

## 目 錄

頁次

壹、摘要.....	1
貳、前言.....	2
參、文獻回顧.....	4
一、蛋白酶於工業之應用.....	4
1、蛋白酶之簡介.....	5
2、蛋白酶之分類.....	5
2-1、絲胺酸蛋白酶.....	6
2-2、硫醇型蛋白酶.....	7
2-3、金屬蛋白酶.....	8
2-4、酸性型蛋白酶.....	8
二、Bacillus 所生產之蛋白酶之應用.....	9
1、廢棄物處理.....	9
2、清潔劑工業.....	10
3、食品.....	12
4、皮革工業.....	13
5、醫藥.....	13
6、X-ray.....	14
三、角蛋白分解酶之純化、特性與應用.....	16
1、角蛋白(keratin)之簡介.....	16
2、角蛋白分解酶之簡介.....	16
3、角蛋白分解酶之純化與生化特性.....	18
4、角蛋白分解酶之應用與發展.....	21
4-1、角蛋白分解酶於飼料工業之應用.....	21
4-2、下水道清潔劑.....	22
四、角蛋白分解酶之酵素工程.....	24
1、酵素固定化.....	24
2、基因工程與同源性探討.....	25
肆、材料與方法.....	29
一、供試菌醃.....	29
二、培養基.....	29
三、藥品.....	29

四、儀器與設備.....	31
五、分析方法.....	32
1、酵素活性測定.....	33
2、蛋白質濃度測定.....	34
3、酵素活性單位定義與比活性.....	34
4、節三酮反應.....	35
5、統計分析.....	36
六、試驗步驟.....	36
1、角蛋白分解酶之生產與純化.....	36
1-1、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 生產角蛋白分解酶之最適培養時間.....	36
1-2、酵素位置之確認.....	37
1-3、粗酵素液的製備.....	37
1-4、超過濾濃縮.....	38
1-5、陽離子交換層析.....	38
2、蛋白分解酶之一般生化特性之測定.....	38
2-1、酵素作用之最適溫度.....	38
2-2、酵素作用之最適 pH.....	39
2-3、酵素熱安定性.....	39
2-4、酵素之 pH 安定性.....	39
2-5、保存性試驗.....	40
3、蛋白分解酶之生化性質分析.....	40
3-1、蛋白酶抑制劑測定.....	40
3-2、天然角蛋白基質專一性測定.....	41
3-3、酵素動力學.....	42
3-4、Azocasein 與 azokeratin 之酵素動力學關係.....	42
4、DNA 序列分析.....	43
4-1、聚合酶連鎖反應.....	43
4-2、接合作用.....	44
4-3、質體 DNA 之轉殖.....	44
4-4、質體 DNA 之純化.....	45
4-5、限制性內切酶檢測.....	45
4-6、定序.....	46
伍、結果與討論.....	47
一、角蛋白分解酶之生產與純化.....	47
1、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶之最適培養時間...	47
2、角蛋白分解酶位置之確認.....	47
3、角蛋白分解酶之純化.....	48

二、角蛋白分解酶之一般生化特性探討.....	55
1、酵素作用之最適溫度.....	55
2、酵素作用之最適 pH.....	55
3、酵素熱安定性.....	56
4、酵素之 pH 安定性.....	56
5、保存性.....	58
三、角蛋白分解酶之生化性質分析.....	66
1、蛋白質抑制劑對酵素活性之影響.....	66
2、天然角蛋白基質專一性.....	67
3、酵素動力學.....	68
4、Azocasein 與 azokeratin 之酵素動力學關係.....	68
四、DNA 序列分析.....	76
1、選殖.....	76
2、限制性內切酶檢測.....	76
3、角蛋白分解酶基因之序列分析.....	76
陸、結論.....	88
柒、參考文獻.....	90
捌、英文摘要.....	95
玖、小傳.....	97
附錄一、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 於食品工業發展研究所之鑑定報告.....	98
附錄二、緩衝溶液之組成與 pH 值.....	99
附錄三、蛋白酶抑制劑之製備.....	100

表 次	頁次
表一、商業用細菌性鹼性蛋白酶之商品名、來源及應用.....	15
表二、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 產生之胞內及胞外酵素活性....	52
表三、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 產生之角蛋白分酶純化結果....	54
表四、不同抑制劑對於 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 之角蛋白分解 酶活性之影響.....	70
表五、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 之角蛋白分解酶之酵素動力學 參數.....	75

圖 次	頁次
圖一、角蛋白中氫鍵與雙硫鍵之結構.....	17
圖二、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 產生角蛋白分解活性之最適培養時間.....	51
圖三、角蛋白分解酶於 CM-cellulose 管柱之離子交換層析圖...	53
圖四、溫度對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶活性之影響.....	59
圖五、pH 對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶活性之影響.	60
圖六、不同溫度對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響.....	61
圖七、長時間下不同溫度對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響.....	62
圖八、不同 pH 對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響.....	63
圖九、長時間下不同 pH 對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響.....	64
圖十、儲存天數對 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶安定性之影響.....	65
圖十一、不同角蛋白基質受 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶分解 4 天之游離胺基酸濃度變化.....	71
圖十二、電子顯微鏡觀察不同角蛋白基質受 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶分解 4 天之影響.....	72
圖十三、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 之角蛋白分解酶對 azocasein 之雙倒數圖.....	73
圖十四、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 之角蛋白分解酶對 azokeratin 之雙倒數圖.....	74
圖十五、以聚合酶連鎖反應擴殖之 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶基因片段.....	79
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.....	80
圖十七、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 角蛋白分解酶基因之核酸與胺基酸序列.....	82
圖十八、 <i>B. licheniformis</i> THSC-1 與 <i>B. licheniformis</i> PWD-1 角蛋白分解酶 DNA 序列之比較.....	84
圖十九、不同來源角蛋白分解酶之胺基酸序列比較.....	86
圖二十、不同來源角蛋白分解酶之演化關係圖.....	87