

壹、中文摘要

雞毛為家禽屠宰時產生之廢棄物，由於富含結構穩定的角蛋白，一般微生物無法有效分解。而 *Bacillus licheniformis* THSC-1 是由蛋雞糞堆肥中篩選出，可在溫度 65 以上存活，並具有分解雞毛角蛋白之能力。在實驗中以 *B. licheniformis* THSC-1 為供試菌進行最適生長條件、雞毛及豬毛分解之相關試驗，以評估其分解效果。實驗結果顯示：*B. licheniformis* THSC-1 在 50 、pH 值 8.5 及有氧條件下有最大雞毛分解能力；在 Nutrient Broth 中，菌株可在 6 8 小時達到生長最旺盛之狀態，而在雞毛粉培養基中則需 60 72 小時；在進行雞毛分解時，不論是雞毛或雞毛粉分解時，總胺基酸量皆持續增加。而雞毛經過粉碎可提高分解效果，完整雞毛分解率為 34.9 %，雞毛粉則為 75.26 %；在雞毛培養基接種不同量菌元，以 4 倍量之菌數、總胺基酸量及乾重減少量皆優於 1 倍及 2 倍。以 *B. licheniformis* THSC-1 分解豬毛之效果遠低於分解雞毛，雖然總胺基酸量亦有增加之趨勢，但豬毛粉之分解率為 15.7 %，完整豬毛則只有 5.2 %。*B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛或豬毛時，以前 12 日的總胺基酸增加量較佳，12 日後的累積幅度會較趨於平緩。

貳、前言

雞毛為家禽屠宰場所產生主要固體廢棄物之一，若以雞毛占雞隻體重 5% 計算，則每隻雞（以白肉雞屠宰活重 1.8 公斤計算）屠宰後將產生約 90 克的雞毛。根據行政院公佈的農業統計年報來看，90 年全台的雞隻屠宰量約為三億七千萬隻，則全年將產生約三萬四千噸雞毛。這些雞毛通常以一般廢棄物處理，僅少部分被回收作為肥料或動物飼料；豬隻飼養及屠宰也是國內畜牧產業之大宗，在屠宰過程產生之豬毛，由於體積細小，易隨屠宰廢水流出而不易回收。如能找出有效之回收及利用方式，則可盡廢棄物處理及再利用之目的。

雞毛中約含 90% 以上的角蛋白（keratin），而角蛋白經過化學酸解或微生物分解後可產生許多不同種類之胺基酸。由於利用化學酸解過程複雜且成本昂貴，不合乎經濟效益，因此利用微生物分解雞毛成為較值得研究之課題。在羽毛分解菌與角蛋白酶的相關研究上，已有若干不同的菌種被發現。其中 William 等人（1990）分離出一株命名為 *Bacillus licheniformis* PWD-1 的細菌，將之接種於雞毛培養基，並以 50°C 厭氣培養六天可產生多量胺基酸，為可以有效分解雞毛的菌株之一。

本實驗室在 1999 年時，由施宗雄博士及研究生在蛋雞糞堆肥中篩選出一株可分解雞毛之菌株，並命名為 *B. licheniformis* THSC-1。此菌株具有相當強的角蛋白分解能力，並可在 65°C 以上環境生長，相較於 *B. licheniformis* PWD-1 在 65°C 以上停止生長之特性，*B. licheniformis* THSC-1 在作為分解角蛋白的研究上，將有更大的發展空間。本論文即利用 *B. licheniformis* THSC-1 為試驗菌株，進行雞毛與豬毛分解之相關實驗，以分析此菌株的生理特性及分解能力，並進一步研究其未來可能之利用性。

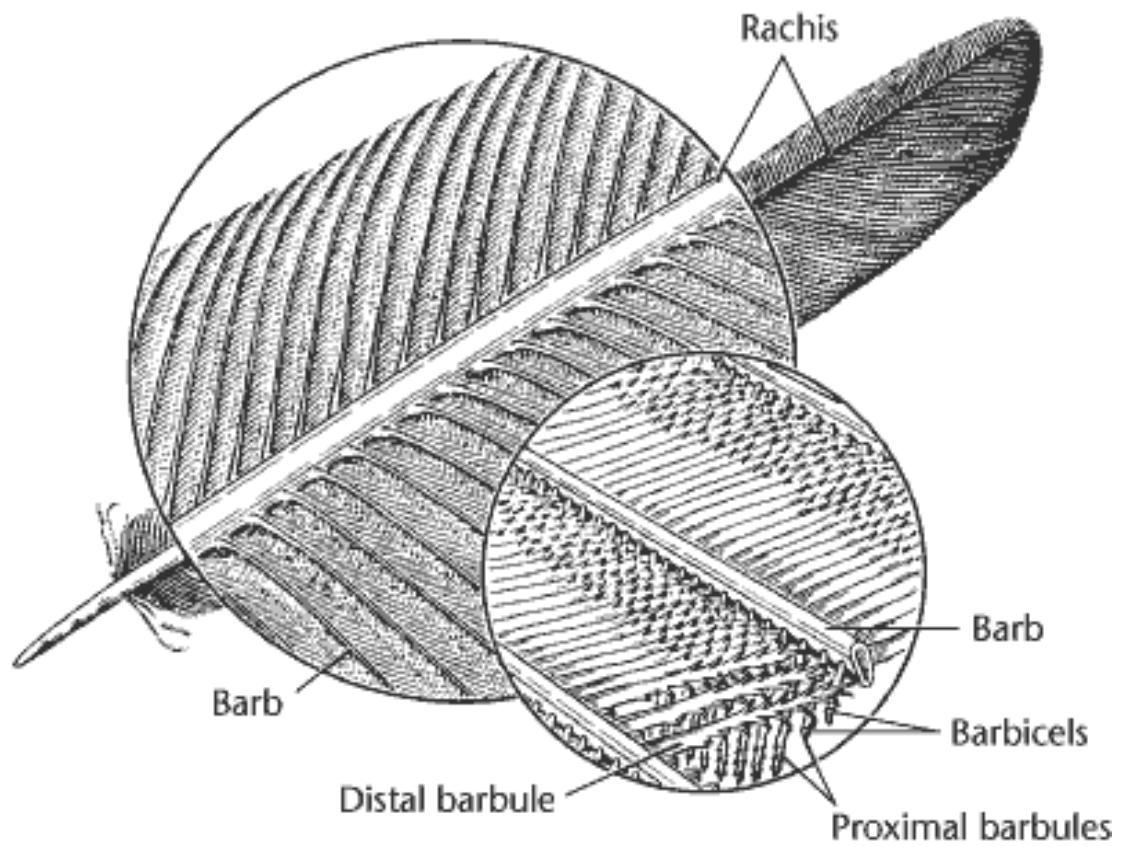
參、文獻檢討

由於實驗主要針對雞毛角蛋白分解的相關討論，因此由其構造、成分等來進行一系列的介紹。其中包括：羽毛、蛋白質與角蛋白的結構與特性；以往有關角蛋白分解之研究、雞毛分解菌的探討；角蛋白酶、雞毛分解菌及其相關基因工程上之應用等分別加以描述。

一、羽毛、蛋白質與角蛋白的結構與特性

(一) 羽毛的構造

整支羽毛的結構是以羽軸 (rachis) 為主幹，沿著羽軸兩側有許多羽支 (barb) 排列，在相鄰羽支之間還有衍生出的末端小羽枝 (distal barbule)、近側小羽枝 (proximal barbules) 以及羽支上的細小鈎狀物 (barbicels) 相互交錯構成整支羽毛，其詳細結構表示於圖一。羽毛由大約 91% 的蛋白質、8% 的水分以及 1% 脂質所構成，其中的蛋白質為角蛋白 (keratin)，是一種含硫的纖維狀蛋白質，而角蛋白也提供羽毛一定的強度及柔軟度。羽毛中含有多種胺基酸，其含量比例可參考表一。但是在羽毛不同部位之間的胺基酸含量也有所差異，以羽軸和羽支為例，兩者中含量最多的胺基酸皆為麩胺酸，所佔比例分別為 13.1% 與 12.4%，羽軸中含量次高



圖一、羽毛的構造

Fig 1. The structure of feather

(Dai *et al.*, 1995)

表一、羽毛及頭髮中交叉結合結構之胺基酸組成

Table 1. Amino acid compositions of cross-linked structure

Amino acid	Hair	Barbs	Rachis
Aspartic	4.9	8.6	8.1
Threonine	8.4	7.3	6.0
Serine	12.9	8.2	7.3
Glutamic	12.8	12.4	13.1
Proline	10.0	10.9	8.4
Glycine	7.8	7.9	8.6
Alanine	4.5	3.6	5.8
Valine	8.9	9.1	7.9
Methionine	0.4	1.9	1.6
Isoleucine	2.9	2.7	3.8
Leucine	5.8	4.1	6.7
Tyrosine	2.4	5.3	4.7
Phenylalanine	1.8	1.2	2.2
Histidine	0.8	1.2	1.3
Lysine	2.6	5.5	6.2
Arginine	7.0	3.5	5.1
Cysteic acid	6.1	6.6	3.2
	100.0	100.0	100.0

(Rice *et al.*, 1994)

的是甘胺酸 (8.6%)，而在羽支方面則是以脯胺酸的 10.9 % 為次高量，在其他胺基酸含量也互有不等的差異 (Rice *et al.*, 1994)。

(二) 蛋白質之介紹

蛋白質是由許多胺基酸所組成的高分子聚合物，大部分蛋白質是屬於球型結構，目前可利用 X 光結晶法 (X-ray crystallography) 來得到這些球狀蛋白質的三度空間結構的資訊。但是並非所有蛋白質都是球型的，例如角蛋白就是屬於纖維性蛋白質，為頭髮、鳥喙、指甲、爪、鱗、角、蹄、羊毛等的主要成份，而纖維性蛋白質可為組織提供支持性，賦予硬度、韌性或彈性。

蛋白質依構造組成可分為四個層次：1.一級結構：為多肽鏈中胺基酸殘基的線狀序列，但此結構在自然界中不存在。2.二級結構：這是一種多肽鏈相鄰部分的摺疊形式。主要以雙硫鍵 (disulfide bond) 與氫鍵 (hydrogen bond) 將一級結構立體化，例如 α -螺旋 (α -helix) 與 β -摺片 (β -sheet) 之蛋白質鍵結。3.三級結構：為一種三度空間的構造，大分子蛋白質多肽鏈以規則的二級結構單位摺疊的狀態稱之。特別是多肽鏈上序列距離較遠的的胺基酸殘基之間所產生的

鍵結，這種構造適用於討論球型蛋白質，而鮮少用於纖維性蛋白質的討論。4.四級結構：這是含有兩個或兩個以上次單元（subunit）的蛋白質，其中的多肽鏈相互作用所形成的構造（Lehninger *et al.*, 1993）。

（三）角蛋白之介紹

角蛋白是由動物外胚層細胞（ectodermal cell）衍生出來的纖維化不溶性蛋白質，具有牢固的物理性結構以及不易反應的化學穩定性，存在於所有高等脊椎動物之中，也是構成其角質化外皮層與附屬組織的主要成份，例如：頭髮、角、爪及羽毛。角蛋白可分為兩類，一為 α 角蛋白，主要存在於哺乳動物；另一種為 β 角蛋白，主要存在於鳥類與爬蟲類（Creighton, 1993）。雞毛中含有90%以上的角蛋白，但是角蛋白中含有多量雙硫鍵、氫鍵與疏水性鍵結，且不被一般為生物所分泌的蛋白酶所分解（高與賴，1995）。因此雖然其中含有大量胺基酸，但動物體內並無水解角蛋白之蛋白酶，故無法直接使用於動物飼料之中（Williams *et al.*, 1991）。角蛋白與一般蛋白質不同之處為，角蛋白不被一般蛋白酶（proteolytic enzymes）分解，如胰蛋白酶（trypsin）、胃蛋白酶（pepsin）和木瓜酶（papain）（Williams *et al.*, 1991；Lin *et*

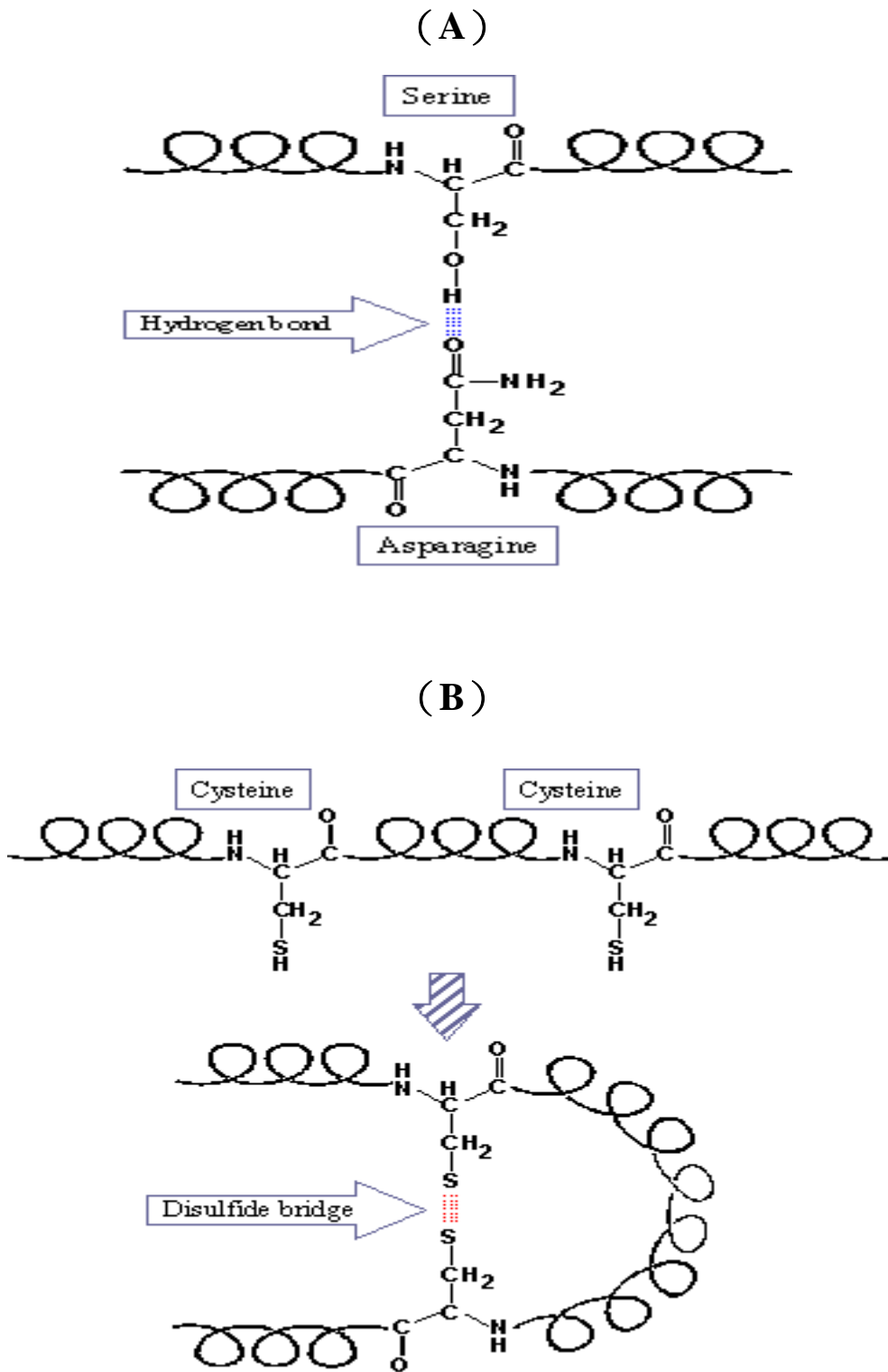
al., 1992 ; Boeckle and Mueller, 1997)。而只有少數微生物分泌角蛋白酶，包括 *Aspergillus* ssp.、*Ctenomyces* ssp.、*Streptomyces* ssp. (Williams and Shih, 1989 ; Mukhopadyay and Chandra, 1990)、*S. fradiae* (Kunert and Stransky, 1988)、*Fumigatus* ssp.、*Bacillus* ssp. (Williams and Shih, 1989) 等菌株有分解角蛋白的能力。

(四) 角蛋白之結構

角蛋白中含有高量的雙硫鍵，可以提高角蛋白之強度，形成哺乳動物與鳥類之外組織，如頭髮、指甲、角質與羽毛等 (Takami *et al.*, 1992 ; Lehninger *et al.*, 1993)。雖因部位不同而含角蛋白之比例亦不同，但大量的胱胺酸為角蛋白之重要角色則為其一致之特性 (Takami *et al.*, 1992)。例如：人的頭髮由三種組織所組成，其中有表皮 (cuticle)、纖維皮質 (fiber cortex) 和黑色素 (melanin) (Marshall *et al.*, 1991)。此三種組織皆含有胱胺酸，而所佔之比例各為 17~19% (Gillespie and Marshall, 1988)。角蛋白可抵抗一般微生物與蛋白酶分解的穩定機制，有賴於雙硫鍵與氫鍵交叉相連而形成縮合態的 α -helix 與 β -sheet 之蛋白質鍵結，以此形成 α -keratin 與 β -keratin。圖二顯示了角蛋白中雙硫鍵與氫鍵之

結構。其中的雙硫鍵是由兩個 cysteine 的硫氫支鏈所形成，而氫鍵則是由 serine 與 asparagine 的極性胺基酸支鏈所形成 (Lehninger *et al.*, 1993)。其特殊之處為 pH 值在 12.0 以上時會使 keratin 變性或形成可溶於水的狀態，故有一些研究便著重於找出能耐鹼性之角蛋白酶，並將培養的 pH 值調高來分解角蛋白 (Takami *et al.*, 1990)。

將 α -keratin 與 β -keratin 做比較：在 α -keratin 中因 cysteine 含量的不同可形成不同的組織，當胱胺酸含量達 22% 時，此時內部包含很多雙硫鍵，故形成較硬之蛋白質，如角質或指甲。若胱胺酸含量約為 10~14% 時，則形成較軟且捲曲的角蛋白，如頭髮、雞毛與羊毛等。 β -keratin 可在蜘蛛絲與一些爬蟲類的喙與爪中發現，其不含胱胺酸或半胱胺酸 (Lehninger *et al.*, 1993 ; Takami *et al.*, 1992)。



圖二、角蛋白中氫鍵 (A) 與雙硫鍵 (B) 之結構
 Fig 2. The structure of hydrogen bond (A) and disulfide bridge (B) in keratin.

(Lehninger *et al.*, 1993)

二、微生物分解角蛋白之探討

根據前人的研究指出，在羽毛加工過程中利用微生物的醱酵培養或角蛋白酶的作用，可能使羽毛中角蛋白結構的改變，或是改變角蛋白對動物消化酶的抵抗能力；在 Barabas 等人（1986）的結論表示，透過微生物處理的羽毛粉，在 lysine、methionine、arginine 的含量高於未處理的。其中也進一步指出微生物作用除了可以提高羽毛粉營養價值外，其生物質量（biomass）亦可成為蛋白質來源；而透過醱酵羽毛生產單項胺基酸，例如動物飼料添加用的 lysine 等，亦是可行的方法（Onifade *et al.*, 1998）。

以微生物來分解不可溶之角蛋白，要靠微生物所分泌的胞外酶，來與受質表面作用。大部分角蛋白酶需要外部的誘導物（例如：角蛋白）來誘導產生（Onifade *et al.*, 1998），為了誘發角蛋白酶的分泌，在以往的研究多用羽毛作為醱酵過程中微生物能利用的唯一碳源與氮源（Boeckle *et al.*, 1995；Boeckle and Mueller, 1997）。角蛋白會被某些特定的微生物水解，但分解之情形有所區分。有些作用是將複合的角蛋白組織（例如：雞毛），分解成更小的物質；另一種則為完全地分解角蛋白分子來形成胺基酸。大部分的研究均將焦點放在角蛋白酶的活力，然而雙硫鍵的裂解在角蛋白分解上亦有相

當重要的影響 (Rajak *et al.*, 1992)。在多年研究以來，已有多種有關角蛋白分解的微生物被發表，表二所列出的是一些由具角蛋白分解力微生物所產生蛋白酶的相關特性，以下將介紹在角蛋白分解相關研究中，幾株較具代表性之菌種 (Onifade *et al.*, 1998)。

首先要介紹的是 *Streptomyces pactum* DSM 40530，在 Boeckle and Muller (1997) 與 Boeckle 等人 (1995) 的研究報告中選擇 *S. pactum* DSM 40530 來進行角蛋白的分解試驗，此菌株原本篩選來產生抗生素，可防止培養中被其他微生物污染，後來被發現可分解角蛋白 (Boeckle and Muller, 1997)。其使用的兩種培養基溶液中分別含水洗過的雞毛 2.5 或 5 克 (雞毛未被粉碎)，此菌最適合的生長狀態為 pH 值 7.5 下以 33 °C 培養 (Boeckle and Mueller, 1997)，但在此溫度下，只有少數雞毛被分解 (Boeckle *et al.*, 1995)。

為了解蛋白酶的活性，將此菌培養於含雞毛 1.7~6.7 g/L 培養基溶液中，4 日後測定蛋白酶活性，發現其活性並沒有顯著因角蛋白濃度不同而增減，但細胞外硫醇基 (thiol group) 卻與角蛋白濃度有高度的相關 (Boeckle and Mueller, 1997)。此酶分子量為 30 kDa，等電點 PI 為 8.5，在 50 °C 下半衰期為 24 小時 (加入鹽類或 Ca^{2+} 可以增加穩定度)。蛋白

表二、由角蛋白分解微生物分离出之角蛋白酶特性

Table 2. Properties of keratinases isolated from some keratin-degrading microorganisms

