

## 參、文獻回顧

### 一、蛋白酶於工業之應用

在目前工業所應用的酵素 (industrial enzymes)，有 60 % 是屬於蛋白分解酵素 (proteolytic enzyme)，應用的範圍包括清潔劑、食品、製藥、皮革、醫療、廢棄物處理等；其次是解醣酵素 (carbohydrase) 約佔酵素總使用量的 30 %，主要應用於澱粉、麵包烘培、釀造及紡織等工業；而其餘 10 % 則為脂肪分解酵素及其他較特殊之酵素 (陳，1989)。

2000 年時全球酵素市場產值為 15 億美金，蛋白分解酵素即佔了全球酵素產值將近 40 %；而在所有蛋白酶中又以鹼性蛋白酶 (alkaline proteinase) 與工業應用之關係最為密切；鹼性蛋白酶的定義指作用條件是在 pH 中性至鹼性的範圍之蛋白酶 (Gupta *et al.*, 2002)。日本於 1994 年鹼性蛋白酶之銷售額有 15000 百萬日幣 (相當於 116 百萬美金)，因此推論未來十年日本之鹼性蛋白酶市場將會越形成長，於工業用酵素市場中之價值可能達到 700 百萬美金，甚至更高 (Kumar *et al.*, 1999)。

商業用蛋白酶的來源主要包括細菌、真菌或放線菌等微生物，這是因為微生物培養方法簡單、易於大量培養，且菌體生長之世代間距 (generation period) 亦比動物或植物細胞來的迅速；此外，可以配合基因重組技術 (recombinant DNA technology) 及人工變異的方法，使

微生物量產所需之酵素產品；因此，微生物可以說是酵素商業化生產之最佳來源（陳，1989）。

## 1、蛋白酶之簡介

自然界中分布許多各種不同的蛋白酶（protease 或 proteinase），泛指為對蛋白質的胜肽鍵（-CO-NH-）具有水解反應之催化活性酵素，又稱蛋白質水解酵素；一般生物體無論是動物、植物及微生物之生理代謝均具有蛋白酶的生理作用。一般蛋白酶之命名，係依據酵素所作用之對象基質（attack substrate）之名稱上去掉適當語尾後，再加上“ase”即成為該酵素之名稱，例如自然界中能夠分解角蛋白（keratin）之酵素則命名為 keratinase；亦有許多酵素是根據其所發生之生物源（nature origin），從其學名上去掉適當語尾後，再加上“in”即成為該酵素之名稱，例如從枯草桿菌（*Bacillus subtilis*）之培養液中分離出之蛋白酶，而命名為 subtilisin（張，1976）。

## 2、蛋白酶之分類

蛋白酶的種類相當廣泛，可依據各酵素不同的功能、作用條件、活性部位等特性進行分類。依據酵素對基質（substrate）之作用位置，可將蛋白酶分為兩類：從蛋白質分子內部水解胜肽鍵的酵素稱為內胜肽鍵分解酶（endopeptidase，EC 3.4.21 ~ 3.4.24）；而從氨基末端或羧基末

端逐次切斷胜肽鍵，解離成胺基酸者稱為外胜鍵分解酶（*exopeptidase*，EC 3.4.11 ~ 3.4.17）（張，1976）。

由微生物所產生之蛋白酶可分成胞內酵素（*intracellular enzymes*）及胞外酵素（*extracellular enzymes*）兩類，胞內蛋白酶存在於多種細胞內，主要在代謝過程扮演重要角色，例如孢子的形成及變異、酵素及內泌素的成熟、細胞蛋白質庫的維持；胞外蛋白酶由菌體分泌至細胞外，重要性為在細胞外的環境能夠水解蛋白質，並且使細胞能夠吸收並利用水解產物（*Gupta et al.*, 2002）。

然而上述之分類方式，並未就酵素之活性部位（*active site*）特異性有所探討，酵素蛋白質構造中必定有一活性部位與其作用之觸媒活性密切相關；且探求活性部位之構造與特徵，已成今日酵素學研究之重點。英國酵素學家 *Hartley* 氏（1960 年）依照酵素活性部位之特性，將蛋白分解酵素分為四大群：即絲胺酸型蛋白酶（EC.3.4.21）、硫醇型蛋白酶（EC.3.4.22）、金屬型蛋白酶（EC.3.4.24）及酸性型蛋白酶（EC.3.4.23）。

## 2-1、絲胺酸蛋白酶（*Serine proteinase*）

絲胺酸蛋白酶之活性部位中，已確定有三個主要胺基酸殘基，即絲胺酸（*serine*）、組胺酸（*histidine*）及天門冬胺酸（*aspartic acid*），皆

參與酵素之觸媒作用（張，1976）。其最適活性 pH 範圍往往介於中性至鹼性之間，並可被 diisopropyl fluorophosphate(DFP)或 phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) 作用而抑制其活性。所有其中絲胺酸蛋白酶中以鹼性絲胺酸蛋白酶（alkaline serine proteinase）特具優越的經濟效益，因此最具代表性（陳，1989）。

