

伍、結果與討論

一、角蛋白分解酶之生產與純化

1、*B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶之最適培養時間

根據張(1999)所確立 *B. licheniformis* THSC-1 之最適培養條件(50 °C, pH 8.5)，將活化之 THSC-1 菌株於羽毛培養基中分別進行靜態(0 rpm)與振盪(120 rpm)培養，使產生酵素活性，結果如圖一所示，THSC-1 菌株在振盪培養之狀態下，於第 3 至 4 天產生之酵素活性最高，以第 3 天產生之酵素活性為 100%，至第 5 天略有下降為 88.7%，但並無顯著差異($P > 0.05$)；且第 2 至 5 天振盪培養所產生之酵素活性顯著較靜態培養為高($P < 0.05$)，顯示 THSC-1 菌株於羽毛培養基中產生角蛋白分解酶必須要有充足之氧氣，在靜態培養下雖然也會產生角蛋白分解酶，但因溶氧程度不足，表現相當微弱。故後續純化及分析試驗即以 50 °C pH 8.5，120 rpm 振盪培養 4 天作為 *B. licheniformis* THSC-1 生產酵素之條件，此結果與 Lin 等人(1992)對 *B. licheniformis* PWD-1 生產酵素所設立之條件(50 °C，pH 7.5，120 rpm，振盪培養 4 天)除了最適 pH 外，其餘皆相同。

2、角蛋白分解酶位置之確認

在進行酵素純化之前，首先要確認此酵素是屬於胞內酵素或胞外

酵素，因為酵素產生位置不同，會影響後續之純化步驟。胞外酵素由菌體分泌至細胞外，因此可直接由培養液中獲取；胞內酵素存在於細胞內，必須打破細胞才能獲得，通常利用超音波震盪（ultrasonication）打破菌體細胞，超音波作用過程容易產熱，必須全程在冰浴下進行，並且振 1 分鐘隨即休息 1 分鐘，以避免因溫度上升而造成酵素活性下降。清洗後之菌體細胞以超音波打破，即可分析細胞內角蛋白分解酶活性。

結果如表二所述，可發現角蛋白分解酶幾乎都分泌至細胞外，酵素活性為 414.43 U/mg，細胞內則偵測不到酵素活性；故可確定 *B. licheniformis* THSC-1 生產之角蛋白分解酶是屬於胞外酵素。目前已知的角蛋白分解酶皆是屬於胞外酵素，因為此酵素存在之目的是水解環境中之角蛋白以作為菌體自身生理所需之碳源（Bockle *et al.*, 1995），與胞內酵素作用於菌體本身合成及代謝之意義不同。

3、角蛋白分解酶之純化

B. licheniformis THSC-1 於羽毛培養基培養 4 天後，收集培養液經過濾、離心而得到的粗酵素液，經酵素活性及蛋白質濃度測定，得粗酵素液之酵素活性為 5464.4 U，蛋白質含量為 15 mg，比活性為 364.3 U/mg。進一步將獲得之粗酵素液利用蛋白質濃縮離心管濃縮約 10 倍，

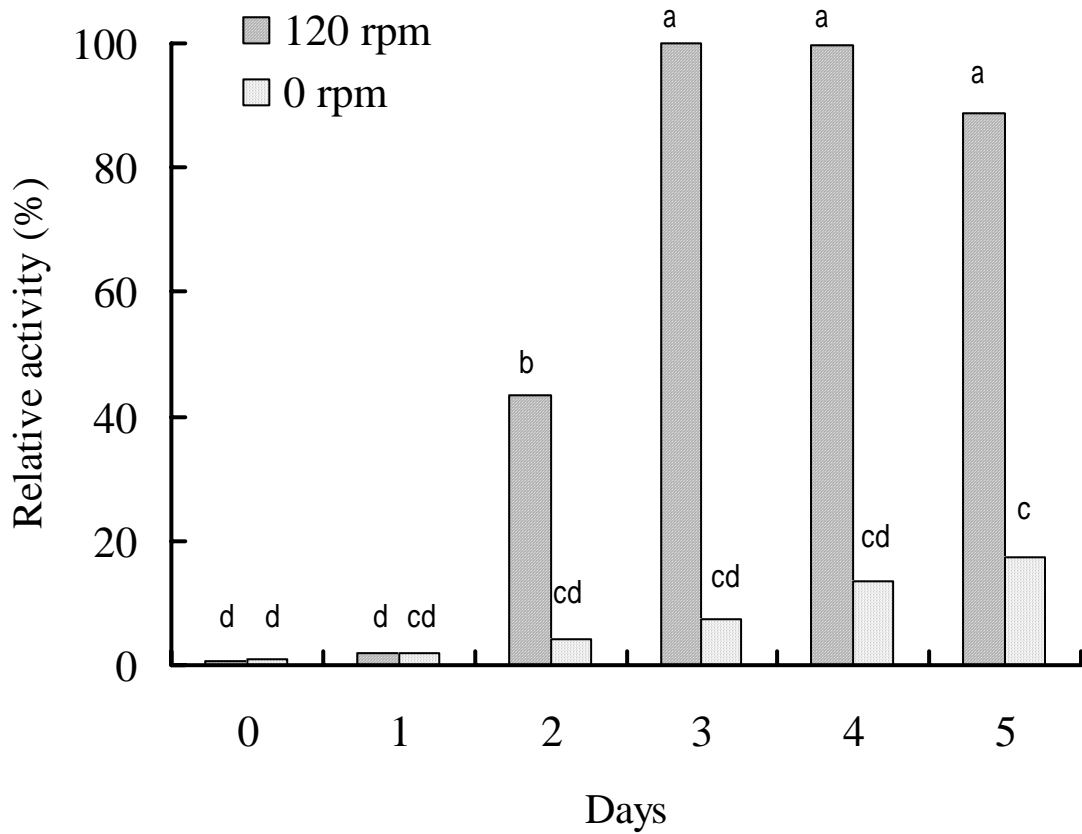
以備後續之純化工作；此裝置利用超過濾原理，使用孔徑為分子量截留 (MWCO) 10kDa 之濾膜，讓分子量在 10 kDa 以下的分子通過，此方式除了濃縮之功能外，同時能達到包括脫鹽及無菌過濾等目的。此步驟所得濃縮酵素之酵素活性為 4392.4 U，蛋白質含量為 6.6 mg，酵素純化倍率較粗酵素階段僅提高 1.8 倍，表示此階段已去過濾掉大部分無活性之雜蛋白，但無明顯之純化效果。

濃縮之酵素液接著注入充填 CM-cellulose 膠體管柱，它是一種弱陽離子交換樹脂，利用擔體 CM 基團 ($-OCH_2CO_2^-$) 帶負電，目標蛋白質帶正電，所以 pH 在等電點以下時可利用 CM-cellulose 來分離帶正電之蛋白；利用鹽濃度或 pH 值之變化以溶離管柱內的蛋白，溶離方式有連續梯度 (continuous gradient) 及階段梯度 (stepwise gradient) (呂和林，1991)。

本試驗使用鹽濃度的連續梯度來進行溶離，結果如圖三所示，當樣品注入之後，馬上出現大量蛋白質之波峰，這些為雜蛋白，故不收集；當 NaCl 濃度增加時，吸附於膠體上之蛋白質逐漸被沖提出來，在 13 至 16 劃分處 (fraction) 有蛋白分解活性高峰產生，且蛋白質濃度也集中出現於此波峰處，此時之鹽濃度約為 20 mM NaCl。將每一劃分管分別進行酵素活性及蛋白質濃度測定，得純化之酵素活性為 2115.8 U，蛋白質含量為 0.5 mg，比活性為 4231.6 U/mg。

綜合以上酵素之純化步驟整理成表二，以粗酵素液之純化倍率為 1 倍，可得知經過超過濾及弱陽離子交換層析，酵素之純化倍率為 11.6 倍（以酵素比活性計算），產率為 39 %（以酵素總活性計算），表示角蛋白分酶已達到純化效果。然而蛋白質回收率甚低，主要在超過濾階段流失 62 % 之蛋白質，推測原因為粗酵素液中含有較多分子量小於 30 kDa 之雜蛋白，隨著超過濾的過程被去除掉；也可能是酵素分泌量原本就不多，影響回收率。

雖然，前人之研究文獻中角蛋白分解酶之純化，如 *S. pactum* DSM 40530 經親和層析法純化獲得 64.8 倍之純化酵素 (Bockle *et al.*, 1995)；*B. licheniformis* PWD-1 經離子交換層析則得到純化 70 倍之酵素 (Lin *et al.*, 1992)。本研究之 *B. licheniformis* THSC-1 純化倍率為 11.6 倍，相對較低，推測原因 THSC-1 採小規模之培養及純化，且粗酵素之蛋白質量較 DSM 40530 和 PWD-1 都低，各別為 15、98、142 mg，故日後可擴大培養規模與修正純化之條件，以改進純化效果。不過此酵素目前仍以基礎研究為主，不需要大量生產，故暫時不考慮此問題。



圖二、*B. licheniformis* THSC-1 產生角蛋白分解活性之最適培養時間。

Fig. 2. Optimal culture time for keratinolytic activity by *B. licheniformis* THSC-1 in feather medium.

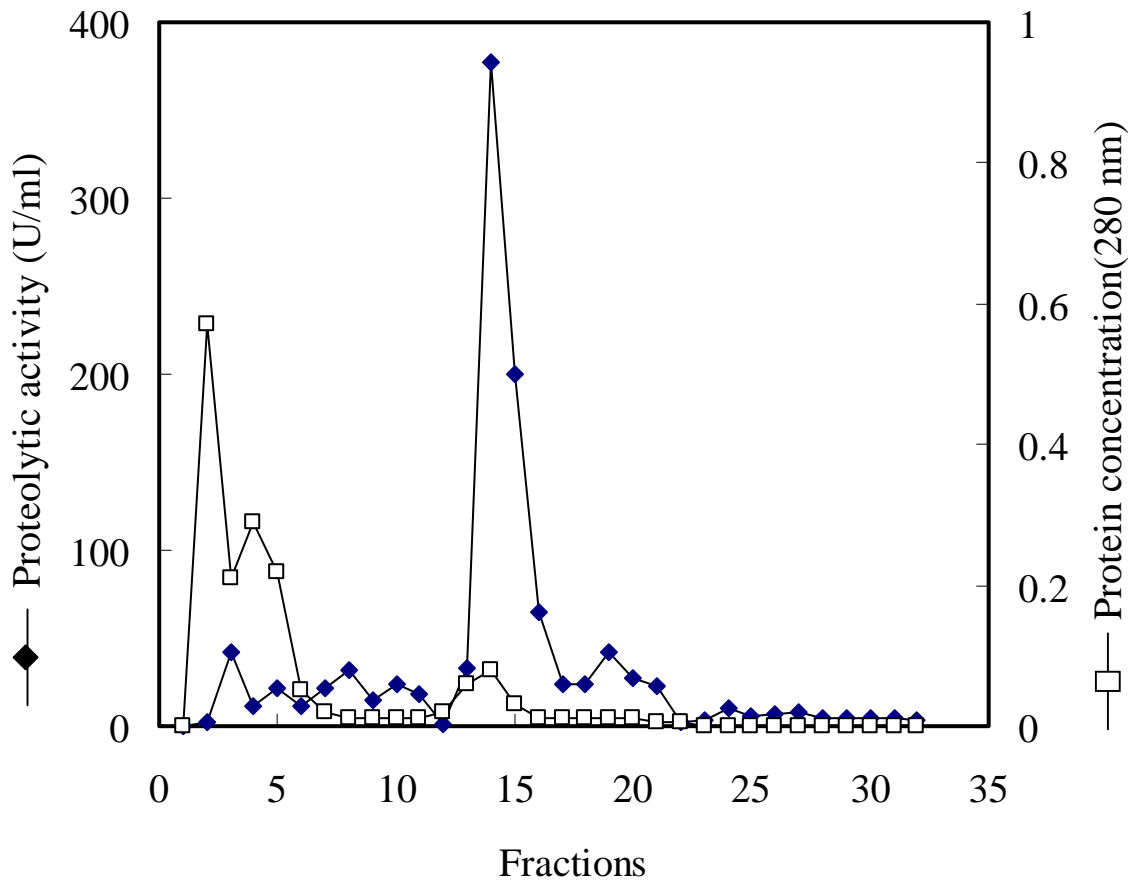
^{a-d} mean values which have the different superscript are significantly different ($P < 0.05$).

