

角蛋白分解酵素應用於非反芻動物飼料之研究

撰文/陳明汝·鍾之儀·黃如婕

前言

羽毛和豬毛是台灣兩項的大宗畜牧廢棄物，皆由不可溶的結構性蛋白質－角蛋白質 (keratin) 所構成，由於含有高量的雙硫鍵和疏水性及氫鍵鍵結，而不易被一般蛋白質水解酵素進行分解。研究多以羽毛的水解菌株及酵素和其營養價值變化作探討，少部分針對豬毛的水解進行試驗。目前，台灣的豬毛處理上，僅有小部分作為飼料原料或豬毛製品，大部分仍以焚燒方式處理，除了造成嚴重的環境污染外，又耗費了大量金錢和能源成本。若直接利用羽毛篩選出的菌株進行豬毛的水解，皆效果不彰。

水解這類角蛋白質廢棄物的酵素，稱為角蛋白酶 (keratinase)，多由家禽廢棄物或是土壤中篩選菌株後進行生產。由於菌株本身的差異，所生產的角蛋白酶特性也不相同，一般而言，最佳活性表現的 pH 值範圍介於中性到鹼性，多屬於鹼性蛋白酶。分子量為 18-200 kDa 的單體蛋白質。可水解許多種物質，包括可溶性蛋白質，如酪蛋白、明膠、牛血清蛋白和不可溶性蛋白質，如羽毛、毛髮、膠原蛋白和牛角等。大多屬於絲胺酸型蛋白酶 (serine protease) 和金屬型蛋白酶 (metalloprotease)。角蛋白酶之作用機制除了一般蛋白質的水解作用外，還包括雙硫鍵的水解。為符合工業應用的需求，許多研究針對微生物作酵素生產的最適化、基因重組工程以及固定化酵素等方式來增加產量和降低成本，未來可望將角

蛋白酶應用於動物飼糧、皮革工業、肥料、清潔劑和製藥產業等。

因此本文將介紹近年來與角蛋白生產及評估角蛋白與角蛋白酶應用於動物飼糧之潛力的最新研究，並將近幾年來本研究團隊於豬毛角蛋白酶開發之進展進行分享。

角蛋白酶的生產

(一) 分泌角蛋白酶之微生物

在自然界中，並沒有角蛋白的累積，其原因是許多種類的微生物，如細菌、真菌及放線菌 (actinomycetes) 會分泌外源性角蛋白酶，以分解角蛋白作為碳及氮的營養來源。

細菌是目前會分泌角蛋白酶的微生物中，最廣為研究的一類，依照革蘭氏染色分類，會分泌角蛋白酶的革蘭氏陽性菌有 *Bacillus*、*Lysobacter*、*Kocuria*、*Arthrobacter*、*Microbacterium* 和 *Nesterionkia* 等；而革蘭氏陰性菌則包括 *Vibrio*、*Xanthomonas* 和 *Chryseobacterium* 等 (Lucas *et al.*, 2003; Thys *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2006; Gupta and Ramnani, 2006; Brandelli, 2008)。目前最廣為研究的為 *Bacillus*，如 *B. licheniformis*、*B. subtilis*、*B. pumilus* 及 *B. cereus* 等 (Lin *et al.*, 1999; Ramnani and Gupta, 2004; Macedo *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2008) 皆具有產生角蛋白酶的能力。

部分嗜熱性 (thermophile) 或嗜鹼性 (alkaliphile) 細菌，如 *B. halodurans*、*B. pseudofirmus*、*Fervidobacterium*、*Thermoanaerobacter* 及 *Besternokia* 等 (Takami *et al.*, 1992; Nam *et al.*, 2002; Gessesse *et al.*, 2003; Ramnani and Gupta, 2004) 也被研究出具有水解角蛋白的能力。

放線菌的部分以 *Streptomyces* 為最大宗，並且為最早被發現具有分解角蛋白能力的微生物。部分的角蛋白分解菌 *Streptomyces* 為嗜熱性，在 50 °C 時可生長並且水解羽毛 (Mohamedin, 1999)；但也有部分角蛋白分解菌為嗜溫性 (mesophilie)，如 *S. pactum* 和 *S. albidoflavus* (Böckle *et al.*, 1995; Bressolier *et al.*, 1999)。

