

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

National Taiwan University

Master Thesis

Bacillus amyloliquefaciens 之角蛋白酶之研究

The study of keratinase from *Bacillus amyloliquefaciens*

黃湘燕

Hsiang-Yan Huang

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor: Whei-Fen Wu, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016



謝誌



這篇論文能夠完成，要首先感謝我的指導教授吳蕙芬老師，給了我一個有趣的題目及實驗的方向，並增進我的邏輯思考及獨立能力，也謝謝黃慶臻老師、陳昭瑩老師、羅凱尹老師及鄧文玲老師在百忙之中擔任我的口試委員，並提供建議使我的論文更加完整，在課業上一路走來感謝我的家人，提供我強而有力的後盾，使我沒有後顧之憂而能全心全意衝刺，尤其是我的媽媽，在生活上給了很大的支持，謝謝外婆、姑姑及阿姨，在很多方面的幫助。

感謝我的實驗室學長姐、同學及朋友們，不論是在知識上還是實驗相關事情上，也給了我很多建議，幫助我突破瓶頸及盲點，在學習的過程中，我們互相成長、互相砥礪，都讓我成長良多，而我的朋友們，在我心情低潮的時候，給我很多的安慰，也在需要毅力的研究所生涯中，有了許多歡笑，每次的充電都能使我更有活力。

謝謝在我成長過程遇見的每個人，每一個人都給我不一樣的啟發，也使得我更能夠認識我自己，希望未來的我能夠在面對更大的挑戰時，勇於迎接困難並克服，不斷的進化。



摘要

羽毛由角蛋白〔keratin〕構成，成分中 80%以上為胺基酸，角蛋白不易分解，一般工業上使用之方法有將羽毛磨成粉末作為飼料添加物，或以強酸強鹼，處理廢棄羽毛，以羽毛粉作為添加物有分解速度緩慢、應用範圍少之缺點，以強酸強鹼方式處理羽毛則使成分受破壞因而再利用效率降低之缺點，因此開始有多篇研究針對以生物降解羽毛，使羽毛在自然狀態下分解，並保有其胺基酸結構，提供再利用價值，而部分研究亦指出分解羽毛之酵素角蛋白酶〔keratinase〕，除降解羽毛外，尚有其他功能，因此實驗先由環境分離菌株，接著針對菌株產生之酵素活性及其基因功能等進行探討，提供酵素開發之參考。

研究中環境篩選所得 *Bacillus cereus* 及 *Bacillus amyloliquefaciens* 將其訂為 *Bacillus cereus* Ker103 及 *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103，以直接培養獲得粗萃蛋白質及大腸桿菌表現系統，兩種方式獲得分解羽毛之酵素，比較酵素生產情況，並測試酵素於不同環境條件下，酵素之活性及穩定性，依據生產方式不同，獲得之酵素純度及數量亦有所差異，此兩菌所產生之羽毛分解酵素均對環境具有良好耐受性及穩定性，在 pH 3.0-10.0 條件下均保有活性，溫度介於 20-70°C 之間酵素皆可作用，其中 *Bacillus cereus* Ker103 之粗萃酵素在 pH 8.0 及 50°C 下活性最佳，*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 粗萃酵素則在 pH 7.0 及 40°C 下有最佳活性，以 PCR 方式選殖酵素基因，*Bacillus cereus* Ker103 分解羽毛之基因 *vpr*，蛋白大小為 99 kDa，*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 分解羽毛基因為 *kerk*，分子量為 28.8 kDa，從蛋白質變性電泳結果判斷，此兩菌產生之羽毛分解酵素為胞外酵素，其中 *Vpr* 會形成內含體而不溶於水，因此不易純化，因此僅以直接培養獲得粗萃酵素，而 *kerk* 則以大腸桿菌 BL21 轉殖株培養於 LB 液態培養基中，以 IPTG 誘導，並使用 6X His-tag 進行純化，*kerk* 純化之效益良好，較易生產純度較高之酵素，

經純化後之 *kerk* 其最佳酸鹼反應條件為 pH 9，在含高濃度鹽類環境中易失活，添加介面活性劑成分 PEG-3350 及 Tween 20 具提升酵素活性之情形，因此未來若要進行大量生產，*Bacillus amyloliquefciens* Ker103 之 KerK 具有開發價值，亦可作為產品中額外添加成分，可再進行進一步探討。

關鍵字：臘樣芽胞桿菌、液化澱粉芽胞桿菌、角蛋白酶、生物降解羽毛。

Abstract



Feather is composed of keratin, with more than 80% amino acid. According to research, keratin is difficult to degrade. Strong acid and basic chemical solvent is used on industry, which will be easily degrade feather. Some factory boil and grind feather into powder, and use it as additive fodder. But there should be more usage by feather. Since 1950, more research study about degrading feather by biodegradation. It is not only a better way to degrade feather but also maintains ingredient and function of feather. And some research also found that feather-degrading enzyme with other function. So we isolated bacterial strain from environment and have cloned a functional gene of keratinase. Then we purified the enzyme to study feature of the enzyme.

In our study, after 16s rRNA sequencing, isolated strains were confirmed as *Bacillus cereus* and *Bacillus amyloliquefaciens*, and identified as *Bacillus cereus* Ker103 and *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103. We produced enzyme by directly culture and *Escherichia coli* BL21 expression system, then analyzed enzyme activity and stability. Between these two methods, purity, productivity and activity was different. Enzymes produced from these two strains are stable and tolerated in different environment. Under pH 3.0-10.0 and 20-70°C, the two enzymes keep their activity and stability. Crude enzyme produced from *Bacillus cereus* Ker103 indicated the best activities are under incubation condition pH 8.0 and 50°C. The crude enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 show the best activity under pH 7.0 and 40°C. We use PCR to detect and clone the enzyme gene. *Bacillus cereus* Ker103 includes enzyme gene, *vpr*, with predicted molecular weight 98.9 kDa and *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 includes enzyme gene, *kerk*, with predicted molecular weight 28.8 kDa. From the result of SDS-PAGE of these two cultural supernatant,

indicated that these two protein are extracellular enzymes. Among these two enzymes, Vpr formed inclusion body, which made it difficult to produce and purify. So we especially try to purify KerK protein by *Escherichia coli* BL21 expression system to improve its purity. Then we detected enzyme activity, we found that purified enzyme show the best activity under pH 9.0, easily get lost activity under high salt concentration condition. The addition of surfactant Tween 20 and PEG-3350 improve the enzyme activity. We concluded that KerK showed its potential on large scale production and application.