表二、*B. licheniformis* THSC-1 產生之胞內及胞外酵素活性

Table 2. Intracellular and extracellular enzyme activity was produced by *B. licheniformis* THSC-1

	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Extracellular enzyme	3771.3	9.1	414.4
Intracellular enzyme	nd*	9.0	nd*

*nd: not detected.



圖三、角蛋白分解酶於 CM-cellulose 管柱之離子交換層析圖。

Fig. 3. The distribution of keratinase on CM-cellulose cation ion exchange chromatogram .

表三、*B. licheniformis* THSC-1 產生之角蛋白分解酶純化結果

Table 3. Purification of keratinase produced by *B. licheniformis* THSC-1

Step	Total activity (Units) *	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	5464.4	15	364.3	1	100
Ultrafiltration	4392.4	6.6	665.5	1.8	80
Ion exchange	2115.8	0.5	4231.6	11.6	39

*酵素活性單位 (Unit) 定義為每分鐘分解 azocasein，使磺胺酸含量增加 1 μmol 所需之酵素量。

The amount of keratinase yield the equivalent of 1 μmol of sulfanilic acid per min after reaction with azocasein.

二、角蛋白分解酶之一般生化特性探討

由於本酵素在應用上仍以粗酵素之型態為主，較符合經濟原則，故以 *B. licheniformis* THSC-1 產生之粗酵素液做為以下分析之材料。

1、酵素作用之最適溫度

將粗酵素液於 30 至 80°C 不同溫度下與 azocasein solution 進行反應，其相對活性如圖四所示，當反應溫度由 30 提高至 70°C，酵素活性明顯提高 ($P < 0.05$)，70°C 酵素活性最高，故以此為最適作用溫度，其次是 60°C ($P > 0.05$)，當溫度到達 80°C 引發酵素之熱變性，即高溫使酵素蛋白質原本摺疊之立體結構 (folding) 崩解成延伸狀態 (unfolding) (陳，1989)，導致酵素活性又顯著下降。

2、酵素作用之最適 pH

將粗酵素液與不同 pH 之 azocasein solution 進行反應，結果如圖五所示，在 pH 8.0 時之酵素活性最高，故為最適作用 pH；其次為 pH 8.5 ($P > 0.05$)，相對地當偏酸或越偏鹼時，酵素蛋白質分子的離子狀態隨 pH 而改變，使酵素活性皆明顯下降 ($P < 0.05$)，故屬於鹼性蛋白酶。

綜合以上酵素作用之最適溫度及 pH (70°C, pH 8.0)，可證明 *B. licheniformis* THSC-1 產生之角蛋白分解酶具有嗜鹼性及嗜高溫的特性；絕大多數角蛋白分解酶也都具有此特性，如同菌屬之 *B.*

licheniformis PWD-1 之角蛋白分解酶最適作用條件為 50°C 及 pH 7.5 (Lin *et al.*, 1992), 放線菌 *S. pactum* DSM 40530 為 65 °C 與 pH 8 (Bockle *et al.*, 1995); *F. pennavorans* 是由高溫溫泉中分離出來的一株角蛋白分解菌, 其酵素之最適條件為 80 °C 與 pH 10.0 (Friedrich *et al.*, 1996)。相較於一般蛋白酶之最適作用溫度介於 30 至 40°C, pH 在中性範圍, 角蛋白分酶的嗜鹼性及嗜高溫特性則頗利於工業之應用。

3、酵素熱安定性

將粗酵素液與 30 至 80°C 之不同溫度下保溫 1 小時, 其相對活性如圖六所示, 在 40°C 保溫 1 小時之處理組酵素活性最高, 其次是 30°C 及 50°C, 較 40°C 相對地有 92.6 % 之活性, 且三者之間無顯著差異; 當處理溫度高於 60°C, 則相對活性顯著下降 ($P < 0.05$), 尤其在 70 和 80 °C 下保溫之熱安定性最差, 其相對活性僅剩 12.7 % 及 10.3 %。

將熱安定性較佳之 30 至 60°C 組進行長時間 8 天之熱安定性試驗, 結果如圖七所示, 結果顯示隨著儲存天數的增加, 4 組酵素活性均有下降之情形; 且隨著溫度的提高, 酵素活性相對降低; 當反應進行至第 2 天, 50 和 60°C 兩組酵素活性即有顯著降低 ($P < 0.05$), 其殘留活性分別為 73.6 % 和 35.7 %; 至第 8 天 30 至 60°C 組之殘留活性分別為 68.8、53.6、32.6 和 4.1%。

4、酵素之 pH 安定性

將粗酵素液在不同 pH 條件下靜置 1 小時，並置於 4°C 以排除溫度對酵素活性之影響，結果如圖八所示，在弱鹼性 pH7.5 至 9 範圍內之酵素活性為最高 ($P > 0.05$)，在弱酸性至鹼性 (pH 5 至 11) 皆能保持 85 % 以上之相對活性，表示對 pH 安定之範圍相當廣，而酸性 pH 3 和 4 下相對活性則明顯偏低，分別為 27 % 及 70 % ($P < 0.05$)。

另針對 pH 安定性進行長時間 8 天之試驗，結果如圖九所示，第 2 天時 pH 3 和 4 之活性就開始有明顯下降的情形 ($P < 0.05$)，其餘各組則表現稍微下降之趨勢 ($P > 0.05$)；第 8 天試驗終點時，以 pH 8 之殘留活性最高 (77.5 %)，pH 5 至 11 各組仍保持 61 % 以上之活性 ($P > 0.05$)，顯示此酵素在酸性較不安定，而在弱酸性至鹼性環性下則能保持至少一週良好之安定性。

一般而言，酵素在應用上受到許多的限制性，特別是受溫度和 pH 變化而影響酵素本身安定性，在操作及貯存過程中造成之酵素失活 (inactivation) 問題，會影響活性的表現 (張，1976)。本研究之 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶在 60°C 保溫 1 小時仍有 87 % 之酵素活性，在 50°C 保溫 6 天也維持將近 50 % 之活性；在 pH 安定性方面則有很寬廣之安定範圍，pH 5 至 11 皆能保持良好之活性 (61 % 以上殘留活性)，並長達 8 天。其他的角蛋白分解酶，例如 *S. pactum* DSM 40530

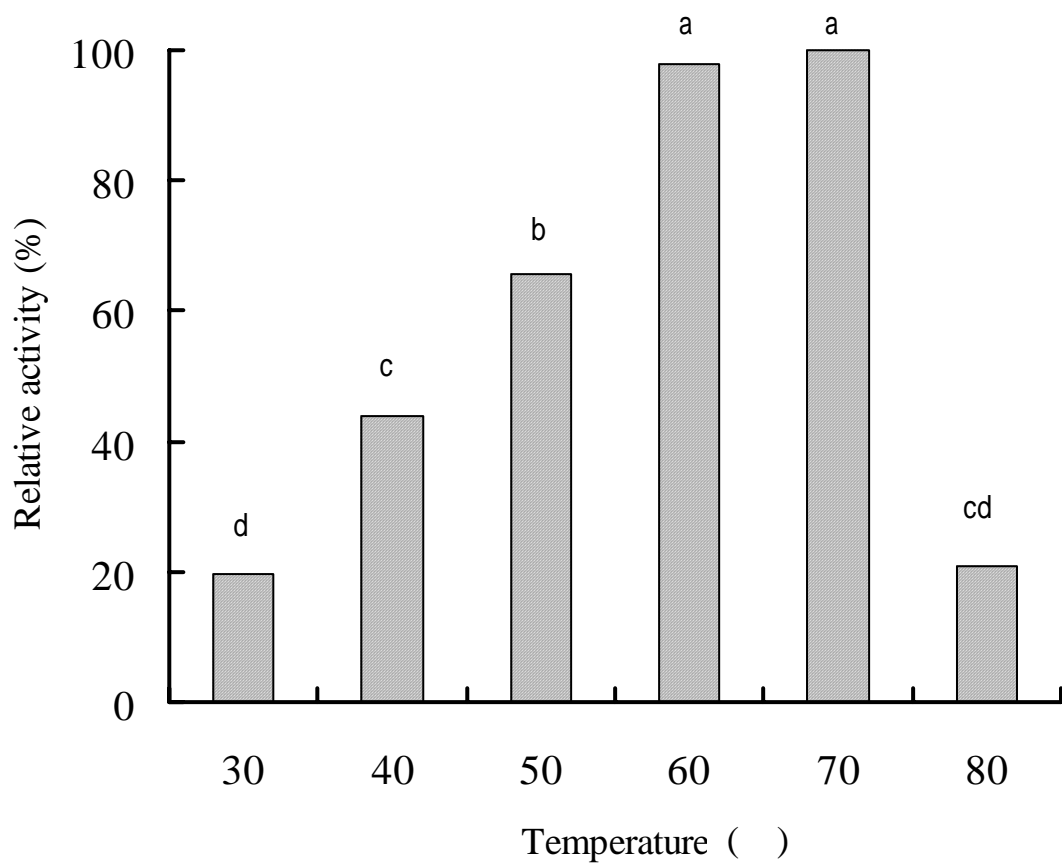
生產之蛋白酶在 50 °C 保存 24 小時可保持約 50 % 之殘留活性(Bockle *et al.*, 1995)；Nam (2002) 則提出 *F. islandicum* AW-1 在 100 °C 保存 90 分鐘仍可保持約 50 % 之殘留活性，於 25°C 下 pH 7 至 10 之範圍則能保持穩定之活性。

雖然目前文獻上對於酵素安定性之優劣並無定義可言，但相較之下 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶對溫度及 pH 變化均具有良好之安定性，並且作用之時效性亦較其他角蛋白分解酶更長。

5、保存性

將粗酵素液於-80°C、4°C及室溫 25°C下保存 20 天，其殘留酵素活性如圖十所示，其中以-80°C保存維持酵素活性之效果最佳，其次是 4 °C，其保存 20 天之殘留活性分別為 95.5 % 和 91.4 %，室溫 25°C 保存至第 2 天開始酵素活性即有顯著下降之情形，效果雖不如其他兩組，但 20 天時之殘留活性仍有 61.2%。

