4).

<94> **표 4. 케라틴분해효소의 활성**

	Keratinase activity (Units/mL)	
	Supernatant	Pellet
Control	0*	0
Test sample	5	0

<95>

<96> [주] ; Control means only NCP sample without keratinase addition.

<97> **본 발명 각질제거제에 첨가할 효소의 안정성 확인**

<98> 농축된 keratinase의 활성을 측정하기위하여 희석할 때 사용되는 용매가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2차 증류수와 50 mM Tris buffer를 이용하여 희석하고 효소활성을 비교한 결과, 용매의 영향이 크지 않음을 확인하였다(표 5).

<99> **표 5. 케라틴분해효소의 활성비교(정제수와 50mL Tris-HCl buffer)**

Dilution solvent	D.W	50 mM Tris-HCl buffer
Keratinase activity (Units/mL)	417.6*	402

<100>

<101> [주] ; Concentrated enzyme solution was diluted by 50 times with water and 50mM Tris-HCl buffer

for measuring keratinase activity.

<102> D.W means distilled water.

<103> **70 L fermentor에서 생산된 keratinase 활성 확인**

<104> 70 L fermentor에서 통기량(aeration)을 20 L/min와 35 L/min로 조절하여 배양한 결과, aeration 35 L/min의 조건에서 배양 1일째부터 효소활성이 2배가량 증가(표 6)하였으나 소포제를 재투입한 배양 3일째 효소활성의 감소를 보였다. 두 번의 배양에서 소포제의 총 투입량은 약 300 mL였다.

<105> 배양상등액 6 L의 총효소활성은 91,200 units이며 250 mL로 농축된 배양액의 총효소활성은 57,275 units로 효소잔존활성은 63%를 나타내었다.

<106> **표 6. 케라틴분해효소 활성(70L 발효조)**

Incubation time(days) / Aeration(L/min)	1	2	3	4
20	12.5*	15.7	24.2	25.6
35	24.0	26.8	22.2	20.3

<107>

<108> [주]* ; Keratinase activity(Units/mL)

<109> **배양상등액의 동결건조농축과 활성확인**

<110> 동결건조된 시료의 무게는 1.15 g으로 시료 0.2 g을 증류수 1 mL에 현탁시키고 10배, 20배 희석하여 keratinase 활성을 측정한 결과, Table 7과 같았다. 사용된 배양액 100 mL의 총효소활성 1,520 units와 비교하였을 때, 1,472 units로 97%의 효소잔존활성을 가진다.

<111> **표 7. 동결건조한 케라틴분해효소의 활성**

Sample	Culture broth	Freeze dried sample	
		10*	20
Activity(Units/mL)	15.2	256	274

<112>

<113> [주]* ; Dilution factor

<114> 이상 설명한 바와 같이, 각질제거제에 첨가하는 효소를 지속적으로 공급하기위한 대량생산의 조건을 조사한 결과 jar-fermentor를 이용한 keratinolytic protease생산의 효소활성을 확인하였다. 이로써 대량배양에서 각질제거제에 첨가할 조정제 효소액의 적정 함량을 결정할 수 있는 가능성을 확인하였다.

<115> 또, 각질제거제에 첨가하는 효소를 지속적으로 공급하기위한 대량생산의 조건을 확립하였고 fermentor를 이용한 keratinase 대량생산 기술을 구축하였다. 대량배양에서 각질제거제에 첨가할 농축된 조정제 효소액의 적정 함량을 50 units/mL로 결정하였다. Blind test의 긍정적인 결과 제품화의 가능성을 확인되게 되었다.

산업이용 가능성

<116> 본 발명은 각질제거에 뛰어난 효과가 있으므로 화장품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<117> 도 1은 케라틴분해 효소의 분석방법을 그린 다이어그램이다.

<118> 도 2는 본 발명 공시균주의 통기량을 확인하기 위한 다양한 모양의 플라스크를 보인 그림이다.

<119> 도 3은 본 발명 공시균주 *Bacillas subtilis* SMMJ-2의 전자현미경 사진도이다.(×30,000)

<120> 도 4는 본 발명 공시균주 *B. subtilis* SMMJ-2 균주의 Keratinase 및 protease 생산 등을 보인 clear zone 형성을 나타낸 사진이다.

<121> 도 5는 본 발명 공시균주 5 L Jar-fermentor에서의 케라틴분해 효소활성을 보인 그래프이다.

<122> 도 6은 본 발명 공시균주의 케라틴분해 효소의 생합성에 미치는 교반효과를 나타낸 그래프이다.

<123> 도 7은 본 발명 공시균주의 케라틴분해 효소의 생합성에 미치는 접종량 효과를 나타낸 그래프이다.

<124> 도 8은 본 발명 5L fermentator에서 케라틴분해 효소의 활성조건을 보인 그래프이다.

