

## *Pseudomonas* sp. KP-364가 생산하는 Keratinolytic Protease의 정제 및 성질

전동호 · 강상모 · 권태종\*  
건국대학교 공과대학 미생물공학과

**Purification and some Properties of Keratinolytic Protease Produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.** Chon, Dong-Ho, Sang-Mo Kang, and Tae-Jong Kwon\*. Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea - A keratinolytic protease was purified from the culture medium of *Pseudomonas* sp. KP-364 by use of an assay of the hydrolysis of feather keratin. Membrane ultrafiltration and DEAE-cellulose ion-exchange resin and Sephadex G-150 gel chromatographies were used to purify the enzyme. The specific activity of the purified keratinolytic protease relative to that in the original medium was approximately 72-fold high. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex G-150 chromatography indicated that the purified keratinolytic protease is monomeric and has a molecular weight of 36 kDa. The optimal pH and temperature of the keratinolytic protease activity were 6.6 and 37°C, respectively, and the keratinolytic protease was relatively stable at pH value from 3.0 to 10.0 at 37°C for 1 hour. The keratinolytic protease was inhibited by EDTA and EGTA, indicating that the keratinolytic protease was a kind of metalloprotease that require Li<sup>+</sup> for cofactor.

**Key words:** Keratinolytic, protease, keratin. purification, properties

Keratin은 척추동물의 표피와 그 부속기관의 주된 구조 단 백질이며, 그 구조 내에 cystein disulfide bond와 수소결합, 그리고 hydrophobic interaction으로 강한 사슬결합을 하고 있기 때문에 trypsin, pepsin, papain같은 일반적인 proteolytic enzymes으로는 거의 분해가 되지 않는다[4, 24].

Keratinase의 가장 특징적인 성질로는 일반적인 protease로는 분해되지 않는 poultry waste를 가수분해하여 그 산물인 각종 아미노산을 사료 등에 재 이용하는 것이다. 때문에 지금까지 보고된 미생물기원의 keratinase는 거의 50°C-70°C의 최적온도를 가지는 고온성 효소였다. 또다른 keratinase에 관한 연구에서는 동물의 피부에 기생하는 미생물의 상피세포에 대한 침투기작을 밝히기 위하여 이미 알려진 trypsin, papain, pepsin등의 protease와 기질에 대한 특이성 및 최적 반응 조건등을 비교하였다[8, 17, 23, 26].

지금까지 보고된 keratinase들은 구조적으로 serine protease의 특성을 나타내는 고온성 keratinolytic protease이 대부분을 차지하며 이러한 효소는 *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* 등의 세균과[22, 25] *Streptomyces pactum* 등의 방선균[2], *Trichophyton rubrum* 등의 fungi가 생산하며, 이밖에 trypsin-like keratinase와 subtilisin-like keratinase 등이 보고되고 있다[3, 11, 12, 14, 20, 21].

Skin에 적용되고있는 protease는 papaya에서 분리한 papain이 대부분이며 식물성이라 독성이 없다는 이유로 keratinolytic activity가 매우 낮음에도 불구하고 화장품 성분으로 이용되고 있다. 그러나 정제시 cost가 매우 높으므로 조정제품으로 이용되며 그 활성에 미치는 계면활성제, 방부제 등에 대한 영향도 불분명한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 여러 가지 첨가제에 안정하고 상온에서 활성이 높은 keratinolytic protease를 정제하고 일반적인 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 효소생산

본 실험에 사용한 균주는 경기도 일대의 가금류 공장근처의 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp. KP-364이었다. 효소 생산을 위한 최적배지는 Keratin 0.1%, Glucose 2.0%, Soybean meal 0.5%, NaNO<sub>3</sub> 0.5%, KCl 0.2%이었으며 초발 pH 6.5, 배양온도 37°C의 조건으로 1.0 L elenmeyer flask에 200 ml씩 분주하여 멸균하고 전배양액 5.0% 접종하여 48시간 진탕 배양(200 rpm)하였다.