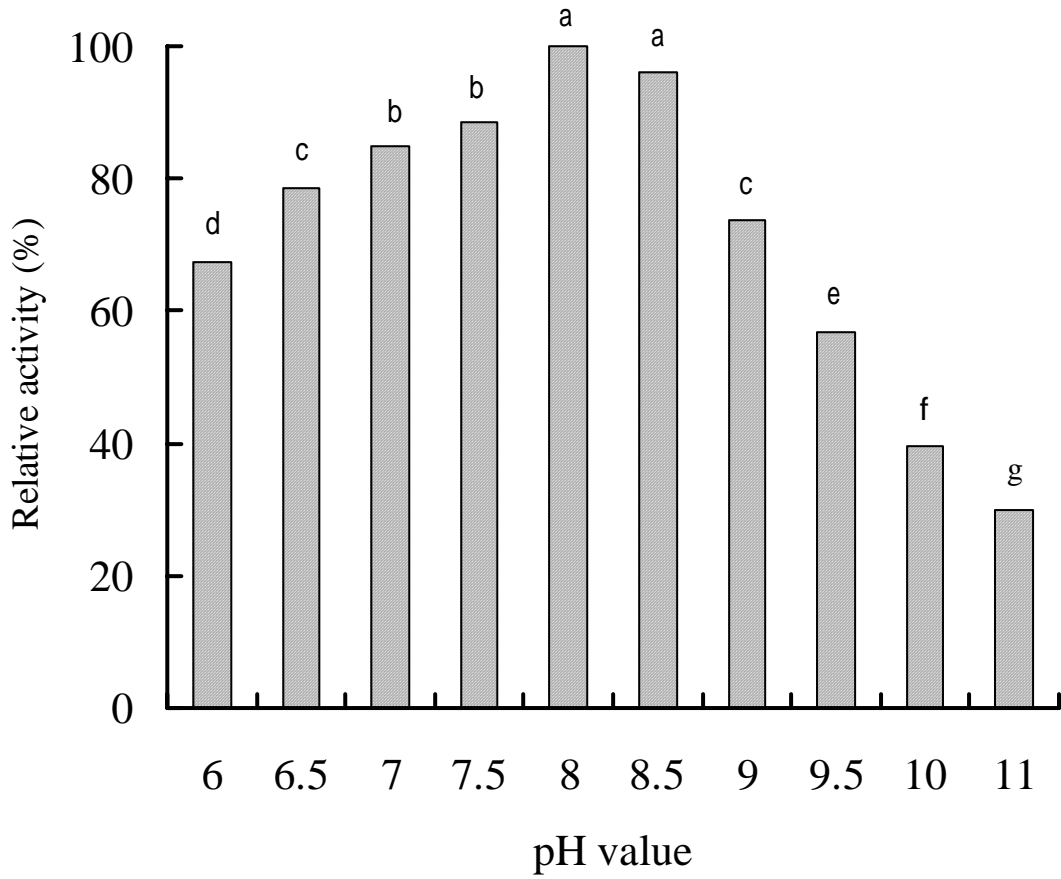
Lin 等人 (1992) 提出 *B. licheniformis* PWD-1 之角蛋白分解酶能夠穩定地儲存於-20°C (儲存 19 天酵素活性僅下降 7 %)，於 4°C 儲存 19 天酵素活性僅下降 20 %，而在室溫 (20 至 25°C) 下酵素活性之半衰期為 4 至 5 天；相較之下，*B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶具有較佳之保存性，更利於工業之使用。



圖四、溫度對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶活性之影響。

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1.

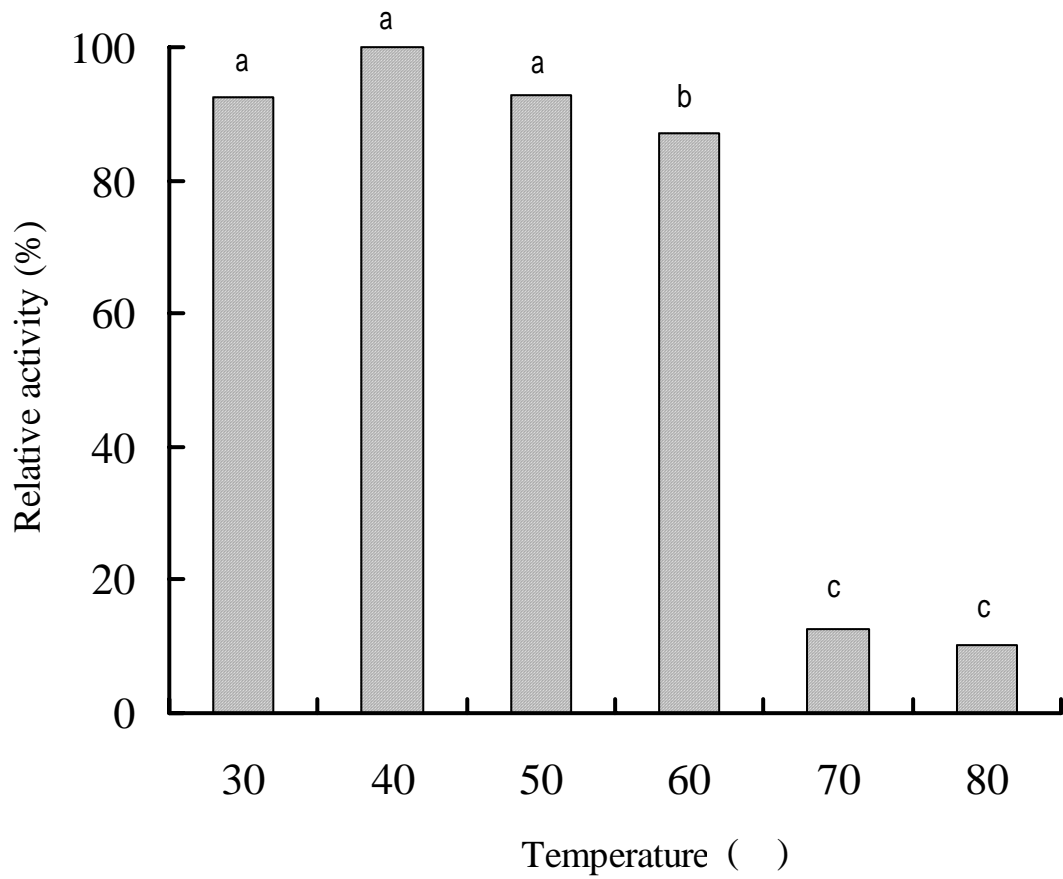
^{a-d} mean values which have the different superscript are significantly different ($P < 0.05$).



圖五、pH 對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶活性之影響。

Fig. 5. Effect of pH on the activity of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1.

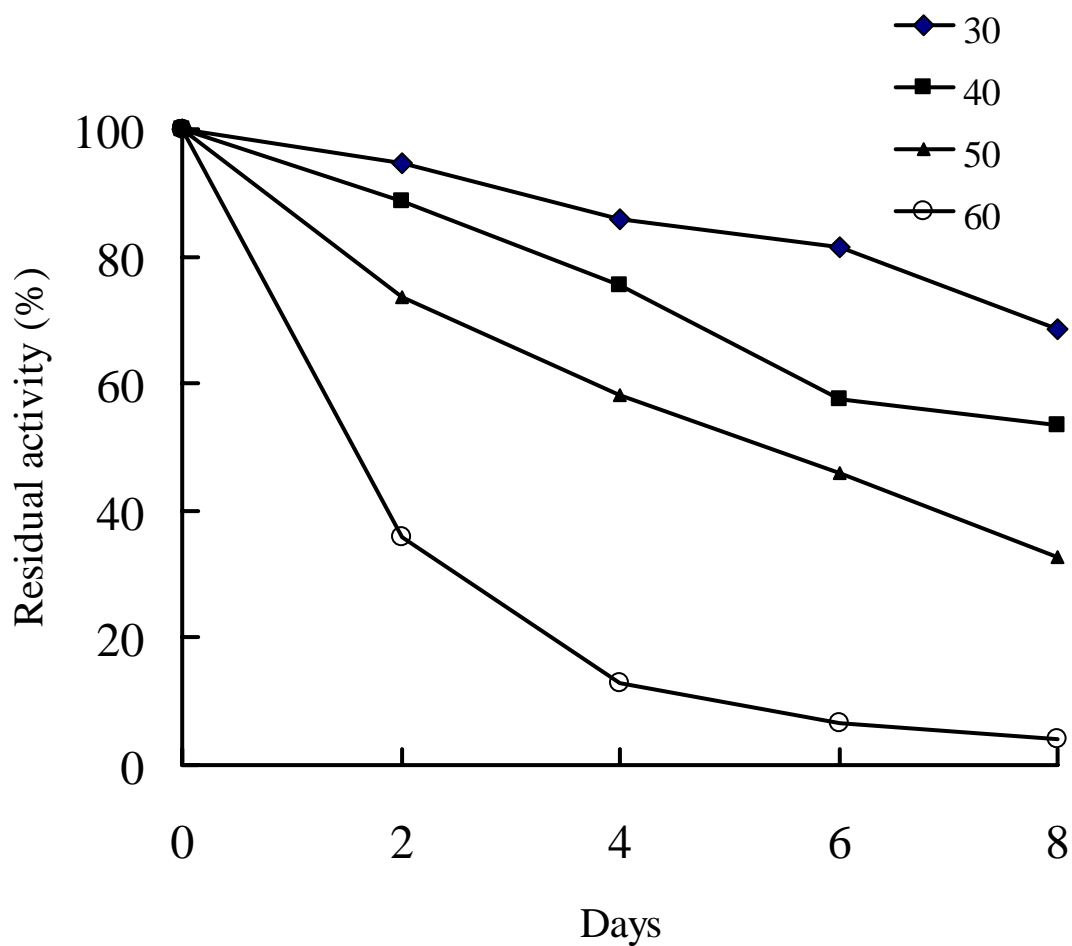
^{a-g} mean values which have the different superscript are significantly different ($P < 0.05$).