Species	Type	M_r (kDa)	I_p	pH	Temp (°C)	Cofactor	Substrates	References
<i>S. pactum</i>	Serine	30	8.5	7-10	40-75	-	Keratin azure, feather, BSA	Bockle <i>et al.</i> , 1995
<i>B. lichineformis</i>		33	7.25	7.5	50	-	BSA, casein, collagen, feather	Lin <i>et al.</i> , 1992
<i>C. keratinophilum</i>	Alkaline	69	-	7-10	90	Fe ²⁺	Keratin only. No activity on casein, BSA, gelatin	Dozie <i>et al.</i> , 1994
<i>A. fumigatus</i>				6.5-9	45		Autoclaved and native feather, casein Guinea pig hair	Santos <i>et al.</i> , 1996
<i>T. mentagrophytes</i>	Serine	48						Yu <i>et al.</i> , 1968
<i>T. rubrum</i>	Serine	27, 35, 93 and 71		8		Ca ²⁺		Apodaca and McKerrow, 1989; Asahi <i>et al.</i> , 1985
<i>T. gallinae</i>				8.0			Chicken feather only	Wawrzkiwicz <i>et al.</i> , 1987
<i>G. penicilloideus</i>	Cysteine	85					Hair	Malviya <i>et al.</i> , 1993a
<i>S. sp. A11</i>	Serine	24 49		7.5	30	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Human hair, chicken feather, wool, etc.	Mukhopadhyay and Chandra, 1990
<i>S. brevicaulis</i>	Serine	40-45 24-29	7.8		40 35		BSA, human hair	Malviya <i>et al.</i> , 1992

(Onifade *et al.*, 1998)

酶活性範圍的 pH 值與溫度各為 6~11 與 40°C~70°C，而最適的 pH 值與溫度各為 8 與 55°C (Boeckle *et al.*, 1995)。

S. pactum DSM 40530 所產生的細胞外酶會引起雞毛分解，但對於其乾重而言並沒有顯著的減少 (Boeckle and Mueller, 1997)。在 Boeckle 等人 (1995) 的實驗中，在 6 日培養後雞毛總重的損失少於 10%。而此菌產生的酶主要為絲胺酸蛋白酶 (serine proteinase)，與 *S. fradiae* 所產生的酶 proteinase K 相似，但其分解能力較強。

Bacillus sp. P-001A 是在溫泉中所發現的高溫菌，此菌的特殊之處為在鹼性的熱噴泉中分離出來，為好氧、革蘭氏陽性的產孢棒狀桿菌。其蛋白酶活力測定之方法為在 Nutrient Agar 中加入 1% 動物膠 (gelatin) 於 55°C 下培養 24 小時後，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，若菌所產生之溶解區域 (clearing zone) 越大者，則顯示其蛋白酶活力越強。利用此菌發酵羊毛、角質與雞毛，培養 120 小時後，分解率分別為 90%、60% 與 50%，但是在頭髮中生長困難 (Atalo and Gashe, 1993)。

Bacillus sp. P-001A 產生之蛋白酶可分解動物膠、澱粉與酪蛋白，在高鹽 (10% NaCl) 條件下尚可生長。而菌株培養 30~40 小時後，即在對數生長後期時，有最高量蛋白酶產生 (65 units/ml)。蛋白酶活力在 pH 值 8~10 時最佳，pH

值高於 11.5 或低於 4.5 時會失去活力，而其活力溫度範圍在 30°C~70°C 之間，於 55°C 時活力最高。故培養之最適條件為 pH 值 9.5 溫度 55°C。相較於其他菌如 *B. subtilis* 與 *B. stearothermophilus* 等研究，此為較高之培養條件 (Atalo and Gashe, 1993)。

Fervidobacterium pennavorans 也是由溫泉中所發現的高溫菌，為棒狀、具有外鞘、革蘭氏陰性且沒有孢子產生之厭氧菌。菌體生長之 pH 值範圍在 5.5~8.0，溫度範圍為 50°C~80°C，在 pH 6.5、70°C 與 NaCl 0.4% (w/v) 下生長最好。此菌可利用澱粉、肝糖、果糖、葡萄糖、木糖與甘露糖作為生長介質，但無法利用乳糖、阿拉伯糖、酪蛋白與膠原蛋白 (Friedrich and Antranikian, 1996)。

F. pennavorans 分泌的角蛋白酶分子量為 130 kDa，較中溫菌 *Bacillus* 和 *Streptomyces* spp. 所產生的角蛋白酶 (分子量約為 20~50 kDa) 為大。其等電點為 3.8，為較稀少的角蛋白酶，因為一般的等電點均在 pH 值 7~9 之間。此酶可在 pH 值 6~10.5 與溫度 50°C~100°C 的範圍下保存活力。而在鹼性 pH 值 10 與高溫 80°C 培養下有最大的活力，此與 *Bacillus* sp. AH-101 所產生的角蛋白酶有相似的特性 (Takami *et al.*, 1989; Takami *et al.*, 1990; Takami *et al.*, 1992)。在角蛋白分

解研究中，*F. pennavorans* 分泌的角蛋白酶可以將角蛋白分解形成胺基酸，但在水解產物中並沒有 cystine 或其殘基被測得，此現象產生機制可能為：在鹼性環境下 cystine 會轉變成羊毛硫胺酸 (lanthionine) (Friedrich and Antranikian, 1996)。利用醱酵後的細胞萃取液與純化後的角蛋白酶來做分解的比較，由結果可以發現：利用細胞萃取液醱酵雞毛，有產生 aspartate、threonine、serine 等多種胺基酸，而雞毛回收乾重比例為 38%；但純化後的角蛋白酶醱酵雞毛後，並沒有胺基酸生成，且雞毛回收乾重比例為 85%。

Bacillus sp. P-001A 與 *F. pennavorans* 兩菌株因為是由高溫溫泉中所分離出來，其所產生的角蛋白酶在高溫下具有較高穩定度，希望被應用在工業上分解雞毛，讓加工過程中的其他微生物污染降至最小，使之轉變成稀有的胺基酸（例如 proline 與 serine）。

F. fresenius 此菌株可以利用雞毛作為唯一碳與氮的來源，而它特殊之處為角蛋白酶是由溶液中角蛋白所誘導產生，因此在培養基中完全以葡萄糖與硝酸鹽作為碳與氮的來源時，角蛋白酶的活力有非常低的表現。在培養基中角蛋白酶之濃度由 pH 值所決定，水解最適當條件為 pH 值 9 與溫度 45°C。此酶在高溫下有顯著之穩定性，在 70°C 下培養 1.5 小

時之後，仍保有 90% 之初始活力。而角蛋白經醱酵後形成容易分解的產物，有利於改善羽毛粉的利用效率。

Bacillus sp. no. AH-101 所產生的鹼性蛋白酶，對自然界不溶性的蛋白纖維（例如：keratin 與 elastin）有高度水解活力。針對 keratin 與 elastin 以不同 pH 值作蛋白酶活力實驗，結果發現在 pH 值 13 的條件下，此蛋白酶對 keratin 有最佳的分解活力；而分解 elastin 時則以 pH 值 10.5 最好。以 AH-101 所產生之蛋白酶與其他三種酶（subtilisin BPN、subtilisin Carlsberg 與 proteinase K），在兩種不同 pH 值下做水解 keratin 之實驗。結果顯示無論在 pH 值 10.5 或 12.5，AH-101 產生的鹼性蛋白酶的活性均較其他三組為高（Takami *et al.*, 1990）。

許多 *Bacillus* 屬菌株所分泌的 serine proteases 已經被定序與複製並了解其特徵，而這些序列資料亦被證實為 subtilisin 家族的一員，且不同菌株所分泌的 serine proteases 在序列與結構上有顯著的相似性（Stahl and Ferrari, 1984；Vasantha *et al.*, 1984）。Lin 等人（1995）進一步證實 *B. licheniformis* PWD-1 所分泌的角蛋白酶會被 PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride 為 serine protease 的抑制劑）所抑制，因此可得知此酶為 serine protease，且其胺基酸序列

與 *B. licheniformis* NCIMB 6816 所分泌的 subtilisin Carlsberg 有 97% 的高度相似性 (Jacobs *et al.*, 1985)。

三、針對雞毛進行分解之相關研究

Shih (1987) 由雞糞堆肥開始，進行一系列有關角蛋白分解的實驗。最初目的是設計用厭氣醱酵槽來處理雞糞，因為用雞糞進行厭氣醱酵會產生多種附加利益，除了甲烷生成菌醱酵產生可燃燒的甲烷氣體外，雞糞醱酵完的殘留物，可以當成飼料補充物。而在雞糞醱酵過程中，發現雞糞中之雞毛會隨著醱酵而消失，因此推測其中可能有某種細菌能分解雞毛 (Shih, 1993; Williams *et al.*, 1990)。雞隻在屠宰後所產生的雞毛通常當廢棄物丟棄，只有少部分透過工廠收集後，經過高溫蒸煮、乾燥並研磨成粉後，充當動物飼料或肥料出售，但此處裡方式不但耗費大量能源，且營養價與經濟價值不高 (Williams and Papadopoulos, 1985)。雞毛主要成分為角蛋白，不會被一般蛋白酶分解，而找出能分解雞毛的微生物可說是相當重要 (Takami *et al.*, 1992)。

(一) *Bacillus. licheniformis* PWD-1

Williams (1990) 在雞糞堆肥中找到一株 *B. licheniformis* PWD-1 為可分解雞毛的細菌，並可將雞毛當成唯一碳、硫和

能量的來源。在電子顯微鏡中發現 PWD-1 內有蛋白質結晶，證明此為 *Bacillus* 屬之菌株，但功能並不清楚。此菌外觀為短棒狀，可產生內孢子，因此能耐過雞糞堆肥醱酵時所產生達 70°C~80°C 的高溫。PWD-1 菌株的其他特性為：有活動性、為革蘭氏陽性菌、有觸酶能力、為可在有氧與厭氧下生長之兼性細菌以及可在 45°C~50°C 生長旺盛之嗜熱性細菌 (Williams *et al.*, 1990 ; Shih, 1993)。利用篩選出的 PWD-1 菌株來探討不同溫度對生長之影響：菌株在 50°C 下生長最好，培養第二天時菌數已達到 10^8 cell/ml，之後緩慢上升；在 25°C 下生長差，第二天菌數只達到 10^5 cell/ml，明顯生長緩慢；37°C 條件中，菌數介於其中；此菌在 65°C 以上停止生長，由此結果得知 50°C 下 PWD-1 生長旺盛 (Williams *et al.*, 1990 ; Shih, 1993)。

而篩選此菌之目的為分解雞毛角蛋白，故繼續利用此菌所產生的蛋白酶能分解雙硫鍵之原理，來測量培養液中硫氫基之濃度用以代表角蛋白之分解量。在有氧與厭氧狀態下以液態雞毛培養基培養 PWD-1，實驗開始於相同之菌數，在有氧狀態菌數於前 5 日有上升達到 10^7 cell/ml，之後菌數下降，而硫氫基產生的濃度持續的上升，培養 10 日後達到 2 nM 以上。但在厭氧狀態下菌數於前 3 日減少達到 10^5 cell/ml，硫

氫基產生的濃度並沒有增加的趨勢。此證明角蛋白分解酶為胞外酵素，因此當菌數增加時，培養液中的硫氫基濃度也隨之增加 (Williams *et al.*, 1990 ; Lin *et al.*, 1992)。

角蛋白分解時有胺基酸被分解出來，雞毛的分解速率用總胺基酸濃度來測定較為準確 (Williams *et al.*, 1990 ; Lin *et al.*, 1992)。使用不同菌數濃度來分解雞毛，取醱酵三天的菌元分別為 20ml、40ml 和 80ml 等三組 (為 1、2 與 4 倍菌數)，各加入 5 克雞毛粉來觀察醱酵狀況，以總胺基酸濃度來判定分解狀況。醱酵結果為添加 20ml 之組別，所產生之總胺基酸濃度最高，而添加 80ml 之總胺基酸濃度有最低之表現。此證實當菌數越多時，因為菌株的繁殖與維持生長會消耗溶液中的胺基酸，故測得總胺基酸之數值越低，所以使用厭氧條件來醱酵雞毛，以得到較高的總胺基酸濃度 (Williams *et al.*, 1990)。

表三顯示在厭氧下使用不同濃度菌數加入雞毛粉液態基質培養 PWD-1 菌株之變化，培養期間測定第 0、3、6、12、24 日之總胺基酸濃度變化，個別胺基酸中丙胺酸 (alanine)、纈草胺酸 (valine)、異白胺酸 (isoleucine) 和白胺酸 (leucine) 為隨著培養時間延長而增加之胺基酸，只有精胺酸 (arginine)

表三、在24日醱酵期中不同濃度*B. licheniformis* PWD-1分解羽毛後之個別胺基酸濃度

TABLE 3. Free-amino-acid concentrations^a in fermentation medium as affected by fermentation time and ratios of feather substrate to liquid culture^b

Amino acid	mol % at various feather / liquid-culture ratios														
	Day 0			Day 3			Day 6			Day 12			Day 24		
	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8
Aspartic acid	3.53	3.12	2.90	3.24	3.12	1.87	4.25	3.36	2.40	3.51	3.05	3.30	3.25	2.98	2.93
Glutamic acid	14.19	13.75	13.41	9.92	8.52	7.10	8.81	8.90	7.47	8.22	7.52	8.46	7.56	8.17	8.46
Cysteic acid	1.63	1.92	0.96	0.81	0.93	0.88	0.55	0.90	0.41	0.61	0.44	0.39	0.44	0.41	0.47
Hydroxyproline ^c	5.49	5.19	9.50	1.20	0.69	1.87	0.51	0.65	0.95	0.53	0.42	0.63	0.34	0.32	0.43
Serine	3.08	2.66	2.44	1.06	1.04	1.68	0.49	0.29	1.81	0.35	0.13	2.09	0.51	0.18	0.32
Glycine	8.66	8.64	8.11	4.29	4.27	4.19	6.41	5.37	4.36	6.65	6.70	5.44	6.03	6.66	5.39
Histidine	5.12	4.08	4.44	2.52	1.32	1.38	1.81	1.50	1.62	2.40	1.66	1.80	2.45	2.44	2.11
Arginine	24.85	24.33	17.48	6.51	4.37	4.93	2.83	4.31	2.91	3.02	2.28	1.61	1.61	1.45	1.90
Threonine	2.40	2.47	2.80	2.56	3.54	3.81	2.02	2.37	2.84	1.53	1.71	2.05	1.20	1.41	2.05
Alanine	8.45	9.09	8.28	11.51	12.46	10.19	12.25	13.38	11.63	11.87	12.89	10.90	11.86	11.74	11.79
Proline	4.20	5.20	3.58	1.90	2.89	1.53	2.74	3.92	1.86	1.81	3.09	1.75	4.33	5.92	4.39
Tyrosine	1.80	2.03	2.90	2.85	3.50	4.43	3.29	3.67	4.65	3.89	4.21	5.02	3.42	3.19	3.38
Valine	3.48	3.28	2.83	9.23	9.94	9.57	10.33	9.03	10.95	11.17	11.01	11.07	9.65	9.62	10.44
Methionine	0.79	0.60	4.87	2.52	3.42	2.94	3.31	3.05	3.46	3.28	3.42	3.86	3.83	3.51	3.66
Cysteine	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isoleucine	1.48	1.66	2.07	6.92	8.58	7.75	8.24	8.44	8.90	8.54	9.59	9.26	9.17	9.41	8.89
Leucine	3.06	3.45	3.76	14.13	13.91	14.77	13.18	13.43	15.37	14.32	15.52	14.45	13.16	13.47	14.66
Phenylalanine	1.76	2.10	2.10	5.60	6.74	7.28	6.88	6.78	7.37	6.27	6.85	7.55	5.79	5.65	6.07
Tryptophan	1.16	1.06	1.70	7.45	6.53	6.62	7.80	6.72	6.72	7.39	5.68	6.58	6.27	6.63	8.47
Lysine	4.88	5.37	5.87	5.46	4.25	7.20	4.29	3.91	4.34	4.39	3.81	3.80	9.02	6.85	4.20
Total (mM)	3.95	2.80	1.05	25.20	23.30	7.60	63.20	26.45	15.60	52.80	25.25	26.70	118.00	110.25	36.90

^a Values represent duplicate-sample means.

^b Liquid culture of *B. licheniformis* PWD-1 contained approximately 10^7 cells per ml.

^c Values include a 200-pmol hydroxyproline spike for chromatographic analysis. This value is taken into account for total millimolar concentration.

(Williams *et al.*, 1990)

為明顯減少的相反情形。12 日的試驗期中發現在第六天並以兩倍菌數培養後，有最高的總胺基酸濃度 63.2 nM。雖然 24 日培養後總胺基酸濃度 118 nM 為最高，但培養在 50°C 條件下，時間延長會導致成本提高，故選定第六天且兩倍菌數的培養條件為最好 (Williams *et al.*, 1990)

雞毛的主要成分為角蛋白，因含有高量雙硫鍵、氫鍵和分子內疏水力量等使之結合緊密，故角蛋白不會被一般蛋白酶所消化分解，但 PWD-1 菌株所產生的角蛋白酶可將其打斷而進一步分解角蛋白。其角蛋白酶不但可分解角蛋白，亦可快速分解酪蛋白、膠原蛋白及彈性蛋白 (Lin *et al.*, 1992)。

實驗得知角蛋白被分解是因為胞外酵素 keratinase 的作用後，使用連續萃取之方法純化此酵素：將 PWD-1 菌株培養在基質中，待其在培養基中產生較大量的 keratinase 後進行實驗，將此時 keratinase 的濃度設定為 1 倍，先使用薄膜超過濾法 (membrane ultrafiltration) 去除約 50% 的總蛋白質，但也使酶總活力下降 30.7%。再使用甲基羧基纖維素離子交換樹脂 (carboxymethyl cellulose ion-exchange) 的方法，使總蛋白質減少成為原始的 2%，但 keratinase 的濃度增加成為 43 倍。最後使用 sephadex G-75 chromatography 之方法使總蛋白質成為原先總量的 1%，總酶活力為原始的 73.1%，且

keratinase 純化倍數上升到原始濃度的 70 倍。此方法可有效純化 keratinase (Lin *et al.*, 1992)。在 Boeckle 等人 (1995) 使用 *S. pactum* DSM 40530 培養液中純化角蛋白酶，使用的方法依序為菌液過濾(culture filtrate)、膜超濃縮法(membrane ultrafiltration) 與酪蛋白瓊脂 (casein agarose) 等三種方法將酶濃度純化到原液的 64.8 倍。

拿純化的 keratinase 與其他蛋白酶做雞毛角蛋白分解之比較，並以不同溫度作測試，若以 50°C 條件下的 keratinase 的雞毛角蛋白分解活力當成 100，其他蛋白酶諸如蛋白酶 K (proteinase K)、彈性蛋白酶 (elastase) 與胰蛋白酶 (trypsin) 之活力各為 51、27 與 16。在 37°C 條件下蛋白酶分解雞毛角蛋白的活力較差，keratinase 與上述三種蛋白酶的活力分別為 41、36、17 與 13。實驗中也發現木瓜蛋白酶 (papain) 和膠原蛋白酶 (collagenase)，無論在 50°C 與 37°C 條件中均無分解雞毛角蛋白之能力 (Lin *et al.*, 1992)。

為瞭解純化的 keratinase 物理化學性狀，進行 SDS-PAGE 蛋白質的電泳實驗，結果顯示其分子量為 33KDa，且為單體蛋白質。此酶其他的物理化學性狀以 azokeratin (模擬角蛋白之物質，被分解後會呈色以便觀察) 分析得到：理想 pH 值為 7.5；在 50°C 下其分解能力最好；等電點為 7.25；-20°C 下

此酶活性減少 7%；在 4°C 儲存 19 天後此酶活性減少 20%；keratinase 在室溫下的半衰期為 4~5 天，活性下降的原因為酶自體分解所造成 (Lin *et al.*, 1992；Williams *et al.*, 1990)。

為了提高角蛋白酶之濃度，Lin 等人 (1995) 繼續進行 *B. licheniformis* PWD-1 所分泌的角蛋白酶遺傳方面的研究。首先設法分離角蛋白酶的基因 (命名為 *ker A*)，使用兩種簡稱為 PCR-Walking 與 PCR-Screening 等技術，利用已知的 DNA 小段序列，來解讀其前後的大段基因構造。結果得知此兩種技術將角蛋白酶基因分離出來，並確定整個基因因為包含 1,457 個核酸的 DNA 構造，並將其可表現蛋白質之序列找出，並以此 1,137 個核酸當模板，來形成含有 379 個胺基酸的蛋白質。角蛋白酶基因的核酸與胺基酸序列在圖三有表示。

找出了角蛋白酶的 DNA 序列後，再將角蛋白酶基因插入傳送質體 (plasmid vector) pUB18 之中，經過限制酶將質體與角蛋白酶的 DNA 序列切開，再進行接合後，植入另一株枯草桿菌 *B. subtilis* 中，在後者寄主細胞內，由於新的啟動子 (promoter) P43 的作用，角蛋白酶得以大量表現，使角蛋白酶在微生物體內濃度提高，生產成本降低，有利於工業上的應用 (Lin *et al.*, 1997)。

```

. . . . .
UTCCTGCCAAGCTGAAGCGGTCTATTCATACITTCGAACTGAACATTTTCTAANAACAGTTATTAATAACCAAAAAATTTTAAATTGGCC 90
CTCCAAAAAATAGGCCTACCAATATAATTCATTTTTTTCTATAATAAATTAACAGAATAATGGAAATGATTATATTATCCTTCTATTT 180
. . . . .          -pro
AAATTATTCTGAATAAAGAGGAGGAGAGTGAGTAATGATGAGGAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACCGGCTTCATGCTCGTGT 270
. . . . .          H H R K K S F W L G M L T A F M L V F
. . . . .          -pro
CACGATGGCATTACGCAATTCGGCTTCTGCTGCTCAACCGGGGAAAAATGTTGAAAAGGATTATATTGTGCGATTTAAGTCAGGAGTGAA 360
T N A F S D S A S A A Q P A K N V E K D Y I V G P K S G V K
. . . . .
AACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAGAGAGCGGGCGAAAAGTGGRCMAGCAGTTTAGAATCATCAACGGCGCAAAAGCGAAGCT 450
T A S V K K D I I K E S G G K V D K Q F R I I N A A K A K L
. . . . .          -mature
AGCAAAGAGCGCTTAGGAAAGTCAAAAATGATCGGATGTGGCTTATGTGGAGAGGATCATGTGGGCCATGCCCTTGGCGCAAAACGGT 540
D K E A L K E V K N D P D V A Y V E E D H V A H A L A Q T V
. . . . .
TCCTTACGGCATTCTCTCATTAAAGGGACAAAAGTGCAGGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCGCTCTGGATACAGG 630
P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G
. . . . .
AATCCAGCTTCTCATCCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACGGACGGCAACGGACAGG 720
I Q A S H P D L N V V G G A S F V A G E A Y N T D C N G H G
. . . . .
CACACATGTTGGCGGTACAGTAGCTGGCGTTGACAATACAACGGGTGTATTAGGCGTTGGCGCAAGCGTATCCTTGTACCGGTAAAGT 810
T H V A G T V A A L D N T T G V L G V A P S V S L Y A V K V
. . . . .          . a t . . . . .          . c . g          . c
ACTGAATTCAGCGGAAGCGGATCATAACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGCGGACAAACAAAGCGCATGGATGTTATCAATATGAG 900
L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T I N G H D V I N K S
. . . . .          T102
t . a . c . . a . . . . .          g t . . . . .          g g . t t .
CCTTGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTGCACAAATGCATATGCCAAGAGGGGTTGTGCTGTAGCTGCAGCAGGCA 990
L G G A S G S T A H K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N
. . . . .          P128
CAGCGATCTTCAGGAAACAGCAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATAGCATCTGTTCATCGCTGTTGGTGGCGGTAGACTCTAACAGCAA 1080
S G S S G N T E T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S H S N
. . . . .          . c . c          . . . . .          . g          . c . g
CAGGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGGGTATACAGCACTTACCCAAACGAACTTATGC 1170
R A S P S S V G A E L E V H A P G A G V Y S T T P T N T Y A
. . . . .          S211
AACRTTGAACGGAAACGTCATGGTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCGCTTIGATCTTGICAAAACATCCGAACCTTTCAGCTTCAG 1260
T L N G T S H V S P H V A G A A A L I L S K H P N I S A S Q
. . . . .          . t          . a . . . . .
AGTCCGCAACCGTCTGTCAGCACCGGACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAAGCTGTGATCAATGTGGAAGCTCCCGCTGA 1350
V R R R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
. . . . .          . . . . .          . a t          . a c . t
ATAACATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTTTACCACTAGCTTTTTCTTCATCTGTGATGAAGGTTGTCCAATATTT 1440
#EOP
. . . . .          . t g
GAATCCGTTCCATGATC (145?)