#### 효소활성측정

Keratinolytic protease의 활성측정은 keratin azure를 기질로 이용하는 Heinz[7]와 Mignon[15] 등의 방법을 약간 변형하여 조사하였다. 즉, 조효소액 1.0 ml을 pre-incubation시킨

\*Corresponding author  
Tel: 02-450-3519, Fax: 02-455-0158  
E-mail: tjkwon@kkucc.konkuk.ac.kr

keratin azure(Sigma Co.)현탁액(7.0 mg/ml) 0.5 ml에 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 6,000×g에서 원심 분리하여 불용성의 기질에서 유리된 발색단을 595 nm에서 측정하였다. 효소의 Unit는 37°C에서 1시간동안 기질과 반응한 반응액의 O.D를 0.01 증가시키는 효소량을 1 unit로 정하였다.

**단백질 정량**

단백질 농도는 Bradford[1]의 방법으로 측정하였고 표품으로는 Bovine serum albumin(Sigma Co.)을 이용하였다. 또한 효소 정제과정중의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 표시하였다.

**효소의 정제**

대량 배양하여 얻은 조효소액을 ultrafiltration법으로 농축한 후 Ammonium sulfate(30~80%)로 분별 침전하였다. 원심 분리 후 침전 단백질을 소량의 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시키고 투석하여 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5)로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose ion exchange column(2.5×60 cm)에 주입하였다. 전개시의 유속은 20 ml/hr, fraction당 5 ml씩 분획하고 용출은 NaCl용액(0.1~0.5 M)을 사용하여 gradient법으로 활성부위를 회수하였다. 활성부위의 효소액을 투석하여 잔존하는 염을 제거시키고 농축시킨 후 동일 buffer로 미리 평형화시킨 Sephadex G-150 column chromatography법으로 keratinolytic protease를 정제하였다.

**단일성 및 분자량측정**

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli[10]의 방법에 따라 12.5% acrylamide gel을 만들어 사용하였으며 표준 단백질은 Bovine albumin(M.W. 66,000), Egg albumin(M.W. 45,000), Carbonic Anhydrase(M.W. 29,000)을 사용하였다.

Gel filtration – 정제된 Keratinolytic protease의 분자량을 측정하기 위하여 정제된 효소액을 Sephadex G-150 column (1.2×150 cm)에 표준단백질과 함께 주입하고 분획된 단백질들의 용출 속도에 따라 각각 확인하였다. 표준단백질은 SDS-PAGE 경우와 동일한 단백질을 이용하였다.

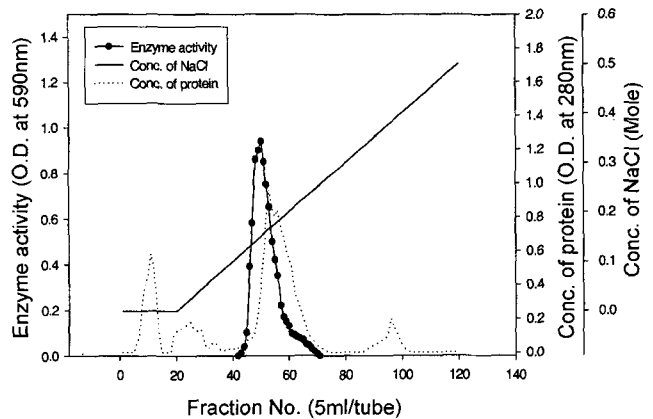
**결과 및 고찰**

**효소의 정제**

*Pseudomonas* sp. KP-364에서 keratinolytic protease를 분리 정제한 결과는 Table 1 및 Fig. 1, 2와 같다. Ultrafiltration과 Ammoniumsulfate 분별침전 후 투석한 조효소액은 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5)로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose ion exchange column(2.5×60 cm)에 주입하였다. 전개시의 유속은 20 ml/hr, fraction당 5 ml씩 분획하고 용

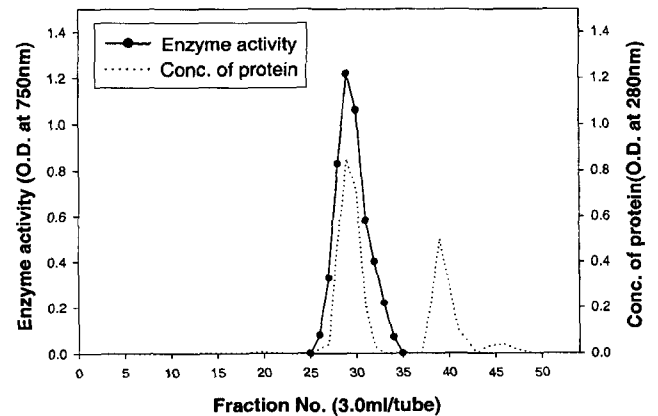
**Table 1. Summary of the purification steps.**