圖六、不同溫度對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響。

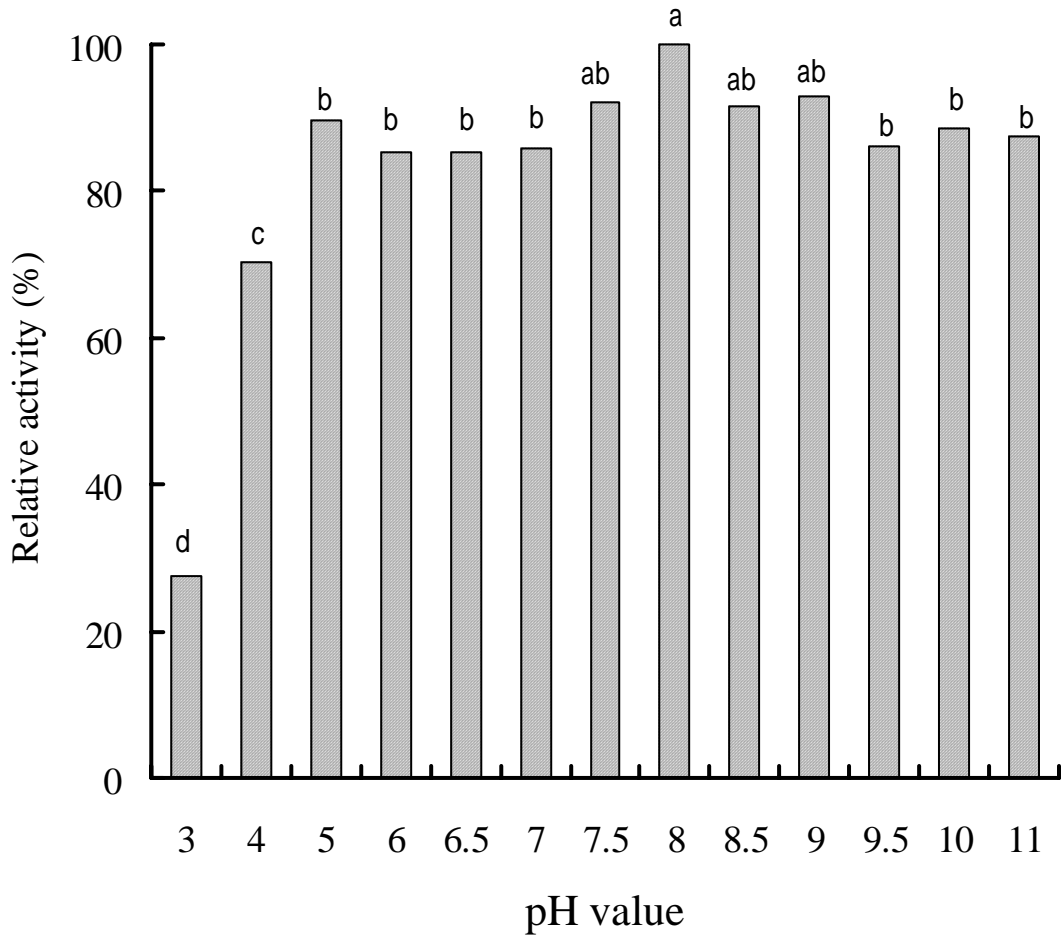
Fig. 6. The thermostability of the keratinase from *B. licheniformis* THSC-1 at various temperatures for 1 h.

^{a-c} mean values which have the different superscript are significantly different ($P < 0.05$).



圖七、長時間下不同溫度對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響。

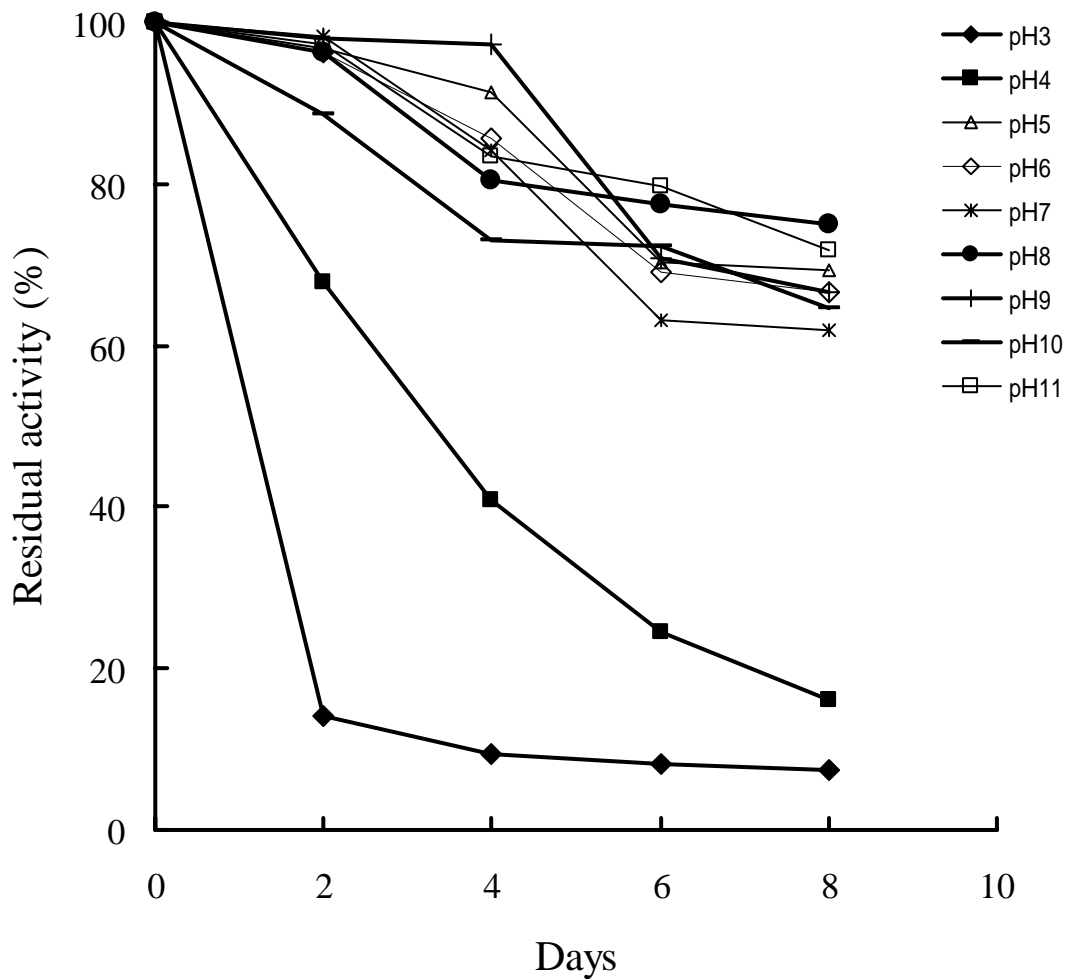
Fig. 7. The thermostability of the keratinase from *B. licheniformis* THSC-1 at various temperatures for 8 days.



圖八、不同 pH 對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響。

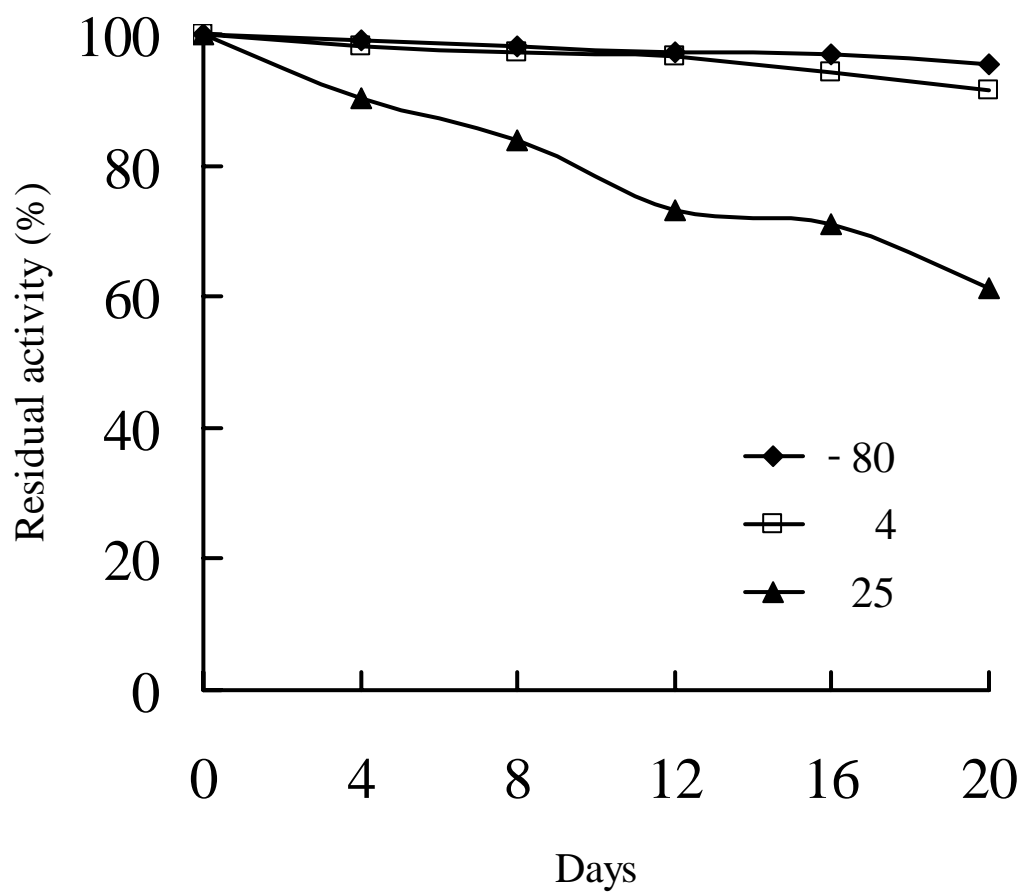
Fig. 8. Effect of various pH on the stability of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1.

^{a-d} mean values which have the different superscript are significantly different (P < 0.05).



圖九、長時間下不同 pH 對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響。

Fig. 9. Effect of various pH on the stability of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1 for 8 days.



圖十、儲存溫度對 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響。

Fig. 10. Effect of temperature of storage on the stability of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1.

三、酵素生化性質分析

1、蛋白酶抑制劑對酵素活性之影響

粗酵素液與含有不同濃度抑制劑之 azocasein solution，於 70°C 反應 30 min 後，所測得之酵素活性如表四所示。並以對照組之酵素活性為 100%，結果顯示 0.1 至 1 mM 之抑制劑 PMSF 較其他三種類型之抑制劑及對照組皆有顯著之抑制效果 ($P < 0.05$)，其相對活性分別為 40.8、24.0 及 5.8%，且三者之間亦有顯著之差異 ($P < 0.05$)；接受另外三種抑制劑作用之處理組與對照組之間則無顯著差異 ($P > 0.05$)。此結果顯示本蛋白酶只被絲胺酸蛋白酶抑制劑 PMSF 所抑制，而不受硫醇蛋白酶、金屬蛋白酶或酸性蛋白酶之專一性抑制劑(E-64, Pepstatin A、EDTA) 所抑制，故判斷本研究之之蛋白酶屬於絲胺酸蛋白酶。目前已知的角蛋白分解酶中，就酵素活性位置之特性分類，絕大部份都屬於絲胺酸蛋白酶型態，例如 *B. licheniformis* PWD-1、*S. pactum* DSM 40530 和 *F. pennavorans* 等(Lin *et al.*, 1992; Bockle *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1996)，但並非所有的絲胺酸蛋白酶都具有角蛋白分解能力；Rozs 於 2001 年時篩選出一具有角蛋白分解活性之 *B. licheniformis* K-508 能夠同時分泌絲胺酸蛋白酶和硫醇蛋白酶，經酵素活性分析發現其中具有角蛋白分解活性的是硫醇型蛋白酶，而非原本預期的絲胺酸蛋白酶。