Key words: *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, keratinase, vpr, kerk

目錄

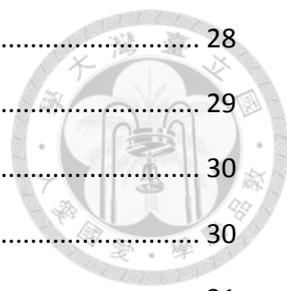
謝誌.....	i
摘要.....	ii
Abstract	iv
目錄.....	vi
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
前言.....	1
壹、 背景.....	1
貳、 羽毛及 keratin 構造.....	2
參、 生物降解羽毛.....	2
肆、 已知微生物降解 keratin 能力.....	4
伍、 目前應用探討.....	4
陸、 <i>Bacillus cereus</i> 介紹及其降解羽毛之研究.....	5
柒、 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 菌種特性介紹.....	6
捌、 羽毛分解酵素〔keratinase〕基因研究.....	6
玖、 <i>Pichia pastoris</i> 重組蛋白表現系統.....	7
材料與方法.....	8
壹、 材料.....	8
一、 菌株及質體.....	8
二、 藥品及試劑.....	9
三、 實驗器材.....	9
四、 分析及製圖軟體.....	9
貳、 實驗設計及方法.....	10
一、 分解羽毛之菌種來源及初步篩選.....	10
二、 菌株篩選.....	10
三、 菌種保存.....	11
四、 16S rDNA 菌種鑑定.....	11
五、 收集培養上清液進行酵素活性分析.....	11





六、	勝任細胞〔competent cell〕製備.....	11
七、	PCR 反應.....	12
八、	PCR 產物純化.....	12
九、	限制酶截切作用〔digestion〕.....	12
十、	接合作用〔ligation〕.....	12
十一、	轉形作用〔transformation〕.....	13
十二、	基因表現質體建構.....	13
十三、	蛋白質表現.....	14
十四、	蛋白質膠體電泳〔SDS-PAGE〕.....	15
十五、	酵素活性測試.....	16
結果.....		19
一、	篩選分離所得之菌株及鑑定.....	19
二、	菌體直接利用之可能性.....	19
三、	收集培養上清液之電泳情形.....	20
四、	上清液酵素活性測試.....	21
I.	粗萃蛋白於 20-70°C 下活性分析.....	21
II.	粗萃蛋白於 pH 3-10 下活性分析.....	21
III.	粗萃蛋白於 20-70°C 下活性維持時間.....	22
五、	基因序列分析結果.....	23
六、	大腸桿菌蛋白質表現及純化情形.....	23
七、	純化後之酵素活性測試.....	24
I.	管柱流洗之酵素於 20-70°C 下活性測試.....	24
II.	管柱流洗之酵素於 pH 3.0-10.0 下活性測試.....	25
III.	管柱流洗後酵素於 20-70°C 下活性維持時間.....	25
八、	經管柱流洗之酵素添加不同化學藥劑之活性分析.....	26
九、	管柱流洗後酵素於不同介面活性劑下活性分析.....	26
十、	pPICZαA 質體構築.....	27
討論.....		28

一、	羽毛降解結果探討.....	28
二、	粗萃酵素活性探討.....	29
三、	酵素活性反應條件探討.....	30
四、	化學藥劑對活性之影響.....	30
五、	添加介面活性劑對酵素應用之探討.....	31
六、	<i>kerk</i> 基因.....	32
結論.....		34
參考文獻.....		35
圖表集.....		42
附錄.....		83



表目錄

表 一、本論文使用之菌株.....	43
表 二、本論文使用之質體.....	44
表 三-1、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於羽毛微量培養基 16°C 下生長曲線....	45
表 三-2、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於羽毛微量培養基 30°C 下生長曲線....	46
表 三-3、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於羽毛微量培養基 45°C 下生長曲線....	47
表 四-1、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於 pH 5 羽毛微量培養基生長曲線.....	48
表 四-2、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於 pH 6 羽毛微量培養基生長曲線.....	49
表 四-3、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於 pH 7 羽毛微量培養基生長曲線.....	50
表 四-4、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於 pH 8 羽毛微量培養基生長曲線.....	51
表 四-5、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於 pH 9 羽毛微量培養基生長曲線.....	52
表 五、 <i>B. cereus</i> Ker103 粗萃酵素不同酸鹼值下之吸光值及相對活性.....	53
表 六-1、 <i>B. cereus</i> Ker103 粗萃酵素於不同溫度下之吸光值及相對活性.....	54
表 六-2、 <i>B. cereus</i> Ker103 粗萃酵素於不同溫度下反應 12 小時活性.....	55
表 七、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 粗萃酵素於不同酸鹼值下之相對活性....	56
表 八-1、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 粗萃酵素於不同溫度之活性.....	57
表 八-2、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 粗萃酵素於各溫度反應 12 小時差異.....	58
表 九、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 較純酵素於不同酸鹼環境之相對活性....	59
表 十-1、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 較純酵素於不同溫度環境之相對活性..	60
表 十-2、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 較純酵素於各溫度反應 12 小時活性...	61
表 十一、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 較純酵素與不同化藥藥劑之反應活性	62
表 十二、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 較純酵素與不同介面活性劑反應活性..	63

圖目錄

圖 一、篩選之微生物於酪蛋白培養基上降解情形.....	66
圖 二、 <i>B. cereus</i> Ker103 及 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 不同 pH 降解結果..	67
圖 三、 <i>B. cereus</i> 經 PCR 偵測致病基因結果	68
圖 四、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 於不同溫度及不同酸鹼值下生長曲線	69
圖 五、將菌體培養於羽毛培養基 24 小時後上清液電泳之結果.....	70
圖 六、 <i>B. cereus</i> Ker103 上清粗萃酵素活性分析之結果.....	71
圖 七、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 上清粗萃酵素之活性分析之結果	72
圖 八、設計引子以 PCR 偵測 <i>Bacillus cereus</i> Ker103 中 <i>vpr</i> 基因之結果	73
圖 九、 <i>B. amyloliquefaciens</i> Ker103 以 PCR 反應偵測基因 <i>kerk</i> 之結果.....	74
圖 十、pET21a 與 <i>kerk</i> 基因之構築	75
圖 十一、KerK 基因純化後電泳結果.....	76
圖 十二、粗萃酵素及管柱流洗後酵素降解酪蛋白結果.....	77
圖 十三、管柱流洗後酵素於不同條件下之相對活性.....	78
圖 十四、酵素添加各化學藥劑下與原始條件相對活性之比較.....	79
圖 十五、酵素添加各介面活性劑成分下與原始條件相對活性之比較.....	80
圖 十六、pPICZαA 與 <i>kerk</i> 基因構築之質體	81
圖 十七、 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Ker103 之 <i>kerk</i> 胺基酸序列.....	82

前言



壹、背景

食品及皮革工業處理程序中，會產生許多固體角蛋白汙染物及不易分解之廢棄物，如羊毛、羽毛、鬃毛及角爪類等動物體上產生之物質，根據統計，世界一年產生至少 16 億單位此類廢棄物，其中羽毛類廢棄物至少占 10%，造成環境中嚴重的汙染，隨著人口增加，對糧食需求也逐漸增加，因此必須飼養更多畜牧類才能提供充足糧食，雞隻的飼養量也隨糧食需求而增加，產生更多羽毛廢棄物 (Williams, 2013)，目前從微生物所發現之羽毛分解酵素角蛋白酶常被用於化學或是飼料工業上，針對羽毛進行分解後，以其構造中之胺基酸組成，作為添加物等用途，其優點為由於胺基酸於羽毛中所佔比例超過 70%，藉由生物自然降解方式避免破壞成分，較不需進一步提煉或是萃取等方式獲得，因此可減少反應過程造成有效物之損失 (Acda, 2010)。