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	139,100	1,817	76.6	100
Ultrafiltration	105,900	724	146.3	76.1
Ammonium sulfate fractionation	85,900	221	388.7	61.8
DEAE-cellulose	44,180	26.5	1667.2	31.8
Sephadex G-150	35,040	6.3	5561.9	25.2



**Fig. 1. Column chromatography of keratinolytic protease on DEAE-cellulose.**

출은 NaCl용액(0.1~0.5 M)을 사용하여 gradient법으로 활성분획(Fraction No. 41-70)을 회수하였다. 활성분획의 효소액을 dialysis법으로 잔존하는 염을 제거하고 PEG 20,000으로 농축하였다. 전기에서 농축된 효소를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5)로 미리 평형화시킨 Sephadex G-150 column (1.2×150 cm)에 주입하고 동일 buffer로 3.0ml/hr유속으로 tube당 3.0 ml씩 분획하였다. Fig. 2에서처럼 단백질 peak와 효소활성 peak가 일치하므로 정제가 완료된 것으로 추정되



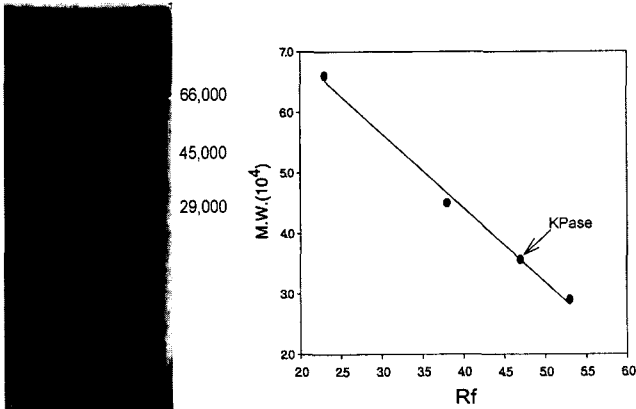
**Fig. 2. Column chromatography of keratinolytic protease on Sephadex G-150.**

었다. 조효소액으로 부터 4단계의 정제과정을 거쳐 얻은 keratinolytic protease의 정제도는 72배였으며 회수율은 25.2%이었다.

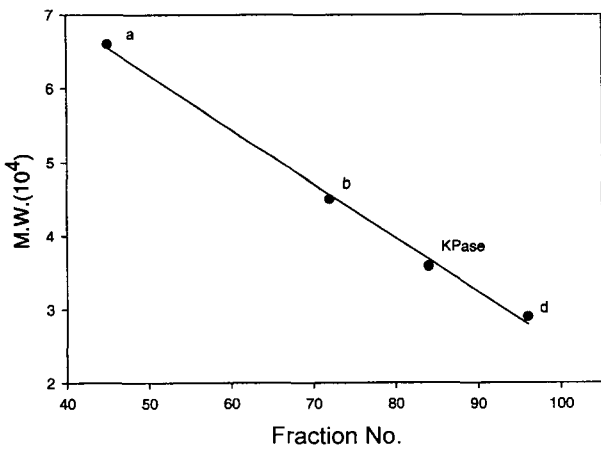
**단일성 및 분자량측정**

**SDS-PAGE** - Sephadex G-150을 이용하여 정제한 keratinolytic protease의 순도를 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 한 결과는 Fig. 3과 같이 단일 band를 보이므로 정제가 완전히 되었다고 추정된다. 또한 표준 단백질의 이동거리와 비교 환산해 본 결과 본 효소의 분자량은 약 36,000 dalton으로 추정되었다.

**Gel filtration** - 본 효소의 분자량을 측정하기 위하여 전기영동에 사용한 표준단백질과 본 효소를 혼합하여 정제과정 중에 이용한 Sepadex G-150 column에 주입하여 동일



**Fig. 3. Electrophoresis of the purified keratinolytic protease and molecular weight determination.** a: bovine albumin (M.W. 66,000), b: egg albumin (M.W. 45,000), c: carbonic Anhydrase (M.W. 29,000).