2、天然角蛋白基質專一性之研究

B. licheniformis THSC-1 之角蛋白分解酶對 4 種角蛋白基質—豬毛、羊毛、頭髮及雞毛在經過 4 天反應後，利用茚三酮反應分析第 0 天及第 4 天之總游離胺基酸濃度變化，結果如圖十一所示，第 0 天時豬毛、羊毛、頭髮及雞毛皆有微量之胺基酸釋出，總胺基酸濃度分別為 25、117、32、55 mg/L，這是因為這 4 種角蛋白基質溶液前先經過高溫高壓滅菌處理，對角蛋白造成之物理性破壞，使得 4 種角蛋白有不同程度之胺基酸流失，其中以羊毛受高溫高壓破壞之情形最為嚴重。經過 4 天角蛋白分解酶作用後 4 種角蛋白基質總胺基酸濃度皆顯著上升 ($P < 0.05$)，豬毛、羊毛、頭髮及雞毛分別增加了 5.2、1.8、9.0、8.7 倍之胺基酸釋出，其中以頭髮和雞毛增加幅度最高，其次為豬毛，而羊毛的胺基酸釋出最少。

另以角蛋白分解酶作用前後之 4 種角蛋白基質以掃描式電子顯微鏡觀察 (如圖十二)，發現豬毛、羊毛、頭髮及雞毛之表面經角蛋白分解酶處理後，皆較處理前有明顯剝離之現象，尤其是頭髮和雞毛表面被破壞之情況最為嚴重，此點與總胺基酸濃度分析之結果正好符合。

同一酵素對不同種類之角蛋白基質有不同程度之分解能力，原因與各種角蛋白中所具有之鍵結強度有關，大量胱胺酸所形成之雙硫鍵則與角蛋白強韌度之關係最為密切；*B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白

分解酶能分解多種堅硬的角蛋白基質，對於畜牧廢棄物之處理及其它工業之應用，則能提供更多樣化的應用方向。Nakanishi 等人 (1974) 也提出 *Streptomyces* 產生之鹼性蛋白酶能在強鹼的狀態下分解頭髮、羽毛和羊毛等角蛋白基質，在 30°C 作用 72 小時分別有 2%、3% 和 6% 等程度之分解，而對蠶絲分解效果則不明顯，故在生產胺基酸之應用上，選擇合適的角蛋白來源亦是很重要的。

3、酵素動力學

以不同濃度之 azocasein solution ($[S]$) 與粗酵素液進行反應，測定其酵素活性，並換算反應速率，以 $1/V$ 對 $1/[S]$ 作圖，可得一回歸直線 (如圖十三)，此回歸直線與 Y 軸之截距為 $1/V_{\max}$ ，與 X 軸之截距為 $-1/K_m$ ；根據此公式求得 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶水解 azocasein 之 K_m 值為 0.19 mM 及最大反應速率 V_{\max} 值為 370.17 mol/min/mg。

然而目前角蛋白分解酶文獻中，酵素動力學方面的探討並不多，也沒有固定的試驗模式可循，Bockle (1995) 針對 *S. pactum* DSM 40530 所作之酵素動力學探討是以人工合成之胜肽為酵素基質，對長鏈胜肽 Suc-Ala-Ala-Ala-pNA 及 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 之 K_m 值分別為 0.98 mM 及 0.55 mM。

4、Azocasein 與 azokeratin 之酵素動力學關係

此試驗各別測定角蛋白分解酶對可溶性蛋白質基質—azocasein 及不溶性蛋白質基質—azokeratin 之酵素動力學反應。以不同濃度之 azokeratin solution 與酵素進行反應，測定其酵素活性，並換算反應速率，依據上述之公式分析酵素對 azokeratin 之酵素動力學，劃出雙倒數圖（如圖十四），並求得 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶水解 azokeratin 之 K_m 值為 6.3 mM 及 V_{max} 值為 21.69 mol/min/mg，此結果代表 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶除了能分解水溶性酪蛋白，亦可分解不溶性的角蛋白基質。

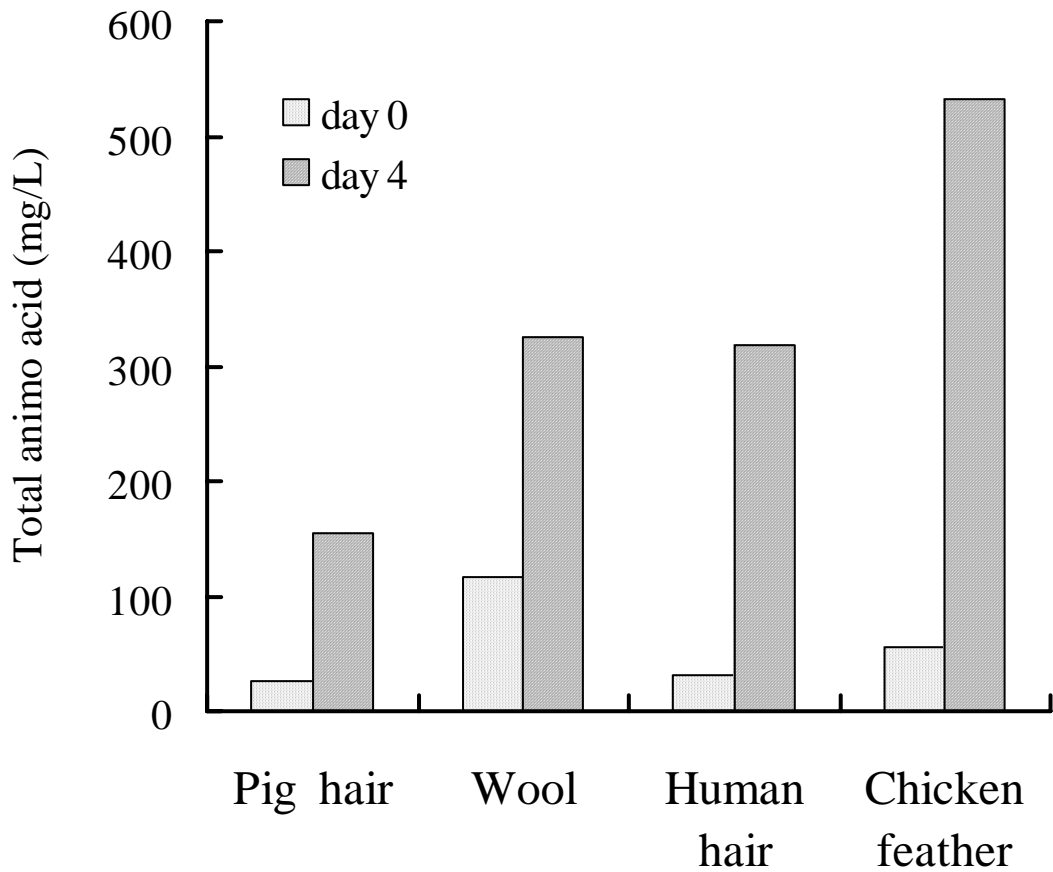
一般而言， K_m 可代表酵素對基質的親和性（affinity），低 K_m 值表示酵素與基質有高親和力，反之高 K_m 值表示酵素與基質之親和力低（呂和林，1991）；而 V_{max} 的意義指在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率。故由表五可知 azocasein 與 azokeratin 之酵素動力學關係比較結果，得 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶對水溶性基質 azocasein 與不溶性的 azokeratin 的水解作用，對 azocasein 具有較高之親和力，且最大反應速率也明顯較高。Lin 等（1992）也指出 *B. licheniformis* PWD-1 之角蛋白分解酶較其他種類之蛋白水解酶能分解多種蛋白質基質，包括水溶性牛血清白蛋白（BSA）、酪蛋白及不溶性膠原蛋白（collagen）、彈力蛋白（elastin）及角蛋白等。

表四、不同抑制劑對於 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶活性之影響

Table 4. Effect of various inhibitors on the activity of keratinase from *B. licheniformis* THSC-1

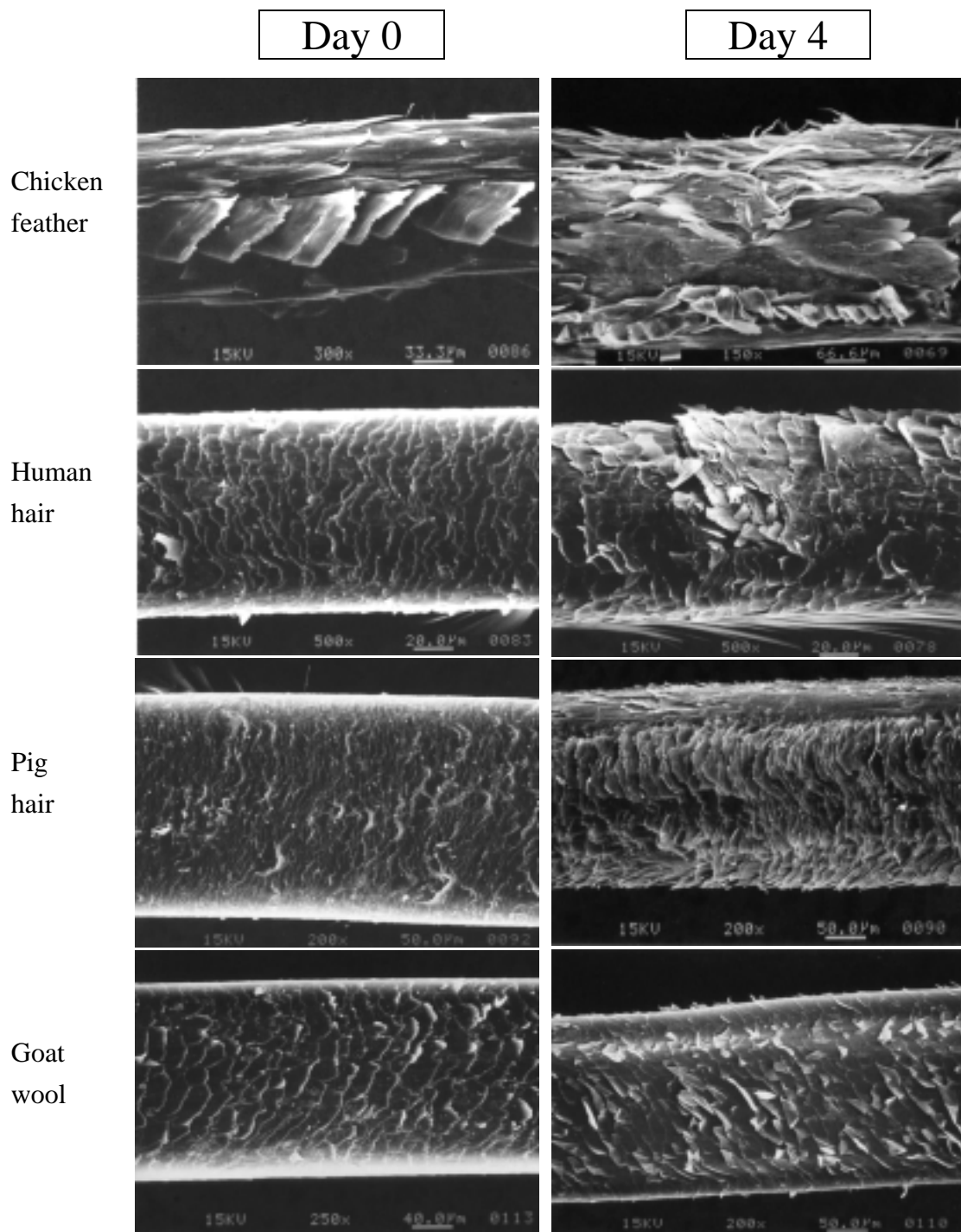
Inhibitor	Specificity of inhibitor	Effective concentration (mM)	Residual activity (%)
control			100 ^a
E-64	Thiol protease	0.001	98.8 ^a
		0.005	98.7 ^a
		0.01	99.0 ^a
Pepstatin A	Acid protease	0.0001	99.3 ^a
		0.0005	99.6 ^a
		0.001	99.6 ^a
PMSF	Serine protease	0.1	40.8 ^b
		0.5	24.0 ^c
		1	5.8 ^d
EDTA	Metalloprotease	1	99.3 ^a
		5	97.7 ^a
		10	97.4 ^a

^{a-d} mean values which have the different superscript are significantly different ($P < 0.05$).