而由微生物產生之角蛋白酶，可能也具有其他功能，目前有研究發現添加由 *Paenibacillus woosongensis* TKB2 產生之角蛋白酶於衣物清洗劑中，其清洗汙漬效果較未添加時增加，在含 7% 介面活性劑之介面活性劑下仍可作用，可耐高溫及酸鹼，顯示其不易喪失酵素活性 (Paul et al., 2013)，因此除了具分解羽毛功能外，微生物產生之角蛋白酶是否具其他功能仍尚待研究，但由此情況來看，角蛋白酶在未來生化工業上具有多方面應用潛力。

因此為了獲得更多具有活性之酵素，本研究希望探討由微生物所產生之酵素可否具有穩定性及適應不同環境，同時加入一般工業中可能添加之鹽類及介面活性劑等成分，探討對酵素之影響，並找出一套可規模化生產此酵素之方法，以因應此酵素在工業上具有應用潛力，能夠具有商品價值，同時針對可分解羽毛之微生物是否能夠搭配羽毛一起應用，作為未來微生物肥料之開發，以及酵素本身於生技工業上之運用。

貳、羽毛及 keratin 構造

羽毛是一種角蛋白〔keratin〕，90%成分為胺基酸，結構中主要以 α -helix 或 β sheet 以雙硫鍵緊密鍵結，藉由 X 光繞射的方式，可將 keratin 分成兩類， α -helix 或 β -sheet 組成， α -helix 為多肽兩兩成對纏繞而成線狀， β -sheet 則是四方形緊密排列，指甲、角及腳爪較堅硬組織就是由後者組成 (Greenwold et al., 2014)，一般羽毛則是 α -helix 及 β -sheet 鍵結，因此構成強韌組織，造成其不易分解等特性，也不易溶於水或其他溶劑中 (Saravanan and Dhurai, 2012)，不經人為方式處理下，在自然界中需經數年至數十年時間才能完全分解，而以人工方法處理則通常以強酸或強鹼，破壞胺基酸間雙硫鍵結，使角蛋白變性，進而溶解羽毛，產生胺基酸等構成羽毛的化合物，但使用強酸或強鹼易有環境汙染及工業安全問題，而在強酸及強鹼環境下，獲得之胺基酸，需繁重程序將酸鹼進行處理，手續上較繁雜，因此通常無法有進一步之使用 (Williams, 2013)。

角蛋白普遍存在於動物體，如人類的毛髮、羊毛及指甲等皆屬於角蛋白 (Bragulla and Homberger, 2009)，藉由 2D-PAGE 方式研究出角蛋白的大小範圍介於 40-70kDa，其中人類的表皮角質層分子量大小與牛的上表皮角質層大小相同，皆為 56.5kDa，使用 antigenetic epitope 辨認不同角蛋白上抗體，發現存在於不同生物體的角蛋白，可能具有相近功能，但其分子結構及胺基酸組成具有差異 (Kuppusamy et al., 2012)。

參、生物降解羽毛

有許多研究針對自然界中，探討微生物本身具有之降解能力，以期能利用非人工及低污染的方式，達到分解羽毛的效果，微生物本身之基因變異性高而能因應不同環境，使得部分微生物具分解特殊物質之功能，環境微生物間藉由基因交流，使得微生物能夠從不同或相同菌種獲得特殊功能基因，因此造就微生物之降解毒害物、廢棄物或汙染物等功能 (Abdel-Razek et al., 2015)，其中細菌及真菌均

有研究發現能夠降解羽毛，而 *Bacillus* 屬中，發現多種菌能夠產生角蛋白酶〔keratinase〕，例如 *Bacillus thuringensis*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis* 及 *Bacillus cereus* 等 (Nagal and Jain, 2010)，這些由環境中分離之微生物能夠分解羽毛，具產生蛋白酶或角蛋白酶的能力，*B. licheniformis* 及 *B. subtilis* 被發現可產生絲胺酸蛋白酶〔serine protease〕 (Cheng, et al, 1995)，*B. cereus* 可產生中性蛋白酶〔neutral protease〕類之羽毛分解酵素 (Ghosh et al, 2009)，角蛋白酶將角蛋白中 β -sheet 鍵結切斷而降解羽毛，而有研究指出利用 *Bacillus subtilis* 降解羽毛後，產生之最終產物 65% 以上為蛋白質或胺基酸等 (Zhang, 2012)，結果如附表，並未有毒害物、汙染物等產生，因此使用微生物降解羽毛，具有環境友善、產物可再利用等優點，在未來羽毛處理及應用上，具有發展潛力。

● *Bacillus subtilis* 降解羽毛後成分組成

Indexes	Raw feather meal	Biodegradation feather meal
Water (%)	7.15	9.61
Crude protein (%)	85.09	65.32
Crude fat (%)	2.58	3.08
Crude fiber (%)	1.62	8.22
Ash (%)	3.92	5.93
Ca ²⁺ (%)	0.23	0.51
P (%)	0.74	0.96
NaCl (%)	1.16	1.28
Digestion rate of protein (%)	6.15	67.82
Mold counting (cfu/g)		537
Coliform group (MPN/100 g)		<3
Pathogens (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Staphyloco aureus</i>)		Not detected

肆、已知微生物降解 keratin 能力

針對微生物降解羽毛之研究最早可追溯至 1950 年代，*Candida albicans* 被發現能在僅以角蛋白為氮源之微量培養基上生長，於數十天後偵測到第一個胺基酸的產生，在研究中發現可產生 13 種胺基酸：丙胺酸〔alanine〕、天門冬胺酸〔aspartic acid〕、谷胺酸〔glutamic acid〕、甘胺酸〔glycine〕、亮胺酸〔leucine〕、絲胺酸〔serine〕、蘇胺酸〔threonine〕、纈胺酸〔valine〕、組胺酸〔histidine〕、甲硫胺酸〔methionine〕、離胺酸〔lysine〕、酪胺酸〔tyrosine〕等，此後也有許多研究嘗試從環境中分離可降解羽毛或 keratin 的微生物 (Kapica and Blank, 1957)。

Williams 等人於 1990 年研究中，也由環境中分離獲得具降解羽毛能力之微生物，經鑑定後為 *Bacillus licheniformis*，研究設計不同生長條件，發現其在 pH7.5 及高溫下〔45-50°C〕有最佳分解活性，並探討培養基中羽毛所含濃度與產生胺基酸之關聯 (Williams et al., 1990)，在培養基中羽毛濃度越高條件下，產生之游離胺基酸也隨之增加。