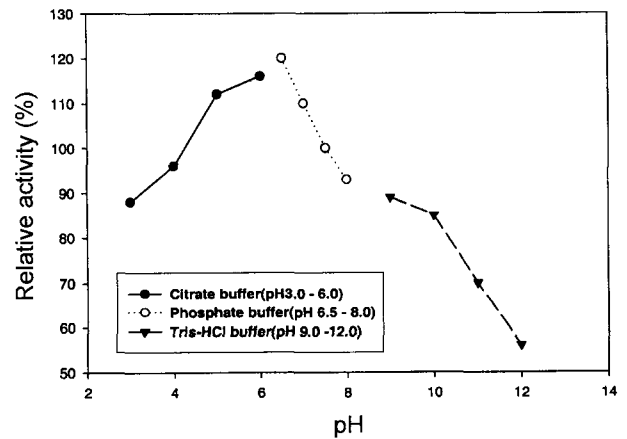
**Fig. 4. Gel filtration of the purified keratinolytic protease and molecular weight determination.** a: bovine albumin (M.W. 66,000), b: egg albumin (M.W. 45,000), c: carbonic Anhydrase (M.W. 29,000).

buffer로 용출한 결과는 Fig. 4에서와 같이 분자량이 약 36,000 Dalton으로 추정되었다. 이 결과는 SDS-PAGE에서의 분자량과 일치하므로 본 효소는 하나의 subunit로 구성되어 있다고 추정된다.

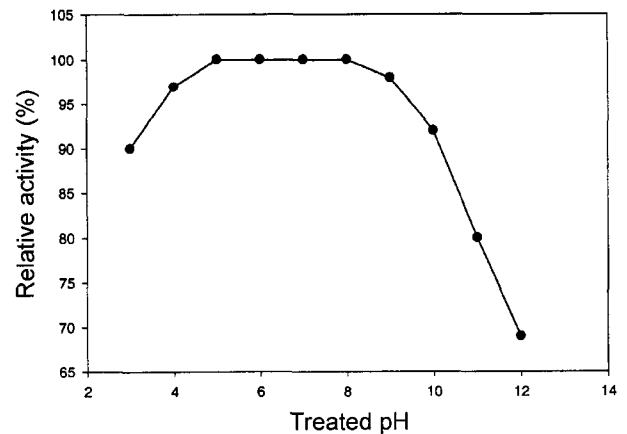
**최적온도 및 열안정성**

본 균주가 생산하는 keratinolytic protease의 최적 온도를 조사한 결과는 Fig. 7와 같이 37°C에서 최적 활성을 나타냈다. 또한 60°C 이상에서는 활성이 급격히 감소되는 경향을 보였으나 20°C에서 50°C까지는 60% 이상의 활성을 나타내는 것으로 보아 상온에서 본 효소를 이용하기에 충분하다고 판단된다. 이는 37°C에서 효소활성이 가장 우수하였다는 Hanel[6]의 보고와 일치하였으나 Young[26]의 60°C보다는 훨씬 낮았다.

본 효소의 열에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같이 10°C에서 40°C까지는 안정하였으나 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 떨어지는 경향을 나타냈다.



**Fig. 5. Effect of pH on the Keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas sp.* KP-364.**



**Fig. 6. pH stability of the Keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas sp.* KP-364.**

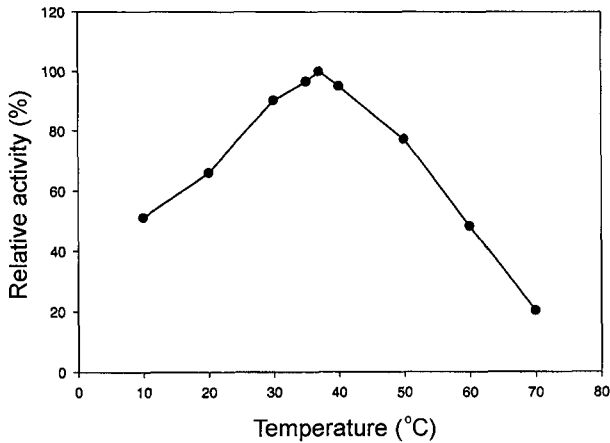


Fig. 7. Effect of temperature on the Keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