<125> 도 9은 5 L fermentor에서 케라틴분해 효소의 활성을 보인 그래프이다.

도면

도면1

조효소액 150 uL + 2.0% azo-casein(50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 uL

↓

50℃ for 15min.

↓

Add 10.0% TCA(Trichloroacetic acid) 1.2 mL

↓

Stand for 15min. at room temp.

↓

10,000rpm, 4℃ for 10min.

↓

O.D 440 nm

도면2



(a) SaKaguch flask

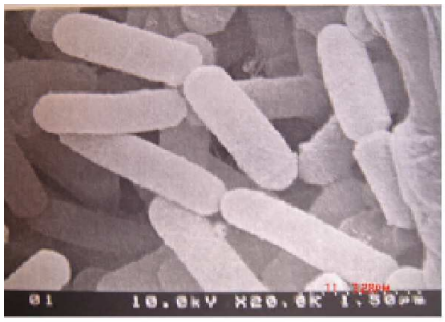


(b) Baffle flask



(c) Erlenmeyer flask

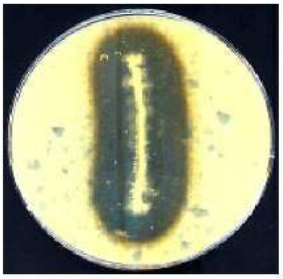
도면3



도면4

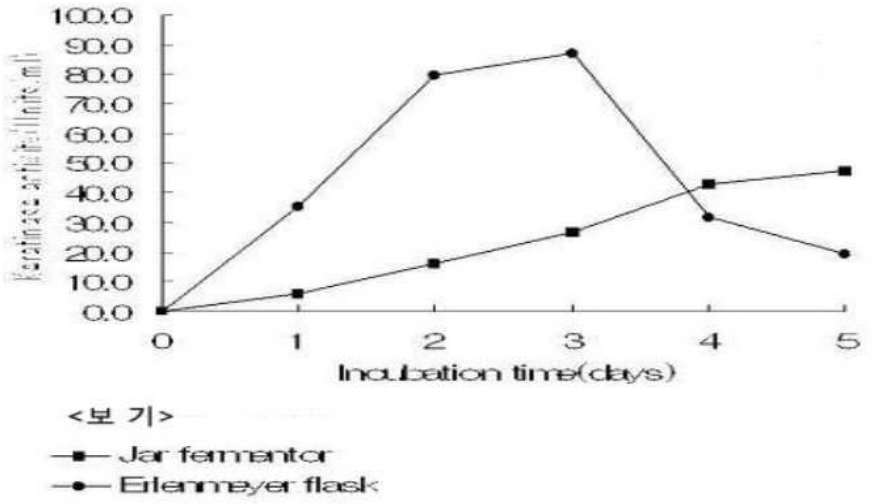


(a) 2% whole chicken feather keratin agar plate

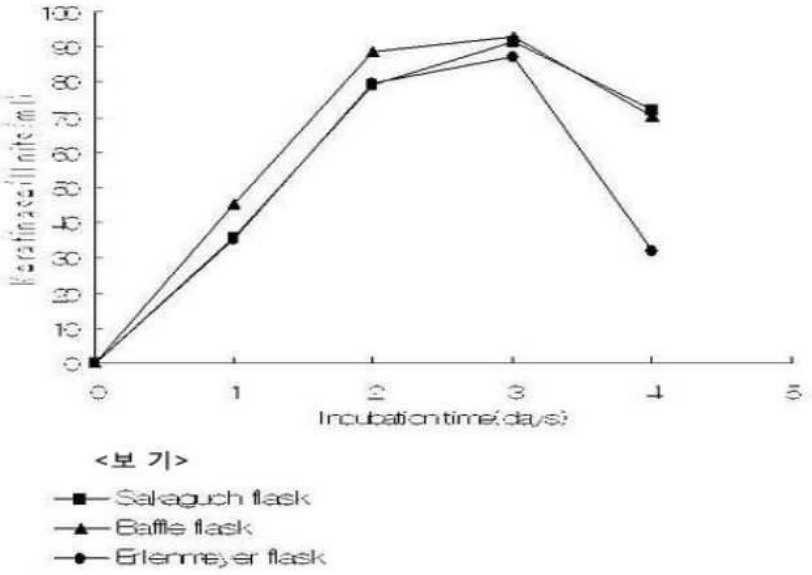


(b) 5% Skim milk agar