另外 *Bacillus subtilis* 也被發現具有良好分解羽毛能力，研究中指出自然界中獲得之原始菌株具有 10 KU/mL 之酵素活性，實驗中發現在 pH 8.5，培養溫度在 45-55°C 下有最佳酵素活性，並嘗試調整培養條件，可使改良後之菌株產生之酵素，產生 500 KU/mL 以上之酵素活性，而最終產物胺基酸的產量也大幅提升 (Zhang, 2012)。

伍、目前應用探討

研究發現，由 *Bacillus licheniformis* strain PWD1 產生角蛋白分解酵素可降解造成牛羊腦部病變的 prion 蛋白，而 *Nocardiosis sp.* TOA-1 產生之角蛋白分解酵素也被發現可降解 prion 蛋白 (Cheng et al., 1995)。由於細菌或真菌感染造成灰指甲、乾癬等疾病，藥物需要滲透入指甲內部，才能達到治療效果，以往的藥物

會受限於滲透量低導致治療效果不佳等問題，因此在使用上若添加角蛋白分解酵素可軟化指甲或降解指甲，使得藥物滲透力增加，提高治療的效果〔陳明汝等人，2010〕。

在民生工業上，keratin 也有其應用，動物腳部角質組織被用於膠水及毛髮照護，角質磨粉後，也被用於添加飼料中，羊毛則可用於衣物製造，人體組織修復，蜘蛛絲〔 β -keratin〕也被嘗試應用於眼角膜、防彈衣等，因此 keratin 也能夠有應用價值，並可減少環境廢棄物的堆積 (Kuppusamy et al., 2012)

陸、 *Bacillus cereus* 介紹及其降解羽毛之研究

革蘭氏陽性菌，兼性厭氧，在逆境下會產生內生孢子維持生存，廣泛存在於環境中，如腐植質堆積區、海水中及植物表面等，被發現對人體具有致病性，人體伺機性病源，進入人體會在人體大量繁殖，由其產生之內毒素，如 hemolysin、nonhemolytic enterotoxin 及 cytotoxin K 等，因而造成組織的破壞，引發腹瀉等症狀，為食品檢測指標之一 (Bottone, 2010)。

由於其廣泛存在於環境中，目前有許多研究指出此菌種能夠具有分解多種物質之基因，如 phenol、石油及羽毛等，在環境上具有強大競爭優勢的菌種，在世界各地均有分離到能夠分解羽毛之菌株，且效果相較其他菌種良好，顯示其應用於分解羽毛之潛力 (Lateef et al., 2010)。

多篇文獻針對由環境分離分解羽毛微生物結果中可發現，*Bacillus cereus* 是較常分離到的菌種之一，且相較其他菌種 (*Bacillus megaterium*、*Bacillus licheniformis* 及 *Bacillus subtilis*) 分解效果良好，在分離效率及酵素活性上極佳，且酵素對溫度及酸鹼耐受性高，不易失活，在應用及開發上，可進一步探討，針對產生酵素之基因進行選殖，調整培養環境，溫度及酸鹼值等，使酵素表現盡可能放大，以獲得符合工業應用之數量，目前最常見之方法為使用 *E.coli* 菌株 BL21 轉殖系統大量表現，並使用 His-tag 等方式進行純化，以獲得純度更高之酵素，

可用於進行結構分析、酵素活性測試等，提高酵素品質並增加降解羽毛效率，或是直接使用菌體在短時間、低成本狀態下產生粗萃酵素 (Sivakumar et al., 2011)。



柒、*Bacillus amyloliquefaciens* 菌種特性介紹

Bacillus amyloliquefaciens 目前被發現是根圍微生物，促進植物根系發育並增加植株對病蟲害的抗性，其競爭優勢在根圍快速並大量繁殖，使其他微生物族群無法相抗衡，達到抑制病原的效力，此菌可追溯至 1960 年代， Welker 等人，將此菌與 *Bacillus subtilis* 進行差異比較，分析並比對後，將此菌訂為 *Bacillus amyloliquefaciens* (Welker and Campbell, 1967)，爾後才有其他研究針對其菌種生理特性，及其是否具有特殊功能等作更深入之探討，接著進入分子生物學時代後，陸續有研究將此菌與 *B. subtilis* 進行基因序列比對，以基因角度，指出其與 *B. subtilis* 為不同之物種，*B. amyloliquefaciens* FZB42 也被發現具有分泌植物生長因子的基因，此特性更加說明其為根圍微生物 (Talboys, et al., 2014)，除了植株保護之外，目前對此菌是否含其他功能仍尚須探討，而 Yang 等人也分別分離得到 *B. amyloliquefaciens* 並找出 *B. amyloliquefaciens* 降解蛋白及角蛋白相關基因，但對於其所產生酵素特性及不同條件下活性等仍有許多可研究之處 (Yang et al., 2015)。

捌、羽毛分解酵素〔keratinase〕基因研究

目前研究發現，keratinase 依其酸鹼性質可分成 alkaline 及 neutral〔尚未發現 acid〕，而依其所分解之鍵結，又有 serine protease、Threonine protease 及 Metalloprotease 等分類，在 *Bacillus* 屬中，已有多種羽毛分解酵素基因被發現，其中 *Bacillus megaterium* MKU3 之 *ker* 基因大小為 1140 bps (Radha and Gunasekaran, 2007)、*Bacillus lichemformis* PWD1 之 *kerA* 基因大小為 683 bps (Cheng et al., 1995)、*Bacillus cereus* DCUW 之 *vpr* 基因大小為 2754 bps (Ghosh et

al., 2009), 因此可發現不同種間具有同功用, 但基因序列及特性等不同之羽毛分解酵素, 未來應有更多種不同基因可被發現, 並進行深入探討。



玖、*Pichia pastoris* 重組蛋白表現系統

Pichia pastoris 是一種酵母菌, 可以甲醇作為唯一碳源, 使用 *Pichia* 本身之強啟動子 AOX1 誘導目標蛋白產生, 產生之重組蛋白比例可達產生之總蛋白量之 30% 以上, 目前已為成熟之工業化生產重組蛋白之系統, 可達到充足提供重組蛋白之效能, 因 *Pichia* 為真核生物, 具有轉譯後修飾及糖基化蛋白質等作用, 可用於生產從真核生物所轉殖之基因或結構鍵結複雜之蛋白質, 且能將表現蛋白質送出胞外, 不需過多繁雜處理手續, 節省生產成本及提升便利性, 目前用於生產抗體、人體蛋白質等, 其生物量可達到 $OD_{600}=3$ 以上 (Gabriel, 2012), 顯示其具有大規模生產高經濟價值蛋白質之能力, 因此本實驗中也嘗試構築送入 *Pichia* 之質體, 並將質體送入 *Pichia* 中, 篩選表現良好之菌株, 取得欲表現之角蛋白酶, 並測定其活性, 提供後續生產參考。

材料與方法



壹、材料

一、菌株及質體

實驗所使用之菌株及質體如附錄表一。

1. 構築質體之保存及選殖

大腸桿菌 XL1-Blue 及 DH5 α 常用於重組蛋白表現及保存，XL1-Blue 以藍白篩方式篩選出轉殖株，XL1-Blue 及 DH5 α 為 *endA* 及 *recA* 基因缺失菌株，因此增加轉殖基因的保存度及穩定性，使用 XL1-Blue 及 DH5 α 先進行 *vpr* 及 *kerk* 基因的轉殖，篩選出轉殖成功之菌株後再進行質體的抽取及菌株之保存。