```

圖三、角蛋白酶基因 (*kerA*) 的核酸與胺基酸序列
Fig. 3 Nucleotide sequence of keratinase gene.
(Lin *et al.*, 1995)

(二) *Bacillus licheniformis* THSC-1

此菌株由東海大學畜產系施宗雄教授與研究生張資奇由雞糞堆肥篩選出，具有雞毛分解能力之菌株，由食品工業發展研究所使用 API 50CHB、Biolog GP microplate、脂肪酸組成分析等鑑定系統鑑定為 *B. licheniformis*，並由實驗室命名為 *B. licheniformis* THSC-1。其生理生化特性詳列於表四，與 Williams 等人(1990)由厭氧堆肥篩選出的 *B. licheniformis* PWD-1 菌株相同。*B. licheniformis* THSC-1 為棒狀的革蘭氏陽性菌，具有觸酶 (catalase) 活性，不具氧化酶 (oxidase) 活性與運動性 (motility)，葡萄糖代謝反應為發酵型，厭氣狀態下可以生長，可產生孢子 (spore)，不產生 indole 及乙酰乙醇 (acetoin)，在 7% NaCl 下可生長，而在 65°C 的高溫下亦可存活，這是與 *B. licheniformis* PWD-1 在 65°C 以上停止生長為最明顯差異。在 *B. licheniformis* THSC-1 進行對硝酸鹽之還原作用的實驗中，發現並不會將其代謝產生 NH₃，如此在堆肥發酵時不會使含氮物質轉化成氣體消散而產生臭氣，使營養分流失 (張，1999)。

表四、食品工業發展研究所之鑑定報告

Table 4. The report of Food Industry Research and Development Institute

<i>B. licheniformis</i> THSC-1 之特性	
Morphology	rod
Gram stain	+
Oxidase test	—
Catalase test	+
Motility	—
Glucose utilization	Fermentation
Anaerobic growth	+
Spore	+
Spore width > cell	+
Growth nutrient BR	+
Indole	—
Voges-proskauer	+
Citrate (Koser's)	+
Growth 2% NaCl	+
Growth 7% NaCl	+
Growth 45°C	+
Growth 65°C	+
發酵 D-Glucose 產酸	+
發酵 D-Glucose 產氣體	—
發酵 L-Arabinose 產酸	+
發酵 D-Xylose 產酸	—
發酵 D-Mannitol 產酸	+

(張，1999)

四、羽毛分解菌或角蛋白酶的應用

大部分有關羽毛分解菌或角蛋白酶的應用方面，重點都放在羽毛粉的營養價值的改善，除了提升羽毛粉之利用性外，羽毛分解菌及角蛋白酶更可做進一步的應用。例如：

(一) 利用固定化酶之技術提高角蛋白酶的利用性

固定化酶的方法是將純化的角蛋白酶利用共價鍵固定在有孔洞的玻璃球上，並以此玻璃球作固定化前後之比較 (Lin *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1990)。分離並純化菌株所產生的角蛋白酶後，可進一步利用此方法將此酶推廣到工業界去，以求得角蛋白大量且快速之分解。

Lin 等人 (1996) 完成角蛋白酶的固定化後，首先比較固定化與游離之角蛋白酶對熱的穩定度，設定原始角蛋白酶的活力為 100，在高溫 80°C 進行 1、5、10 分鐘和 90°C 進行 1 分鐘的實驗後，固定化的角蛋白酶仍各有 48、26、18、22 的活性，但游離的角蛋白酶其活性各為 11、1、0、1，差異很大，顯示角蛋白酶經固定化後對熱的穩定度較高。

接下來比較對 pH 值的穩定程度，以 pH 值 7.5 之活力設為 100，結果顯示在 pH 值之下，無論是固定化與游離的角蛋白酶，其活力均不受影響。但低 pH 值對角蛋白酶影響較大，當實驗的 pH 值為 4、3、2 時，固定化角蛋白酶仍各別有 96、

42、23 的活性，但游離的角蛋白酶活性各別為 84、8、5，差異很大，顯示經固定化後，角蛋白酶對低 pH 值的穩定度較高。

由於角蛋白酶會自體分解與結構改變，故測定其活力亦為工業化一個重要的指標 (Lin *et al.*, 1996)。比較固定化與游離的角蛋白酶在 7 日實驗期間活性之變化，設定最初之活性為 100，游離的角蛋白酶因自體分解，故培養第二天時活性只剩 20%，當第 6~7 天時幾乎沒有活性。但在固定化角蛋白酶的活性緩慢地下降，培養第二天時活性只減少 10%，第 4 天時活性尚存 60%，在 7 日的實驗期後，活性還有 40%，較游離的角蛋白酶保有較佳之活性。結果顯示雖然均為相同的酶，但經過固定化之後，其對熱穩定度、低 pH 值之安定度與活性的維持均有較佳之表現，這些實驗均為了解固定化角蛋白酶在工業上的運用，並可將固定化角蛋白酶用在肉雞屠宰場所產生的大量雞毛副產物，以工業化方法將之分解，不但可防治環境污染，並且使營養物質再利用 (石, 1997)。

(二) 將羽毛分解菌或角蛋白酶應用為清潔劑的研究

Takami 等人 (1992) 提出構想，利用鹼性蛋白酶分解頭髮，期望可以進一步解決下水道堵塞之問題。由於頭髮聚集

過多為家庭下水道被堵塞之主因，而頭髮亦由角蛋白組成。在其研究中使用 *Bacillus* sp. No. AH-101 所產生之蛋白酶，其特點為在高溫下穩定與適應鹼性的條件。實驗所使用材料為取 1g 日本人的黑頭髮置於 50ml 培養液中（溶液 pH 值調整為 11.0），再加入 AH-101 之蛋白酶 3mg 混合均勻，於 40°C 下培養 2 小時。使用冰浴 5 分鐘，再利用濾紙過濾來停止酶反應，因頭髮之黑色素會溶於溶液中，以吸光值 535nm 來測溶液混濁程度，判定頭髮分解速率。結果得知若只使用培養液，則頭髮毫無變化；但若 AH-101 蛋白酶與 thioglycolic acid（為冷燙之燙髮用藥劑）一起加在培養液中，可分解頭髮，並使纖維皮質中的黑色素溶於溶液之中。在 AH-101 蛋白酶與 thioglycolic acid 作用下，1g 黑頭髮置於 70°C 下培養 2 小時，用濾紙過濾沒有發現殘渣。分解頭髮最適當的溫度為 90°C，較分解酪蛋白的最適溫度 80°C 稍高（Takami *et al.*, 1990）。*Bacillus* sp. No. AH-101 所產生之蛋白酶培養在鹼性培養基中 56 小時後，有 2500 units/ml 之最大濃度（Takami *et al.*, 1989），可應用於工業上，以增進雞毛粉的利用、蛋白質分解、鞣皮過程與廢水處理，因為此蛋白酶可在強鹼（pH 13.0）之下作用（Takami *et al.*, 1990）。

肆、材料與方法

本試驗共分為三個部分：第一部分是將 *B. licheniformis* THSC-1 在不同之培養基與培養條件下加以培養（包括不同溫度、不同 pH 值與有氧及厭氧培養），用以確定菌株的最佳生長條件，並製作生長曲線；第二部分將利用 *B. licheniformis* THSC-1 菌元，添加至不同濃度的雞毛（粉）培養基中，進行雞毛之發酵分解試驗。在 24 日醱酵期間於第 0、3、6、12 及 24 日採樣並測定菌數、pH 值、總胺基酸量、個別胺基酸含量及殘存乾重的變化，並以電導度計測定培養基之電導度；第三部分則是以雞毛分解試驗相同的模式與程序，進行豬毛之分解試驗，進一步比較雞毛及豬毛分解之效果，以評估 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛及豬毛的能力，作為日後推廣利用價值之參考。

一、試驗中使用之基本材料

（一）供試菌株

供試菌是由施宗雄博士與研究生自蛋雞糞堆肥中篩選出具有角蛋白分解能力之菌株，經食品工業研究所菌種中心鑑定為 *Bacillus licheniformis*，並命名為 *B. licheniformis* THSC-1。以此為試驗菌株，經純化後製成冷凍菌元，保存於 - 80 備用。

(二) 雞毛與雞毛粉

雞毛收集自耀陞家禽屠宰廠，以清水洗淨，50℃ 烘乾。其中一部分以粉碎機製成雞毛粉，另一部分則不經粉碎處理，以完整雞毛的形式，分別收藏於 4℃ 冷藏櫃中保存，用以配製雞毛培養基。

(三) 豬毛與豬毛粉

豬毛收集自嘉義地區的養豬戶，直接從豬隻身上剪取，以清水洗淨後，以 50℃ 烘乾。其中一部分以粉碎機製成豬毛粉；另一部分則不經粉碎處理，以完整豬毛的形式收藏，皆置於 4℃ 冷藏櫃中保存。

(四) 試驗中使用之主要藥品

1. NH_4Cl (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)
2. NaCl (Sigma Chemical Co., Louis, USA)
3. K_2HPO_4 (Katayama Chemical Co., Japan)
4. KH_2PO_4
(Hayashi Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)
5. $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
(Hayashi Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)
6. Yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, USA)
7. ninhydrin (Sigma Chemical Co., Louis, USA)
8. hydrindantin (Sigma Chemical Co., Louis, USA)
9. methyl cellosolve
(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)
10. $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Chemical Co., Louis, USA)

11. L-leucine (Sigma Chemical Co., Louis, USA 出品)
12. Nutrient Broth (Merk kGaA, Darmstadt, Germany)
13. Nutrient Agar (Merk kGaA, Darmstadt, Germany)
14. acetate buffer

(五) 試驗中使用之主要儀器設備

1. 迴旋式恆溫培養箱 Model 705R
(Hotech Instruments Co., Taipei, Taiwan)
2. 厭氧操作培養箱 Anaerobic Chamber 1025
(Thermo Forma Co., Marietta, Ohio, USA)
3. 超高速離心機
(Hettich Universal 32R, Germany)
4. 分光光度計 Spectrophotometer Model UV-1601
(Shimadzu Co., Tokyo, Japan)
5. 手提式電導度計 Portable Conductivity Meter SC-120
(Suntex Co., Taipei, Taiwan)
6. 胺基酸分析儀 Beckman 6300 Amino Acid Analyzer
(GMI, Inc., Albertville, Minnesota, USA)

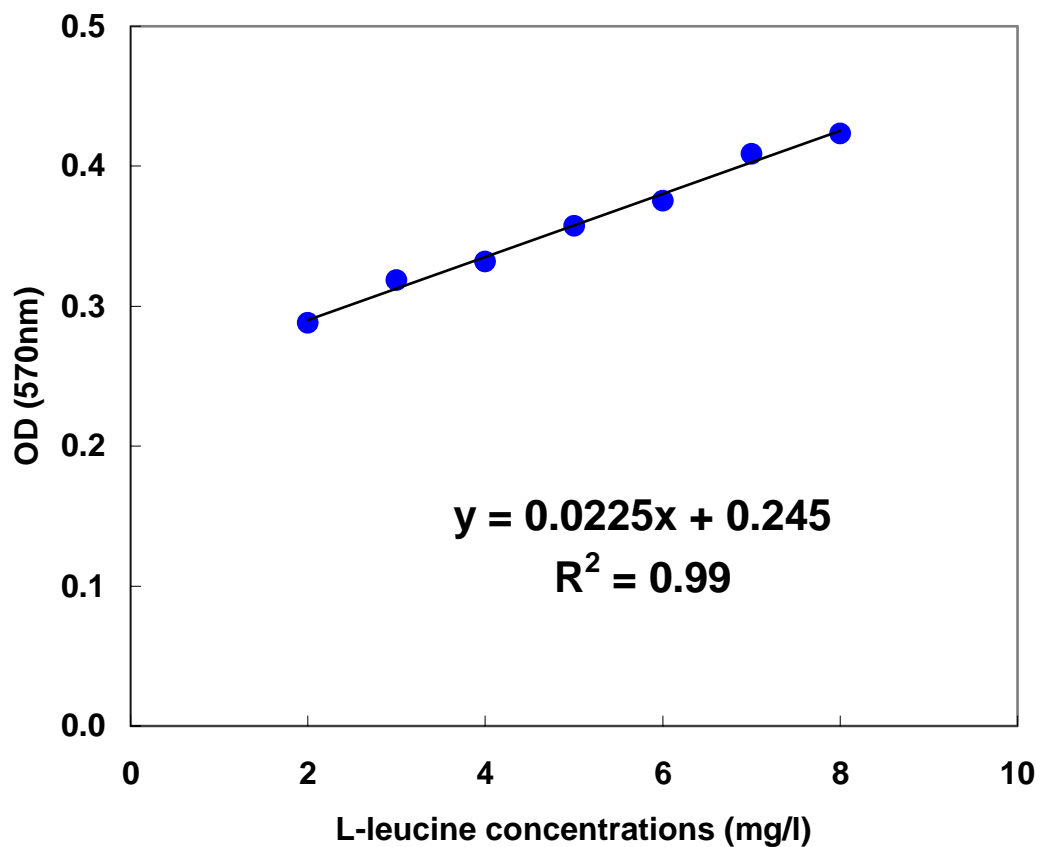
(六) 雞 (豬) 毛培養基之配製

試藥濃度以每公升所含克數為單位，配方如下：NH₄Cl, 0.5 ; NaCl, 0.5 ; K₂HPO₄, 0.3 ; KH₂PO₄, 0.4 ; MgCl . 6H₂O, 0.1 ; Yeast extract, 0.1 (Williams *et al.*, 1990) ; 培養基中添加之雞毛 (粉) 及豬毛 (粉) 量及 pH 值，則依不同試驗所需調整。

二、試驗步驟與方法

(一) 胺基酸定量法之空白試驗

在進行主要試驗前，首先以寧海準反應 (ninhydrin reaction) 進行胺基酸定量之空白試驗，製作提供對照之標準曲線，來作為總胺基酸量測定及換算的依據 (Moore, 1968 ; Rosen, 1957)。其試驗步驟如下：將受測液體以 $15,000 \times g$ 之高速離心 20 分鐘之後，取上層澄清液 2 ml (因發酵後胺基酸濃度相當高，故要進行稀釋至適當濃度) 加入 ninhydrin reagent 2 ml，煮沸 15 分鐘後拿出，冷卻至室溫，再加入 50 % ethanol 3 ml，等待 10 分鐘後以光電比色計測其波長 570 nm 之吸光值。ninhydrin reagent 的配製方法為：ninhydrin 0.8 g + hydrindantin 0.12 g + methyl cellosolve 30 ml + acetate buffer 10 ml (使用 4M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 990 ml 調整 pH 值到 5.5)。在胺基酸定量法之空白試驗方面，測定方式與胺基酸定量法相同，但受測液體則為濃度調配為 2 8 mg/l 之 L-leucine 溶液，以此幾種溶液之濃度所測定出對應之吸光值，製作標準曲線。將所得之數據繪製成標準曲線如圖四所示。此標準曲線所得到換算濃度的方程式 ($y=0.0225x + 0.245$ 。y 為受測樣品的吸光值)，可用於實驗期間培養液中總胺基酸濃度的測定。



圖四、以寧海準反應測定不同濃度的 L-leucine 來製成的標準曲線

Fig 4. Using different concentrations of L-leucine to draw a standard curve after ninhydrin reaction.

(二) 確定 *B. licheniformis* THSC-1 以最單純的雞毛或豬毛為營養源之最佳生長條件。此部分進行之試驗包括溫度、pH 值以及有氧與厭氧培養之比較，並測定菌株在不同培養基之生長曲線。

1. 溫度試驗

配製含 1% 雞毛粉或 1% 豬毛粉之培養基，試驗共分七組，於每支試管中加入培養基 10 ml，在滅菌後接種 1 ml 之 *B. licheniformis* THSC-1 菌元，測試溫度分別為 20、30、40、50、60、70 及 80。Williams 等人 (1990) 之結果表示，以 *B. licheniformis* PWD-1 發酵雞毛粉時，在第 6 日之培養效果最好，故本試驗亦選擇培養 6 日作為參考。經培養 6 天之後，以胺基酸定量法測定試管中之胺基酸含量，並測定其菌數變化，以期得知在哪一種溫度培養下菌株會具有較高的分解能力。以三重複進行試驗，取其平均值。

2. pH 值試驗

得知菌株分解雞毛與豬毛的最佳生長溫度之後，接下來要找出分解之最佳 pH 值。由於一些研究報告用來篩選及培養的雞毛培養基的 pH 值為 7.5 (Williams *et al.*, 1990)，因此以 7.5 中心點選取上下各 3 個 pH 值，分別調整為 4.5、5.5、

6.5、7.5、8.5、9.5、10.5，共計 7 種不同 pH 值。試管中加入 10 ml 包含 1% 雞毛粉或豬毛粉的培養基，經滅菌後接種 1 ml 的菌元，在最佳溫度下培養 6 天後，測定胺基酸含量及菌數，以確定分解之最佳 pH 值。並進行三重複試驗。

3. 有氧與厭氧條件下培養之試驗

由於 *B. licheniformis* THSC-1 為兼性厭氣菌，可在有氧或厭氧的環境下生長。經上面的實驗確定最適合分解雞毛與豬毛的溫度與 pH 值後，試管中加入 1% 的雞毛粉或豬毛粉經調整最適 pH 值之培養基 10 ml，經滅菌後接種 1 ml THSC-1 菌元，在最適溫度進行培養，並分為 2 個處理組：一組直接置於震盪培養箱中，以 125 rpm 的速率震盪進行培養；另一組則利用厭氧操作培養箱，使試管中空氣置換為 95% N₂ + 5% CO₂ 的厭氧狀態，並置於厭氧操作箱培養。進行 24 日的培養，並於第 0、3、6、12、24 日採樣，測定總胺基酸量與菌數的變化。

4. 菌株之生長曲線

菌株生長曲線是為了瞭解菌株到達最佳生長狀態的時間，此一資料可以提供菌元在活化的時候之培養時間控制。

此部份將以 3 種培養基：Nutrient Broth、1% 雞毛粉培養基及 1% 豬毛粉培養基進行培養，每隻試管中培養基量為 10 ml，經滅菌後接種 1 ml 的菌元，在最適溫度及 pH 值下培養 24 小時，並每 2 小時取樣測定其菌數變化。以三重複進行試驗。

5. 不同震盪處裡對菌株生長之影響

此部分的試驗是在進行培養期間，分別給予 3 種不同震盪處理（培養中完全不震盪、每 12 小時以每分鐘 125 rpm 的轉速進行震盪 5 分鐘、全程以每分鐘 125 rpm 的轉速進行震盪），以觀察不同震盪條件對菌株生長及分解效果之影響。在每隻試管中加入 1% 雞毛粉或豬毛粉培養基 10 ml，經滅菌後接種 1 ml 的菌元，在最佳溫度及 pH 值下培養 6 天後，測定菌數及總胺基酸含量並加以紀錄。三重複進行試驗。

（三）利用 *B. licheniformis* THSC-1 進行雞毛的分解。

此階段試驗分為兩部分：第一部分主要在觀察雞毛經過粉碎與否，對 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛時的效果影響。培養基的配製以每 200 ml 為一單位，置於容量 250 ml 的血清瓶中，每 200 ml 的培養基中分別包含 1% 的雞毛粉及完整雞毛，將 pH 值調整至最佳值之後進行滅菌備用。在菌

元接種部分，先以 Nutrient Broth 培養菌株至生長最高峰之時間，以此為菌元進行接種，每瓶雞毛培養基接種 3% (6 ml) 之菌元，置於迴旋式恆溫培養箱中以最佳溫度進行為期 24 日的分解試驗，在培養期間以每分鐘 125 rpm 的轉速進行震盪，以避免培養基中雞毛陳積在血清瓶底層，降低分解的效果。在分解期間的第 0、3、6、12、24 日時進行取樣，測定菌數、pH 值、總胺基酸含量、殘留乾重變化、培養基之電導度及個別胺基酸含量並加以紀錄。

殘留乾重測定的步驟如下：以濾紙過濾出培養基中留下的殘渣，在 50 °C 下進行 12 小時烘乾，以測定乾重；個別胺基酸則是由成大貴重儀器中心之高性能胺基酸分析儀 (Beckman 6300 Amino Acid Analyzer) 測定。