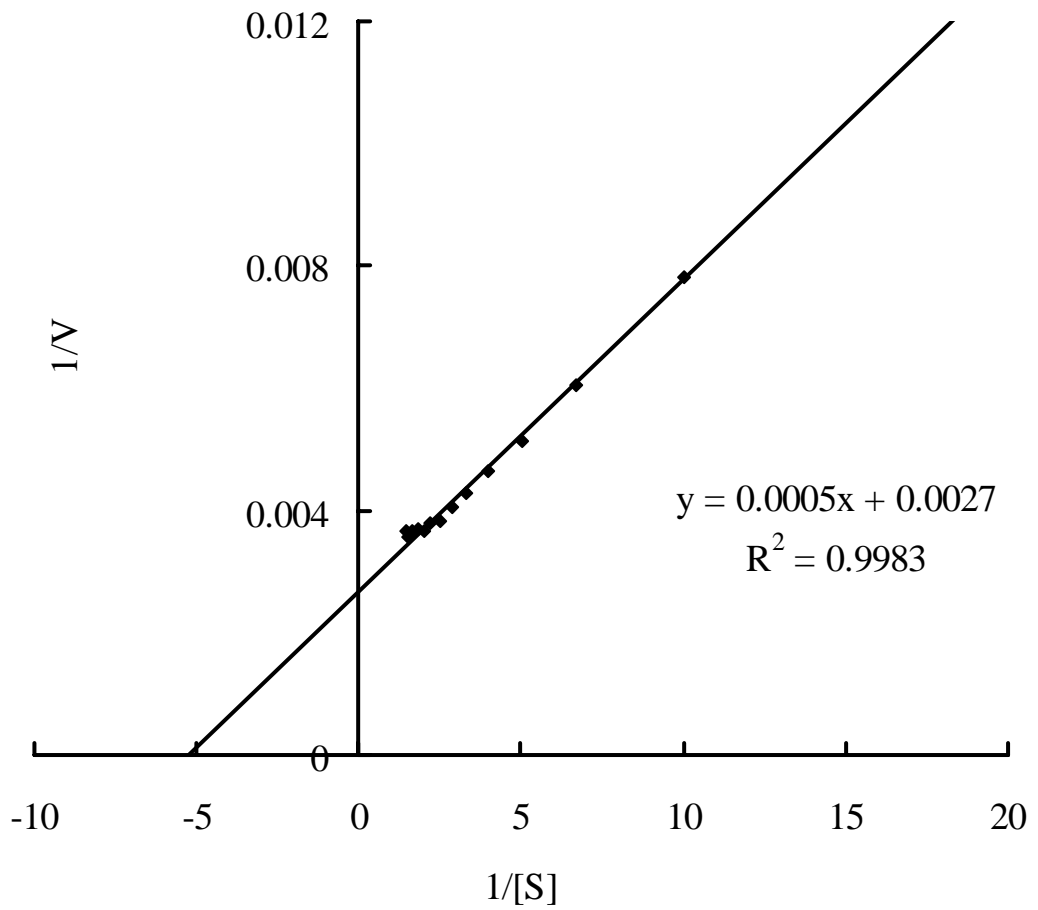
圖十一、不同角蛋白基質受 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶分解 4 天之游離胺基酸濃度變化。

Fig. 11. Free amino acid concentrations of various keratinous proteins degraded by keratinase from *B. licheniformis* THSC-1 for 4 days.



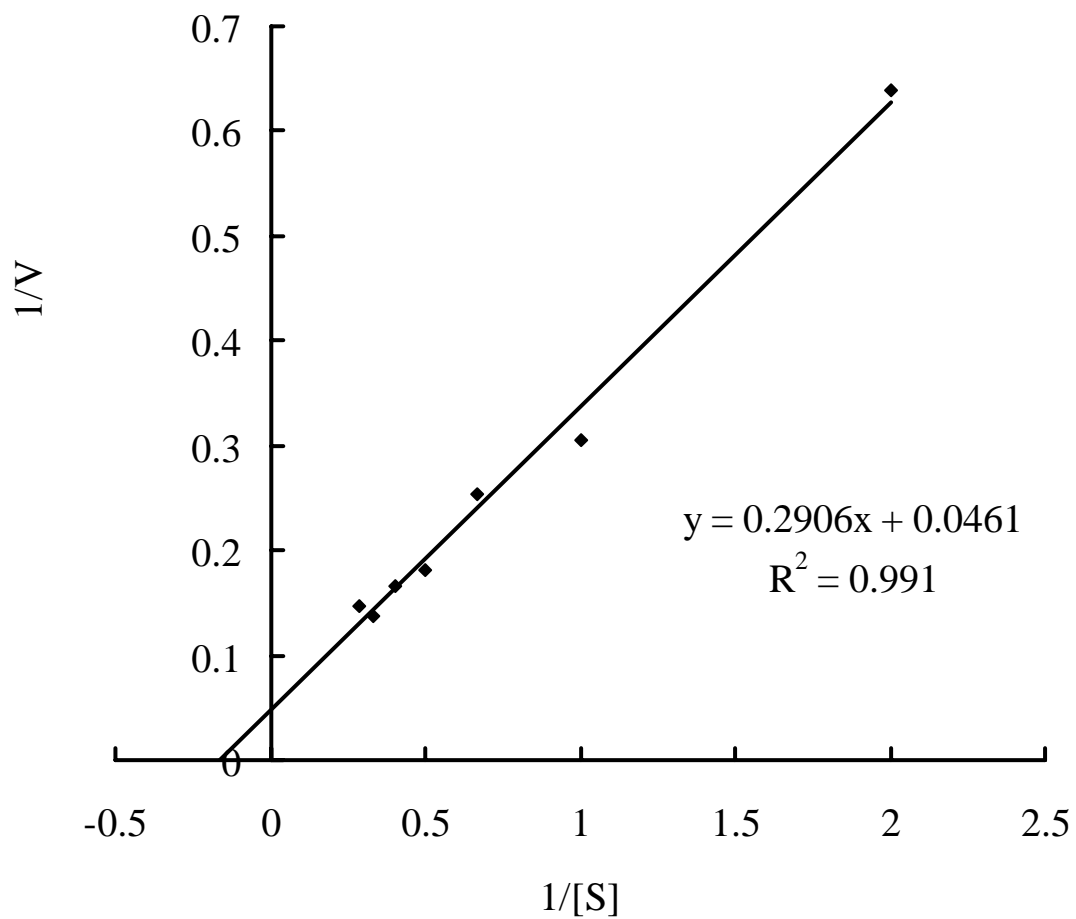
圖十二、不同角蛋白基質受 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶分解 4 天之電子顯微結構圖。

Fig. 12. Scanning electron micrographs of various keratinous proteins degraded by keratinase from *B. licheniformis* THSC-1 during 4 days.



圖十三、*B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶分解 azocasein 之雙倒數圖。

Fig. 13. Double reciprocal plot of keratinase from *B.licheniformis* THSC-1 against azocasein.



圖十四、*B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶分解 azokeratin 之雙倒數圖。

Fig. 14. Double reciprocal plot of keratinase from *B.licheniformis* THSC-1 against azokeratin.

表五、*B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶之酵素動力學參數

Table 5. Kinetic parameters of keratinase from *B.licheniformis* THSC-1

Enzyme	Substrate	K _m (mM)	V _{max} (mol/min/mg)
Keratinase	azocasein	0.19	370.17
	azokeratin	6.3	21.69

四、DNA 序列分析

在以上之分析中已確定 *B. licheniformis* THSC-1 產生之蛋白酶具有角蛋白分解能力，為了更加確定以上之結果，因此對其 DNA 序列進行選殖及序列分析，並與其它已知的角蛋白分解酶序列進行比對，探討其相似性與演化關係。

1、選殖

根據 Lin 等人 (1995) 所發表 *B.licheniformis* PWD-1 之角蛋白分解酶序列 (*ker A*)，設計其專一性合成引子—Primer A1 及 A2，以 *B. licheniformis* THSC-1 之 genomic DNA 為模板進行 PCR 擴殖反應，電泳結果顯示得單一 DNA band (如圖十五)，此片段長度約為 1250 bp，與預期長度 (1243 bp) 極為相符，也與 Lin 等人 (1995) 所發表 *ker A* 基因序列長度相符合。

2、限制性內切酶檢測

上述之 PCR 產物與 pGEM-T vector 進行接和後，經轉殖及質體 DNA 純化後，利用限制性內切酶 (Not I) 進行剪切，藉以檢測目標基因是否確實存在，結果如圖十六所示，得到兩片段，一符合 Vector 長度 3015 bp，另一片段也與角蛋白分解酶基因 1243 bp 相符。

3、角蛋白分解酶基因之序列分析

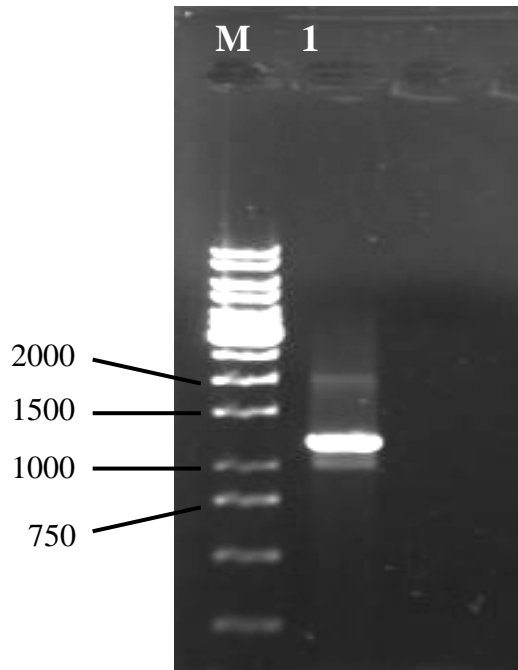
圖十七為委託源資生物科技公司進行序列分析所獲得之序列圖，得角蛋白分解酶基因序列共有 1243 個核酸，其中 1137 個核酸為可表現蛋白質之序列，轉譯 (translation) 成 379 個胺基酸之蛋白質序列，包含 perprotein (29 個胺基酸)、proprotein (76 個胺基酸) 和 mature protein (274 個胺基酸)。酵素活性中心之天門冬胺酸、組胺酸、絲胺酸殘基位置於 A32、H63、S220；並利用 NCBI 基因資料庫比對，與 Lin 等人所發表 *B. licheniformis* PWD-1 之 *ker A* 基因序列相似度為 99 % (如圖十八)，兩者序列之前、中段並無差異，而尾段有 5 個核酸有差異。此結果顯示 THSC-1 產生之角蛋白分解酶與 PWD-1 產生之角蛋白分解酶極為相似。