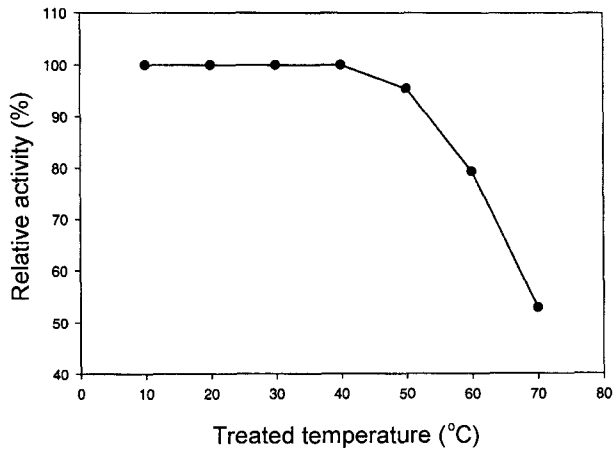


Fig. 8. Thermal stability of the Keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

**최적 pH 및 pH 안정성**

*Pseudomonas* sp. KP-364가 생산하는 keratinolytic protease의 최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 5과 같이 최적 pH는 6.5 이었다. 이러한 결과는 Masakazu[14]가 보고한 pH 8.0, Ruey[18]의 pH 8.0과 alkaline pH에서 keratinolytic activity가 높았다는 Kaul[8]의 보고와는 상이하였으나 피부의 pH가 약 산성이므로 Human skin에의 이용가치는 더 높다고 사료된다.

본 균주가 생산하는 keratinolytic protease의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같이 pH 3에서 10까지는 90%이상의 잔존활성을 보였고 pH 10 이상에서 활성이 급격히 감소하였다. 이는 Ruey[18]의 pH 4-10에서 안정하다는 보고와 유사한 결과를 보였다.

**금속염의 영향**

본 효소의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같이 KCl, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때 효소활성이 약간 증가하였으며 Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>에 의해서 효소활

Table 2. Effect of inorganic salts on the keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

Metal ion	Relative activity(%)
None	100
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	29
KCl	113
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110
NaCl	100
BaCl <sub>2</sub>	64
CaCl <sub>2</sub>	81
CdCl <sub>2</sub>	55
Co(HO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	66
CuCl <sub>2</sub>	35
FeSO <sub>4</sub>	101
HgCl <sub>2</sub>	24
MgSO <sub>4</sub>	86
MnCl <sub>2</sub>	70
NiCl <sub>2</sub>	62
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	67
ZnSO <sub>4</sub>	87
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	84

성이 크게 저해되었다. 이는 keratinolytic enzymes가 Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성이 촉진된다는 Ruey[18], Lee[11], Ryoji [19] 등의 보고와는 상이한 결과를 나타내었다.

**저해제의 영향**

효소활성에 미치는 각종 저해제의 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같았다. 본 효소는 EGTA와 EDTA에 의해서 강하게 저해를 받는 것으로 보아 금속을 함유하고 있는

Table 3. Substrate specificity of the keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

Substrates	Relative activity(%)
Feather keratin	100.0
Milk casein	121.0
Collagen	13.0
Elastin	5.8

Table 4. Effect of inhibitors on the Keratinolytic protease activity produced by *Pseudomonas* sp. KP-364.

Inhibitor	Relative activity(%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
PMSF	95.5	84.4
SDS	140.1	192.7
EDTA	89.4	35.9
EGTA	89.8	4.2
O-Phenanthroline	71.6	79.7
Potassium cyanide	101.5	125.5
L-cystein	100.4	106.8

metalloprotease의 일종인 것으로 추정된다, 또한, EGTA와 EDTA를 1.0 mM 첨가하였을 때에는 저해정도가 미약하였으므로 본 효소와 결합되어 있는 금속의 결합강도는 비교적 강한 것으로 추정된다. 많은 keratinase가 PMSF에 의해 저해를 나타내는 serine protease라는 Brigitte[2], Krystyna[9] 등의 보고와는 상이하나 *Trychophyton verrucosum*의 keratinase가 EDTA에 의해 저해되었다는 Lobarzewsky[12]와 Ruey[18]의 keratinase에 관한 보고와 일치하였다.

**Cofactor의 성분**

본 효소와 결합되어 있는 cofactor의 성분을 조사하기 위하여 정제 효소에 EGTA를 넣어 금속과 착염을 형성시킨 후 투석하여 EGTA와 금속을 제거하고 각각의 금속염을 넣고 결합시킨 후 효소활성의 부활정도를 측정한 결과는 Table 5와 같이 본 효소에는 cofactor로 Li<sup>+</sup>가 결합된 것으로 추정되며, 이와 같은 결과는 지금까지 밝혀진 *Microsporum sp.*의 Mg<sup>2+</sup>[11], *Trychophyton sp.*의 Sr<sup>2+</sup>[9]과는 상이하였다.