第二部分則是以接種不同量之菌元，來觀察不同起始菌數對雞毛粉分解時之影響。培養基的配置以試管為單位，每支試管中裝填 1% 的雞毛粉培養基 10 ml。試驗包含 3 個處理組，分別為添加 1 ml (1 倍量)、2 ml (2 倍量) 及 4 ml (4 倍量) 的 THSC-1 菌元，每個處理組包含 5 支試管培養基，在接種菌元後分別於第 0、3、6、12、24 日時，測定其菌數、pH 值、殘留乾重及總胺基酸量並做紀錄。

(四) 利用 *B. licheniformis* THSC-1 進行豬毛的分解。

此部分試驗主要目的是在觀察：以 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛以外的含角蛋白質之效果。培養基的配製、試驗進行的流程及測定項目與雞毛分解試驗的第一部分相同，但是進行分解的材料則是以豬毛和豬毛粉取代雞毛和雞毛粉。

三、統計分析

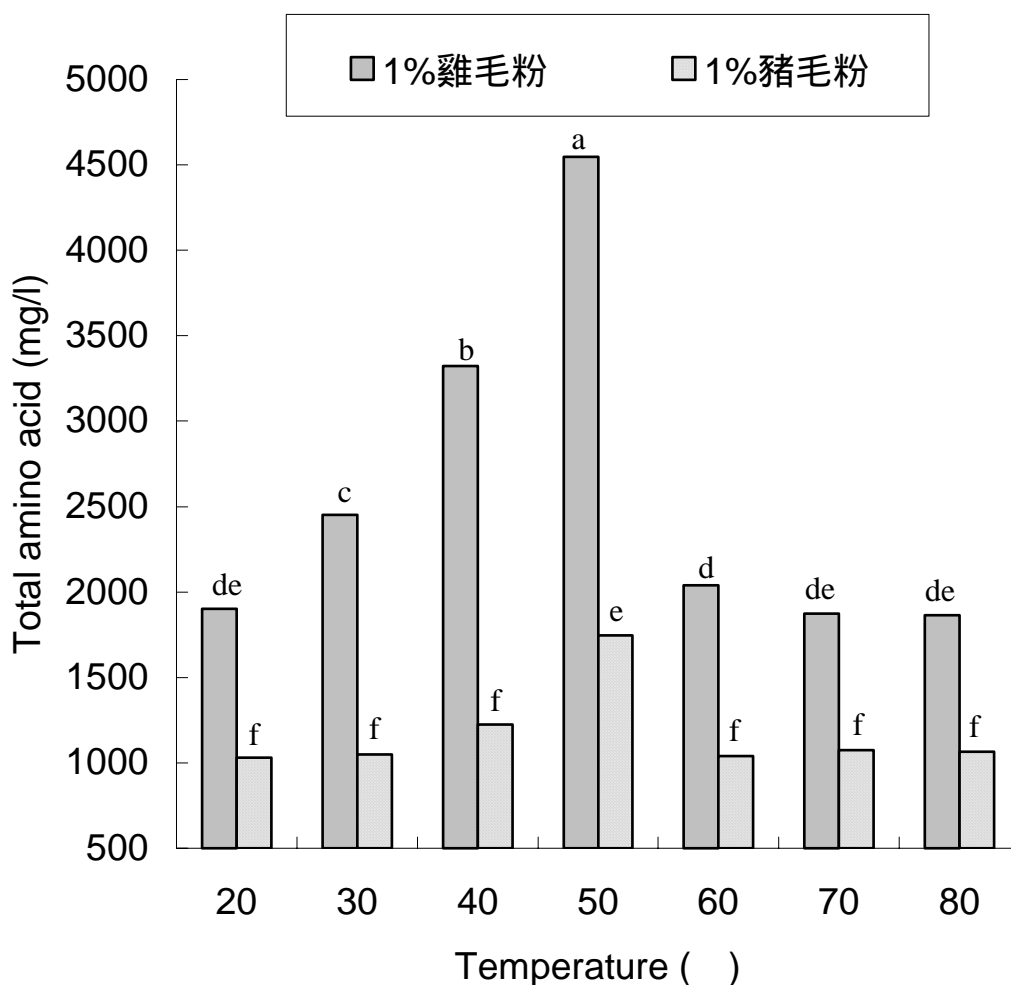
實驗至少重複三次，依測定項目所得數據，以 SAS 統計套裝軟體（1999）進行分析。將試驗結果以一般線性模式（GLM）進行不同處理間之差異性測定；另以 LSD 測定法比較各處理組平均值之差異顯著性。

伍、結果與討論

一、*B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛與豬毛之最適條件

(一) 最適溫度試驗

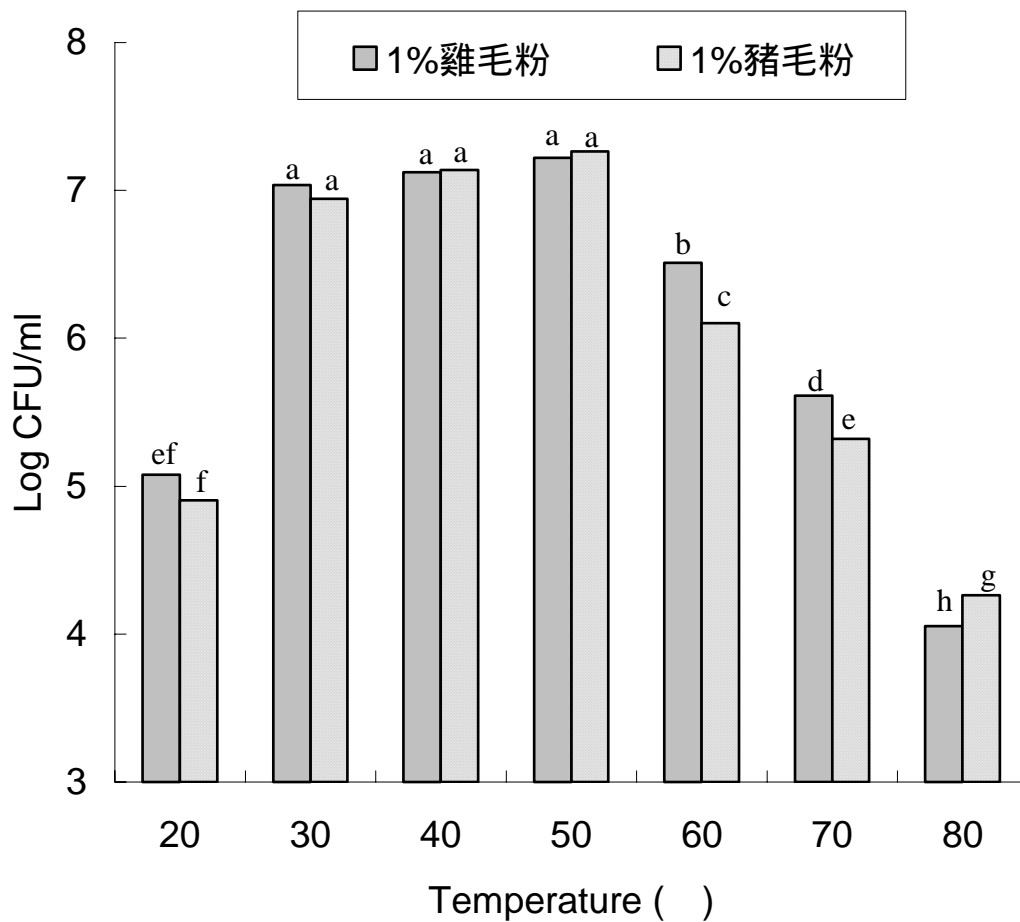
取 1 ml 經過活化的 THSC-1 菌元 (菌數約為 10^7 CFU/ml), 加到 10 ml 含有 1% 雞毛粉或豬毛粉且經過滅菌的液態培養基, 以 $20^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$ 為範圍, 分為 7 個不同溫度 (20°C 、 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 及 80°C) 來進行培養, 並在培養 6 日後測定總胺基酸濃度與菌數, 試驗經三重複求平均值, 其結果如圖五及圖六所示。在總胺基酸變化方面, 在 $20^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 之間, 雞毛粉培養基之總胺基酸量隨著溫度上升而呈現上升的趨勢, 在 50°C 時出現最高值 (4547 ± 78 mg/l) 但在 $60^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$ 之間的總胺基酸濃度皆維持在 2000 mg/l 左右; 在豬毛粉部分, 在 50°C 培養時有最高總胺基酸量 (1747 ± 43 mg/l), 在其他溫度的胺基酸量則維持在 1000 mg/l 左右。顯示出 THSC-1 所分泌的角蛋白酶在不同溫度條件下, 分解雞毛粉與豬毛粉時之分解效率會有差異。由於產生的總胺基酸濃度越大表示雞毛的分解效果越好 (Willams *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1992; 高與陳, 1995), 因此可以發現 *B. licheniformis* THSC-1 不論是分解雞毛或豬毛粉, 在 50°C 會有最佳分解效果, 此結果顯示之最適溫度與 Willams 等人



圖五、*B. licheniformis* THSC-1 在 pH 7.5 與不同溫度條件下分解 1% 雞毛粉或豬毛粉之總胺基酸濃度變化

Fig 5. Changes of total amino acid content in cultures with 1% chicken feather powder or bristle powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 at pH 7.5 and different temperatures.

^{a-f} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)



圖六、*B. licheniformis* THSC-1 在 pH 7.5 與不同溫度條件下分解 1% 雞毛粉或豬毛粉之菌數變化

Fig 6. Bacterial counts in cultures with 1% chicken feather powder or bristle powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 at pH 7.5 and different temperatures.

^{a-h} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)

找出的 *B. licheniformis* PWD-1 相同。

在不同溫度培養之菌數變化方面，由圖六可看出雞毛粉與豬毛粉有相似的變化圖形，在 20°C~50°C 之間菌數有上升的趨勢，而 30°C~50°C 間菌數維持在 10^7 CFU/ml 左右，雞毛粉與豬毛粉皆在 50°C 培養時有最高的菌數 (1.65×10^7 CFU/ml 與 1.86×10^7 CFU/ml)，但豬毛粉之菌數略高於雞毛粉。培養溫度在 60°C 以上時，菌數則有明顯的下降，而在 80°C 的條件培養下菌數維持在 10^4 CFU/ml 左右，雖然菌數不高，卻也表示 THSC-1 在此高溫下仍可存活。

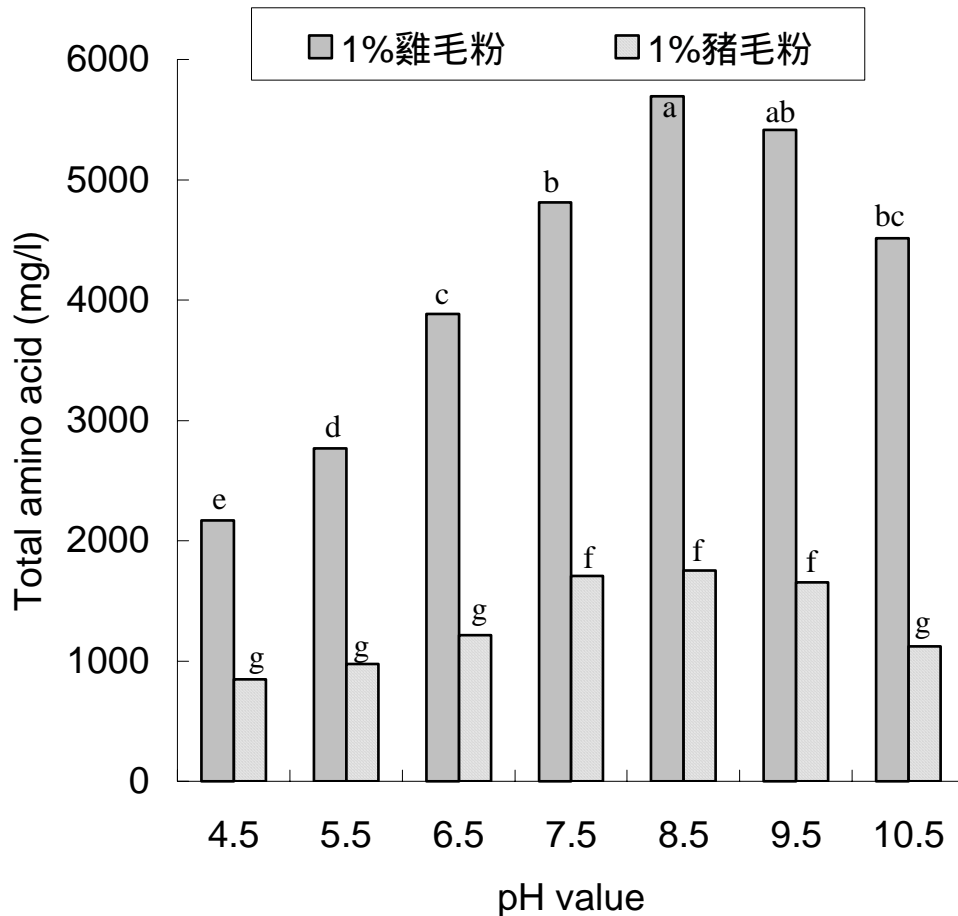
對照不同溫度培養下的總胺基酸濃度與菌數，將 THSC-1 在 50°C 培養於雞毛粉與豬毛粉時，總胺基酸濃度有最高表現，且菌數亦維持在最高峰。而在 30°C~40°C 之間的菌數，與 50°C 的菌數差異不大，但分解雞毛的效率較 50°C 分解時差。20°C 與 60°C~80°C 的條件下，雖有菌數生長，但其分解效果是最差的，因為溫度會影響菌數的生長與角蛋白酶的活力，間接影響總胺基酸濃度的表現 (Boeckle *et al.*, 1995; Willams *et al.*, 1990; Takami *et al.*, 1992)。由此結果可看出 THSC-1 菌株在 30°C~50°C 可以生長良好，但是 50°C 為最適合進行雞毛與豬毛分解的溫度。

(二) pH 值試驗

確定最適合培養溫度後，在此部分的實驗中分別配製 7 組不同 pH 值 (4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5) 的 1% 雞毛粉與豬毛粉培養基，經滅菌後各添加 1 ml 之 THSC-1 菌元，在 50°C 條件下進行 6 日的培養，經三重複試驗，紀錄總胺基酸含量與菌數變化，求平均值結果如圖七及圖八所示。

由圖七可以看到在總胺基酸變化方面，雞毛粉培養雞基在 pH 4.5~8.5 間之總胺基酸濃度，有隨著 pH 值增加而上升的趨勢，最高值出現在 pH 8.5 時的 5693 ± 130 mg/l，之後隨著 pH 值升高胺基酸濃度逐漸下降；而豬毛粉的部分，雖然跟雞毛粉有相似的變化趨勢，但是其變化幅度並不如雞毛粉，最高值則是出現在 pH 8.5 時的 1752 ± 84 mg/l。由此可發現在酸性條件下，THSC-1 分解雞毛粉與豬毛粉所產生的胺基酸濃度偏低，而 pH 7.5~9.5 之間的胺基酸濃度則有較佳之表現，所以在偏鹼性的條件中，THSC-1 菌株對雞毛粉的分解效果較好。

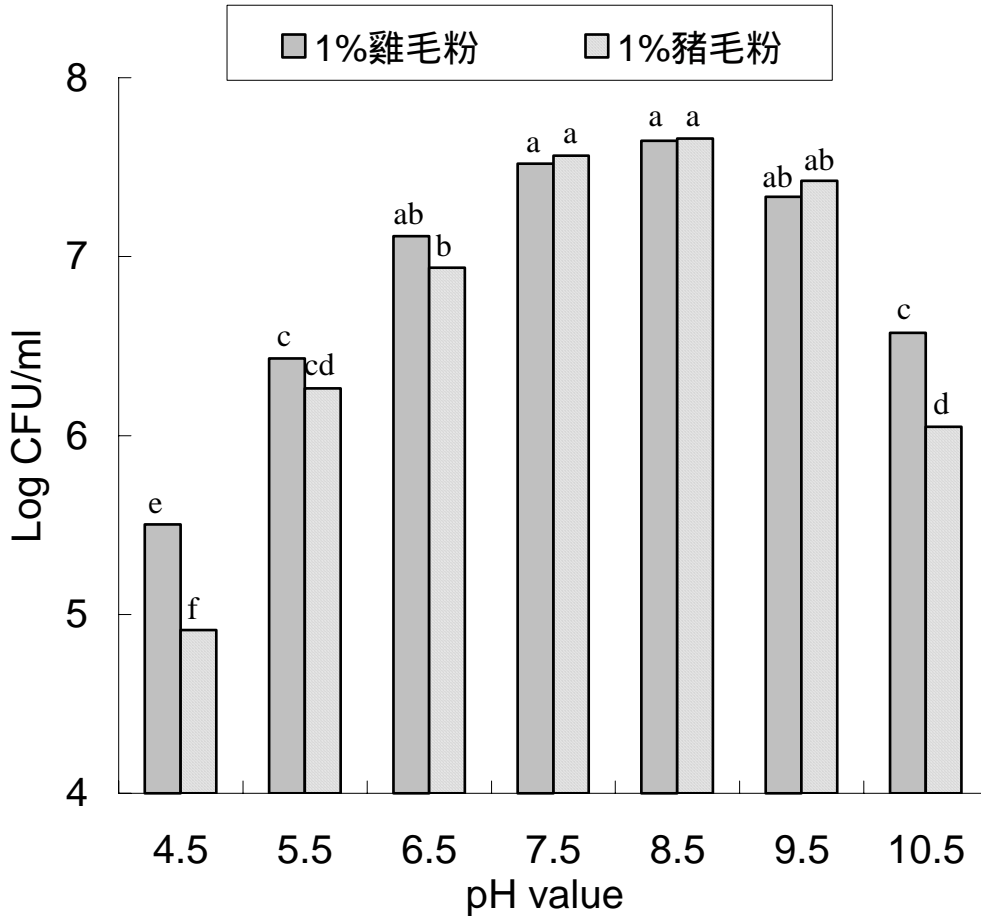
在菌數變化與不同 pH 值的關聯中，由圖八可以看到隨著 pH 值上升，雞毛粉與豬毛粉中 THSC-1 的菌數會隨著增加，到 pH 8.5 時有最高菌數 (雞毛粉 4.4×10^7 CFU/ml；豬毛粉 4.68×10^7 CFU/ml)，以豬毛粉之菌數略高。之後隨著 pH



圖七、*B. licheniformis* THSC-1 在 50°C 與不同 pH 值條件下分解 1% 雞毛粉或豬毛粉之總胺基酸濃度變化

Fig 7. Changes of total amino acid contents in cultures with 1% chicken feather powder or bristle powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 at 50 and different pH values.

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



圖八、*B. licheniformis* THSC-1 在 50°C 與不同 pH 值條件下分解 1% 雞毛粉與豬毛粉之菌數變化

Fig 8. Bacterial counts in cultures with 1% chicken feather powder or bristle powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 at 50 °C and different pH values.

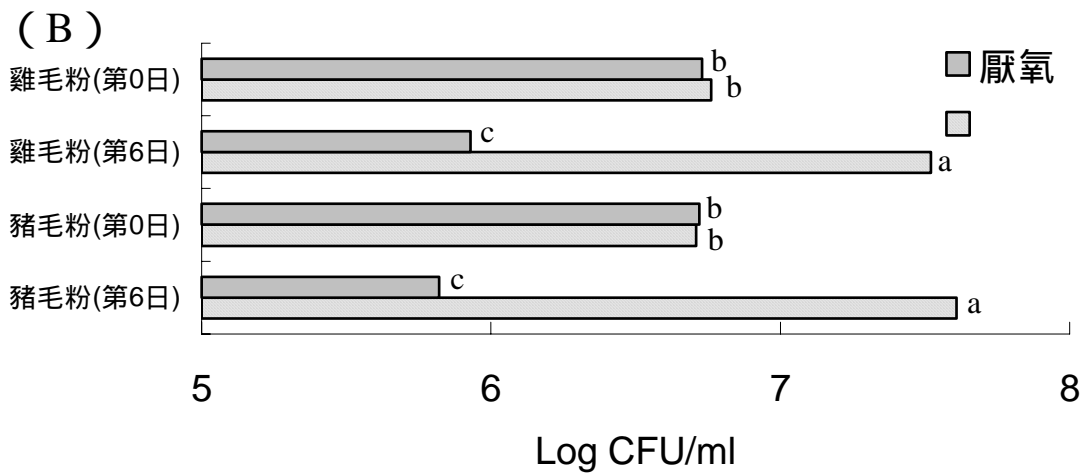
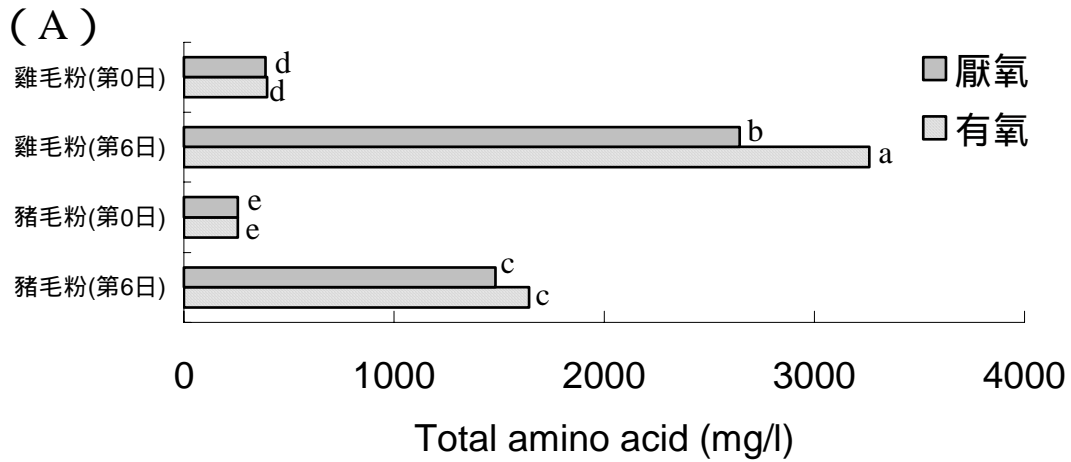
^{a-f} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)

值繼續上升時，菌數則呈現下降的趨勢。相較於偏酸性培養下所測得的菌數，在偏鹼性 pH 值培養下的菌數仍要來的高。整體來看，不論是雞毛粉或豬毛粉，雖然 pH 值 7.5~9.5 之間 THSC-1 可以發育良好，但綜合菌數及總胺基酸濃度的結果來看，以 pH 8.5 為最適合分解雞毛粉與豬毛粉之 pH 值。

(三) 有氧培養與厭氧培養之比較

由於 *B. licheniformis* THSC-1 為兼性厭氣菌，可在有氧或是厭氧的環境下生長。經上面的實驗確定最適合分解雞毛與豬毛的溫度與 pH 值後，接著準備 1% 的雞毛粉與豬毛粉培養基，接種 THSC-1 菌元在 50°C、pH8.5 的條件下進行培養，並分為 2 個處理組：一組為有氧狀態培養，置於培養箱中，以每分鐘 125 rpm 的速率進行震盪；另一組則使用厭氧操作箱進行厭氧狀態培養。進行 6 日的培養後紀錄總胺基酸量與菌數，試驗經三重複後求平均值，其結果如圖九所示。

從總胺基酸濃度的比較來看，經過 6 日培養後，不論是在雞毛粉或豬毛粉中，有氧或厭氧條件下，總胺基酸量都有增加的現象，以雞毛粉中增加幅度最大，由 397 ± 44 mg/l 增加到 3262 ± 82 mg/l，而豬毛粉則增加至 1643 ± 95 mg/l，且有氧條件下培養產生之總胺基酸量皆高於厭養培養。



圖九、在有氣及厭氧培養下 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉或豬毛粉之 (A) 總胺基酸濃度與 (B) 菌數變化

Fig 9. Changes of total amino acid content and bacterial count in cultures with 1% chicken feather powder and bristle powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 in aerobic and anaerobic condition.