人類及動物的皮膚疾病，如甲癬症，是由於真菌及黴菌入侵皮膚所造成，許多研究從皮膚疾病當中，分離出會分泌角蛋白酶的真菌類，如 *Microsporum*、*Trychophyton* 和 *Doratomyces microsprum* 等，此類角蛋白酶的特性具有成為醫藥的價值；而其他研究發現能夠產生角蛋白酶的真菌還包括 *Aspergillus*、*Alternaria*、*Trichurus*、*Curvularia*、*Cladosporium*、*Fusarium*、*Geomyces*、*Gleomastis*、*Monodictys*、*Myrothecium*、*Paecilomyces*、*Stachybotrys*、*Urocladium*、*Scopulariopsis*、*Sepedonium*、*Penicillium* 等 (Gupta and Ramnani, 2006; Brandelli, 2008)。

由於產生角蛋白酶的微生物從菌屬、菌種及品系到微生物本身皆具不同的特性，未來若能更深入研究，了解各個微生物的作用機制及最適發展的條件，便能將其微生物角蛋白酶運用在更廣泛的產業上。

(二) 微生物角蛋白酶之生產

酵素在全球工業應用上每年有十億美元的產值，其中蛋白酶占了 60% 左右 (Rao *et al.*, 1998)；未來，角蛋白酶若要應用於各種產業，就必須先找出增進其產量的方法，目前已有下列三種研究方向：

1. 微生物發酵

許多研究已篩選出能夠產生角蛋白酶的真菌及細菌，但這些微生物必須生長在含有角蛋白基質的營養來源，以誘導產生角蛋白酶。大部分能夠利用角蛋白的微生物，都具有以角蛋白做為碳源及氮源的能力 (Gupta and Ramnani, 2006)。能夠誘導角蛋白酶生產的角蛋白原料範圍很廣泛，從羽毛、羽毛粉、羊毛、角、指甲、角質層到毛髮等 (表一)，但也有研究指出某些真菌可使用大豆粉產生角蛋白酶 (Gradišar *et al.*, 2000)。

角蛋白酶的產生因微生物種類的不同，而需要不同的營養。部分研究指出，培養基中額外添加氮源或胺基酸，如蛋白脛和穀胱甘肽 (glutathione)，可增加角蛋白酶的生產量 (Ramnani and Gupta, 2004)，但也有研究發現氮源的添加具有負向影響 (Son *et al.*, 2008)，或是加入酪蛋白或胺基酸等易於利用的氮源，則反而降低角蛋白酶之活性表現。碳源的添加亦同，目前大部分的研究指出簡單的醣類如葡萄糖，會抑制角蛋白酶的合成，因為會造成碳水化合物代謝抑制效應 (catabolic repression)，菌株僅利用碳水化合物進行菌體生長，而使角蛋白酶的合成降低；但最近也有研究發現某些 *Bacillus* 的培養基中添加葡萄糖，會增加角蛋白酶的生產 (Ramnani and Gupta, 2004; Son *et al.*, 2008)。

加入界面活性劑，如 Tween 20、Tween 80 或 Triton X-100 等於培養液，可以刺激菌體生長及提高角蛋白酶產出量；而變性劑的添加，由於會與細胞壁和細胞膜作用，除了增加細胞內外某些蛋白質的滲透性，而提高細胞膜上蛋白酶的作用活性；亦有可能破壞菌體細胞膜或影響菌株生長，反而降低其活性表現 (Brandelli and Riffel, 2005; Sumantha *et al.*, 2006)。

許多研究會在培養基中添加氯化鈉、磷酸鉀及磷酸二氫鉀等離子，提供微生物生長使用 (Riffel and Brandelli, 2002; Ramnani and Gupta, 2004; Tatineni *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2008)，但氯化鈣的添加會降低角蛋白酶的生成 (Ramnani and Gupta,

2004)；而添加氯化銨雖然可增加菌量，但會抑制角蛋白酶的生產 (Son *et al.*, 2008)；含水硫酸鎂的添加可增加角蛋白酶的生成 (Son *et al.*, 2008)。

2. 基因工程

DNA 重組技術已大量應用於微生物中進行特定蛋白質的生產，角蛋白酶基因序列的分析和複製亦是增進產量達到商業化的途徑之一。目前，*B. licheniformis* PWD1 *ker A* (Lin *et al.*, 1995)、*B. licheniformis* RG1 (Accession No. AY590140) 和 *S.*

fradiae var. k11 (Li *et al.*, 2007) 等角蛋白酶基因已被確認，其中以 *B. licheniformis* PWD1 *ker A* 的研究最多。

Lin *et al.* (1995) 利用 PCR walking 及 PCR screening 兩種方法確認角蛋白酶基因 *ker A* 序列，並由北方吸漬分析 (northern blot analysis) 發現只有在角蛋白基質 (羽毛) 存在時，該基因才有表現。而為了使角蛋白酶大量生產，分別以大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及枯草桿菌 (*B. subtilis*) 兩種細菌