**기질특이성**

본 균주가 생산하는 keratinolytic protease의 기질에 대한 특이성을 조사하기 위하여 keratin기질 대신에 각각의 기질 단백질을 정제된 효소와 반응시킨 결과는 Table 3과 같았다. 본 효소는 feather keratin뿐만 아니라 milk casein에 대한 분해능이 높았으나 collagen, elastin 등의 단백질에 대한 분해능은 미약하였다.

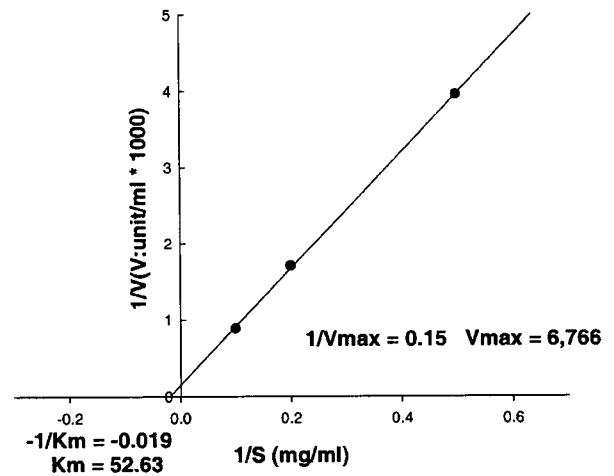
이는 keratin뿐만 아니라 casein, collagen, elastin, BSA, gelatin에 대하여 분해능을 나타낸다는 Garcia[5]의 보고와는 상이하였으나 Rosa 등[17]이 보고한 *Pseudomonas sp.*의 keratinolytic protease가 caseinolytic activity를 가지고 있다는 결과와 일치하였다. 또한 Muhsin 등[16]은 다수의 피부 기생균에 존재하는 keratinase가 elastin에 대하여 분해능을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 본 효소는 keratin에 대하여 기질의 특이성이 비교적 높다고 판단할 수 있다.

**K<sub>m</sub> 값**

본 효소의 반응속도에 미치는 기질농도의 영향을 조사하

**Table 5. Reactivation ratio of keratinolytic protease by metal ions produced by *Pseudomonas sp.* KP-364.**

Metal-ion	Conc.(mM)	
	Relative activity(%)	
	1.0 mM	5.0 mM
None	0.0	0.0
Fe <sup>2+</sup>	0.0	0.0
K <sup>+</sup>	14.9	28.1
Li <sup>+</sup>	38.0	112.0
Mg <sup>2+</sup>	58.4	63.8
Zn <sup>2+</sup>	22.0	22.3



**Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of various concentration of keratin on the enzyme reaction ratio.**

기 위하여 각각 keratin의 농도를 다르게 하여 반응시킨 후 keratinolytic activity를 Lineweaver-Burk plot상에 나타난 결과는 Fig. 9와 같았다. 본 효소의 K<sub>m</sub>값은 52.63 mg/ml이었으며 V<sub>max</sub>는 6,766 unit/ml이었다. K<sub>m</sub>값은 Brigitte[2] 등의 66.0 mg/ml보다는 낮았으나 Masakazu[14] 등이 보고한 27.0 mg/ml보다는 높았다.

**요 약**

경기도 일대의 가금류 공장부근 토양로부터 keratinolytic protease생산성이 우수한 균주 KP-364를 선별하여 본 효소를 정제하고 일반적인 특성을 조사하였다. 본 효소는 ultrafiltration, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration 등을 통하여 정제되었으며 회수율은 25.2%이었다. SDS-PAGE와 gel filtration으로 단일성과 분자량을 추정한 결과 전기영동 상에 단일 band를 나타내었으며 분자량은 약 36,000 dalton이었으며 1개의 subunit로 구성되어 있었다. 효소반응의 최적조건을 검토한 결과 최적 pH는 6.5, pH 3.0에서 10.0까지 90%이상의 활성을 나타냈으며 반응 최적 온도는 37°C이었고 60°C에서 1시간동안 80% 이상의 활성을 유지하였다. 정제된 효소의 활성은 FeSO<sub>4</sub>, KCl, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때 증가하였으며 Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>에 의해 저해되었다. 또한 EDTA, EGTA에 의해 저해되는 것으로 보아 metalloprotease의 일종이라고 판단되며 Li<sup>+</sup>를 cofactor로 함유하고 있는 것으로 조사되었다.