有許多細菌及黴菌均可產生鹼性含絲胺酸蛋白酶，最著名的是 *B. subtilis* 所產生的枯草菌素（subtilisin），另外 *Bacillus licheniformis* 也是常用的商業生產菌，其他如 *Aspergillus* 及 *Streptomyces* 等菌屬亦能生成此類蛋白水解酶。一般而言，大部份的絲胺酸蛋白酶屬於類枯草菌素（subtilisin-like）絲胺酸蛋白酶，並統稱為 subtilases（Barrett *et al.*, 1995）。在應用方面，由於鹼性含絲胺酸蛋白酶最大特點就是在鹼性條件下，其活性仍十分穩定，故大量使用於清潔劑工業上，作為去污除垢之用途，同時亦可用於皮革的軟化及食品加工上。

## 2-2、硫醇型蛋白酶（Thiol proteinase）

此群酵素的活性部位中，具有一個與觸媒活性有關的硫醇基（sulfhydryl group），此反應基已證明為半胱氨酸（cysteine）的硫醇基，故得其名。此群酵素分布甚廣，包括動物、植物及微生物界，而以植物為來源最多，例如木瓜蛋白酶（papain）與鳳梨蛋白酶（bromelain）為此群酵素之典型代表（張，1976）。

### 2-3、金屬蛋白酶 (Metalloproteinase)

係為一群含有金屬離子的酵素，如鋅 (Zn)，其金屬有無與活性有密切關係，若將此類酵素的金屬離子移去，將使酵素活性喪失，因此金屬螯合劑—EDTA 能將金屬離子自酵素的活性部位去除，故有抑制此類酵素活性之能力；大部分金屬蛋白酶之最大活性 pH 值約在 7 至 8 之間，屬於中性蛋白水解酶 (neutral protease)，並可用許多微生物作為商業化生產，然而此類酵素在所有微生物蛋白水解酶中是最不穩定的酵素，使得酵素在濃縮及純化過程極易喪失活性，而造成金屬蛋白酶於實際應用之限制性 (陳，1989)。

### 2-4、酸性蛋白酶 (Acid proteinase)

係為一群酵素其活性最適酸鹼度在酸性範圍 (pH 1.0 至 5.0) 內，此類酵素應用在食品工業上非常普遍，原因便是其反應的低 pH 環境可抑制微生物生長(陳，1989)。以胃蛋白分解酶(pepsin)及凝乳酶(rennin) 為其代表性的酵素 (張，1976)，其中較具商業價值的酵素來源幾乎都源自於黴菌。

## 二、*Bacillus* 所產生蛋白酶之應用

*Bacillus* 菌屬通常含有鹼性蛋白水解酶及中性蛋白水解酶兩種酵素；前者為絲胺酸蛋白酶，而後者為金屬蛋白酶（張，1976）。大部分的鹼性含絲胺酸蛋白酶最大活性 pH 約在 9.5 至 10.5 之間，此特性對工業上的操作過程非常重要，使酵素的穩定性能夠長時間的維持，而某些 *Bacillus* 屬的嗜鹼性菌株所產生的該類酵素甚至可達 pH 11 至 12（陳，1989），故 *Bacillus* 成為工業用酵素最重要的來源之一。以下為 *Bacillus* 所產生之不同蛋白酶之重要工業應用：

### 1、廢棄物處理

鹼性蛋白酶在此方面的應用主要包括在食品加工及農業廢棄物處理，蛋白酶能溶解廢棄物中的蛋白質，再經過一連串的過程而獲得液態之營養成分，以供畜牧業利用（Kumar *et al.*, 1999）。

Williams 等人（1990）利用 *B. licheniformis* PWD-1 發酵處理畜牧業產生的廢棄羽毛；現代化家禽屠宰過程會產生的大量廢棄羽毛，若未經處理會在環境中堆積，長久下來會造成污染，甚至引發臭味。*B. licheniformis* PWD-1 能分泌角蛋白分解酶，此堅硬的角蛋白廢棄物經過角蛋白分解酶作用後，形成較小分子之片段，並釋出具營養價值的游離胺基酸成分，不僅降低羽毛在環境中的堆積也可做為食品及飼料之

蛋白質來源。也可利用做為排水孔的毛髮清除劑 (Gupta *et al.*, 2002)，甚至製成在沐浴時使用的脫毛劑 (Kumar *et al.*, 1999)。

農作物、林產及蔬果加工等所產生的廢棄物中，主要成分為纖維素 (cellulose)、半纖維素 (hemicellulose) 及木質素 (lignin)，這些廢棄物多半以掩埋及焚化方式處理，不但需大量的垃圾處理空間，且經燃燒產生之大量黑煙，亦對空氣及生態造成傷害，因此利用 *Bacillus* 所產生之纖維分解酵素及聚木糖酵素進行降解，不僅改善傳統處理對環境的破壞，也產生再生性醣類，達到減少污染及能源浪費之目標 (李，2000)。