B. licheniformis THSC-1 之角蛋白分解酶與枯草菌蛋白酶家族 (subtilisin family) 中產生角蛋白分解酶之菌株 *B. licheniformis* PWD-1 (*ker A*)、*B. licheniformis* Carlsberg NCIMB 6816 (*Sub C*)、*B. licheniformis* ATCC 12759 (*Sub C*) 及 *B. licheniformis* NCIMB 10689 (*Sub C*) 進行比對，結果 (如圖十九) 顯示 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶之胺基酸序列與此 4 個不同來源之序列皆有很高之相似性，差異度皆在 0.5 % 以內；PWD-1、NCIMB 6816、ATCC 12759、NCIMB 10689 與 THSC-1 不同處分別為 mature protein 之 V222、mature protein 之 K144、proprotein 之 N29、preprotein 之 L15；THSC-1 於 222 位置之

丙胺酸殘基 (A222) 與大部分枯草菌酵素相同 (Siezen *et al.*, 1997) 而與 *KerA* 之纈胺酸殘基 (V222) 不同，因此可推論 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶亦屬於枯草菌蛋白酶家族之成員。

另一方面，A222 與酵素活性中心之絲胺酸殘基位置 S220 相當靠近，Evans 等 (2000) 推測 PWD-1 角蛋白分解酶 (*KerA*) 之 V222 可能與此酵素對受質之專一性有關，且纈胺酸 (V) 支鏈多於丙胺酸 (A) 支鏈，則可能增強對角蛋白質之分解能力，故 mature protein 之 222 位置可視為基因定點突變之最佳位置。圖二十為 *B. licheniformis* THSC-1 之演化關係圖，得知 THSC-1 與 NCIMB 10689 之演化關係最為親近，其次是 ATCC 12759，而與 PWD-1 和 NCIMB 6816 關係較遠。

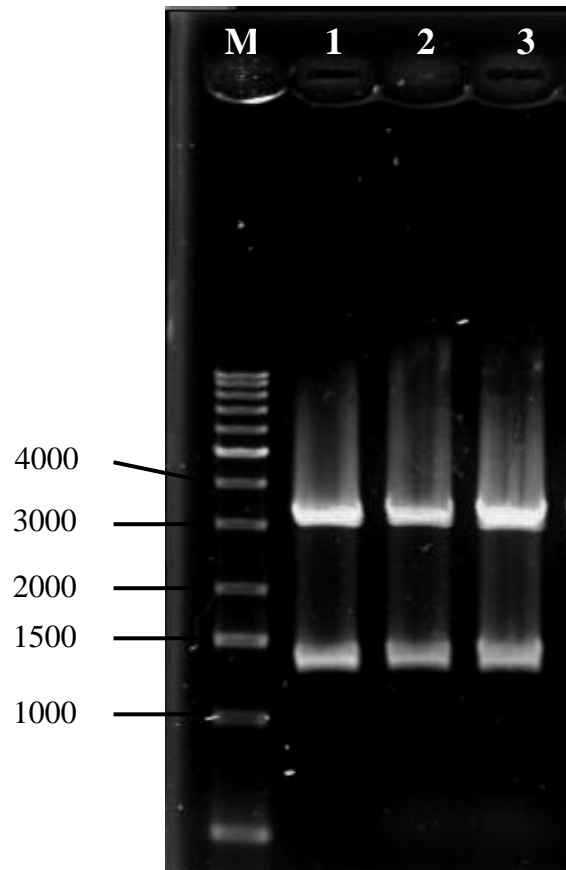
藉由 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶基因序列之確立，期望提供日後研究之參考，未來更可配合基因工程，如基因重組和定點突變技術，使本土菌醃 *B. licheniformis* THSC-1 產生之角蛋白分解酶之安定性提高並大量生產，增加工業應用價值。



圖十五、以聚合酶連鎖反應擴殖之 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶基因片段。

Fig. 15. The keratinase gene from *B. licheniformis* THSC-1 specifically amplified by PCR.

(M: Marker ;Line 1: keratinase DNA fragment)



圖十六、角蛋白分解酶基因以限制酶（Not I）剪切之電泳分析圖。

Fig. 16. Electrophoresis analysis of restriction fragments from digesting the keratinase gene with Not I.

(M: Marker; Line 1,2,3: restriction fragments)

1 ATGATGAGGA AAAAGAGTTT TTGGCTTGGG ATGCTGACGG CCTTCATGCT
 M M R K K S F W L G M L T A F M L
 →pre

51 CGTGTTCACG ATGGCATTCA GCGATTCCGC TTCTGCTGCT CAACCGGCGA
 V F T M A F S D S A S A A Q P A K
 →pro

101 AAAATGTTGA AAAGGATTAT ATTGTCGGAT TTAAGTCAGG AGTGAAAACC
 N V E K D Y I V G F K S G V K T

151 GCATCTGTCA AAAAGGACAT CATCAAAGAG AGCGGCGGAA AAGTGGACAA
 A S V K K D I I K E S G G K V D K

201 GCAGTTTAGA ATCATCAACG CGGCAAAAGC GAAGCTAGAC AAAGAAGCGC
 Q F R I I N A A K A K L D K E A L

251 TTAAGGAAGT CAAAAATGAT CCGGATGTCG CTTATGTGGA AGAGGATCAT
 K E V K N D P D V A Y V E E D H

301 GTGGCCCATG CTTGGCGCA AACCGTTCCT TACGGCATT C TCTCATTAA
 V A H A L A Q T V P Y G I P L I K
 →mature

351 AGCGGACAAA GTGCAGGCTC AAGGCTTTAA GGGAGCGAAT GTAAAAGTAG
 A D K V Q A Q G F K G A N V K V A

401 CCGTCCTGGA TACAGGAATC CAAGCTTCTC ATCCGGACTT GAACGTAGTC
 V L D T G I Q A S H P D L N V V

451 GGCGGAGCAA GCTTTGTGGC TGGCGAAGCT TATAACACCG ACGGCAACGG
 G G A S F V A G E A Y N T D G N G

501 ACACGGCACA CATGTTGCCG GTACAGTAGC TGCCTTGAC AATACAACGG
 H G T H V A G T V A A L D N T T G

551 GTGTATTAGG CGTTGCGCCA AGCGTATCCT TGTACGCGGT TAAAGTACTG
 V L G V A P S V S L Y A V K V L

601 AATTCAAGCG GAAGCGGATC ATACAGCGGC ATTGTAAGCG GAATCGAGTG
 N S S G S G S Y S G I V S G I E W

651 GGCGACAACA AACGGCATGG ATGTTATCAA TATGAGCCTT GGGGGAGCAT
 A T T N G M D V I N M S L G G A S

(接下頁)

```

701 CAGGCTCGAC AGCGATGAAA CAGGCAGTCG ACAATGCATA TGCAAGAGGG
    G S T A M K Q A V D N A Y A R G
751 GTTGTCTGTTG TAGCTGCAGC AGGGAACAGC GGATCTTCAG GAAACACGAA
    V V V V A A A G N S G S S G N T N
801 TACAATTGGC TATCCTGCGA AATACGATTC TGTCATCGCT GTTGGCGCGG
    T I G Y P A K Y D S V I A V G A V
851 TAGACTCTAA CAGCAACAGA GCTTCATTTT CCAGTGTGGG AGCAGAGCTT
    D S N S N R A S F S S V E A E L
901 GAAGTCATGG CTCCTGGCGC AGGCGTATAC AGCACTTACC CAACGAACAC
    E V M A P G A G V Y S T Y P T N T
951 TTATGCAACA TTGAACGGAA CGTCAATGGC TTCTCCTCAT GTAGCGGGAG
    Y A T L N G T S M A S P H V A G A
1001 CAGCAGCTTT GATCTTGTCA AAACATCCGA ACCTTTCAGC TTCACAAGTC
    A A L I L S K H P N L S A S Q V
1051 CGCAACCGTC TCTCCAGCAC GGCGACTTAT TTGGGAAGCT CCTTCTACTA
    R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y
1101 TGGGAAAGGT CTGATCAATG TCGAAGCTGC CGCTCAATAA CATATTCTAA
    G K G L I N V E A A A Q *
1151 CAAATAGCAT ATAGAAAAAG CTAGTGTTTT TAGCACTAGC TTTTTCTTCA

1201 TTCTGATGAA GACTGTTCAA TATTTTGAAT CCGTTCCATG ATC

```

圖十七、*B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶基因之核酸與胺基酸序列。

Fig. 17. The nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of keratinase gene from *B. licheniformis* THSC-1.

(: start codon; : stop codon)

1 ATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCCTTCATGCTCGTGTTCACG 60
|||||
215 ATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCCTTCATGCTCGTGTTCACG 274
→pre →pro

61 ATGGCATT CAGCGATTCCGCTTCTGCTGCTCAACCGGCGAAAAATGTTGAAAAGGATTAT 120
|||||
275 ATGGCATT CAGCGATTCCGCTTCTGCTGCTCAACCGGCGAAAAATGTTGAAAAGGATTAT 334

121 ATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAG 180
|||||
335 ATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAG 394

181 AGCGGCGGAAAAGTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGAC 240
|||||
395 AGCGGCGGAAAAGTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGAC 454

241 AAAGAAGCGCTTAAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCAT 300
|||||
455 AAAGAAGCGCTTAAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCAT 514

301 GTGGCCCATGCCTTGGCGCAAACCGTTCCTTACGGCATTCTCTCATTAAAGCGGACAAA 360
|||||
515 GTGGCCCATGCCTTGGCGCAAACCGTTCCTTACGGCATTCTCTCATTAAAGCGGACAAA 574
→mature

361 GTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGGAATC 420
|||||
575 GTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGGAATC 634

421 CAAGCTTCTCATCCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCT 480
|||||
635 CAAGCTTCTCATCCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCT 694

481 TATAACACCGACGGCAACGGACACGGCACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGAC 540
|||||
695 TATAACACCGACGGCAACGGACACGGCACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGAC 754

541 AATACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGTTAAAGTACTG 600
|||||
755 AATACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGTTAAAGTACTG 814

601 AATCAAGCGGAAGCGGATCATAACGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACA 660
|||||
815 AATCAAGCGGAAGCGGATCATAACGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACA 874

(接下頁)

```

661 AACGGCATGGATGTTATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAAA 720
    |||
875 AACGGCATGGATGTTATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAAA 934

721 CAGGCAGTCGACAATGCATATGCAAGAGGGGTTGTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGC 780
    |||
935 CAGGCAGTCGACAATGCATATGCAAGAGGGGTTGTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGC 994

781 GGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGATTCTGTCATCGCT 840
    |||
995 GGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGATTCTGTCATCGCT 1054

841 GTTGGCGCGGTAGACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTT 900
    |||
1055 GTTGGTGCAGGTAGACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTT 1114

901 GAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACA 960
    |||
1115 GAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACA 1174

961 TTGAACGGAACGTCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGCA 1020
    |||
1175 TTGAACGGAACGTCAATGGTTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGCA 1234

1021 AAACATCCGAACCTTTCAGCTTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTAT 1080
    |||
1235 AAACATCCGAACCTTTCAGCTTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTAT 1294

1081 TTGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGGTCTGATCAATGTGGAAGCTGCCGCTCAATAA 1140
    |||
1295 TTGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGGTCTGATCAATGTGGAAGCTGCCGCTCAATAA 1354

1141 CATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTTAGCACTAGCTTTTTCTTCA 1200
    |||
1355 CATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTTAGCACTAGCTTTTTCTTCA 1414

1201 TTCTGATGAAGACTGTTCAATATTTTGAATCCGTTCCATGATC 1243
    |||
1415 TTCTGATGAAGTTGTCCAATATTTTGAATCCGTTCCATGATC 1457

```

圖十八、*B. licheniformis* THSC-1 與 *B. licheniformis* PWD-1 角蛋白分解酶核酸序列之比對。

Fig. 18. Comparison of the DNA sequence for keratinase gene from *B. licheniformis* THSC-1 with the one from *B. licheniformis* PWD-1.