**REFERENCES**

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
2. Brigitte, B., B. Galunsky, and R. Muller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3705-3710.
  3. Brysk, M. M. and S. Rajaraman. 1992. Cohesion and desquamation of epidermal stratum corneum. *Prog. Histochem. Cytochem.* **25**: 1-53.
  4. Elaine, F. 1995. Keratins and the skin. *Annu. Rev. Cell and Develop. Biol.* **11**: 123-153.
  5. Garcia-Kiichner, M., S. Guanados, and I. R. Bautisa. 1991. Digestion of various substrates by *Streptomyces* sp. KER p-08 keratinase. *Microbial Infections of Skin and Nails* **12**: 23-29.
  6. Hanel, H., J. Kalisch, M. Keil, W. C. Marsch, and M. Buslau. 1991. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol(Berl)*. **180**: 45-51.
  7. Heinz, H., K. Jurgen, K. Manfred, C. M. Wolfgang, and B. Michael. 1991. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol. Immunol.* **180**: 45-51.
  8. Kaul, S. and G. Sumbali. 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia* **139**: 137-140.
  9. Krystyna, W., J. Lobarzewski, and T. Wolski. 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Veteri Mycol.* **25**: 261-268.
  10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  11. Lee, K. H., K. K. Park, S. H. Park, and J. B. Lee. 1987. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum canis*. *Yonsei Med. J.* **28**: 131-138.
  12. Lobarzewski, J., K. Grzywnowics, K. Wawrzkiwicz, M. Staszczak, M. Staszczak, and T. Wolski. 1990. Feather keratin as a ligand in an affinity chromatographic technique for isolation of protease from *Trichophyton verrucosum*. *J. Chromat.* **520**: 223-235.
  13. Lundstrom, A. and T. Egelrud. 1991. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta. Derm. Venereol.* **71**: 471-474.
  14. Masakazu, A., L. Robert, K. Fukuyama, G. Apodaca, W. L. Epstein, and J. H. McKerrow. 1992. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* **232**: 139-144.
  15. Mignon, B. R., A. F. Nikkels, G. E. Pierard, and B. J. Lison. 1998. The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kD keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatol.* **196**: 438-441.
  16. Muhsin, T. M., A. H. Aubaid, and A. H. al-Duboon. 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates solid media. *Mycoses.* **40**: 465-469.
  17. Rosa, S. P., F. Bicca, P. C. Santos, S. K. Ferrao, H. Dewes, C. C. Gaylarde, C. Termignoni, and R. W. S. P. Thomas. 1996. Digestion of Keratin by *Pseudomonas* sp. *Int. Biodeter. & Biodegre.* **37**: Issue 1-2.
  18. Ruey, J. Y. D., S. R. Harmon, F. Blank, D. S. Nat, and D. S. Techn. 1969. Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Investi Dermatol.* **53**: 166-171
  19. Ryoji, T., I. J. Ko, K. Matsuda, and H. Ogawa. 1987. A New keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Dermatol.* **14**: 506-508.
  20. Suzuki, Y., J. Koyama, O. Moro, I. Horii, K. Kikuchi, M. Tanida, and H. Tagami. 1996. The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br. J. Dermatol.* **134**: 460-464.
  21. Suzuki, Y., J. Nomura, J. Hori, J. Koyama, M. Takahashi, and I. Horri. 1993. Detection and characterization of endogenous protease associated with desquamation of stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* **285**: 372-377.
  22. Tideto, T., S. Nakamura, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. No. AH-101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1667-1669.
  23. Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie, and J. C. H. Shih. 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1509-1515.
  24. Xiang, L., C. G. Lee, S. C. Ellen, and C. H. S. Jason. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3271-3275.
  25. Xing, L., D. W. Kelemen, E. S. Miller, and C. H. S. Jason. 1995. Nucleotide sequence and expressing of *KerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ Microbiol.* **61** : 1469-1474.
  26. Young, R.A. and R.E. Smith. 1975. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 583-586.

(Received March 17, 2003/Accepted July 15, 2003)