## 2、清潔劑工業

添加酵素於清潔劑之應用相當發達，1997 年整體清潔劑用酵素佔工業用酵素 38%，產值為 500 百萬美金 (蘇，1999)。細菌的鹼性蛋白酶之商業用途最重要的即為 *Bacillus* 所產生之枯草菌素 (subtilisin) 在清潔劑的應用；選擇添加於清潔劑中的理想酵素必須在寬廣的 pH 及溫度範圍中保持高活性及穩定性，且必須在低濃度下有長效作用，並適應各種清潔劑中的成分。添加鹼性蛋白酶能夠穩定地自污垢中降解出蛋白質成分，另一方面又可改善洗滌效率，包括利用酵素降低清洗溫度及縮短洗衣過程攪拌時間 (Kumar *et al.*, 1999)。

許多由 *Bacillus* 菌屬所分離出的鹼性蛋白酶，其酵素活性之穩定性

多在高 pH 之範圍，此特性對鹼性蛋白酶作為清潔劑成分非常重要，因為洗衣業清潔劑之 pH 範圍正介於 9.0 至 12.0 之間 (Ferrero *et al.*, 1996)。 *Bacillus* KSM-K16 是由土壤中分離出來，其產生之酵素稱為 M protease，屬於絲胺酸蛋白酶，其酵素活性於 pH 6.0 至 11.0 之間均很穩定，而在添加 CaCl<sub>2</sub> (2 mM) 後更使酵素穩定性範圍擴大至 pH 5.0 至 12.0 之間；M protease 於洗衣工業能長時間 (3 週) 處在 40°C 溶液 (pH 9.6) 中，仍保有 70 %；並對各種界面活性劑皆相當穩定：分別對 SDS、sodium linear alkylbenzene sulfonate、sodium polyoxyethylene alkyl sulfate 等界面活性劑 (各添加 5%) 保持 71 %、61 %、97 % 之酵素活性 (Kobayashi *et al.*, 1996)。

*Bacillus licheniformis* MIR29 所生產之胞外蛋白酶亦屬於絲胺酸蛋白酶；其蛋白酶在 pH 13 以上仍具有酵素活性；另外在洗衣工業正常的作業溫度 60°C 下，MIR29 之鹼性蛋白酶能持續 30 分鐘維持 100 % 之酵素活性，因此非常也適合應用於清潔劑工業 (Ferrero *et al.*, 1996)。

近年來鹼性蛋白酶於自動化洗碗系統之應用也逐漸增加；超過濾 (ultrafiltration, UF) 及逆滲透 (reverse osmosis, RO) 設備之定位清洗 (cleaning in place, CIP) 系統更是現代化乳品及食品工業重要的一環，含酵素的清潔劑則被用以清潔並溶解清洗系統中的蛋白質成分，*Thermus* Rt41A 的嗜熱性蛋白酶及 *Bacillus* MK5-6 之鹼性蛋白酶則被成



功地應用於此方面 (Kumar *et al.*, 1999)。

*Bacillus* 之鹼性蛋白酶在清潔劑工業之利用性提高，主要在於這些酵素作用是在自然環境的可耐受度內，又是具有清潔能力的無磷清潔劑，正符合現代環保之需求 (Kumar *et al.*, 1999)。

### 3、食品

鹼性蛋白酶能夠水解植物、動物及魚類中的蛋白質，並產生胜肽，在肉品嫩化上扮演重要角色，尤其是應用於牛肉上；*Bacillus* 生產之 *alcalase* 是深具應用潛力的肉質嫩化酵素，因為其具有水解結締組織蛋白（如肌肉纖維蛋白）之能力，*alcalase* 之最適作用條件為 pH 8.5 及 55 至 60°C。嫩化的方式包括噴灑粉末狀酵素、或將肉浸泡於酵素溶液或將濃縮之蛋白酶注射於肉品的血管中 (Kumar *et al.*, 1999)。

微生物生產的木聚糖酶 (*xylanase*)，可將半纖維素 (*hemicellulose*) 來源之農產廢棄物轉化成一種本身味甜又對人體腸胃系統有益的木寡糖，即機能性糖質甜味料木寡糖 (或低聚木糖, *xylooligo-saccharides*)，此產品具有促進腸內有益菌，優勢化生長之效果；此外也用於果汁或酒之澄清處理、動物飼料消化率之改善。*Bacillus* 較黴菌及其他菌種所產生之木聚糖酶具有良好之耐熱性，因此最具開發之價值 (李, 2000)。

日本傳統大豆發酵產品—納豆，是利用納豆菌 *Bacillus subtilis natto* 發酵分解黃豆而得。納豆菌本身非常穩定，能有效進入腸道作用，及

促進腸道乳酸菌生長之作用。納豆酵素是自納豆發酵物萃取出來的一種纖維蛋白酵素，現今更是良好的保健食品素材（蘇，1999）。

*Bacillus* 產生之溶果膠酶（pectinases）是工業上重要的酵素之一，酸性溶果膠酶主要應用在果汁及葡萄酒的榨汁及淨化；鹼性溶果膠酶應用範圍廣泛，其主要被用於植物性食品加工業果膠類之廢水處理、植物纖維之加工及脫膠、咖啡及茶之發酵等；除此之外也應用於紡織加工、造紙工業（Hoondal *et al.*, 2002）。