^{a-e} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)

在菌數方面，有氧條件下培養 6 日可發現，在雞毛粉或豬毛粉中之菌數都有上升之現象；而在厭氧條件下，兩組菌數皆有下降。配合胺基酸測定的結果，發現以 THSC-1 分解雞毛或豬毛時，在有氧狀態有利菌株生長，而進一步提高分解的效果，因此，有氧狀態為雞毛或豬毛分解時較佳條件。此現象與 Willams 等人（1990）發現厭氧下培養會有較高總胺基酸濃度的結果不同，而 Willams 等人認為菌株在有氧條件下大量繁殖，會消耗培養液中的胺基酸，使總胺基酸濃度呈現較低的表現（Willams *et al.*, 1990）。

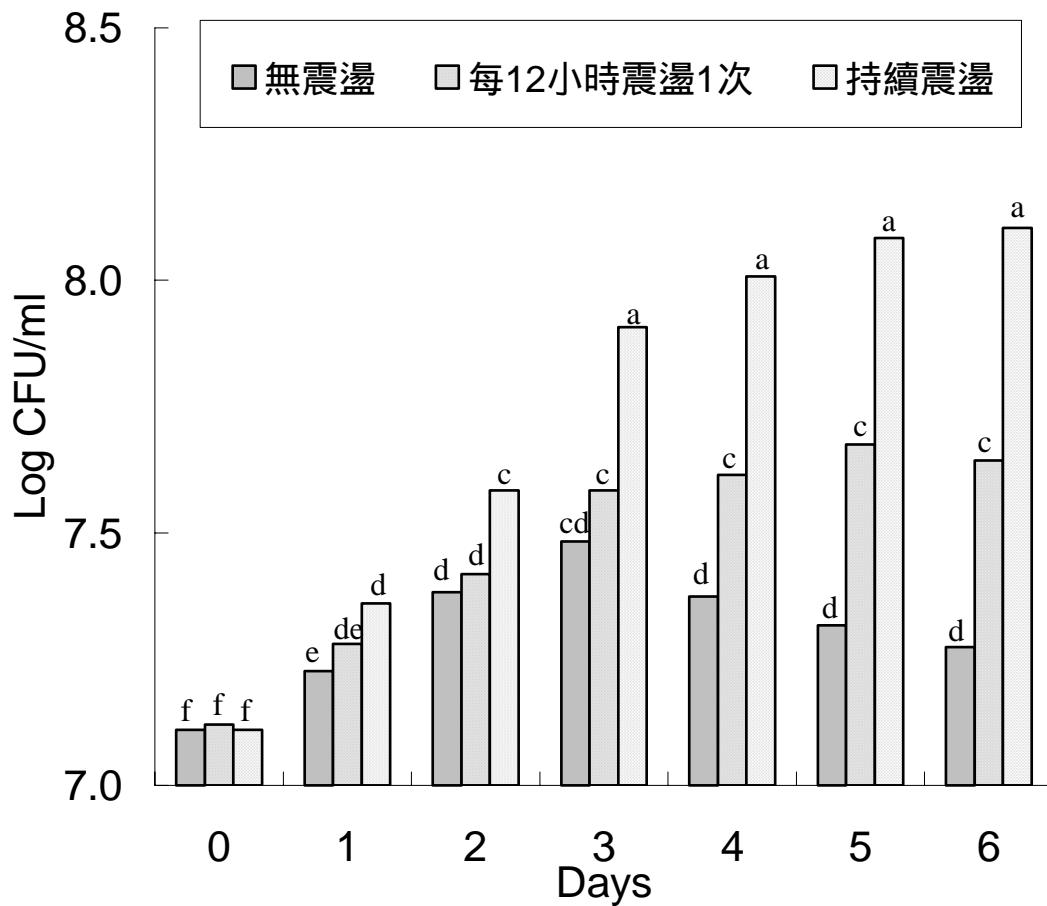
二、不同震盪方式對 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛效果之影響

此部分的試驗將針對雞毛分解過程中，提供三種不同震盪處理（完全不震盪、每 12 小時以 125rpm 的速率震盪 5 分鐘及持續以 125rpm 的速率震盪）對 *B. licheniformis* THSC-1 分解效果之影響。試驗期為 6 日，每日測定菌數及總胺基酸量之變化，並進行三重複試驗求其平均值，結果如圖十與圖十一所示。

由圖十可以發現，3 個處理組在培養的前 3 日，菌數都有明顯的增加，而以持續震盪這組的菌數增加幅度最大，達

到 8.4×10^7 CFU/ml。而在第 3 日之後，完全不震盪這組的菌數開始逐漸降低；每 12 小時震盪 1 次在菌數變化上則趨於平緩；而持續震盪這組菌數仍有小幅成長，在第 6 日時達到 10^8 CFU/ml 左右。相較於圖十一的總胺基酸變化，3 個處理下的總胺基酸量皆持續上升，且增加幅度差異不大，但仍以持續震盪組有較高之總胺基酸量。由於醱酵過程中給予培養基適當之震盪或攪拌，可以使雞毛培養基均勻混合，得到較佳分解效果，同時也會改變培養基中溶氧濃度。不同的攪拌速率會影響到雞毛分解菌分解雞毛時胺基酸的產生與累積效果（高與陳，1995）。

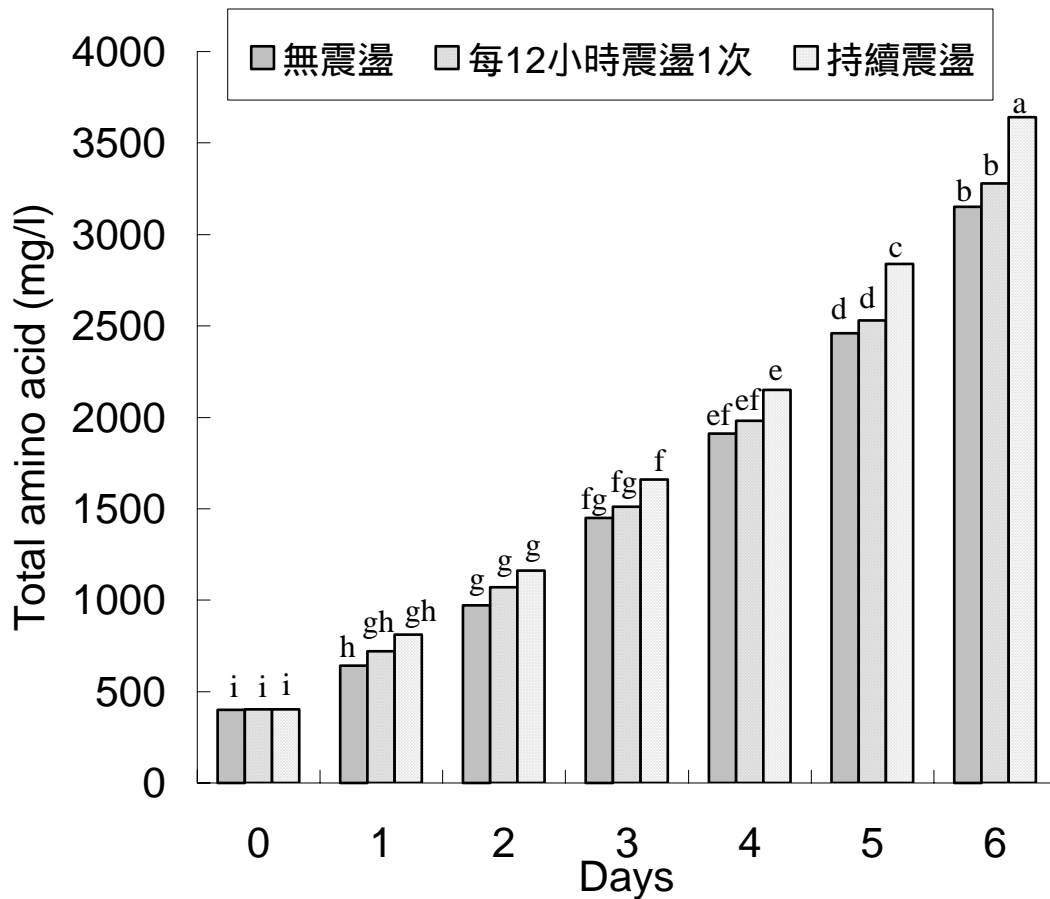
結果可以發現在 6 日醱酵期之中，不同震盪處理對菌數變化上有很大的影響，尤其以持續震盪的方式可以提高菌數的增長。但在胺基酸增加幅度上，雖然 3 組之間並無大幅的差距，仍以持續震盪下胺基酸增加較快，顯示 *B. licheniformis* THSC-1 菌數增加幅度越高，對總胺基酸量增加有正面影響。以此趨勢看來與 Willams 等人（1990）所強調：避免 *B. licheniformis* PWD-1 分解雞毛大量繁殖，才能有效累積胺基酸的結論有所差異。



圖十、不同震盪處理對 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉之菌數變化

Fig 10. Bacterial counts in cultures with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 in different shaking models.

^{a-f} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)



圖十一、不同震盪處理對 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛之總胺基酸量變化

Fig 11. Changes of total amino acid content in cultures with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 in different shaking models.

^{a-i} mean values which have the different superscript are significantly different ($p < 0.05$)

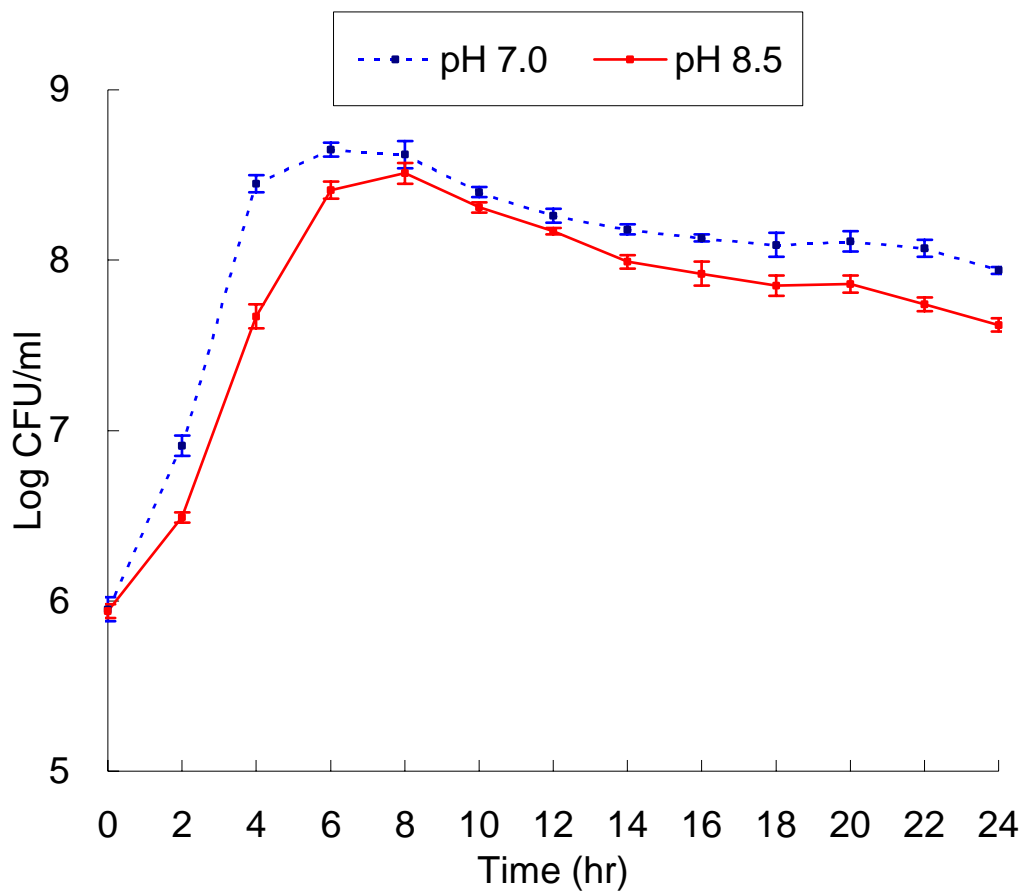
三、*B. licheniformis* THSC-1 在 Nutrient Broth、雞毛及豬毛培養基中之生長曲線

在試驗中配製的雞毛及豬毛培養基，是用來觀察醱酵試驗中 *B. licheniformis* THSC-1 分解的效果，如果以此培養基來進行菌元的活化，對菌株的生長則有相當大的影響，主因是雞毛或豬毛為培養基中唯一的碳、氮來源，對菌株增殖來說是較差的生長條件，儘管 THSC-1 可以分解利用，卻會拉長其生長到最旺盛之時間。此部分的試驗以液體營養汁培養基、1% 雞毛粉及 1% 豬毛粉培養基進行 *B. licheniformis* THSC-1 培養，比較其生長情形。每支試管含有 10 ml 培養基，調整 pH 值後並滅菌，接種 1 ml 菌元後在 50°C 下培養 24 小時，每 2 小時取樣測定菌數，試驗進行三重複取平均值並紀錄，其結果如圖十二、圖十三及圖十四所示。

Nutrient Broth 為實驗室常用的培養基，經滅菌後的 pH 值為 7.0，由於 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛最佳的 pH 值為 8.5，因此調整培養基之 pH 值為 7.0 及 8.5 兩組，以這兩種不同條件來做比較其生長之差異。由圖十二的結果可以看到在 pH 值 7.0 時，菌數在第 6 小時可達到生長最高峰，之後便逐漸下降；而在 pH 8.5 時，於第 8 小時會有最高菌數。

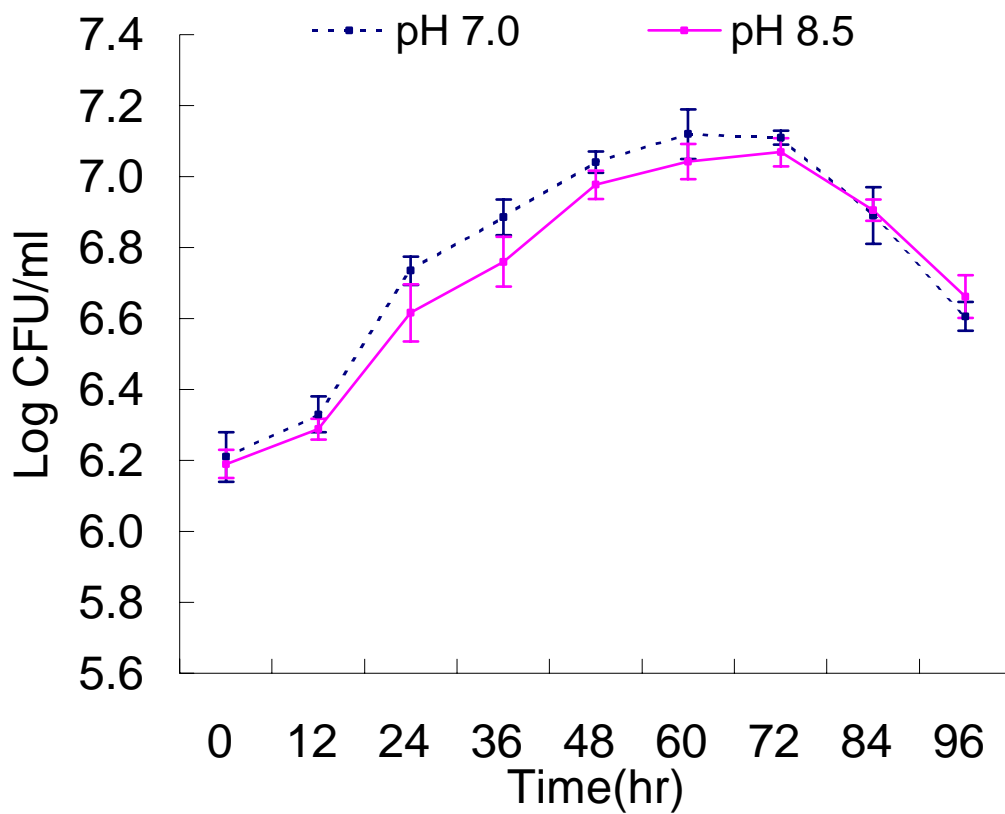
由於雞毛粉及豬毛粉培養基對於菌株是較嚴苛的生長

環境，*B. licheniformis* THSC-1 生長速度較緩慢，在 24 小時內僅能發現菌數有上升的現象，卻無法確定是否達到生長最旺盛之狀態，因此延長培養至 96 小時，每 12 小時紀錄一次菌數，可較明顯看出生長的變化。由結果可看不論 pH 7.0 或 8.5，以雞毛粉培養 THSC-1，在 60 到 72 小時左右才會達到生長最高峰，但以 pH 7.0 的菌數略高於 pH 8.5，菌數在 1.31×10^7 CFU/ml 左右；而在豬毛粉的部分，亦是在 60 到 72 小時之間達到生長旺盛，之後菌數便逐漸下降，與雞毛粉有相似之變化趨勢，最高菌數也是出現在 pH 7.0。相較培養於 Nutrient Broth，將 *B. licheniformis* THSC-1 培養於雞毛粉或豬毛粉中，其達生長最旺盛時的菌數與時間有相當大的差距。若以菌元活化為目的，用 Nutrient Broth 來進行 *B. licheniformis* THSC-1 培養會有較好的效率，可在 6 至 8 小時達到生長高峰。而以這三種培養基進行活化時，對雞毛或豬毛的分解效果是否有影響，則需進一步研究。



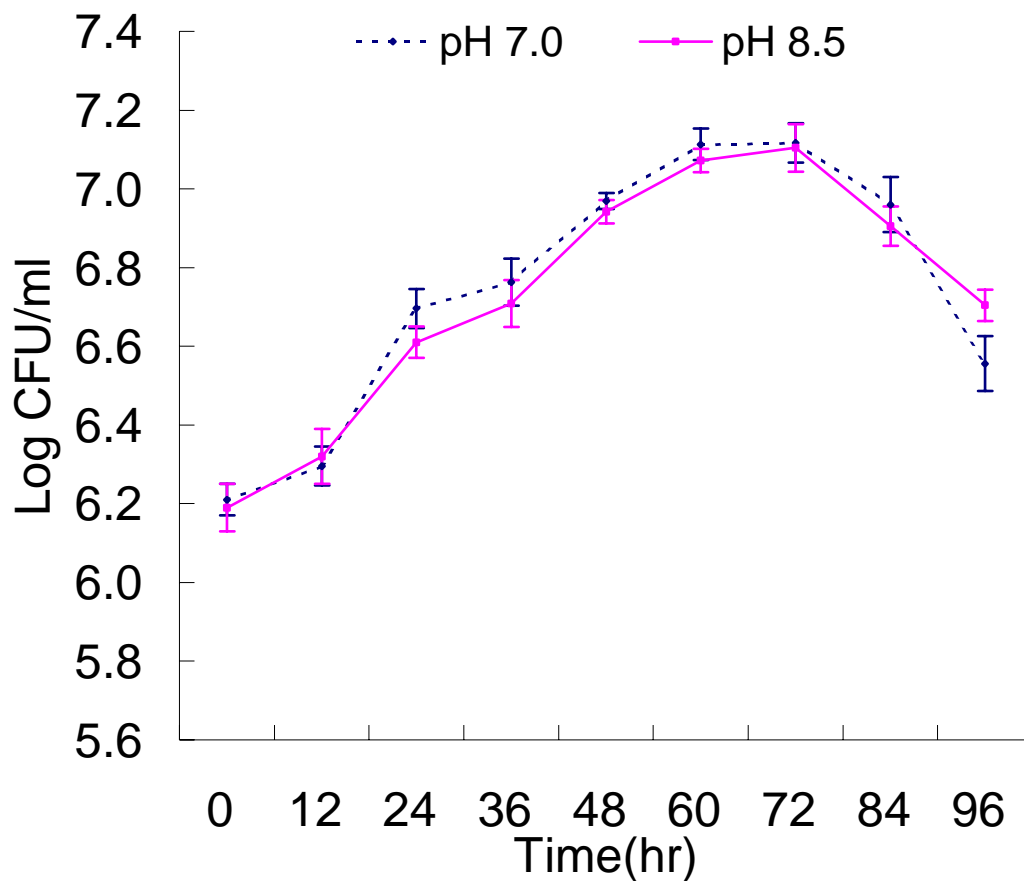
圖十二、*B. licheniformis* THSC-1 在不同 pH 值 Nutrient Broth 中之生長曲線

Fig 12. The growth curve of *B. licheniformis* THSC-1 in Nutrient Broth at different pH values.



圖十三、*B. licheniformis* THSC-1 在不同 pH 值 1% 雞毛粉培養基中之生長曲線

Fig 13. The growth curve of *B. licheniformis* THSC-1 in culture with 1% chicken feather powder at different pH values.