表一 部分重要的細菌角蛋白酶之來源、生產條件及相關特性

微生物種類	來源	最適pH值	最適溫度 (°C)	攪拌速度 (rpm)	培養時間		受質	文獻
					角蛋白完全水解/角蛋白酶作用	角蛋白酶生產最適時間		
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD1	家禽廢棄物之分解	7.5	50	120	10 天	30 h	羽毛	Williams <i>et al.</i> , 1990; Lin <i>et al.</i> , 1992
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	溫泉	6.3	70	靜止	48 h	-	羽毛	Friedrich and Antranikian, 1996
<i>Kocuria rosea</i> LBP-3	土壤	7.5	40	75	55%, 96 h	36 h	羽毛	Vidal <i>et al.</i> , 2000; Bernal <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus subtilis</i> KS1	家禽廢棄物	5-9	40	200	72 h	84 h	羽毛	Kim <i>et al.</i> , 2001; Suh and Lee, 2001
<i>Bacillus</i> sp. FK 28	土壤	7.5	37	150	-	3 天	羽毛及羽毛粉	Pissuwan and Suntomsuk, 2001
<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i> sp. nov.	地熱溫泉	6.8	70	靜止	10 天水解量為 70%	96 h	羽毛及羊毛	Rissen and Antranikian, 2001
<i>Bacillus licheniformis</i> K-508	腐爛的羽毛	7	45	180	4 天	-	羽毛	Roz <i>et al.</i> , 2001; Manczinger <i>et al.</i> , 2003
<i>Xanthomonas maltophila</i> POA-1	家禽廢棄物	7	30	200	-	72 h	羽毛粉	De Toni <i>et al.</i> , 2002
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	地熱溫泉	7	70	靜止	48 h	48 h	羽毛	Nam <i>et al.</i> , 2002
<i>Stenotrophomonas</i> sp. D1.	土壤與鹿毛	7	20	130	2.5 天	4 天	角蛋白粉(人類毛髮角蛋白)及羽毛	Yamamura <i>et al.</i> , 2002a
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	家禽廢棄物	8	25-30	180	72 h	48 h	羽毛	Riffel <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus</i> sp. FK 46	土壤	9	37	250	5天水解量為 85%	5 天	羽毛	Suntomsuk and Suntomsuk, 2003
<i>Bacillus licheniformis</i> RG1	堆肥	7	37	250	24 h	72 h	羽毛	Ramnani and Gupta, 2004
<i>Microbacterium arborescens</i> kr 10	家禽廢棄物	7	30	180	72 h	36 h	羽毛	Thys <i>et al.</i> , 2004

宿主表現系統，研究發現前者由於易形成細胞內的包涵體 (inclusion body)，後續回收必須進行破菌及蛋白質再折疊 (refolding)，具實行上的複雜性；相對地，*B. subtilis* 將角蛋白酶外泌於培養液中，可直接進行應用。然而，培養過程菌體分裂不穩定，亦為待解決的問題之一 (Lin *et al.*, 1995, 1997; Wang and Shih, 1999; Wang *et al.*, 2003)。Porres *et al.* (2002) 利用酵母菌 *Pichia pastoris* 作宿主，由於真菌具有醣基化修飾的能力，造成產出的角蛋白酶分子量較大，但同時也使活性表現及產量提高，相較於其他兩個系統，*Pichia pastoris* 產出效率較高，後續若進一步針對培養條件作最適化將可大幅提升產量。

另外，也可利用增加序列重覆數目使角蛋白酶產量提高，和將序列架接入宿主染色體以增進穩定度 (Wang *et al.*, 2004)，或是探討角蛋白酶的完整序列，和成熟蛋白質序列表現活性的相關研究 (Lin *et al.*, 1997)。目前，還有許多角蛋白酶尚未完成定序，但就已知的角蛋白酶序列可發現與枯草桿菌蛋白酶具有極高的相似度。

3. 固定化

酵素和微生物都屬於生物觸媒 (biocatalysts) 的一種，扮演著生化反應的觸媒角色，由於微生物在應用上必須符合一般認為安全 (generally regarded as safe, GRAS) 標準，又生長過程容易受到污染，因此多利用酵素進行固定化。固定化酵素主要分為：(1) 物理吸附法；(2) 離子鍵結法；(3) 共價鍵結法；(4) 包埋法 (Farg and Hassan, 2004)。其中，物理吸附法由於花費較低且容易實行，因此最常被應用。固定化後的酵素不僅可減低自我降解情形 (autolysis)，又容易自產物中移除。Lin *et al.* (1996) 將角蛋白酶固定於孔徑一致的玻璃珠 (controlled-pore glass beads)，發現其熱穩定度及 pH 耐受性皆有提升，活性亦能維持較久；然而，受質與酵素間吸附性不佳導致產率較低 (43-63%)。為了提高產率、簡化角蛋白酶純化的繁複過程和克服適當固定化基質選擇上的不易，Wang *et al.* (2003) 利用基因工程將已知