#### 4、皮革工業

鹼性蛋白酶中的彈力蛋白分解（elastolytic）能力及角蛋白分解（keratinolytic）能力提供皮革工業良好的生物處理效果（Kumar *et al.*, 1999），能夠軟化皮革，用以製造高級的皮製服飾及商品。而 *Bacillus subtilis* B72 在皮革工業中扮演資源回收之角色，在製革過程前皮革因為撕裂之動作而留下許多腐肉，其中包含有真皮層及其下的脂肪組織，這些物質之主要成分則為膠原蛋白及脂質。為了再利用此些廢棄物，傳統上以酸處理而後榨出或在高溫下壓榨；然而這些傳統方法之設備昂貴又耗費時間，因此藉由 *B. subtilis* B72 之鹼性蛋白酶處理，以回收有用之廢棄物，達到節省時間、成本之效果（Dalev *et al.*, 1992）。

#### 5、醫藥

彈性蛋白分解酶 (elastase) 能促進新彈性纖維的新生，並去除動脈壁變性彈性蛋白上脂肪和鈣之沉澱，因此對動脈硬化有預防及保護作用，除此之外對高血脂症、高血壓及糖尿病等病症都有防治效果；由 *Bacillus subtilis* 316M 所分泌之彈性蛋白分解酶則應用於外部潰傷之治療，將其固定於繃帶上，可用以治療潰傷燙傷、化膿、紅斑、結痂等傷口 (Kumar *et al.*, 1999)。另有取自於 *Bacillus* CK 11-4 之鹼性蛋白酶具有纖維蛋白分解 (fibrinolytic) 活性，故在醫藥上可應用為血栓溶解劑 (thrombolytic agent) (Kim *et al.*, 1996)。

## 6、膠片工業

X 光片上之凝膠層上含有將近 1.5 至 2 % 的銀含量，傳統上使用燃燒 X 光片來回收銀，卻會造成嚴重的環境污染問題；鹼性蛋白酶被發現能夠以生物處理的方法使 X 光片釋出銀的成分，也使 X 光片的聚酯底層能夠再次利用 (Kumar *et al.*, 1999)。例如 *Bacillus* B21-2 及 B18' 之鹼性蛋白酶皆能降解 X 光片上之凝膠層而回收銀，取代一般用燃燒來回收銀之傳統方法。其中 *Bacillus* B18' 具有較高的最適作用 pH 及溫度，分別為 pH 13 及 85°C，能夠在 2 分鐘內有效降解 X 光片上之凝膠層，效果優異 (Fujiwara *et al.*, 1993)。

表一、商業用細菌性鹼性蛋白酶之商品名、來源及應用

Table 1. The sources, applications and industrial suppliers of commercial bacterial alkaline proteases

Supplier	Product trade name	Microbial source	Application
Novo Nordisk, Denmark	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Detergent, silk degumming
	Savinase	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent, textile
	Esperase	<i>B. lentus</i>	Detergent, food, silk degumming
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Feed
	Durazym	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent
	Novozyme 243 Nue	<i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp.	Denture cleaners Leather
Genencor International, USA	Puraface	<i>B. lentus</i>	Detergent
	Primatan	<i>Bacillus</i> sp.	Leather
Gist-Brocades, The Netherlands	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Detergent
	Maxacal	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent
	Maxatase	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent
Solvay Enzymes, Germany	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Detergent
	Optimase	<i>B. licheniformis</i>	Detergent
	HT-proteolytic	<i>B. subtilis</i>	Baking, brewing, feed, Photographic waste, food, leather
	Protease	<i>B. licheniformis</i>	Food, waste
Amano Pharmaceuticals, Japan	Proleather	<i>Bacillus</i> sp.	Food
	Collagenase	<i>Clostridium</i> sp.	Technical
	Amano protease S	<i>Bacillus</i> sp.	Food
Nagase Biochemicals, Japan	Biopraser concentrate	<i>B. subtilis</i>	Cosmetic, pharmaceuticals
	Ps. Protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Research
	Ps. elastase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Research
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i> ( K2 )	Research
	Cryst. Elastase	<i>B. subtilis</i> ( bioteus )	Research
	Biopraser	<i>B. subtilis</i>	Detergent
	Biopraser SP-10	<i>B. subtilis</i>	Food
Godo Shusei, Japan	Godo-Bap	<i>B. licheniformis</i>	Detergent, food
Rohm, Germany	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Food
Wuxi Synder Bioproducts, China	Wuxi	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent
Advance Biochemicals, India	Protosol	<i>Bacillus</i> sp.	Detergent

( Gupta *et al.*, 2002 )