1 50
 NCIMB_6816 MMRKKSFWLG MLTAFMLVFT MAFSDSASAA QPAKNVEKDY IVGFKSGVKT
 THSC-1 MMRKKSFWLG MLTAFMLVFT MAFSDSASAA QPAKNVEKDY IVGFKSGVKT
 ATCC_12759 MMRKKSFWLG MLTAFMLVFT MAFSDSASAA QPAKNVEKDY IVGFKSGVKT
 PWD-1 MMRKKSFWLG MLTAFMLVFT MAFSDSASAA QPAKNVEKDY IVGFKSGVKT
 NCIMB_10689 MMRKKSFWLG MLTAFMLVFT MAFSDSASAA QPAKNVEKDY IVGFKSGVKT
 →pre →pro

51 100
 NCIMB_6816 ASVKKDIIKE SGGKVDKQFR IINAAKAKLD KEALKEVKND PDVAYVEEDH
 THSC-1 ASVKKDIIKE SGGKVDKQFR IINAAKAKLD KEALKEVKND PDVAYVEEDH
 ATCC_12759 ASVKKDIIKE SGGKVDKQFR IINAAKAKLD KEALKEVKND PDVAYVEEDH
 PWD-1 ASVKKDIIKE SGGKVDKQFR IINAAKAKLD KEALKEVKND PDVAYVEEDH
 NCIMB_10689 ASVKKDIIKE SGGKVDKQFR IINAAKAKLD KEALKEVKND PDVAYVEEDH

101 150
 NCIMB_6816 VAHALAQTVP YGIPLIKADK VQAQGFKGAN VKVAVLDTGI QASHPDLNVV
 THSC-1 VAHALAQTVP YGIPLIKADK VQAQGFKGAN VKVAVLDTGI QASHPDLNVV
 ATCC_12759 VAHALAQTVP YGIPLIKADK VQAQGFKGAN VKVAVLDTGI QASHPDLNVV
 PWD-1 VAHALAQTVP YGIPLIKADK VQAQGFKGAN VKVAVLDTGI QASHPDLNVV
 NCIMB_10689 VAHALAQTVP YGIPLIKADK VQAQGFKGAN VKVAVLDTGI QASHPDLNVV
 →mature

151 200
 NCIMB_6816 GGASFVAGEA YNTDGNGHGT HVAGTVAALD NTTGVLGVAP SVSLYAVKVL
 THSC-1 GGASFVAGEA YNTDGNGHGT HVAGTVAALD NTTGVLGVAP SVSLYAVKVL
 ATCC_12759 GGASFVAGEA YNTDGNGHGT HVAGTVAALD NTTGVLGVAP SVSLYAVKVL
 PWD-1 GGASFVAGEA YNTDGNGHGT HVAGTVAALD NTTGVLGVAP SVSLYAVKVL
 NCIMB_10689 GGASFVAGEA YNTDGNGHGT HVAGTVAALD NTTGVLGVAP SVSLYAVKVL

201 250
 NCIMB_6816 NSSGSGSYSG IVSGIEWATT NGMDVINMSL GGASGSTAMK QAVDNAYAKG
 THSC-1 NSSGSGSYSG IVSGIEWATT NGMDVINMSL GGASGSTAMK QAVDNAYARG
 ATCC_12759 NSSGSGSYSG IVSGIEWATT NGMDVINMSL GGASGSTAMK QAVDNAYARG
 PWD-1 NSSGSGSYSG IVSGIEWATT NGMDVINMSL GGASGSTAMK QAVDNAYARG
 NCIMB_10689 NSSGSGSYSG IVSGIEWATT NGMDVINMSL GGASGSTAMK QAVDNAYARG

(接下頁)

```

                251                                     300
NCIMB_6816 VVVVAAAGNS GSSGNTNTIG YPAKYDSVIA VGAVDSNSNR ASFSSVGAEL
  THSC-1 VVVVAAAGNS GSSGNTNTIG YPAKYDSVIA VGAVDSNSNR ASFSSVGAEL
ATCC_12759 VVVVAAAGNS GSSGNTNTIG YPAKYDSVIA VGAVDSNSNR ASFSSVGAEL
  PWD-1 VVVVAAAGNS GSSGNTNTIG YPAKYDSVIA VGAVDSNSNR ASFSSVGAEL
NCIMB_10689 VVVVAAAGNS GSSGNTNTIG YPAKYDSVIA VGAVDSNSNR ASFSSVGAEL

```

```

                301                                     350
NCIMB_6816 EVMAPGAGVY STYPTNTYAT LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV
  THSC-1 EVMAPGAGVY STYPTNTYAT LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV
ATCC_12759 EVMAPGAGVY STYPTNTYAT LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV
  PWD-1 EVMAPGAGVY STYPTNTYAT LNGTSMVSPH VAGAAALILS KHPNLSASQV
NCIMB_10689 EVMAPGAGVY STYPTNTYAT LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV

```

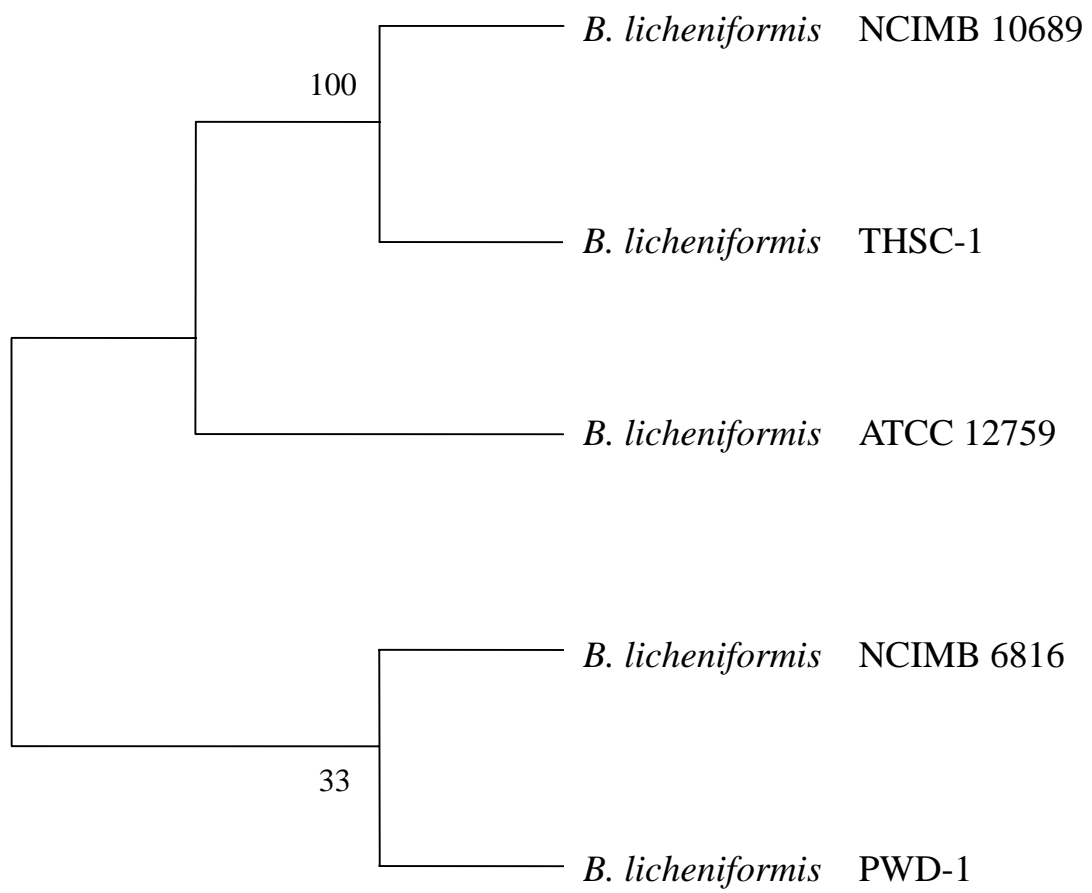
```

                351                                     379
NCIMB_6816 RNRLSSTATY LGSSFYYGKG LINV~~~~~
  THSC-1 RNRLSSTATY LGSSFYYGKG LINVEAAAQ
ATCC_12759 RNRLSSTATY LGSSFYYGKG LINV~~~~~
  PWD-1 RNRLSSTATY LGSSFYYGKG LINVEAAAQ
NCIMB_10689 RNRLSSTATY LGSSFYYGKG LINV~~~~~

```

圖十九、不同來源角蛋白分解酶之胺基酸序列比較。

Fig. 19. The multiple sequence alignment of different keratinase from various *Bacillus*.



圖二十、不同來源角蛋白分解酶之演化關係圖。

Fig. 20. Evolutionary analysis of the keratinase gene from various *Bacillus*.

陸、結論

- 1、本研究以 *B. licheniformis* THSC-1 為醱酵菌株，其所生產之角蛋白分解酶為胞外蛋白酶，由酵素活性位置之特性分類之，是屬於絲胺酸蛋白酶；粗酵素液經純化後酵素活性由 364.3 U/mg 提高至 4231.6 U/mg，得到純化 11.6 倍之酵素，其產率為 39 %。
- 2、*B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶之最適作用溫度及 pH 值分別為 70°C 與 pH 8.0，是屬於嗜熱性鹼性蛋白酶；並具有良好之熱穩定性及 pH 穩定性，在 50°C 保溫 6 天仍可維持將近 50 % 之活性，pH 5 至 11 保存 8 天後皆保持 80 % 以上之活性；可穩定地長期儲存於 4°C 以下之低溫條件，而於室溫下儲存 20 天也仍有 61.2 % 之殘留活性。
- 3、*B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶能分解多種角蛋白基質，雞毛、羊毛、豬毛及人類頭髮經過此酵素作用 4 天後，游離胺基酸濃度皆顯著上升，其中頭髮和雞毛分別增加 9.0 和 8.7 倍，分解效果最佳。
- 4、根據 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法計算酵素動力學參數，*B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶對 azocasein 與 azokeratin 之 K_m

值分別為 0.19 及 6.3 mM， V_{\max} 值分別為 370.17 及 21.69 mol/min/mg，表示對 azocasein 具有較高之親和力，且最大反應速率也明顯較高。

5、經核酸序列分析得 *B. licheniformis* THSC-1 之角蛋白分解酶基因序列共有 1137 個核酸，轉譯成 379 個胺基酸之蛋白質序列，並與枯草菌蛋白酶家族中數種角蛋白分解酶有高度的相似性，故屬於枯草菌蛋白酶家族之成員。