2. 構築質體之蛋白表現系統

實驗中使用大腸桿菌 BL21 [DE3] 作為轉殖之宿主細胞，DE3 為帶有 DE3 lysogen 之 BL21 品系突變株，DE3 內含有受 *lac* 啟動子調控之 T7 RNA 聚合酶基因，以 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside [IPTG] 誘導後，T7 RNA 聚合酶選擇性轉錄 T7 啟動子後帶有之基因，表現外源蛋白質，本研究用 pET-21a 質體構築轉殖基因，pET-21a 中帶有之 T7 啟動子可被宿主染色體上誘導表現之 T7 RNA 聚合酶辨識，使轉殖基因大量表現融合蛋白質，並設計目標基因 C 端帶有 6X His tag 以進行純化。

3. *Pichia pastoris* 表現系統

實驗以 pPICZ α A 作為載體，利用 *Pichia pastoris* X-33 的 *AOX1* 基因為 promoter，轉殖成功之基因會插入其染色體中，引子設計以 KpnI 及 SacII 為切位，抽取完質體後，再以 SacI 將質體切成線狀，使其較易插入染色體中，再由提高培養基抗生素濃度之方式，篩選表現較好及多個插入數之菌株，進行功能及誘導培養，從上清液中獲得酵素。



二、藥品及試劑

1. 一般藥品購自 Sigma [St. Louis, U.S.A.]、J.T. Baker [Phillipsburg, U.S.A.]、慧眾公司 [臺北，臺灣]、季勛公司 [臺中，臺灣]。
2. 限制酶、接合酶購自 NEB [New England Biolabs, Inc. U.S.A.]。
3. PCR 套組購自萬造公司 [臺北，臺灣]。
4. DNA 純化套組購自 Genemark [臺北，臺灣]、Viogene [臺北，臺灣]、諾貝爾公司 [臺北，臺灣]。
5. 特殊抗生素 Zeocin 購自萊富公司 [臺北，臺灣]。

三、實驗器材

1. 微量離心機 [Heraeus Pico-21, Thermo Fisher Scientific Taiwan Co., Ltd.]。
2. 冷凍超高速離心機 [CF 15D2, Hitachi, Japan]。
3. DNA 電泳槽 [伯昂，臺北，臺灣]。
4. 蛋白質電泳槽 [Amersham, 臺北，臺灣]。
5. 分光光度計 [Ultraspec 2100 pro, 北極光，臺北，臺灣]。
6. 超音波破碎儀 [Vibra-Cell™, U.S.A.]。
7. DNA 影像系統 [B-BOX™ Blue Light LED epi-illuminator, 捷昇，臺北，臺灣]。

四、分析及製圖軟體

BioEdit Sequencing Alignment Editor (BioEdit) v7.0.9.0。

Sigmaplot v12.0

Snapgene



貳、實驗設計及方法

一、分解羽毛之菌種來源及初步篩選

本研究所使用之微生物，主要由土壤及羽毛存在之地區採集樣本，並於實驗室中進行後續培養及篩選分離，實驗步驟如下：將採集之樣本去除非羽毛之雜質後，浸泡至無菌水中，進行系列稀釋，並塗於酪蛋白篩選培養基上，當微生物能夠產生降解蛋白之酵素時，將混濁狀酪蛋白降解成透明狀之小分子多肽，會在培養基上產生透明圈，藉以此方式判斷可能分解角蛋白之菌種及其分解活性，取稀釋 10^5 - 10^6 倍率菌液塗在培養基上，分別於 30 及 37°C 下培養數天，接著挑選產生透明圈較大之數種菌落，再於 Luria-Bertani medium 上以劃線平板方式畫出單一菌落，以獲得純度較高之菌株。

實驗中使用之酪蛋白篩選培養基〔Casein phosphate buffer medium〕含有：50 mM phosphate buffer pH 7.0、100g skimmed milk、1.5% agar，配置成最終體積為 1000 mL。

二、菌株篩選

進行初步篩選後，再將獲得之菌種，培養於含羽毛之微量培養基上，觀察生長情形，並挑選分解效率良好之菌株，羽毛前處理步驟如說明：將收集之羽毛使用清水，去除非羽毛及灰塵等物質，事先配置 1% HCl 或 0.05M NaOH，將已風乾羽毛浸入此溶液中，浸泡 overnight，接著取出羽毛，以 RO 水清洗兩到三次，去除酸或鹼液，用擦手紙將 RO 水稍微擦乾，自然風乾羽毛，處理好之羽毛可磨成粉末或整隻放入培養基中待用。

實驗中羽毛篩選培養基〔Feather minimal medium〕成分為：0.3 g/L K_2HPO_4 ，0.4 g/L KH_2PO_4 ，0.2 g/L $MgSO_4$ ，0.22 g/L $CaCl_2$ ，0.1 g/L Yeast extract，0.01 g/L Feather，1.5% Agar。



三、菌種保存

取 500 ml 於 LB 培養基中培養之隔夜菌液與 500 ml 之 85% glycerol 混合，放入 -80°C 冰箱保存。

實驗中使用之營養培養基〔Luria-Bertani medium〕10 g/L NaCl, 10 g/L tryptone, 5 g/L Yeast extract, 1.5% Agar。

四、16S rDNA 菌種鑑定

16S rDNA 引子設計如附錄。目前已知細菌基因序列中，16S rDNA 在物種間為一段不易發生變異，具有高度保留性的序列，長度約在 1500 bp 左右，因此可由此鑑定方式，作為分辨菌種的依據。

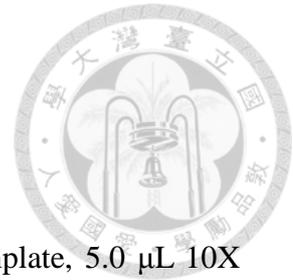
五、收集培養上清液進行酵素活性分析

藉由羽毛微量培養基直接誘導菌體產生酵素，並分別培養於 pH5.0-9.0 酸鹼值培養基及 16、30、45°C 中，測試菌體對酸鹼及環境溫度之耐受性，並探測其最佳生長條件，收取上清液獲得酵素，粗萃酵素進行活性分析，分別置於 pH 3.0-10.0 及 20-70°C，加入天藍角蛋白質為基質進行反應，並於 595nm 下測定吸光值。

六、勝任細胞〔competent cell〕製備

於 37°C 下培養 3 mL 大腸桿菌菌液隔夜〔12-16 小時〕，接著將菌液以 1:100 方式放大繼代培養，37°C 下震盪培養至 OD₆₀₀=0.4-0.6，將菌液瓶均分裝至兩支 50 mL 離心管，冰浴 10 分鐘。以下步驟開始均於冰上操作，以 6000 rpm、4°C 下離心 10 分鐘，移除上清液，每管以 1 mL 冰氯化鈣懸浮菌體，再加入 3-5 mL 冰氯化鈣混勻，置於冰上 30 分鐘，4000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，移除上清液，重複離心及氯化鈣懸浮菌體兩次，移去上清液後，集中兩管菌體，加入 2 mL 冰 0.1M 氯化鈣及 2 mL 15% 甘油懸浮菌體，最後將菌液以每管 100 μL 分裝至 1.5 mL 離心