### 三、角蛋白分解酶之純化、特性與應用

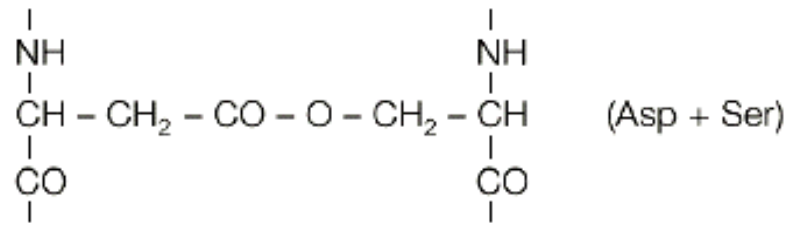
#### 1、角蛋白 (keratin) 之簡介

角蛋白屬於不溶性纖維蛋白質 (insoluble fibrous protein)，與一般蛋白質不同之處為角蛋白不會被一般蛋白分解酶所分解，例如：胰蛋白酶 (trypsin)、胃蛋白酶 (pepsin) 等。角蛋白特性堅硬，就蛋白質的二級結構而言，主要是因為角蛋白中含有多量之氫鍵、雙硫鍵及疏水性鍵結 (Williams *et al.*, 1990)，包含  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helix) 及  $\beta$ -褶片 ( $\beta$ -sheet) 兩種型態；家禽的羽毛中含有約 90 % 之  $\alpha$ -螺旋角蛋白， $\alpha$ -角蛋白也是構成動物的蹄 (hoofs)、爪 (nails)、角 (horns)、毛髮 (hair) 等構造之主要成分；而  $\beta$ -褶片 ( $\beta$ -sheet) 則在爬蟲類身上被發現 (Onifade *et al.*, 1998)。圖一顯示角蛋白中氫鍵與雙硫鍵之結構，其中的氫鍵是由絲胺酸和天門冬胺酸 (asparagine) 的極性胺基酸支鏈所形成，而雙硫鍵是由胱胺酸 (cystine) 的硫氫基支鏈所形成。

#### 2、角蛋白分解酶之簡介

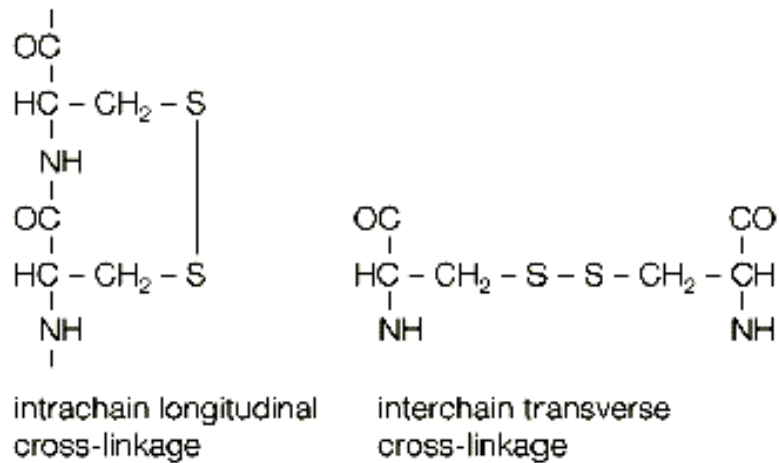
自然界中存在有 150 種以上之微生物能分解角蛋白，包括有細菌 (bacteria)、少數嗜中溫真菌 (fungi) 及放線菌 (actinomycetes)，它們可以水解角蛋白以作為自身生理所需之碳源 (Bockle *et al.*, 1995)；其中研究較為廣泛的為細菌之 *Bacillus*、*Fervidobacterium* 菌屬；真

A



(Ester linkage bridges between carboxyl and hydroxyl groups in side chains)

B



(Disulphide bridges of cystine)

圖一、角蛋白中氫鍵 (A) 與雙硫鍵 (B) 之結構

Fig. 1. The structure of hydrogen bond (A) and disulfide bridge (B) that in keratin.

(Lehninger *et al.*, 1993)

菌之 *Aspergillus* 菌屬及放線菌之 *Streptomyces* 菌屬等。這些微生物能分泌胞外酵素—角蛋白分解酶，且絕大部份具有嗜高溫及鹼性蛋白酶之特性；至目前為止微生物分解角蛋白的機制並不十分清楚，可能的機制有兩種理論：一為黴菌會破壞角蛋白基質的表層，使菌絲得以伸展對角蛋白基質造成壓力，或直接穿透角蛋白基質進入中心 (Figueras *et al.*, 1997, Malviya *et al.*, 1992)；第二種推測為角蛋白雙硫鍵的裂解 (sulfitolysis)，角蛋白之所以堅硬是因為含有高量的胱氨酸所形成之雙硫鍵，故推測雙硫鍵的裂解與角蛋白之分解有密切的關係；Malviya (1992) 提出角蛋白分解酶與角蛋白接觸的初期就發生雙硫鍵的裂解反應，此作用使得後續的分解過程，角蛋白結構更容易被破壞。為了證明雙硫鍵的分解與羽毛分解有關，Bockle 等人 (1997) 利用含雙硫鍵物質—麩胱甘肽 (glutathione) 加入含有角蛋白分解菌之羽毛培養基，發現除了因為角蛋白分解菌分解羽毛而造成之硫氫基含量上升，在加入麩胱甘肽後硫氫基含量也顯著上升；此理論普遍地被接受，並廣泛研究，因此硫氫基含量變化也可作為角蛋白分解程度之指標。

### 3、角蛋白分解酶之純化與生化特性

微生物之酵素純化過程，主要可分粗蛋白質之取得及進一步純化兩階段，第一階段大多利用硫酸銨沉澱，由於蛋白質在水溶液中的溶解度，會因溶液中其它鹽類濃度的改變而增減，可利用來沉澱蛋白質；