與生物素 (biotin) 具高親和性的蛋白質序列卵白素 (streptavidin) 架接入含有 *ker A* 序列的載體，分別表現於 *E. coli* 及 *B. subtilis* 兩個系統，研究證實與生物素直接進行固定化後，其熱穩定度顯著提高，然而在產量上仍僅有 24-28%。因此，在角蛋白酶的固定化及應用上，未來仍有相當大的進步空間。

評估角蛋白與角蛋白酶應用於動物飼糧之潛力

(一) 角蛋白水解後之營養價值

富含角蛋白之廢棄物，如羽毛、豬毛作為動物飼糧，是豐富的蛋白質及胺基酸營養來源，羽毛粉的粗蛋白含量約為 84%，而豬毛的粗蛋白含量約有 87% (Wang and Parsons, 1997)。但角蛋白使用的限制由於低消化率及低生物價值，並且缺乏甲硫胺酸 (methionine)、離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 及色胺酸 (tryptophan) 等必需胺基酸 (Baker *et al.*, 1981)。近年，工業上多利用高溫高壓方式處理羽毛粉，不僅耗費能源，又由於缺乏 methionine、lysine、histidine 和 tryptophan 等，營養價值也不高。為使羽毛粉的可消化胺基酸增加，研究學者使用各種加工方法，根據 Papadopoulus (1989)、Latshaw *et al.* (1994) 及 Wang and Parsons (1997) 等人研究，水浴加熱法可有限地增加營養成分，但會損失如 lysine、methionine 和 tryptophan 等必需胺基酸，並導致離胺丙胺酸 (lysinoalanine) 和羊毛硫胺酸 (lanthionine) 等非必需胺基酸含量的增加。然而也有研究指出，肉雞隨著年齡增加，對於 methionine、lysine 及 histidine 的需求量降低，對非必需胺基酸的比例增加 (Stilborn *et al.*, 1997)，羽毛粉中的非必需胺基酸成分，也可對雞隻帶來營養。許多研究針對加工方式進行探討，發現羽毛粉的組成分和消化率容易受加工方式的差異而改變，但皆不能有效提高其品質，Wang and Parsons (1997) 改變羽毛粉製程中的加工處理系統以及水解溫度和時間，產製出六種不同的羽毛粉處理組，分別分析

其蛋白質及胺基酸品質。由胺基酸真正消化率 (true amino acid digestibility) 和蛋白質效率比 (protein efficiency ratio, PER) 之結果可知，不同的加工處理系統對於蛋白質及胺基酸品質影響較大；而水解溫度和時間兩因子對於蛋白質及胺基酸品質則無一致的相關性。真代謝熱能 (true metabolizable energy, TME_n) 的結果，同樣也在各處理組間具有顯著差異，主要與 lysine 和胱胺酸 (cystine) 兩種胺基酸的比例有關。若將處理完成的水解液利用噴乾技術製成粉末，可發現水解液的胺基酸真正消化率較羽毛粉好，表示水解液可提供較佳的利用性。目前，利用高溫高壓的方式破壞羽毛中角蛋白質的結構，雖然可提高約 70-80 % 的消化率；但可能由於丙胺酸 (alanine) 和 lanthionine 等胺基酸的產生，造成營養的不平衡；因此，在飼料應用上仍需額外添加飼料等級的 lysine 或其它微量的必需胺基酸 (Bertsch and Coello, 2005)。由於利用高壓蒸煮或是化學方式產製的羽毛粉，使用鹼液或加熱處理角蛋白，容易破壞含硫胺基酸 (Steiner *et al.*, 1983)，不但耗費能源且部分胺基酸易被破壞，造成營養使用上受限。

Grazziotin *et al.* (2006) 將羽毛經角蛋白酶水解，再經由 6 M HCl 在 110 °C 水解 24 小時後，進行必需胺基酸含量的分析，發現羽毛水解物含有較高量的絲胺酸 (serine)、麩胺酸 (glutamate)、白胺酸 (leucine) 及精胺酸 (arginine)，但 methionine、lysine 及 histidine 的含量較為缺乏。而羽毛水解後，大部分的必需胺基酸含量皆大於未水解的羽毛，而 tryptophan 的含量則不受角蛋白水解處理的影響。將羽毛水解物進行豬隻腸胃道體外消化試驗的結果顯示，羽毛水解物的消化率與大豆蛋白及酪蛋白相近，並且高於未水解之羽毛粉近兩倍，其原因是角蛋白酶具有切斷雙硫鍵之功能，使羽毛水解物更容易被胃蛋白酶及胰酵素所消化 (Sangali and Brandelli, 2000)。而水解後羽毛的預期蛋白質效率比、預期生物價 (predicted biological value, predicted BV) 和蛋白質經消化修正的胺基酸評分值