管中，於-80°C中保存。



七、PCR 反應

Primer 設計如附錄，其所用試劑及反應條件：1.0 μL Template, 5.0 μL 10X prime buffer, 1.0 μL dNTP(10mM), 0.5 μL Forward primer(5 μM), 0.5 μL Reverse primer(5 μM), 1.0 μL *Taq* polymerase, 40.5 μL ddH₂O，PCR 設定條件為於 95°C 下使 DNA 初步解旋，維持 3 分鐘，接著再以 95°C 解旋 DNA 40 秒，降溫至 50 到 60 度間 45 秒〔作用溫度隨引子不同而有所差異〕，使引子與模板專一性黏合，再將溫度提升至 72°C 使 dNTP 開始合成 DNA，時間為每 1000bp 長度之核酸作用 1 分鐘。

八、PCR 產物純化

將反應所得之 PCR 產物以 analytikjena innuPREP DOUBLEpure kit 回收。

九、限制酶截切作用〔digestion〕

取適量質體集 PCR 產物，加入所設計切位之限制酶及相容之緩衝液，混合均勻，反應溫度因限制酶種類而定，反應時間 60-90 分鐘，反應完成後，回收並純化已處理之產物。

十、接合作用〔ligation〕

透過接合酶〔ligase〕將欲轉殖基因與經限制酶處理後之載體黏接，構築好質體可留待接續實驗操作，使用之藥品及材料為：3.0 μL Vector DNA, 13.0 μL Insert DNA, 2.0 μL 10X ligation buffer, 1.0 μL 10mM ATP, 1.0 μL T4 DNA ligase, Total volume 20.0 μL ，將轉殖基因及載體以莫耳濃度 3:1 均勻混合，加入 ligation buffer，ATP 於冰上或 4°C 下解凍後，加入混合液中，最後加入 ligase，於 16°C 下反應隔

夜。



十一、轉形作用〔transformation〕

取 100 μ L 勝任細胞與 10 μ L 構築好之質體混合，於冰上靜置 30-60 分鐘後，於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽下進行反應 90 秒，接著置於冰上 2-3 分鐘，加入 1 mL LB 液態培養基，於 37 $^{\circ}$ C 中震盪培養一小時，再以 6000-8000 rpm 離心 3 分鐘，收集菌體，移除上清液，僅留 50 μ L 懸浮菌體，塗盤於含抗生素之培養基上。

十二、基因表現質體建構

1. *In vitro* 實驗系統

pET21a 質體上有內建之 6X His tag (CAC) 序列 MCS 的 C 端，但基於實驗設計性質，於設計引子時，在 *vpr* 及 *kerk* 基因在 C 端加入 His tag 序列，其中 N 端以 BamHI 為切位，C 端以 XhoI 為切位，pET21a 質體含抗 ampicillin 基因，可於含 ampicillin 之培養基進行篩選。

2. *Pichia pastoris* 表現系統

I. *Pichia pastoris* 轉殖作用

先以 3 mL YPD 液態培養基小量培養菌體隔夜，測得菌液 OD₆₀₀ 達 1.3-1.5 時，將菌液以 1:100 比例加入事先滅好 50 mL 之 YPD 液態培養基培養數小時，待菌液濃度達 OD₆₀₀ 為 1.3-1.5 時，以 1500g 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分中收集菌體，以 ddH₂O 輕輕沖提菌體，均勻懸浮後，再次離心，重複清洗及離心 2 次，倒去 ddH₂O，加入 1 mL sorbitol 懸浮菌體，分裝至微量離心管，每管 80 μ L，接著加入欲轉殖之 DNA 與分裝菌液均勻懸浮，置於冰上 10 分鐘，1500 mV 進行電穿孔，結束後立即加入 1 mL sorbitol，於 30 $^{\circ}$ C 下培養 1-4 小時，分別取 25、50 及 100 μ L 塗於含抗生素之培養基中，30 $^{\circ}$ C 下培養 3-7 天。YPD 配方：1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose, 1-2% Agar。

pPICZαA 中之 multiple cloning site 中含有多個切位，以 KpnI 為 N 端切位及 SacII 為 C 端切位，培養時，先以甘油為初始碳源，接著加入甲醇開始誘導蛋白質表現，為 *Pichia pastoris* 之表現蛋白質過程。



十三、 蛋白質表現

將已構築好之質體送入大腸桿菌 BL21 中，使其大量表現轉殖基因，以獲得大量蛋白質，而可提供後續活性及蛋白質特性等分析。

I. *E.coli* BL21 IPTG 誘導表現蛋白

將已構築好之質體送入 BL21，將 BL21 轉殖株小量培養在 LB 培養液中，並加入抗生素，菌液以 1:100 繼代至含抗生素之 LB 培養液中，震盪培養至 OD₆₀₀=0.4，加入終濃度為 1mM 之 IPTG 誘導目標蛋白，繼續震盪培養 4 小時，4°C 下 8000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液。

II. 利用超音波法破菌取得蛋白

將菌液分裝置離心管，6000-8000 rpm，10 分鐘，倒去上清液，接著使用 binding buffer (1.56 g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 15.01 g NaCl, pH 8.0) 懸浮菌體，調整至 OD₆₀₀ 約 0.8-1.0，將懸浮液置於冰上，安置好破細胞機，開始操作破細胞機，條件設定為每次運作 1 分鐘，靜置 2 分鐘方式操作，進行 3-5 次，以 10000 rpm，20 分鐘，4°C 離心，收取上清液，進行後續純化。

III. His tag 純化

本研究中以 His-tag 純化之蛋白質主要為在 C 端加入 6X His-tag 之 *vpr* 及 *kerk* 基因，以 pET21a 作為載體，將構築好之質體送入 BL21 (DE3) 中表現及純化。

取 2-3 mL 鎳離子親和性膠體 (Ni³⁺ affinity resin, GE healthcare) 到乾淨之管



柱中，binding buffer〔約 25 mL〕將 column 流洗平衡後，將已破菌完之上清液加入 column 中，以 25-35 mL 之 binding buffer 流洗管柱，去除非專一性結合之雜質，待 binding buffer 沖洗完以後，以 elution buffer (binding buffer, 250 mM imidazole, pH 8.0) 流洗管柱，使結合於 resin 上目標蛋白溶出，並收集通過管柱流下之液體，以每管收取 1 mL 之體積，共收取 10 管，10X 去離子水流洗管柱，使 resin 與 elution buffer 中之 imidazole 結合力下降，去除 elution buffer，binding buffer 20mL 流洗管柱，並將管柱保存於 4°C 冰箱中，最後將所收集之液體每管分別取 20 μ L 及 10 μ L，與 2X SDS buffer (20.0 mL 10% SDS, 10.0 mL Glycerol, 5.0 mL β -mercaptoethanol, 6.25 mL 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 1.25 mg Bromophenol blue, 8 mL ddH₂O) 混合並於 95°C 下加熱 10 分鐘，冷卻後進行 SDS-PAGE 及 Bradford assay 測試蛋白質純化情形。