或利用超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF) 濃縮蛋白質並除去小分子，因為其具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子，主要目的在於濃縮、脫鹽及無菌過濾。第二階段則使用層析技術進一步純化酵素，例如：離子交換層析 (ion exchange chromatography)、親和力層析 (affinity chromatography)、膠體層析 (gel chromatography) 等方法。

*B. licheniformis* PWD-1 分泌之胞外酵素—角蛋白分解酶，其純化策略是將此菌於雞毛培養基中培養，使其分泌大量角蛋白分解酶，首先將培養液初步過濾去除雜質後得到粗酵素液，以薄膜超過濾法 (membrane ultrafiltration) 濃縮酵素並去除小分子雜質，再以陽離子交換層析，使酵素之純度較原先提高約 43 倍；接著再利用膠體層析純化，此方法使總蛋白質含量濃縮為粗酵素液之 1%，而酵素活性為原始之 73.1%，則得到純化 70 倍之角蛋白分解酶 (Lin *et al.*, 1992)。

*B. licheniformis* PWD-1 是由雞糞堆肥中篩選出來之羽毛分解菌，此分子量為 33 kDa，最適作用 pH 及溫度分別為 7.5 及 50 °C，等電點為 7.25；在室溫下酵素活性之半衰期為 4~5 天，4 °C 儲存 19 天酵素活性僅降低 20%，酵素活性下降則是因為酵素蛋白質自體分解 (autolysis) 所造成 (Lin *et al.*, 1992)。

角蛋白分解菌 *Streptomyces pactum* DSM 40530 生產之絲胺酸蛋白



酶是經由單一純化步驟：親和層析法純化而得，所獲得之純化倍數為原始之 64.8 倍，其蛋白酶活性可被絲胺酸蛋白酶抑制劑 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) 及 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 抑制 70 % 以上之活性，故被歸類為絲胺酸蛋白酶之成員，分子量為 30 kDa，等電點為 8.5；表現此酵素之活性之條件介於 45 至 75 °C，pH 範圍則介於 7 至 10 之間，而最適當之作用條件為 65 °C 與 pH 8。此蛋白酶之儲存性在 35 °C 以下皆可穩定地保存數週，在 50 °C 之半衰期僅有 24 小時，而添加 Ca<sup>2+</sup> 則可提高酵素在高溫下之穩定性 (Bockle *et al.*, 1995)。

*Fervidobacterium pennavorans* 是由高溫溫泉中分離出來的一株厭氧菌，並具有在高溫下分解羽毛之特性，其酵素經純化與定性分析後，可獲得 32 倍純化之角蛋白分解酶，證明為一絲胺酸蛋白酶，分子量為 130 kDa，等電點為 3.8，活性表現之最適條件為 80 °C 與 pH 10.0。此酵素分子量較 *Bacillus* 及 *Streptomyces* 所產生之角蛋白分解酶 (20 至 50 kDa) 為大，而等電點則較一般角蛋白分解酶 (pH 7.0 至 9.0) 偏酸 (Friedrich *et al.*, 1996)。

目前已知的角蛋白分解酶中，絕大部份都屬於絲胺酸蛋白酶型態，但並非所有的絲胺酸蛋白酶都具有角蛋白分解能力，絲胺酸蛋白酶與角蛋白分解機制之間有何關聯，目前仍不清楚 (Friedrich *et al.*,

1996)。

#### 4、角蛋白分解酶之應用與發展

近年來對角蛋白分解酶之研究越趨透徹，代表對此酵素應用之重要性也越來越重視，除了用來解決畜產加工所產生的角蛋白廢棄物外，更可進一步做為商業化的應用，包括分解羽毛生產胺基酸或胜肽做為飼料添加劑，清潔劑等工業 (Onifade *et al.*, 1998)。若利用基因轉殖之技術可將角蛋白分解酶基因轉移至其他微生物上，大量並快速複製，使此酵素在使用上更為簡便。

##### 4-1、角蛋白分解酶於飼料工業之應用

一般商業用的羽毛粉若佔雞隻飼料蛋白質組成分的 20~25%時，甲硫胺酸 (methionine)、離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 均缺乏。故飼糧中欲成功的利用羽毛粉蛋白質；乃須要正確地添加限制性胺基酸。而經過 *B. licheniformis* 處理的羽毛粉與未處理的羽毛粉相比較，這些限制性胺基酸皆有增加的現象，證明利用微生物處理的方法，能有效改進羽毛之營養價值 (Shih, 1993)。*Fervidobacterium islandicum* AW-1 產生之角蛋白分解酶被證明能夠於高溫 (70°C, pH 7) 下有效分解羽毛，並具有良好之熱穩定性；與天然羽毛於 70°C 作用 24 小時後分析其游離胺基酸含量，結果顯示作用 24 小時後總游離胺基酸含量較原