(protein digestibility-corrected amino acid scoring, PDCAAS) 皆較高溫高壓產生之羽毛粉高 (Grazziotin *et al.*, 2006)。相較於大豆粕的價格，羽毛粉低廉且又含有較高量的 cysteine、纈草酸 (valerian acid) 和蘇胺酸 (threonine)，可取代約 7 % 的大豆粕為主的飼料 (Apple *et al.*, 2003)。若將羽毛粉與生產角蛋白酶的菌株共同發酵，除了可以增加必需胺基酸含量外 (methionine、lysine 和 histidine)，同時菌體也是另一種蛋白質的來源。

(二) 應用角蛋白酶於動物飼糧

商業使用的家禽飼糧皆是以較低成本的原料所組成，或是包含多種不同的蛋白質原料，以符合生物所需的胺基酸含量。蛋白質原料中，以動物副產物為多，但飼糧中的蛋白質並不能完全被家禽消化道所利用，因此多於飼糧中添加蛋白酶以增加胺基酸的利用 (Wang *et al.*, 2006)。

家禽於幼年時期，需要較高比例的蛋白質以提供生長所需，幼雛的腸道發育尚未完全，但是如果腸道內具有幫助消化的酵素，可增加幼雛的生長速度 (Uni *et al.*, 1998)。大豆粕含有高量蛋白質 (CP 48 %)，並且為可消化率高的飼糧原料，而玉米雖然蛋白質含量較低 (CP 8.5 - 8.8 %)，但在飼糧中占有高比例，因此玉米也是飼糧中的主要蛋白質來源。雖然傳統的玉米大豆粕飼糧被認為具有高可消化性，但可能包含多種較複雜的蛋白質，不容易被幼雛消化。早在 1980 年代，酵素於飼料的應用就受到學術及商業上的注意，提供大量的蛋白酶、 α -澱粉水解酵素 (α -amylases) 和 β -葡萄糖聚糖酶 (β -glucanases) 於飼料中，除了對動物生長有正面的效果，也增加其營養利用性及家禽腸道健康，可幫助幼雛腸道的消化率 (Uni *et al.*, 1999)，以期改善其生長表現。

Greenwood *et al.* (2002) 於肉雞的玉米大豆粕飼糧中添加混合的蛋白酶、木聚糖酶及澱粉酶，可增加 14-42 日齡的體增重，但對於飼料換肉率沒有顯著影響。由於過去的研究指出，角蛋白酶具有水解

多種蛋白質，如角蛋白、酪蛋白、膠原蛋白和彈力蛋白等的能力。添加 0.1 % (wt/wt) 角蛋白酶於 0-20 日齡的雞飼料中，可增加其 21、35 及 42 日齡的體重和飼料換肉率表現 (Odetallah *et al.*, 2003, 2005)。從 *Bacillus licheniformis* PWD-1 所分離純化出的角蛋白酶 Versazyme (VZ)，添加 0.1 % 於肉雞飼糧中，不管是在體增重或飼料換肉率上，添加角蛋白酶的組別明顯優於未添加角蛋白酶的組別；若降低飼糧的蛋白質比例，添加角蛋白酶的組別，其體增重與飼料換肉率的表現與正常蛋白質飼糧無顯著差異，顯示角蛋白酶能夠幫助雞隻有效率地使用飼糧中的蛋白質 (Odetallah *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006)，也能幫助增加雞隻的屠體重 (Wang *et al.*, 2006)。以雞隻較難使用的蛋白質原料棉籽粕，取代飼糧中的主要蛋白質原料大豆粕，角蛋白酶添加於棉籽粕的組別，其體增重與飼料換肉率表現甚至近於大豆粕銀飼組別 (Wang *et al.*, 2008)。

小腸絨毛的高度、寬度、絨毛面積為腸道吸收能力的指標之一，絨毛的長度、面積越大，吸收營養物質的面積也越大。腺窩的幹細胞不斷地分化取代老舊的上皮細胞，腺窩的深度及有絲分裂增加，代表組織快速更新。添加角蛋白酶於飼糧的組別，雞隻的小腸絨毛長度與腺窩深度之比例皆優於未添加角蛋白酶的組別，顯示角蛋白酶具有促進小腸吸收的效果 (Wang *et al.*, 2008)。