圖十四、*B. licheniformis* THSC-1 在不同 pH 值 1% 豬毛粉培養基中之生長曲線

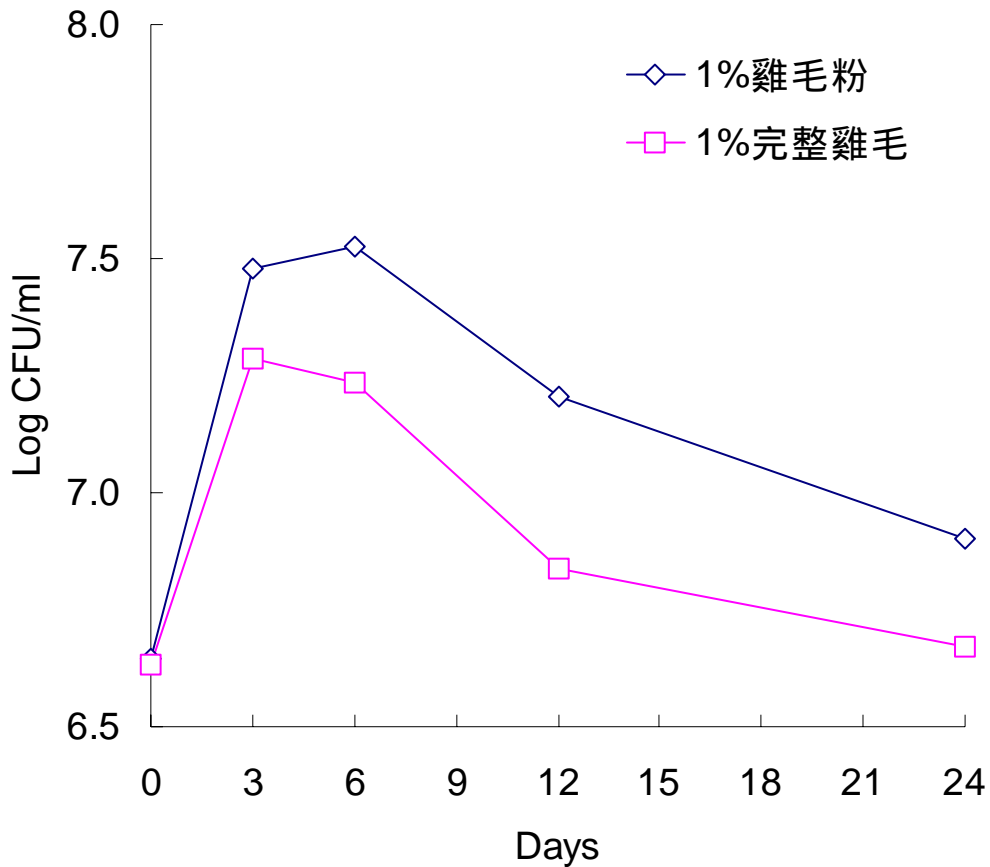
Fig 14. The growth curve of *B. licheniformis* THSC-1 in culture with 1% bristle powder at different pH values.

四、利用 *B. licheniformis* THSC-1 進行雞毛的分解

在前面部分的試驗已經確定 *B. licheniformis* THSC-1 解雞毛時最適合的溫度、pH 值之後，這部分試驗要觀察在雞毛粉與完整雞毛培養基中，以 *B. licheniformis* THSC-1 進行分解的效果比較。每單位雞毛培養基為 200ml，置於 250ml 的血清瓶中，培養基中的雞毛濃度為 1% (2g)，pH 值調至 8.5，菌元接種量為 3% (6ml)，在 50°C 培養箱中進行 24 日培養，並於第 0、3、6、12、24 日測定菌數、pH 值、總胺基酸量及殘存乾重之變化，以三重複試驗取平均值，其結果如圖十五、十六、十七及十八所示。

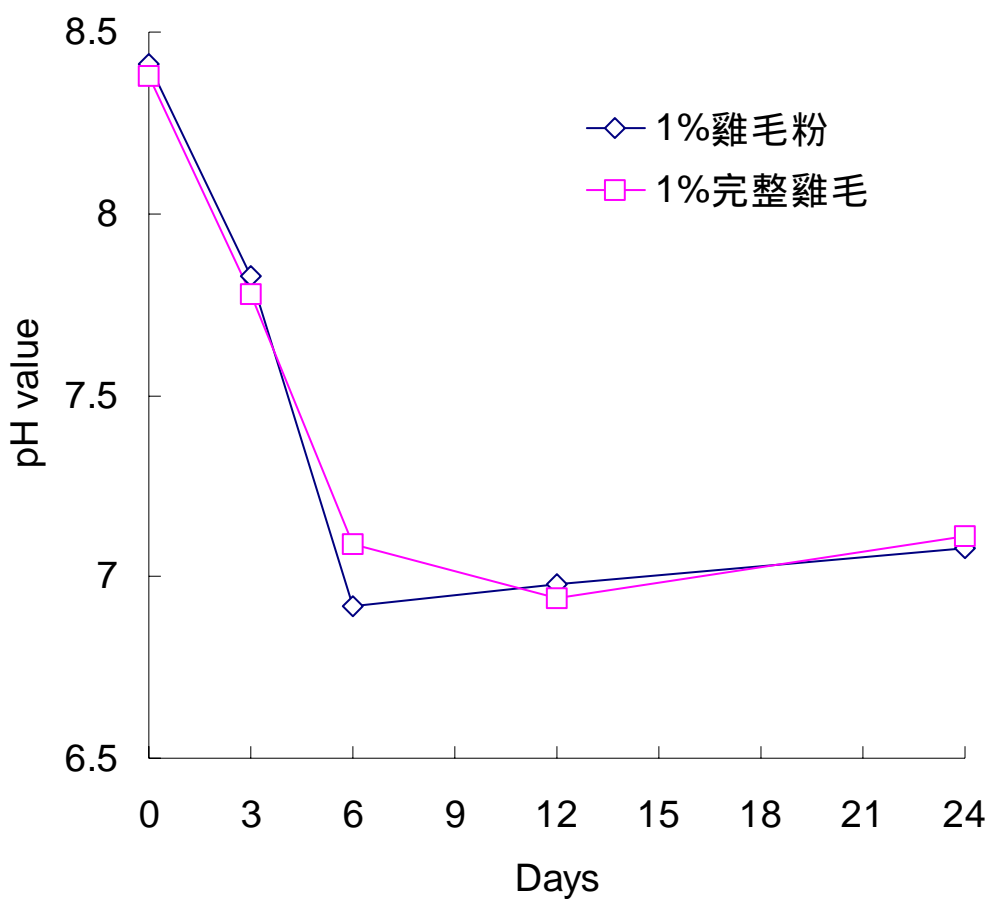
在菌數變化方面，第 3 日時兩者菌數皆有明顯上升，且以雞毛粉中的菌數較高，達到 3×10^7 CFU/ml 左右，而完整雞毛的菌數則是為 1.92×10^7 CFU/ml。到第 6 日時，雞毛粉組之菌數還有小幅上升，之後便逐漸下降到 24 日時的菌數為 8×10^6 CFU/ml；完整雞毛組之菌數則是從第 3 日開始下降，到 24 日時菌數已下降至 4.7×10^6 CFU/ml。顯示 *B. licheniformis* THSC-1 在雞毛粉中較完整雞毛中容易生長。

兩組培養基在 pH 值變化方面有相似的變化，在第 6 日時 pH 值會由最初接近 8.5 下降至 7 左右，並維持至 24 日無大幅變化；在總胺基酸量的變化上，兩組在 24 日的培養期



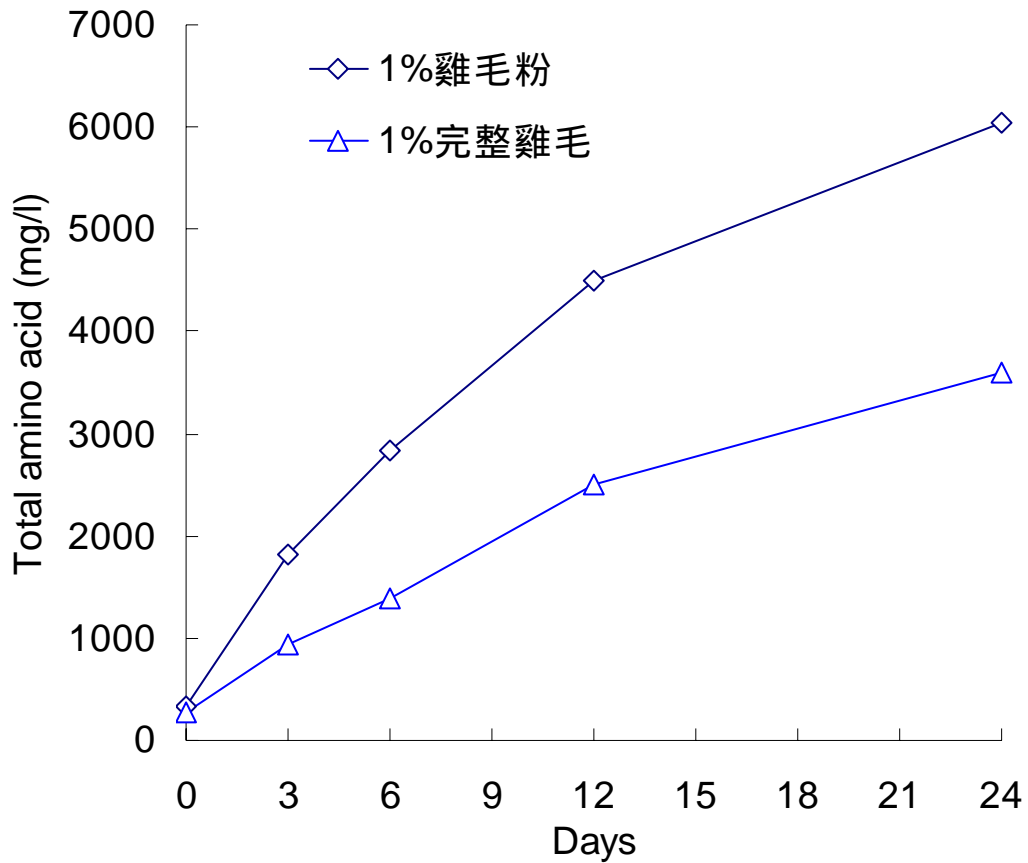
圖十五、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉或完整雞毛之菌數變化

Fig 15. Changes of Bacterial counts in culture with 1% chicken feather powder or 1% whole chicken feather that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.



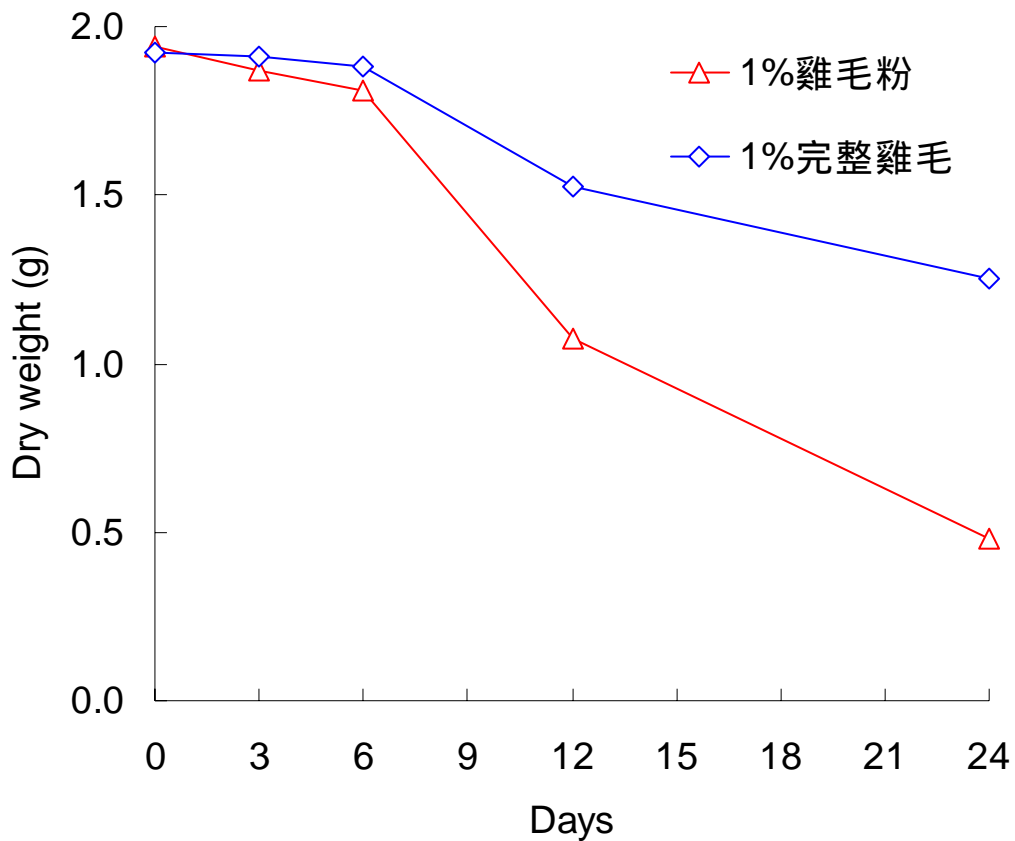
圖十六、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉或完整雞毛之 pH 值變化

Fig 16. Changes of pH value in culture with 1% chicken feather powder or 1% whole chicken feather that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.



圖十七、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉或完整雞毛之總胺基酸量變化

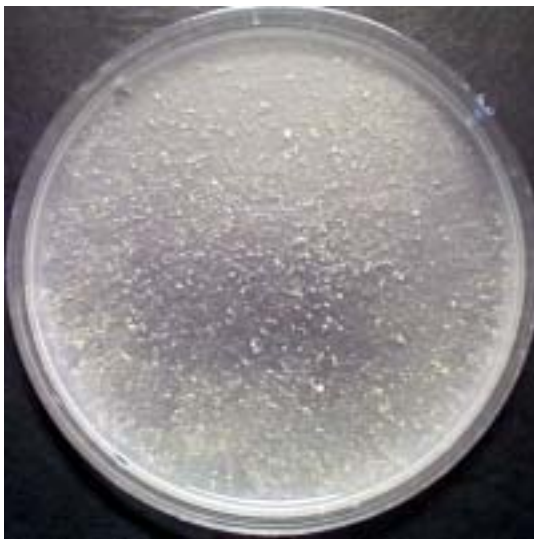
Fig 17. Changes of total amino acid in culture with 1% chicken feather powder or 1% whole chicken feather that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.



圖十八、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉或完整雞毛之殘留乾重變化

Fig 18. Changes of dry weight in culture with 1% chicken feather powder or 1% whole chicken feather that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.

中均有增加，而雞毛粉中總胺基酸量之增加幅度較完整雞毛高出許多，雞毛粉組由第 0 日的 335 mg/l，在 24 日時已增加到 6051 mg/l；完整雞毛組則是由 279 mg/l 增加到 3606 mg/l。由殘存乾重的變化來比較，在培養前 6 日雞毛粉與完整雞毛並無明顯減少，在第 6 日後兩者乾重有較明顯變化，其中雞毛粉的減少量較完整雞毛高，到 24 日時培養基中雞毛粉與完整雞毛的量，分別由最初的 1.94 g 與 1.92 g，減少至 0.48 g 與 1.25 g，殘留乾重之比例分別為 24.74% 與 65.1%，分解率達到 75.26% 與 34.9%。從培養基外觀的變化，也可以明顯觀察到雞毛粉與雞毛減少的情形：雞毛粉培養基經過 24 日發酵後，其中雞毛粉顆粒會逐漸變細甚至於消失，而培養液的顏色也逐漸變深；而完整雞毛經過分解後會留下羽軸及小碎片，大部分細小的羽枝會被分解而形成小顆粒，使培養液呈現混濁且顏色亦逐漸加深，這些現象可以由圖十九及圖二十觀察到。



第 0 天

第 24 天

圖十九、1% 雞毛粉經 *B. licheniformis* THSC-1 分解後之外觀變化

Fig 19. The appearances of chicken feather powder in medium that degraded by *B. licheniformis* THSC-1



第 0 天

第 24 天

圖二十、1% 完整雞毛經 *B. licheniformis* THSC-1 分解後之外觀變化

Fig 20. The appearances of chicken feather in medium that degraded by *B. licheniformis* THSC-1

綜合以上四項結果來看，雞毛經過粉碎後可使 *B. licheniformis* THSC-1 更易生長，有效分解雞毛減少其乾重，並持續累積總胺基酸量。但是由總胺基酸量變化曲線的斜率來看，在 0 到 12 日的平均每日胺基酸增加幅度 (348 mg/l)，較 12 至 24 日的增加幅度 (129 mg/l) 來的高，因此在 12 日前的胺基酸累積效果優於 12 日後。若要應用於大規模醱酵生產上，培養時間的控制與胺基酸產量會對成本造成影響，因此這方面則必須進一步評估。

五、利用 *B. licheniformis* THSC-1 進行豬毛的分解

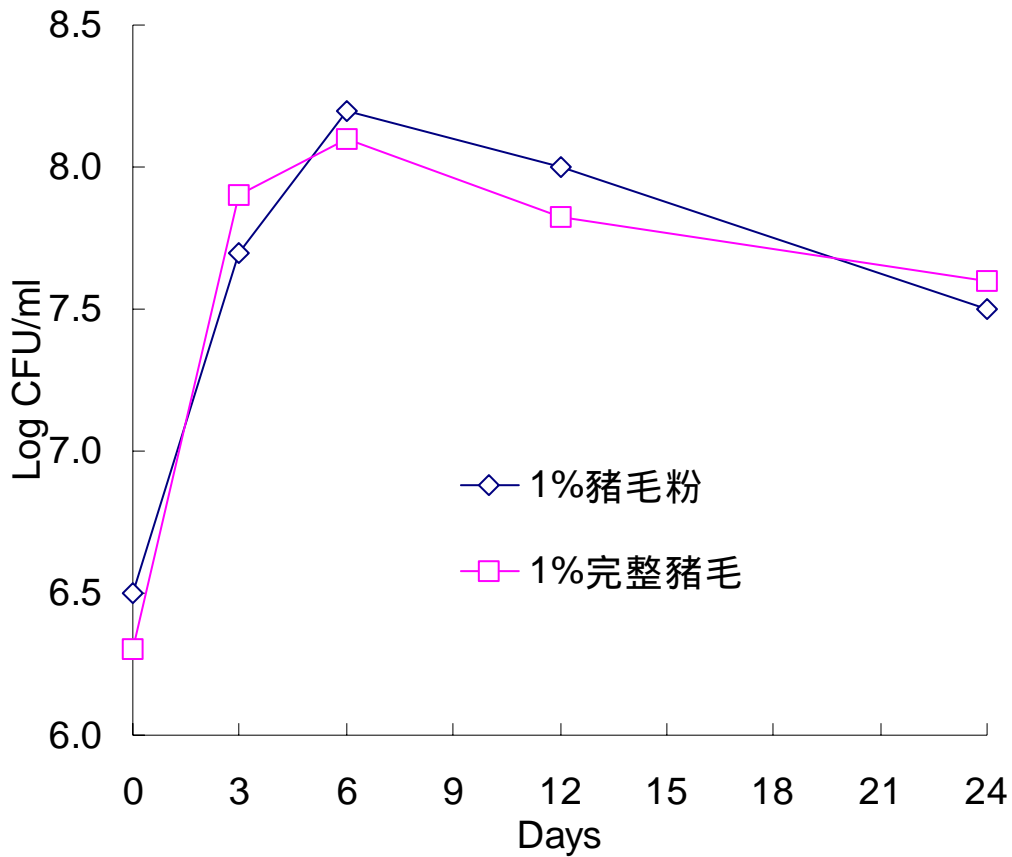
由於 *B. licheniformis* THSC-1 是自蛋雞糞堆肥中有分解現象的雞毛上篩選出來 (張, 1999)，加上前一部份有關雞毛分解的試驗後，可以確認 *B. licheniformis* THSC-1 具有很強的雞毛分解能力。*B. licheniformis* THSC-1 除了能分解雞毛，是否還能分解其他含角蛋白的物質？這部分的試驗將利用 *B. licheniformis* THSC-1 來分解豬毛，觀察其變化以評估分解豬毛的效果。

每單位豬毛培養基為 200 ml，其中含有 1% 的豬毛粉或完整豬毛 (2g)，調整 pH 值到 8.5，菌元接種量為 3% (6g)，在 50°C 培養 24 日，並在第 0、3、6、12、24 日測定其菌數、

pH 值、總胺基酸量及殘存乾重之變化，以三重複試驗取平均值，其結果如圖二十一、二十二、二十三及二十四所示。

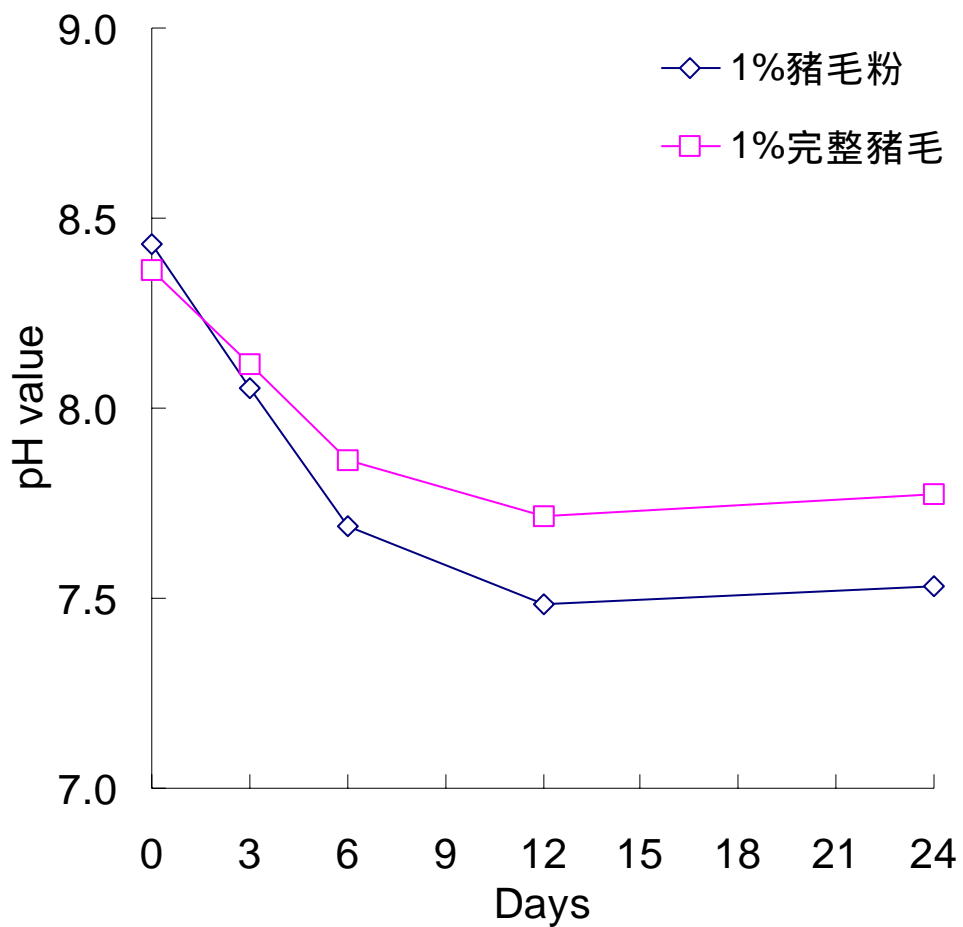
在菌數變化上，第 3 日時完整豬毛的菌數 (8×10^7 CFU/ml) 較豬毛粉組高，而在第 6 日時豬毛粉組則高於完整豬毛組，到達 10^8 CFU/ml 左右。6 日以後兩組菌數皆隨時間增加而減少，到 24 日分別下降至 3.2×10^7 CFU/ml 與 4×10^7 CFU/ml。把雞毛分解與豬毛分解試驗之菌數變化比較可發現，*B. licheniformis* THSC-1 在豬毛培養基的生長速度，較雞毛培養基快，且 6 日之後菌數減少的幅度也比在雞毛培養基小，這是可進一步探討的現象；在 pH 值變化方面，與雞毛培養基相比也有很大的差異。24 日培養期中，雖然豬毛粉的 pH 值下降幅度較完整豬毛組大，但豬毛粉及完整豬毛培養基的 pH 值均在 7.5 以上，較雞毛培養基來的高。