始高出 50 倍；天然羽毛中的主要胺基酸，如丙胺酸 (alanine)、絲胺酸、半胱胺酸、脯胺酸 (proline) 等胺基酸含量皆有顯著之增加，而羽毛角蛋白結構中較為缺乏的必需胺基酸如甲硫胺酸、離胺酸及色胺酸 (tryptophan) 含量也有增加的現象，克服羽毛角蛋白消化率差以及營養成分不足等問題 (Nam *et al.*, 2002)。

或直接將角蛋白分解酶作為飼料添加劑，取代微生物處理之方法，可以增加家禽對總胺基酸的消化率，當粗角蛋白分解酶 (crude keratinase) 以 1:1000 之比例添加入商用羽毛粉，可使消化率由 77% 提高至 90% (Shih, 1993)。由於飼料成本佔雞隻生產成本的大部分，故以回收的角蛋白廢棄物，重新處理所製成之羽毛粉來替代其他較昂貴的蛋白質原料；能夠降低飼養成本，提高經濟效應；也是目前角蛋白分解菌及其酵素最重要之應用方向。

#### 4-2、下水道清潔劑

家庭下水道被堵塞之原因多半是因為頭髮聚集過多，頭髮亦由角蛋白所組成，因此 Takami 等人 (1992) 提出構想，利用 *Bacillus* AH-101 所產生之鹼性蛋白酶來分解頭髮，此蛋白酶分解頭髮之條件，在 90°C 時有最大之酵素活性；於電子顯微鏡下觀察分解情形，發現酵素作用 30 分鐘頭髮開始有被分解之情形，作用 90 分鐘後則發現頭髮角蛋白已大部份被破壞。*Bacillus* AH-101 所產生之鹼性蛋白酶在高溫及強鹼 (pH

12 至 13) 下仍具有良好之穩定性，因此適合於各種工業之應用，例如：  
蛋白質分解、羽毛粉之改善、揉皮及廢水處理 (Takami *et al.*, 1999)。

*Streptomyces* 產生之鹼性蛋白酶能在強鹼的狀態下分解多種角蛋白基質，如頭髮、羽毛和羊毛等，在 30°C 作用 72 小時分別有 2%、3% 和 6% 等程度之分解 (Nakanishi *et al.*, 1974)。故可應用於畜產加工之廢棄物處理，以降低這些角蛋白廢棄物在環境中之堆積，並轉換成有用之資源再利用。

#### 四、角蛋白分解酶之酵素工程

近年來酵素工程在改善蛋白質之結構性質上成了一項有利的工具，最重要之目的就在於提高酵素的穩定性，以期提供商業上更廣泛之應用，影響酵素穩定性的因子很多，包括物理性的熱、壓力、紫外線、振動等，化學性的酸鹼、有機溶劑、表面活性劑等。酵素固定化（immobilization）即工業上常用以增加酵素穩定性之方法；此外，可利用基因定點突變（site-directed mutagenesis）技術修飾酵素之胺基酸以提高安定性（Takagi *et al.*, 1990），因為以酵素蛋白質結構而言，胱胺酸形成的雙硫鍵自然提供了蛋白質構型之穩定性（Hazes *et al.*, 1988），因此更應加強對酵素序列之認識，以便進行合適且正確之酵素工程。

##### 1、酵素固定化

酵素在工業上應用相當廣泛，然而自由態酵素（free enzyme）受到本身耐熱性、對 pH 安定性不佳以及容易自體分解（autolysis）等因素影響，使應用性受到限制，因此利用酵素固定化技術以期增加酵素之穩定性及對環境之耐久性；方法主要可分為以下四種：吸附法（adsorption）、包埋法（entrapment）、共價結合（covalent binding）及交聯法（cross-linking）將可溶性的酵素結合在不溶性的載體上；其中共價結合法相較於其他方法，能有效保持酵素活性，故被普遍採用

(Anwar *et al.*, 1998)。

Lin 等人 (1996) 將 *B. licheniformis* PWD-1 產生之角蛋白分解酶利用共價結合法固定於有孔洞的玻璃珠上，經過固定化的酵素相較於自由態酵素，耐熱性提高，設定處理前之酵素活性為 100 %，經高溫 80 °C 和 90 °C 分別進行 1 分鐘實驗後，固定化角蛋白分解酶之殘留活性分別為 48 % 和 22 %，而自由態角蛋白分解酶之殘留活性分別僅剩 11 % 及 1 %；另在 pH 穩定性方面，以 pH 7.5 時之酵素活性為 100 %，當 pH 降低至 4 及 2 時，固定化角蛋白分解酶之殘留活性分別為 96 % 和 23 %，而自由態角蛋白分解酶之殘留活性分別僅剩 84 % 及 5 %，顯示酵素固定化技術能確實提高角蛋白分解酶之熱穩定性與 pH 穩定性；同時也在減緩自體分解速度方面具良好之成效，經過 7 天反應期，固定化角蛋白分解酶較自由態酵素高出約 40 % 之酵素活性，並提高了酵素的保存性和重複使用率；因此可藉此方法以期增加角蛋白分解酶在工業上之應用性並降低生產成本。