分解豬毛角蛋白酶之開發與應用之研究

我們研究室從豬毛上篩選到一株具高角蛋白酶及蛋白質水解能力之菌株，以變性梯度膠體電泳法及定序確認菌株為 *Bacillus cereus* H10。以離子交換管柱及快速蛋白質液相層析系統純化得到一種蛋白酶及角蛋白酶，兩種酵素合起來我們稱此酵素為 H10 酵素，接著以膠體過濾法確認分子量分別約為 50.0 及 44.8 kDa，再進一步利用液相層析儀配合串聯質譜儀確認蛋白酶為白胺酸脫氫酶 (leucine dehydrogenase)，而角蛋白酶沒有比對到相似的片

表二 蛋白質序列與NCBI之已將重複的序列剔除的序列資料庫(non-redundant protein sequence database)跨數據資料庫(NCBI Entrez cross-database)比對結果

蛋白酶	比對之蛋白質	胺基酸序列	NCBI序號
酵素 50 kDa	Leucine dehydrogenase [<i>Bacillus cereus</i> E33L]	AI IAIHDTTLGP ALGGTR	YP 085497.1
		NAAAGLNLGG	
		AKTVIIGDPR	
		EAFGT DNLEGK	
		LIVTDINKEA VQR	
		VIAG SANNQLKENR	
		RVESIYDTIA	
酵素 44 kDa	Chitinase A	KVIEISKRDG	BAB16890.1
		IATYVAADR	
		NGH DIISR	

段，很可能是新的蛋白酶 (表二)。

由於角蛋白酶的活性在 50-90°C 及 pH 5.0 表現良好活性，蛋白酶的活性則在 50°C 及 pH 6.0-8.0 有最佳的活性表現，為了使蛋白酶及角蛋白酶同時有最佳的活性表現，利用反應曲面法及序列二次規劃法尋求最佳 H10 酵素活性表現，當 pH 7.57 及 59°C 時可得到最高的蛋白酶活性 (29,080 U/mg) 及角蛋白酶活性 (6,391.25 U/mg)。耐熱性測試中，蛋白質的水解活性在三種溫度作用 120 分鐘，仍可維持 30-40% 活性，而角蛋白酶的水解活性不論在 59、70 或 80°C 作用 120 分鐘皆可維持 95% 活性。H10 酵素中的角蛋白酶為耐熱蛋白質，可增加其商業利用性。

接著為大量生產 H10 酵素，利用反應曲面法探討 *B. cereus* H10 發酵培養基的最佳比例，並且進行大量發酵及 H10 酵素粉之製作 (圖一)。H10 酵素液經過噴乾後，酵素活性幾乎沒有明顯改變。將 H10 酵素粉，分別放置於 37、25、4、-20、-80°C 的環境下，經過 180 天保存後，蛋白酶及角蛋白酶分解活性皆無明顯之下降趨勢。

比較不同來源蛋白質之水解時，以豬毛粉水解效果最佳 (70%)，與大豆粕水解情形相似，豬毛及羽毛粉較差 (30%)。與蛋白酶 K (protease K) 相比，*B. cereus* H10 生產酵素的水解效果亦高出約兩倍左右。就其水解產物之胺基酸組成作探討，H10 酵素

處理組皆顯著高於未添加酵素處理組。若利用必需胺基酸計算其化學積分，以酪胺酸 (tyrosine) 和苯基丙胺酸 (phenylalanine) 為第一限制胺基酸，離胺酸是第二限制胺基酸，異白胺酸 (isoleucine) 是第三限制胺基酸。當考量豬隻及家禽之理想蛋白質組成，幾乎所有必需胺基酸皆可符合需求，因此，未來若要供飼糧應用，可搭配較高量離胺酸的飼糧，供作動物生長。在體外 (*in vitro*) 試驗中，豬毛粉添加 2% 的 H10 酵素粉或與粗萃 H10 酵素液，培養經 5 日後，其可消化蛋白質含量及 *in vitro* 蛋白質消化率顯著高於未經酵素處理的豬毛粉。若分析豬毛及豬毛粉的水解液成分，豬毛經 H10 酵素水解後，其胺基酸含量皆高於未經酵素處理的豬毛；豬毛粉經 H10 酵素水解後，部分胺基酸的含量高於未經酵素處理的豬毛粉。

最後由褐藻酸鈉及氯化鈣固定化之 *B. cereus* H10 生產酵素，蛋白質的水解活性在 59°C 下有提高的情形，70°C 無明顯改變，80°C 作用 120 分鐘則有降低的情況；角蛋白質的水解活性在三種溫度無差異。將固定化酵素重複試驗六次後，蛋白質的水解活性仍可維持 40-60%，而角蛋白質的水解活性則可維持 80%。