而在總胺基酸量與殘存乾重變化上，隨著培養時間的增加，2 種培養基的總胺基酸量皆有增加，以豬毛粉組的增加幅度較大，由 257 mg/l 增加至 3206 mg/l，而完整豬毛組在 24 日總胺基酸量僅由 106 mg/l 增加至 1070 mg/l，增加幅度不高，與雞毛分解相較，總胺基酸增加效果方面皆大幅低於雞毛粉與完整雞毛。而總胺基酸變化上，豬毛粉、雞毛粉及完整雞毛有相似的變化趨勢：在前 12 日的每日平均胺基酸



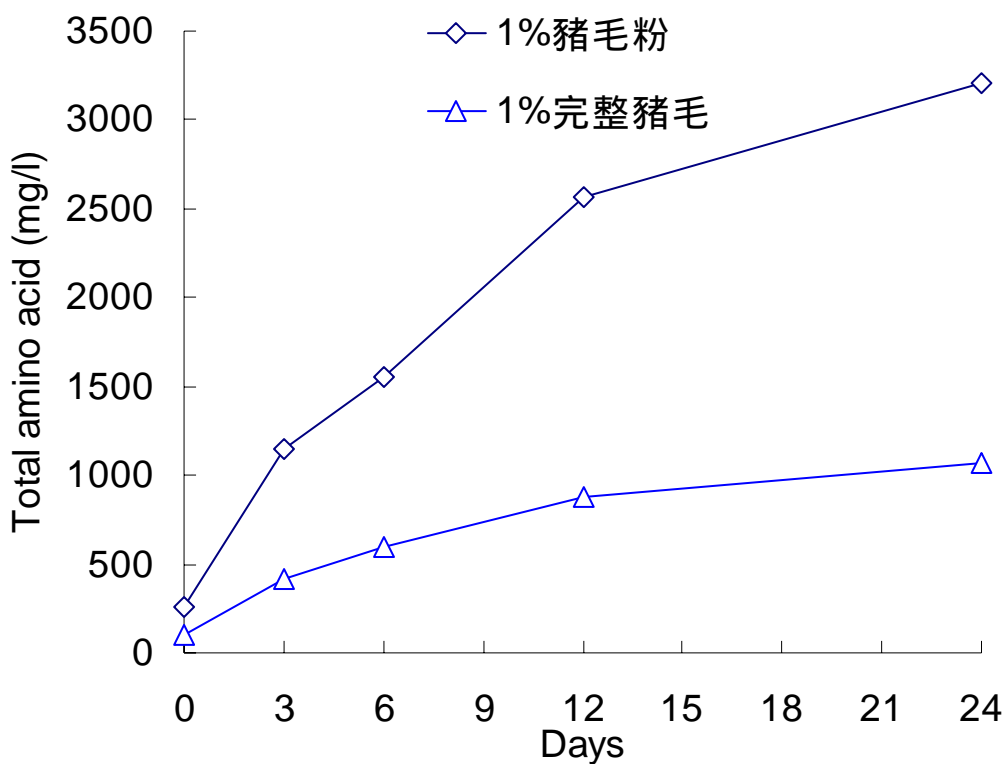
圖二十一、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 豬毛粉或完整豬毛之菌數變化

Fig 21. Changes of Bacterial counts in culture with 1% bristles powder or 1% whole bristles that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.



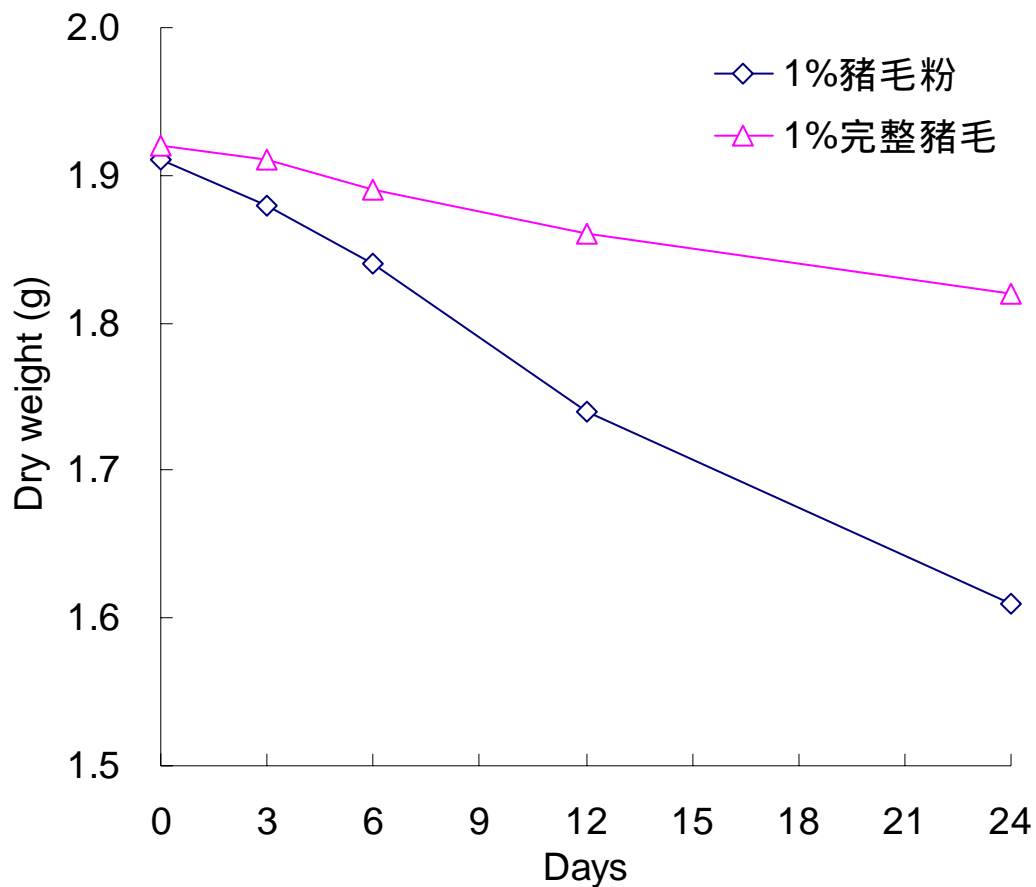
圖二十二、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 豬毛粉或完整豬毛之 pH 值變化

Fig 22. Changes of pH value in culture with 1% bristles powder or 1% whole bristles that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.



圖二十三、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 豬毛粉或完整豬毛之總胺基酸量變化

Fig 23. Changes of total amino acid in culture with 1% bristles powder or 1% whole bristles that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.

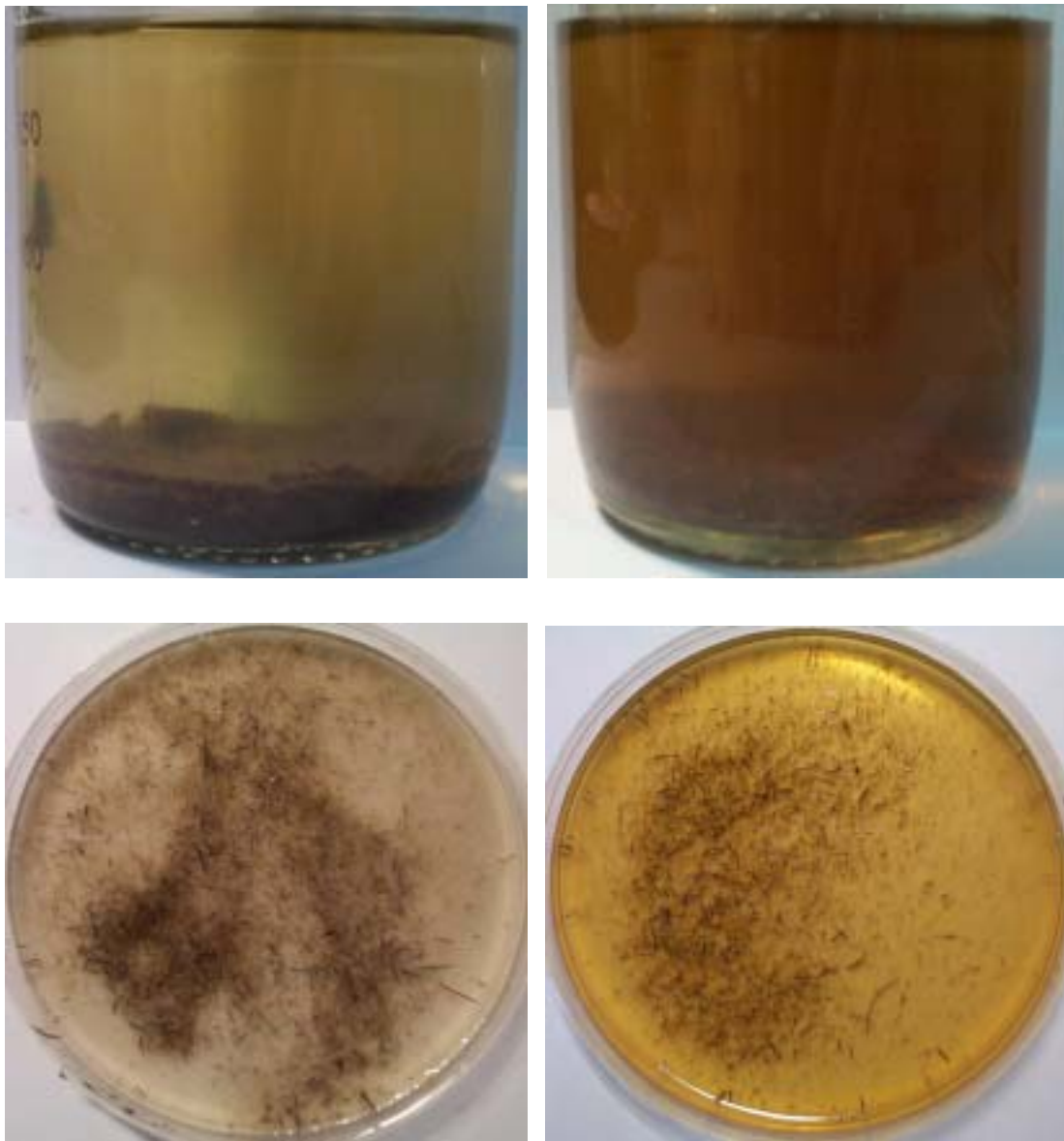


圖二十四、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 豬毛粉或完整豬毛之殘留乾重變化

Fig 24. Changes of dry weight in culture with 1% bristles powder or 1% whole bristles that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.

增加量（豬毛粉：192 mg/l、雞毛粉：348 mg/l、完整雞毛：185 mg/l）皆高於後 12 日之平均增加量（豬毛粉：53 mg/l、雞毛粉：129 mg/l、完整雞毛：93 mg/l），而完整豬毛的總胺基酸增加幅度在分解期間則是以小幅度平緩增加；由乾重變化上，更可以發現在 24 日培養結束時，豬毛粉殘存乾重由 1.91 g 減少到 1.61 g，完整豬毛由 1.92 g 減至 1.82 g，分解率分別僅為 15.7% 及 5.2%。培養基外觀變化由圖二十五及圖二十六可發現：豬毛粉經分解後，其整體外觀並沒有很大的變化，但培養液顏色會變深，懸浮的小顆粒會增加；完整豬毛經 THSC-1 作用後，除了培養液顏色有變深以外，豬毛外型幾無明顯變化，但在過濾後殘渣可發現豬毛有褪色的現象，而且豬毛會分解成小段。

綜合雞毛與豬毛分解結果可以發現，以 *B. licheniformis* THSC-1 分解豬毛的效果並不佳（分解率 5.2%），雖然將豬毛粉碎可提高分解效率（分解率 15.7%），但分解效果依然有限，與其分解雞毛效果相比有相當大的差距，因此以 THSC-1 來分解雞毛有較佳之利用性。



第 0 天

第 24 天

圖二十五、1% 豬毛粉經 *B. licheniformis* THSC-1 分解後之外觀變化

Fig 25. The appearances of bristle powder in medium that degraded by *B. licheniformis* THSC-1



第 0 天



第 24 天

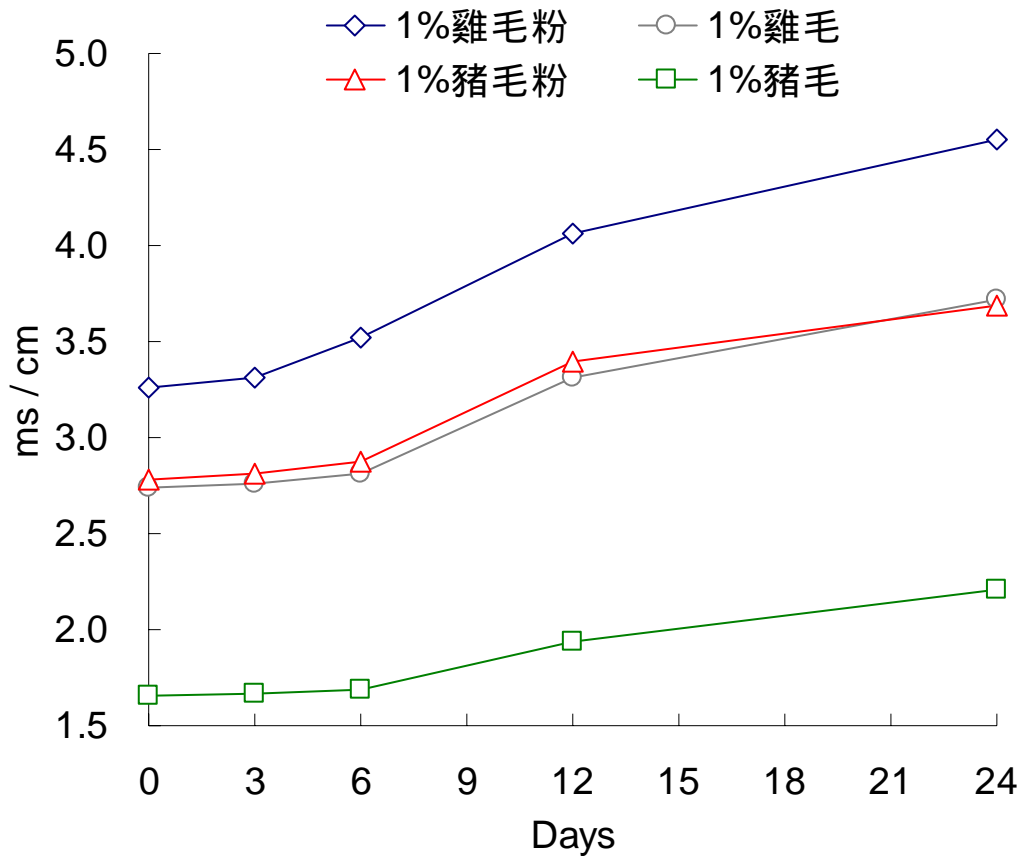
圖二十六、1%完整豬毛經 *B. licheniformis* THSC-1 分解後之外觀變化

Fig 26. The appearances of bristle in medium that degraded by *B. licheniformis* THSC-1

此外，在雞毛及豬毛分解試驗中，也進一步利用手提式電導度計，測定在培養期間電導度的變化，結果如圖二十七所示。其中可以發現隨著培養時間增加，四組培養基之電導度都有增加的趨勢，但增加幅度不一，其中以雞毛粉組增加較快，豬毛組增加幅度最小。配合前部分總胺基酸測定結果來看，培養基中胺基酸初始濃度不同，其相對所測得溶液中電導度亦有差異，初步推定電導度增加幅度與總胺基酸量增加有關。由於電導度計使用簡便，若能運用在胺基酸測定上，將可簡化測定總胺基酸時的繁複過程，但這項數值的利用性仍需進一步研究。

六、不同初始培養菌數對 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛效果之影響

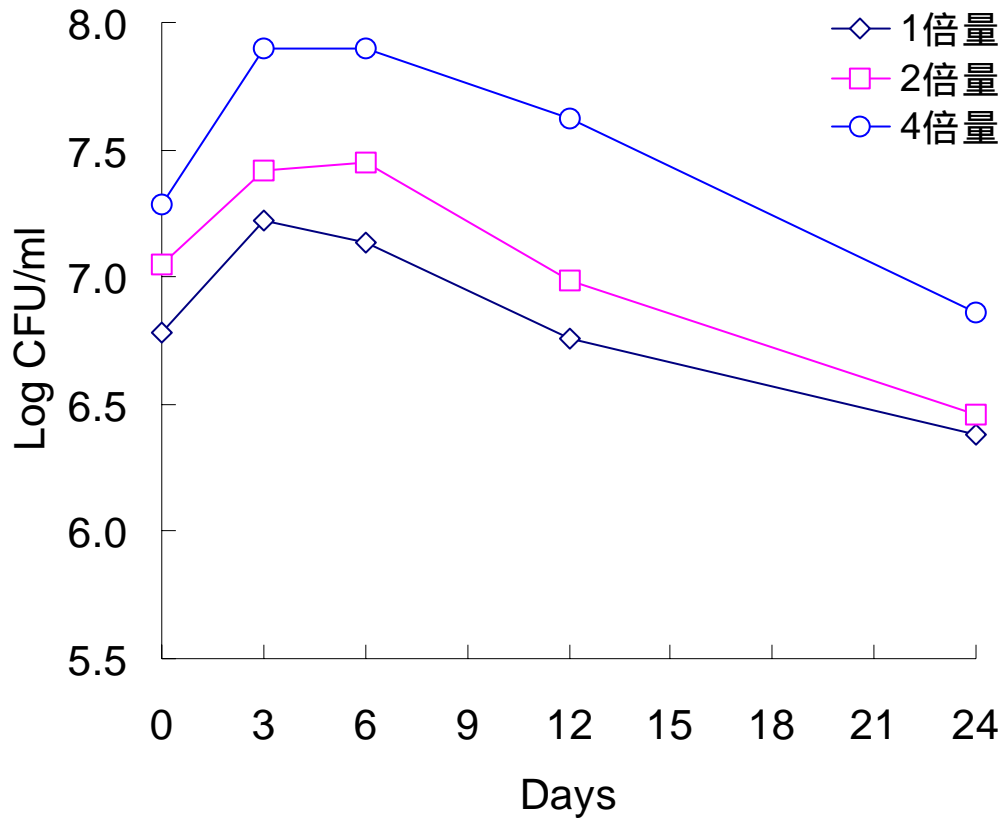
此部分試驗是以接種不同量之 *B. licheniformis* THSC-1 菌元，進行雞毛粉分解，來觀察不同起始菌數對分解雞毛效果之關係。每單位培養基量為 10 ml，包含 1% 雞毛粉(0.1g)，置於試管中並調整 pH 值至 8.5，菌元接種量分別為 1 ml、2 ml 及 4 ml，以 50°C 培養 24 日，在第 0、3、6、21、24 日時紀錄菌數、pH 值、總胺基酸量及乾重之變化，三重複試驗取平均值，其結果如圖二十八、二十九、三十及三十一所示。



圖二十七、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉、雞毛、豬毛粉及豬毛之電導度變化

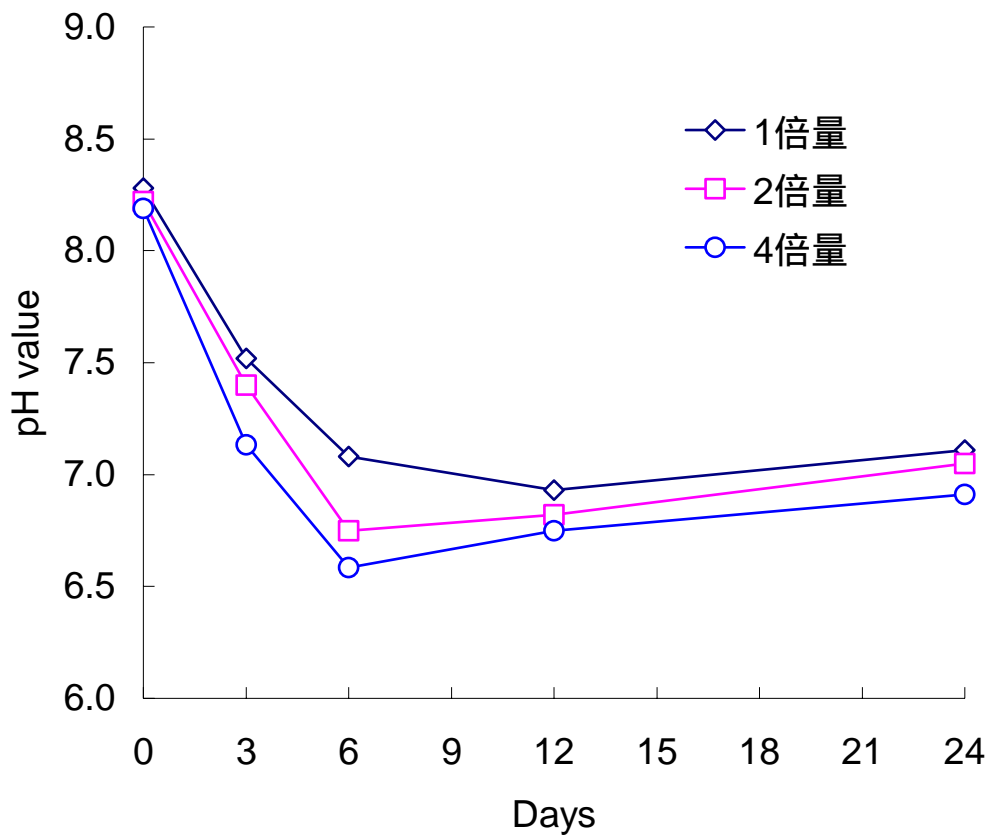
Fig 27. Changes of Conductivity in culture with 1% chicken feather powders, chicken feather, bristle powders and whole bristles that degraded by *B. licheniformis* THSC-1.