IV. 儲存蛋白質

因 elution buffer 中含有不利蛋白質保存之成分，因此需利用濃縮離心之方式，將 elution buffer 置換成保存緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM PBS pH 7.4，將所有收集純化蛋白質放入濃縮離心管中，6000 rpm，15-30 分鐘，先將 elution buffer 離心去除，再加入保存緩衝液，回收離心管中蛋白質。

十四、 蛋白質膠體電泳〔SDS-PAGE〕

SDS-PAGE 以 SDS 使蛋白質變性，SDS 在蛋白質疏水區表面附著，形成一層均勻之負電荷，因此可使結果將實驗中所收得之上清液，純化之蛋白質，只以分子量大小作為分離之指標，泳動率只取決於蛋白質分子量，可做初步預測及分析。

樣本處理中利用加熱破壞蛋白質的三級及四級結構，使其分子內部的疏水區暴露而與 SDS 結合，此外 SDS-sample buffer 中的還原劑 β -mercaptoethanol 亦可

破壞蛋白質分子內雙硫鍵。電泳條件以 100 伏特先進行 20 分鐘，再以 120 伏特電泳約 60-80 分鐘，完成後以 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染色約 20 分鐘，再以甲醇-醋酸溶液 (20% methyl alcohol, 10% acetic acid) 脫色至條帶與背景可成對比。

使用之 SDS-PAGE 電泳膠片配方為：12.5% running gel (3.2 mL H₂O, 4.15 mL 30% acrylamide, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 100 μL 10% SDS, 100 μL 10% APS, 0.004 μL TEMED, Total volume 10.0 mL), 4% stacking gel (3.4 mL H₂O, 0.83 mL 30% acrylamide, 0.63 mL 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 50 μL 10% SDS, 50 μL 10% APS, 0.004 μL TEMED, Total volume 5.0 mL)。

跑膠時使用 gel running buffer (15.0 g Tris base, 72.0 g Glycine, 5.0 g SDS, 使用時稀釋至 1X 體積)。

電泳完畢後以 CBR 染色液 (0.75 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 250 mL Methyl alcohol, 50 mL Acetic acid, 250 mL ddH₂O) 進行染色，15 分鐘後，以 CBR 脫色液 (10% Acetic acid, 20% Methyl alcohol) 洗去膠體背景。

十五、 酵素活性測試

酵素活性測試中，以 sigma 所提供之天藍角蛋白 [keratin] 作為基質，並於不同條件下進行反應，最後於 595nm 下測試吸光值，以 0.01 吸光值為一個酵素活性單位。

I. 不同 pH 值對活性之影響

不同酸鹼環境下，測試酵素之穩定性及活性，可得知酵素之最佳反應條件及可作用酸鹼範圍。實驗設計以 pH 值 3-10 為測試範圍，加入基質後一小時回收反應，並測試結果。使用之緩衝液 stock 為：pH 3.0 緩衝液 (39.72 mL 0.1M Citric acid, 10.23 mL 0.1M Na₂HPO₄)、pH 4.0 緩衝液 (30.72 mL 0.1M Citric acid, 19.28

mL 0.1M Na₂HPO₄)、pH 5.0 緩衝液 (24.25 mL 0.1M Citric acid, 25.75 mL 0.1M Na₂HPO₄)、pH 6.0 緩衝液 (6.15 mL 0.2 M Na₂HPO₄, 43.85 mL 0.2 M NaH₂PO₄)、pH 7.0 緩衝液 (30.5 mL 0.2 M Na₂HPO₄, 19.5 mL 0.2 M NaH₂PO₄)、pH 8.0 緩衝液 (50 mL Tris-HCl 100 mM)、pH 9.0 緩衝液 (50 mL Tris-HCl 100 mM)、pH 10.0 緩衝液 (50 mL Tris-HCl 100 mM)。

II. 不同溫度對活性之影響

測試 *vpr* 及 *kerk* 酵素在不同溫度條件下之反應活性，分析其在不同溫度時之活性表現，及可耐受之溫度範圍。

反應條件設定為 20-70°C，Vpr 蛋白以 100mM Tris-HCl (pH 8.0) 為緩衝液，KerK 以 citirc acid-Na₂HPO₄ (pH 5.0) 為緩衝液，每 10 度為一測試間隔，開始反應至結束反應以 1 小時為作用時間，將反應置於水浴槽中進行，接著以 96-well 孔盤測試在 595nm 下之吸光值，以最高數值作為 100% 相對活性。

III. 酵素於不同溫度下之穩定性

為了解酵素於何溫度下，其活性及穩定性維持能力最佳，因此將基質與酵素置於不同溫度，20-70°C 下於水浴槽下作用 12 小時，取出反應液加置 96-well 孔盤中，測定其在 595nm 下之吸光值，並與反應 1 小時後之數值進行比較，若數值提高，則將反應時間繼續延長，直至活性開始降低，其活性以 0.01 吸光值為一單位，以反應最高吸光值作為 100% 相對活性。

IV. 不同化學藥劑對酵素活性之影響

實驗以 SDS、乙醇、EDTA 及 NaCl 等化學物質，置於 pH 9.0 Tris-HCl 溶液中，與酵素以體積 1:1 比例進行反應，所添加之化學藥劑終濃度為 5% (EDTA 為 50mM)，於 60°C 反應 1 小時，以未加入任何藥劑之酵素反應活性為對照組，換

算不同化學藥劑反應後殘餘活性。



V. 不同介面活性劑成分對酵素活性之影響

實驗針對常見之介面活性劑 PEG-3350 (polyoxyethylene glycol-3350)

、 Tween 20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate 20) 、 Triton X-100 (polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether) 及肥皂水〔南僑水晶肥皂〕與 pH 9.0 Tris-HCl 緩衝溶液配置成反應液〔除肥皂為 1% 濃度，其餘配置成 5% 濃度〕，接著與酵素以體積 1:1 比例混合進行反應，以未加任何介面活性劑之酵素反應活性值作為對照組，在 60°C 下反應 1 小時，接著測量 OD₅₉₅ 之吸光值，並將數值換算成相對活性。