## 2、基因工程與同源性探討

為了提高角蛋白分解酶之表現能力，Lin 等人於 1995 首次針對 *B. licheniformis* PWD-1 產生之角蛋白分解酶進行基因工程之研究，確定整段基因 1457 個核酸所組成之序列，並命名為 *KerA*；其中 1137 個核酸為可表現蛋白質之序列，轉譯成 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)。KerA 序列與 *B. licheniformis* NCIB 6816 之 subtilisin Carlsberg (*subC*) 基因序列有高度的相似 (相似度 97%)，差異處包括兩者啟動子 (promoter, -TATAAT-) 位置分別在 123 至 128 和 141 至 146；就蛋白質序列而言，有五個胺基酸 (Ser-102, Ala-128, Ser-157, Asn-160 與 Ans-211) 與枯草菌素 subtilisin Carlsberg 不同 (Lin *et al.*, 1995)；然而此兩菌株皆能在羽毛培養基中生長並分泌蛋白酶，也都具有分解角蛋白及酪蛋白之能力 (Evans *et al.*, 2000)。另外 KerA 之 V222 與大部份 *subC* 序列之 A222 不同 (Siezen *et al.*, 1997)；並與酵素活性中心之絲胺酸殘基位置 S220 相當靠近；在所有枯草菌酵素序列中，幾乎都包含 A222，而角蛋白分解酶 V222 則被推測可能與此酵素對受質之專一性有關，故 222 位置可視為基因定點突變之最佳位置。(Evans *et al.*, 2000)。

*Bacillus* 菌屬其他已被定序完成之 subtilisin Carlsberg 的來源菌株中，*B. licheniformis* ATCC 12759 能夠於羽毛培養基中生長並分解羽毛，然而 NCIB 10689 之蛋白酶含有 R144 和 A222 密碼，無法分解羽毛，卻具有分解羊毛之能力 (Evans *et al.*, 2000)。

序列比對結果顯示所有的 *B. licheniformis* 菌株產生之 subtilisin 都有相似度極高的核酸序列及蛋白質序列，並與角蛋白分解菌株 PWD-1

之 *KerA* 頗為符合 (Evans *et al.*, 2000)。一般而言，大部份的絲胺酸蛋白酶皆屬於類枯草菌素 (subtilisin-like) 絲胺酸蛋白酶，並統稱為 subtilases (Barrett *et al.*, 1995)。*Fervidobacterium pennivorans* 所產生之角蛋白分解酶—fervidolysin 經序列分析，獲得 fervidolysin (*fls*) 基因長度 2.1 kb 及 699 個胺基酸之蛋白質序列，並顯示與 Subtilases family 之絲胺酸蛋白酶有高度的同源性 (Kluskens *et al.*, 2002)。

隨著 Lin 等人對 *B. licheniformis* PWD-1 之 *Ker A* 基因研究後，後續有許多學著藉此對不同來源之角蛋白分解酶進行基因工程之研究；Lin 等人(2001)篩選出羽毛分解菌 *B. licheniformis* L-25，並根據 PWD-1 之序列設計引子進行定序，結果得到長度為 1.46 kb 之角蛋白分解酶基因 (*Ker B*)。與 *Ker A* 比對發現兩者蛋白質序列有高度相似性，僅與 Val-273 兩個胺基酸和 *Ker A* 中 Phe-15 與 Ala-273 不同 (Lin *et al.*, 2001)。

在工業上被應用作為清潔劑之 *Bacillus* AH-101 及其酵素在分類尚未清楚之前，只知道與 *Bacillus halodurans* 或 *Bacillus clausii* 在一些物理性狀上頗為類似；經過 16S rDNA 序列分析，結果與 *Bacillus halodurans* 有密切的關連，其中與 *Bacillus halodurans* DSM497 和 C-125 之 16S rDNA 序列，分別有 88 % 和 97 % 之相似度 (Takami *et al.*, 1999)，故 AH-101 菌株被認定屬於 *Bacillus halodurans* 之成員。C-125



完整的基因序列 (Takami *et al.*, 1999) 對於 AH-101 菌株日後基因工程之發展有相當重要的幫助，然而 C-125 被認定能夠產生 xylanase 和  $\beta$ -galactosidase 兩酵素，卻尚未被發現具有角蛋白分解能力 (Takami *et al.*, 2000)。

為了提高角蛋白酶之濃度，Lin 等人於 1997 年利用基因重組技術，將 *B. licheniformis* PWD-1 之 *Ker A* 基因植入宿主細胞 *B. subtilis* DB104 中，原始 *Ker A* 基因包含啟動子 (promoter)  $P_{ker}$ ，當宿主細胞外接啟動子 P43 序列形成新的啟動子 P43- $P_{ker}$ ，或以 P43 取代原本之  $P_{ker}$ ，觀察 *Ker A* 基因於 *B. subtilis* DB104 中之表現，結果顯示 P43- $P_{ker}$  組、P43 組及  $P_{ker}$  組皆能產生角蛋白分解酶，其中 P43- $P_{ker}$  組及 P43 組均較原本之  $P_{ker}$  組表現較大之酵素活性，表示 P43 與  $P_{ker}$  兩啟動子對 *Ker A* 之表現具有相乘效果；顯示改變角蛋白分解酶之啟動子，能使濃度因此提高，將更有利於未來工業上之利用 (Lin *et al.*, 1997)。