在菌數變化上，3 種不同初始菌數培養下有相似的菌數變化圖形，皆在第 3 至第 6 日時有較高菌數，之後便逐漸下降，但是初始菌數高者，在培養期間持續保有較高之菌數；而初始菌數較高的，pH 值下降速度較快，前 6 日的 pH 值會由接近 8.5 大幅下降至 6.5 和 7 之間，以接種 4 ml 的下降最快（6.58）。6 日後 pH 值會逐漸趨於平穩，維持在 7 左右；進一步比較總胺基酸量的變化，在前 6 日總胺基酸增加幅度，隨著菌元接種量增加而提高，接種 4 ml 菌元組為 3 組中增加最快的，由 411 mg/l 增加到 5,030 mg/l。6 日後的胺基酸增加幅度變逐漸趨於平緩但仍持續增加，且 3 組的變化趨勢相似；在乾重變化上，3 組不同初始菌量的變化趨勢相似，在第 6 日後殘存乾重有明顯的減少，以 4 ml 組減少量稍高於其他 2 組，整體來看並無很大的差距出現。結果綜合來看，顯示接種菌元量之多寡，對 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛粉的前 6 日，對總胺基酸量增加與 pH 值的減少有較大影響，但整體來說接種菌量越高，總胺基酸量累積越高。這點與 William (1990) 的結果不同，其結果顯示 PWD-1 初始菌量越高者，總胺基酸累積量越低。並且在培養期間還有出現總胺基酸量下降的現象，而以 THSC-1 培養時，不論何種初始菌量，其總胺基酸量皆持續上升，無下降之現象。



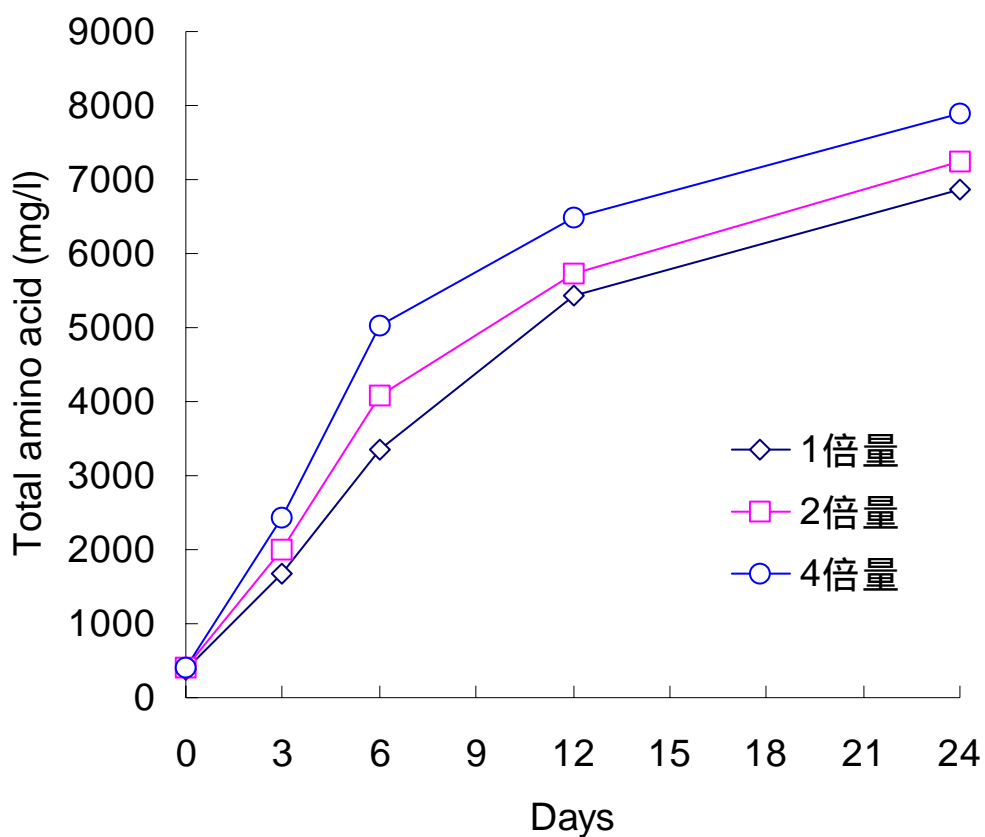
圖二十八、以不同菌量 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉之菌數變化

Fig 28. Changes of Bacterial counts in culture with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 for different concentrations of starter.



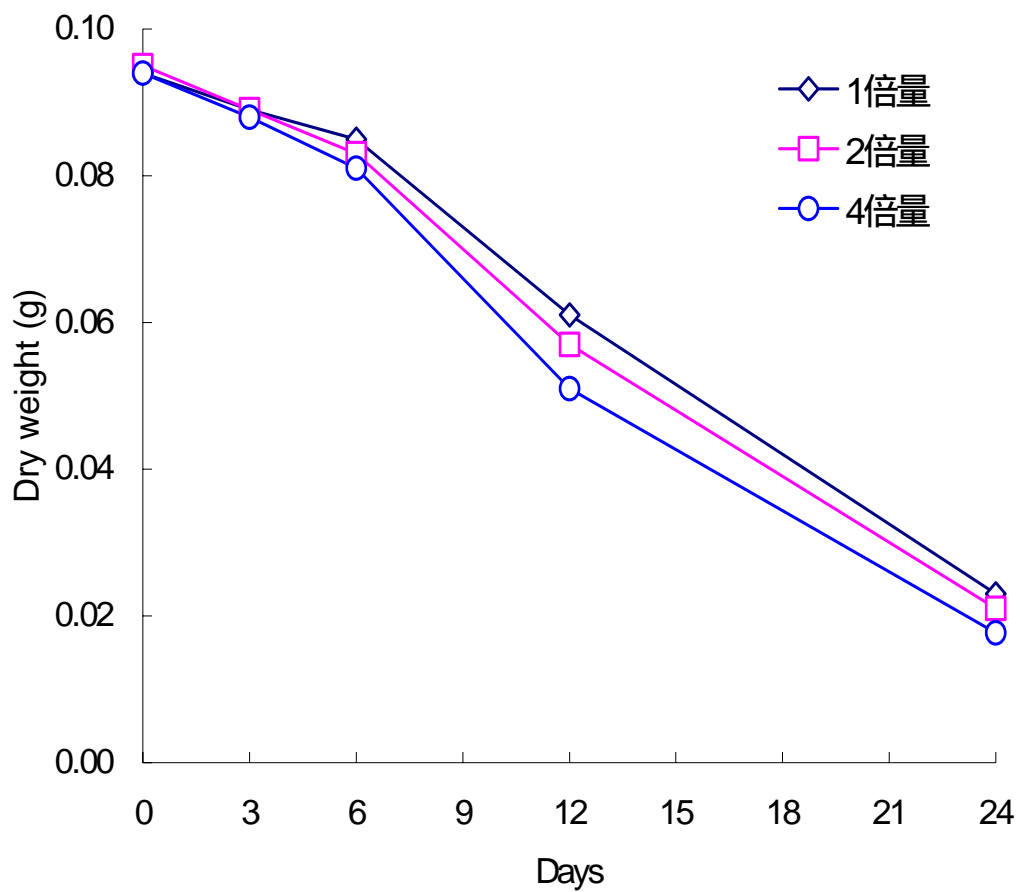
圖二十九、以不同菌量 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉之 pH 值變化

Fig 29. Changes of pH value in culture with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 for different concentrations of starter.



圖三十、以不同菌量 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉之總胺基酸量變化

Fig 30. Changes of total amino acid in culture with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 for different concentrations of starter.



圖三十一、以不同菌量 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 雞毛粉之殘留乾重變化

Fig 31. Changes of dry weight in culture with 1% chicken feather powder that degraded by *B. licheniformis* THSC-1 for different concentrations of starter.

七、個別胺基酸之比較

選取雞毛與豬毛分解試驗中雞毛粉與豬毛粉組之樣品，將其醱酵後之上清液送至成功大學貴重儀器中心，測定第 0、12 及 24 日之個別胺基酸，以得知經 *B. licheniformis* THSC-1 分解過後之個別胺基酸含量，其結果如表五所示。

由表五可以發現雞毛粉與豬毛粉培養基中的 17 種胺基酸及總胺基酸量，皆隨著培養時間延長而增加，尤其雞毛粉中胺基酸量有大幅度的提高。相較於 Williams 等人 (1990) 以 *B. licheniformis* PWD-1 分解雞毛的結果顯示僅 alanine、valine、isoleucine 及 leucine 隨培養時間而增加，更可看出以 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛之效果更佳；而分解豬毛粉時胺基酸持續增加，亦可確定 THSC-1 可以分解豬毛，只是效果較分解雞毛時差。而培養過程中，雞毛粉與豬毛粉中的 cysteine 濃度亦隨時間延長而增加，與 Williams 等人 (1990) 的結果比較發現，其 24 日醱酵期內之 cysteine 濃度均為 0 mM，並無因為雞毛分解菌的作用使 cysteine 濃度上升的趨勢。當角蛋白酶作用時，角蛋白中的雙硫鍵會被打斷形成 cysteine，並造成蛋白質分解成胺基酸 (Williams *et al.*, 1990；Lin *et al.*, 1992)。因此，培養基中 cysteine 濃度的變化亦是評估菌株分解能力的指標。

表五、*B. licheniformis* THSC-1 醱酵 1% 雞毛粉與 1% 豬毛粉之
個別胺基酸之含量

Table 5. Free amino acid concentration in 1% chicken feather
powder and bristle powder fermentation medium
degraded by *B. licheniformis* THSC-1. (m mole/L)

Amino acid	初始濃度		分解第 12 日		分解第 24 日	
	雞毛粉	豬毛粉	雞毛粉	豬毛粉	雞毛粉	豬毛粉
Aspartic acid	47	25	216	220	453	386
Glutamic acid	136	65	713	576	1425	1162
Serine	23	66	487	580	1234	1179
Glycine	42	40	1060	351	3126	673
Histidine	9	4	147	36	238	79
Threonine	39	43	1380	378	4010	733
Alanine	92	23	904	202	2474	346
Proline	9	51	32	450	80	891
Tyrosine	19	12	301	108	584	138
Valine	47	45	724	400	1848	782
Methionine	13	2	178	18	270	40
Half-cystine	6	31	193	274	581	505
Isoleucine	32	15	468	130	1088	187
Leucine	69	29	702	261	1574	475
Phenylalanine	29	9	399	81	799	78
Tryptophan	13	10	46	38	99	81
Lysine	57	13	510	117	1092	158
NH ₄ ⁺	3597	2796	6070	3866	7667	7088
Total amino acid	4294	3288	13983	8106	28543	15011

陸、結論

- 一、在 1% 雞毛粉及豬毛粉培養基中，以不同溫度範圍（20 80 ℃）不同 pH 值（4.5 10.5）以及有氧與厭氧條件下，分別進行 *B. licheniformis* THSC-1 的 6 日培養，以確定最佳分解雞毛與豬毛之條件。結果發現在 50 ℃、pH 值 8.5 及有氧條件下，菌株有最佳分解雞毛與豬毛能力。
- 二、以 1% 雞毛粉培養基進行 *B. licheniformis* THSC-1 培養 6 日，在培養期間分別給予不同方式震盪（125 rpm 持續震盪、每 12 小時震盪 5 分鐘及完全不震盪）。發現菌數增加速度以持續震盪組最佳，完全不震盪組最差；總胺基酸量方面 3 組皆持續上升，雖然增加幅度的差異不大，仍以持續震盪組增加較高。
- 三、將 *B. licheniformis* THSC-1 培養於不同 pH 值之 Nutrient Broth、1% 雞毛粉及 1% 豬毛粉培養基中，由其生長曲線可以發現：pH 值 7.0 時，*B. licheniformis* THSC-1 在 Nutrient Broth 培養至 6 小時，可達到生長最旺盛的狀態。pH 值 8.5 時，則需 8 小時；在雞毛粉與豬毛粉培養基中，不論是 pH 值 7.0 或 8.5，皆在 60 72 小時左右才達到生長高峰。

- 四、以 *B. licheniformis* THSC-1 進行 1% 雞毛粉與完整雞毛之分解，在 50 °C、pH 值 8.5 下培養 24 日。結果發現雞毛經過粉碎後可提升分解的效果，菌數與總胺基酸量皆以雞毛粉組較高。而雞毛粉與完整雞毛之分解率分別為 75.26 % 與 34.9 %。
- 五、以 *B. licheniformis* THSC-1 分解 1% 豬毛與豬毛粉，可以發現總胺基酸量遠低於雞毛與雞毛粉，但分解過程中的菌數及 pH 值卻略高於雞毛與雞毛粉；豬毛與豬毛粉的分解率分別為 5.2 % 與 15.7 %，與雞毛及雞毛粉的分解率有大幅差距。
- 六、由雞毛與豬毛分解時之總胺基酸量變化來看，可以發現一種趨勢：不論是分解豬毛或雞毛，在培養前 12 日之總胺基酸增加幅度要高於 12 至 24 日之增加幅度，顯示 *B. licheniformis* THSC-1 分解雞毛或豬毛時，培養 12 日有較佳之胺基酸累積效果。
- 七、以 *B. licheniformis* THSC-1 培養於雞毛或豬毛培養基 24 日後：其中的雞毛與雞毛粉有明顯減少，培養液的顏色會變深；在豬毛方面，培養液顏色亦會變深，培養基中的豬毛會分解成小段，豬毛粉則看不出明顯減少，淡色則有明顯變淡。

- 八、在分解雞毛或豬毛過程中，培養基的電導度有隨著時間及總胺基酸量增加而增加的趨勢。其中以雞毛粉培養基的電導度最高，完整豬毛的最低。
- 九、以不同菌元量(1 倍 2 倍及 4 倍量)接種 *B. licheniformis* THSC-1 於 1% 雞毛粉培養基中，可發現 4 倍量相較於 2 倍與 1 倍量，其菌數持續維持在較高的狀態，而總胺基酸量及乾重減少量高於其他組。
- 十、整合實驗結果顯示：*B. licheniformis* THSC-1 有分解雞毛與豬毛之能力，以分解雞毛之效果最好，而豬毛的分解效果遠低於雞毛分解效果，經過粉碎處理均可提高分解效果。且以培養 12 日時會有較佳之總胺基酸累積。接種菌元量提高，可以提高分解的效果。



柒、參考文獻

- 石家興。1997。近代生物技術在廢料資源化與環境保護上的應用。
雜糧與畜產 282 : 13-16。
- 高銘木、賴辛堯。1995。雞毛分解菌篩選之研究。中國環境工程
學刊 5 (1): 37-43。
- 高銘木、陳俊哲。1995。通氣、碳源及養分狀態對雞毛生物分解
生產胺基酸品質之影響。第十屆廢棄物處理技術研討會論文
集 : 98-104。
- 張資奇。1999。蛋雞糞堆肥中篩選雞毛分解菌之研究。碩士論文。
- 農委會。2001。90 年台灣農業統計年報 , 畜牧生產 : 144-146。
- Al Musallam, A. A. and S. S. Radwan. 1990. Wool-colonizing
micro-organisms capable of utilizing wool-lipids and fatty acids
as sole sources of carbon and energy. J. Appl. Bacteriol. 69
(6) :806-813.
- Atalo, K. and B. A. Gashe. 1993. Protease production by a
thermophilic Bacillus species (P-001A) which degrades various
kinds of fibrous proteins. Biotech. Lett. 15(11): 1151-1156.
- Boeckle, B., B. Galunsky and R. Mueller. 1995. Characterization of a
Keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM
40530. Appl. Environ. Microbiol. 61 (10) :3705-3710.

- Boeckle, B. and R. Mueller. 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2) :790-792.
- Creighton, T. E. 1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties.* (Second ed.) New York: Freeman.
- Dai, W. K., Z. C. Shih and R. C. Chang. 1995. Synthesizing feather textures in Galliformes. *Computer Graphics Forum* 14, 3(Aug.) :407-420.
- Fraser, R. D. B. and D. A. D. Parry. 1996. The molecular structure of reptilian keratin. *Int. J. Biological Macromolecules.* 19:207-211.
- Friedrich, A. B. and G. Antranikian. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (8) :2875-2882.
- Gillespie, J. M. and R. C. Marshall. 1988. A comment on the composition of normal and trichothiodystrophic human hair. *J. American Academy of Dermatology.* 18: 745-746
- Jacobs, M., M. Eliasson, M. Uhlen and J. I. Flock. 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Research.* 13: 8913-8926.

- Kunert, J. 1973. Keratin decomposition by dermatophytes. I. Sulfite production as a possible way of substrate denaturation. *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie*. 13:489-498.
- Kunert, J. 1972. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. *Experientia*. 28:1025-1026.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox. 1993. The three-dimensional structure of proteins. In: *Principles of Biochemistry*. 2nd ed. Worth Publishers, New York.
- Lin, X., D. W. Kelemen, E. S. Miller and J. C. H. Shih. 1995. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a Keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD - 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4) :1469-1474.
- Lin, X., C. G. Lee, E. S. Casale and J. C. H. Shih. 1992. Purification and characterization of a Keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10) :3271-3275.
- Lin, X., S. L. Wong, E. S. Miller and J. C. H. Shih. 1997. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD - 1 Keratinase gene in *B. subtilis*. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 19 (2) :134-138.

- Marshall, R. C., D. F. Orwin and J. M. Gillespie. 1991. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microscopy Reviews*. 4: 47-83.
- Moore, S. 1968. Amino acid analysis: Aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.* 243, 6281-6283.
- Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam and S. Al-Zarban. 1998. A Review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology* 66: 1-11.
- Papadopoulos, M. C. 1986. The effect of enzymatic treatment on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16:151-156.
- Rajak, R. C., H. K. Malviya, H. Deshpande and S. K. Hasija. 1992. Keratinolysis by *Absidiacylindrospora* and *Rhizomucor pusillus*: biochemical proof. *Mycopathologia*. 118:109-114.
- Rice, R. H., V. J. Wong and K. E. Pinkerton. 1994. Ultrastructural visualization of cross-linked protein features in epidermal appendages. *J. Cell Sci.* 107 : 1985-1992.

- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 10-15.
- Stahl, M. L. and E. Ferrari. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an in vitro-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* Vol.158 (2): 411-418.
- Shih, J. C. H. 1987. Ecological benefits of anaerobic digestion. *Poul. Sci.* 66: 946-950.
- Shih, J. C. H. 1993. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization-a review. *Poul. Sci.* 72: 1617-1620.
- Takami, H., T. Akiba and K. Horikoshi. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2): 120-124.
- Takami, H., T. Akiba and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 (5): 519-523.
- Takami, H., 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. Biotechnol. Biochem.* 56 (10): 1667-1669.
- Vasanthan, N., L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle and

- Filpula. 1984. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyliliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol.* 159 (3): 811-819.
- Wang, J. J. and J. C. H. Shih. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 22: 608-616.
- Williams, C. M. and J. C. H. Shih. 1989. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.* 67(1): 25-35.
- 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 (6) :1509-1515.
- Williams, C. M., C. G. Lee, J. D. Garlich and J. C. H. Shih. 1991. Evaluation of a bacterial feather product, feather-lysate, as a feed protein. *Poul. Sci.* 70: 85-94.

捌、英文摘要

The Studies for the degradation of chicken feather and bristle
with *Bacillus licheniformis* THSC-1

Ming-Kuo Hsieh.
Graduate Institute of Animal Science
Tunghai University

ABSTRACT

The chicken feathers are the wastes when chickens were slaughtered. Due to lots of keratin stably exist in the structure of feathers, the microbe can not decompose the feather efficiently. *Bacillus licheniformis* THSC-1 is screened from excrement of chickens. This bacterium can live above 65 and it also can decompose keratin. The aims of this study were to examine the best condition for *B. licheniformis* THSC-1 to survive and to compare the efficiency of decomposition for chicken feathers and bristles.

The results indicated that *B. licheniformis* THSC-1 presented the best performance of decompositions at 50 , pH 8.5 when oxygen existed. The culture approached the best

growth condition in nutrient broth within 6-8 hours. However, *B. licheniformis* THSC-1 took 60 to 72 hours to decompose chicken feathers. No matter the degradation of chicken feathers or chicken feather powder, the total amount of amino acid was increased. The rate of chicken feathers degradation was 34.9% and the powder was 75.26%. The rate of degradation could be raised when the feathers were milled. The degradation rate of bristles was lower than chicken feathers in the culture of *B. licheniformis* THSC-1. The total amount of amino acid was increased. The degradation rate of bristle powders was 15.7% and the whole bristle was only 5.2%. The different amounts of starters were inoculated to chicken feather cultures for 4 times of total count. The results indicated the total amount of amino acid and the decreased amount of dry matter were better than 1 or 2 times. No matter chicken feathers or bristle, it presented a sharp decomposed curve for the total amount of amino acid in the 12th day. After that, the curve become smooth.