圖一 H10 角蛋白酵素

結語

從微生物中純化角蛋白分解酵素的研究非常多，但多針對分解 β 角蛋白結構的羽毛，鮮少針對分解 α 角蛋白結構的豬毛做研究。豬毛角蛋白酵素的開發，可增加角蛋白酵素的利用性，未來期能：(1) 應用於動物飼糧增加動物之生長表現。(2) 豬毛廢棄物的水解，取代目前以焚燒處理可能造成之環境污染及能源耗費，同時亦增進豬毛粉營養價值。(3) 分離毛髮使得皮革製程中可減少化學藥品之用量。

AgBIO

陳明汝	國立臺灣大學	動物科學技術學系	教授
鍾之儀	國立臺灣大學	動物科學技術學系	研究生
黃如婕	國立臺灣大學	動物科學技術學系	研究生

參考文獻

1. Baker, D. H., Blitenthal, R. C., Boebel, K. P., Czarnecki, G. L., Southern, L. L., and Willis, G. M. (1981) *Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal*. Poultry Sci. 60: 1865-1872.
2. Bernal, C., Cairó, J. and Coello, N. (2006) *Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from Kocuria rosea*. Enzyme Microb. Technol. 38: 49-54.
3. Bertsch, A., and Coello, N. (2005) *A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient*. Bioresour. Technol. 96: 1703-1780.
4. Bückle, B., Galunski, B. and Müller, R. (1995) *Characterization of a keratinolytic serine protease from Streptomyces pactum DSM 40530*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3705-3710.
5. Brandelli, A. (2008) *Bacterial keratinases: Useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond*. Food. Bioprocess. Technol. 1: 105-116.
6. Brandelli, A., and Riffel, A. (2005) *Production of an extracellular keratinase from Chryseobacterium sp. growing on raw feathers*. J. Biotechnol. 8: 35-42.

參考文獻

7. Bressolier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. and Verneuil, B. (1999) *Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces albidoflavus*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2570 - 2576.
8. Farag, A. M., and Hassan, M. A. (2004) *Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae*. Enzyme Microb. Technol. 34: 85-93.
9. Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A. and Mattiasson, B. (2003) *Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather*. Enzyme Microb. Biotechnol. 32: 519-524.
10. Gradišar, H., Kern, S. and Friedrich, J. (2000) *Keratinase of Doratomyces microsporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 196-200.
11. Graziotin, A., Pimetel, F. A., de Jong, E. V. and Brandelli, A. (2006) *Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase*. Anim. Feed. Sci. Technol. 126: 135-144.
12. Greenwood, M. W., Fitts, C. A. and Waldroup, P. W. (2002) *Utilization of avizyme 1502 in corn-soybean meal diets with and without antibiotics*. Poult. Sci. 81: 25
13. Gupta, R. and Ramnani, P. (2006) *Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*. Appl. Microbio. Biotechnol. 70: 21-33.
14. Gupta, R. and Ramnani, P. (2006) *Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*. Appl. Microbio. Biotechnol. 70: 21-33.
15. Latshaw, J. D., Musharf, N. and Retrum, R. (1994) *Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry*. Anim. Feed Sci. Technol. 47: 179-188.
16. Li, J., Shi, P. J., Han, X. Y., Meng, K., Yang, P. L., Wang, Y. R., Luo, H. Y., Wu, N. F., Yao, B. and Fan. Y. L. (2007) *Functional expression of the keratinolytic serine protease gene sfp2 from Streptomyces fradiae var. k11 in Pichia pastoris*. Protein Expres. Purif. 54: 79-86.
17. Lin, X., Inglis, G. D., Yanke, J. L. and Cheng, J. K. (1999) *Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost*. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 23: 149-153.
18. Lin, X., Kelemen, D. W., Miller, E. S. and Shih, J. C. H. (1995) *Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of Bacillus licheniformis PWD-1*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1469-1474.
19. Lin, X., Shih, J. C. H. and Swaisgood, H. E. (1996) *Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4273-4275.
20. Lin, X., Wong, S. L., Miller, E. S. and Shih, J. C. H. (1997) *Expression of the Bacillus licheniformis PWD-1 keratinase gene in B. subtilis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19: 134-138.
21. Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I. and Heeb, P. (2003) *High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil*. Micob. Ecol. 45: 282-290.
22. Macedo, A. J., da Silva, W. O. B., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J. A. P. and Termignoni, C. (2005) *Novel keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 594-596.
23. Mohamedin, A. H. (1999) *Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic Streptomyces strain grown on chicken feather as substrate*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 1-2: 13-21.
24. Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. J. and Choe, E. A. (2002) *Native feather degradation by Fervidobacterium islandicum AW-1, a newly isolation keratinase-producing thermophilic anaerobe*. Arch. Microbiol. 178: 538-547.
25. Odetallah, N. H., Wang, J. J., Garlich, J. D. and Shih, J. C. H. (2003) *Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks*. Poult. Sci. 82: 664-670.
26. Odetallah, N. H., Wang, J. J., Garlich, J. D. and Shih, J. C. H. 2005. *Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance*. Poult. Sci. 84: 858-864.
27. Papadopoulos, M. C. (1989) *Effect of processing on high protein feedstuffs: A review*. Biol. Wastes. 29: 123-138.