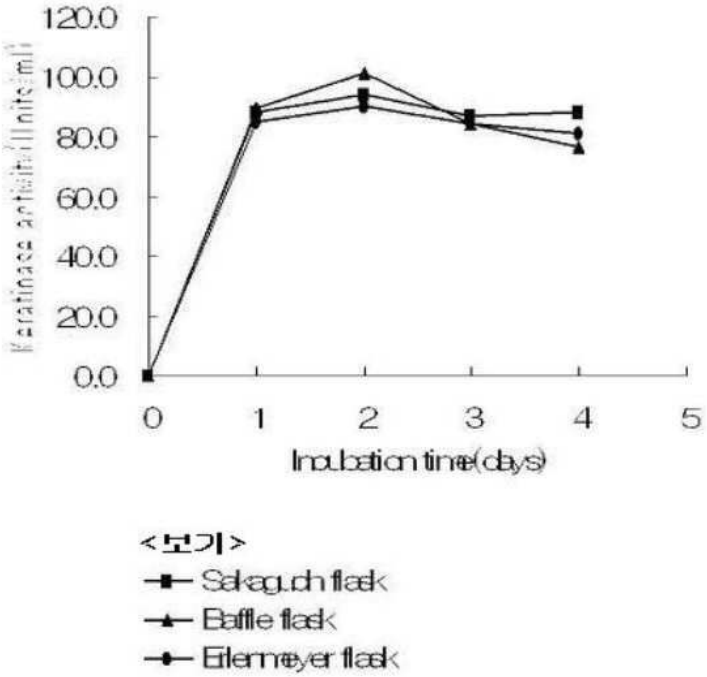
도면5



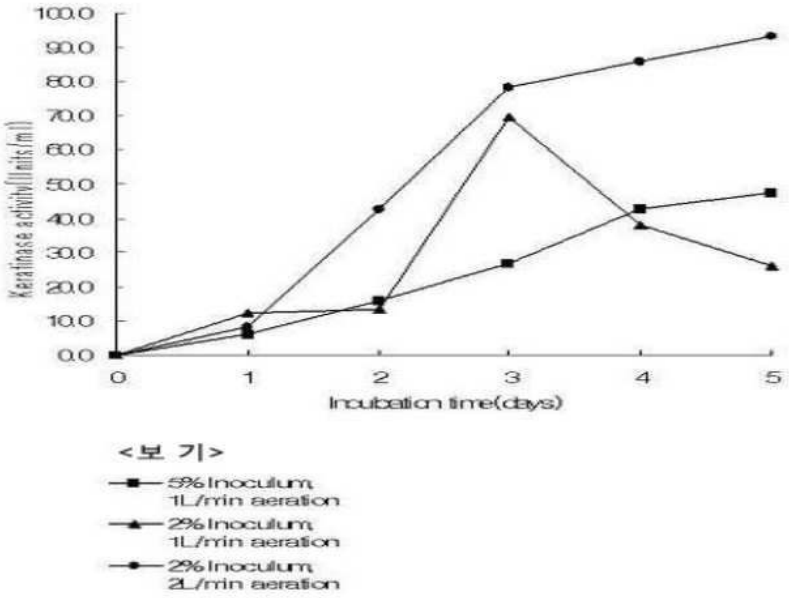
도면6


Incubation time(days)
<보 기>
Sakaguch flask
Baffle flask
Erlenmeyer flask

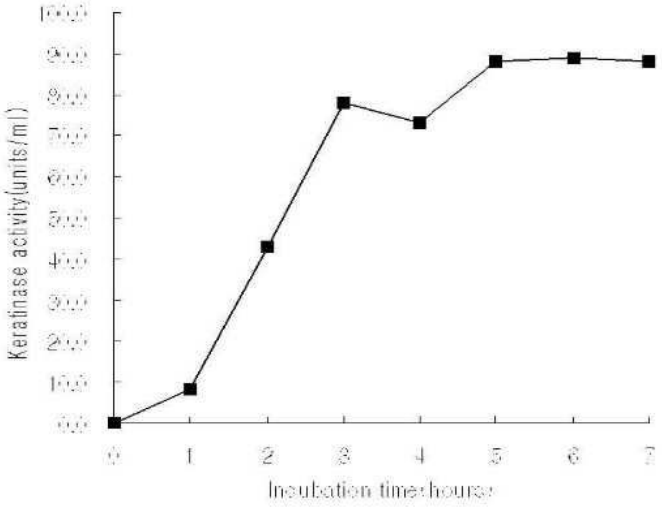
도면7


120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
1
2
3
4
5
Incubation time(days)
<보기>
Sakaguch flask
Baffle flask
Erlenmeyer flask

도면8


100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
Keratinase activity(Units/ml)
0
1
2
3
4
5
Incubation time(days)
<보 기>
5% Inoculum, 1L/min aeration
2% Inoculum, 1L/min aeration
2% Inoculum, 2L/min aeration

도면9


Keratinase activity(units/ml)
0
1
2
3
4
5
6
7
Incubation time(hours)