參考文獻

28. Porres, J. M., Benito, M. J. and Lei, X. G. (2002) *Functional expression of keartinase (kerA) gene from Bacillus licheniformis in Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. 24: 631-636.
29. Ramnani, R. and Gupta, R. (2004) *Optimization of medium composition for keratinase production on feather by Bacillus licheniformis RG1 using statistical methods involving response surface methodology*. Biotechnol. Appl. Biochem. 40: 191-196.
30. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998) *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635.
31. Riffel, A. and Brandelli, A. (2002) *Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry*. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 29: 255-258.
32. Sangali, S. and Brandelli, A. (2000) *Feather keratin hydrolysis by a Vibrio sp. strain kr2*. J. Appl. Microbiol. 89: 735-743.
33. Son, H. J., Park, H. C. and Kim, H. S. (2008) *Nutritional regulation of keratinolytic activity in Bacillus pumilis*. Biotechnol. Lett. 30: 461-465.
34. Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A. and Gubitz, G. M. (2007) *A novel metalloproteas from Bacillus cereus for protein fibre processing*. Enzyme Microb. Technol. 40: 1772-1781.
35. Speer, V. (1965) *Nutritional value of hydrolyzed hog hair*. Mimeograph report, Dept of Animal Science, Iowa State University, Ames.
36. Steinert, R. J., Kellms, R. O. and Church, D. C. (1983) *Feather and hair meals for ruminants. IV. Effect of chemical treatments of feathers and processing time on digestibility*. J. Anim. Sci. 57: 495-502.
37. Stilborn, H. L., Moran, E. T., Gous, R. M. and Harrison M. D. (1997) *Effect of age on feather amino acid content in two broiler strain crosses and sexes*. J. Appl. Poult. Res. 6: 205-209.
38. Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey, A. (2006) *Microbiology and industrial biotechnology of food-grade protease: a perspective*. Food Technol. Biotechnol. 44: 211-220.
39. Takami, H., Kobayashi, T., Aono, R. and Horikoshi, K. (1992) *Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structure gene for a thermostable alkaline protease from Bacillus sp. no. AH-101*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 101-108.
40. Tatineni, R., Doddapaneni, K. K., Potumarthi, R. C. and Manganmooi, L. N. (2007) *Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with Streptomyces sp7*. Appl. Biochem. Biotechnol. 141: 187-202.
41. Thys, R. C. S., Lucas, F. S., Riffel, A., Heeb, P. and Brandelli, A. (2004) *Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species*. Lett. Appl. Microbiol. 39: 181-186.
42. Uni, Z., Ganot, S. and Sklan, D. (1998) *Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine*. Poult. Sci. 75: 1104-1108.
43. Uni, Z., Noy, Y. and Sklan, D. (1999) *Posthatch development of small intestinal function in the poult*. Poult. Sci. 78: 215-222.
44. Wang, H., Guo, Y. and Shih, J. C. H. (2008) *Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals*. Anim. Feed Sci. Technol. 140: 376-384.
45. Wang, J. J. and Shih, J. C. H. (1999) *Fermentation production of keratinase from Bacillus licheniformis PWD-1 and a recombinant Bacillus subtilis FDB-29*. J. Ind. Microbiol. Biot. 22:608-616.
46. Wang, J. J., Garlich, J. D. and Shih, J. C. H. (2006) *Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens*. J. Appl. Poult. Res. 15: 544-550.
47. Wang, J. J., Kawan, R. and Shih, J. C. H. (2004) *Increased production of Bacillus keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the kerA gene*. Biotechnol. Bioeng. 87: 459-464.
48. Wang, J. J., Swaisgood, H. E. and Shih, J. C. H. (2003) *Bioimmobilization of keratinase using Bacillus subtilis and Escherichia coli systems*. Biotechnol. Bioeng. 81: 421-429.
49. Wang, X., and Parsons, C. M. (1997) *Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals*. Poultry Sci. 76: 491-496.