結果



一、篩選分離所得之菌株及鑑定

由於角蛋白酶〔keratinase〕為蛋白酶〔protease〕之一類，而角蛋白酶之活性更強，因此在初步篩選過程，需先確定蛋白酶活性，才可向下確認其分解角蛋白之能力，從環境收集之樣本進行分離及培養後，結果發現有兩菌在酪蛋白培養基上產生明顯降解圈，其結果如圖一，取得單一菌落後，接種至含羽毛之微量金屬離子液態培養基，發現羽毛皆有斷裂情形，確認是否由所接種的菌分解羽毛，因此取出上清液，系列稀釋後測試 OD₆₀₀ 之結果並培養在 LB 培養基上 12 小時，觀察菌落是否長出，OD₆₀₀ 有吸光值變化，其中添加羽毛培養基中分為添加羽毛粉及羽毛原體，添加羽毛粉之培養基誘導菌體生長較添加羽毛原體培養基效果要佳，且使用粉末誘導菌體其生長速度極快，為添加羽毛原體誘導速度之兩倍，因而此後實驗皆以粉末作為培養基之添加，而將菌液塗於培養基上，於 12 小時後，有菌落長出，顯示此兩菌在羽毛培養基內生長並以羽毛為碳氮源。

接著抽取此兩菌之染色體，進行 16S rDNA 菌種鑑定，結果發現此兩菌皆為 *Bacillus* 屬，為 *Bacillus cereus* 及 *Bacillus amyloliquefaciens*，將此兩菌編號為 *Bacillus cereus* Ker103 及 *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103，並以此兩菌進行後續功能及基因等分析，比較此兩菌分解羽毛之效能。

二、菌體直接利用之可能性

除了開發酵素外，本研究亦針對菌體於不同培養條件下，降解羽毛及生長之情形進行探討，於微量元素液態培養基中，觀察羽毛斷裂情形，並於接種菌源於 pH 5.0-9.0 之微量液態培養基中，兩天後收取上清液，偵測是否含有酵素，並將上清液滴於酪蛋白培養基中，偵測降解情形，結果發現 pH 5.0-9.0 培養基所或得

之上清液均具蛋白酶活性，降解情形如圖二，但其中 *B. cereus* 此種菌根據文獻顯示其可能為病原菌，經 PCR 確認其致病基因之存在，發現其具有溶血毒素 (hemolytic enterotoxin and nonhemolytic enterotoxin complexes)，結果如圖三，因此 *B. cereus* Ker103 無法直接應用，而只能轉而探討其酵素之應用，而 *B. amyloliquefaciens* Ker103 為根圈微生物，並非病原微生物，菌體可直接利用，並偵測此菌在不同溫度及酸鹼環境下之生長，結果顯示此菌在溫度介於 16-45°C 及 pH 介於 5.0-9.0 間均可生長，結果如圖四，顯示此菌對環境耐受度良好，其中在 30°C、培養基 pH 值 7.0 條件下，生長最為良好，實驗中微量培養基分別添加羽毛粉及羽毛原體，測試菌體之生長情形，結果顯示添加羽毛粉之培養基使菌體生長速度較添加羽毛原體之培養基之生長速度超過兩倍，顯示羽毛粉可加快生長速率，但在觀察菌體產生酵素降解羽毛等狀態，以羽毛原體則較易觀察，當菌體可分解羽毛，則羽毛原體有斷裂之情形，可做為判斷依據。

三、收集培養上清液之電泳情形

藉由直接收集上清液進行電泳方式，可以獲得上清液中是否具蛋白質存在，並以此推測酵素存在之可能，以及獲得羽毛分解之初步資訊，經過培養前測試發現添加羽毛粉末可使菌體生長快速，因此於配置直接誘導原菌產生酵素之培養基皆加入羽毛粉，經由生長曲線測量及吸光值分析，發現 *B. cereus* Ker103 及 *B. amyloliquefaciens* Ker103 皆在接種 24 小時後，生長達到高峰，因此實驗以培養 24 小時為佳，於培養 24 小時後，收取上清液，並利用硫酸銨沉澱方式收集粗萃蛋白質，再以 phosphate buffer saline (pH 7.4) 回溶蛋白質，接著進行 SDS-PAGE 電泳，結果如圖五，其中 *B. cereus* Ker103 僅於 100 kDa 位置有蛋白質條帶，*B. amyloliquefaciens* Ker103 則產生三條不同大小之蛋白質，其中兩條介於 35 到 48 kDa，另一條則接近 28 kDa，顯示藉由直接培養菌體之方式，獲得之上清蛋白質專一性尚佳，顯示菌體直接誘導酵素產生具有可行性，接著以活性測試獲得酵素

之其他資訊。



四、上清液酵素活性測試

I. 粗萃蛋白於 20-70°C 下活性分析

本研究探討溫度對粗萃蛋白酵素活性之影響，由此得知產生之上清酵素之溫度耐受範圍，以作為後續應用價值之參考，探討最佳反應條件，使分解羽毛具有最佳效能，並提供酵素於其他方面應用之資訊，若酵素可耐受溫度範圍廣，則顯示酵素不易受環境溫度影響，具有開發價值。

B. cereus Ker103 及 *B. amyloliquefaciens* Ker103 產生之粗萃酵素分別置於最佳酸鹼緩衝液之條件，為 pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液中及 pH 5.0 Citric acid- Na_2HPO_4 中，加入酵素基質，接著於 20-70°C 下反應 1 小時，最後結果發現 *B. cereus* K103 產生之酵素於 50°C 下有最佳活性，並以此為最高相對活性值 100%，其次為 40°C 下之反應活性，為 69.75%，於 20°C 下反應之活性最低，為 42.18%，各溫度相對活性值結果如圖 六 (A)，而 *B. amyloliquefaciens* Ker103 產生之上清酵素則是在 60°C 下活性最高，因此作為最高相對活性值 100%，其餘溫度下之活性均以其相對，結果如圖 七 (A) 而次高之活性則為 70°C 之反應條件，為 86.9%，在 20°C 下則活性最低，僅餘四成活性，顯示產生之酵素可於不同溫度下表現活性，但於低溫狀態下，活性表現不佳。

II. 粗萃蛋白於 pH 3-10 下活性分析

藉由測試不同酸鹼值下上清液之酵素活性，得知最佳反應活性與可耐受之酸鹼範圍，探討酵素於不同酸鹼值下之活性表現，由於不同環境下之酸鹼條件可能不同，由此測試可得知酵素是否易受環境酸鹼影響，提供後續酵素應用價值之參考，以利後續應用開發。

B. cereus Ker103 及 *B. amyloliquefaciens* Ker103 之粗萃酵素皆置於 40°C 下與

天藍角蛋白 (keratin azure) 反應 1 小時，其中 *B. cereus* Ker103 產生之酵素在 pH 8.0 下有最佳活性，而粗萃酵素在 pH 3.0-10.0 皆具有活性，將測得之吸光值換算成相對活性，結果如圖 六 (B)，由測得數據發現，pH 7.0-10.0 中性偏鹼性環境平均活性較 pH 3.0-6.0 之偏酸性環境為佳，顯示 *B. cereus* Ker103 產生之羽毛分解酵素偏好中偏鹼性環境，而 *B. amyloliquefaciens* Ker103 之粗萃酵素在 pH 7.0 條件下活性最佳，在 pH 5.0-9.0 之間皆有穩定活性，但在 pH 10.0 則活性大幅降低，將測得之吸光值換算成相對活性，其結果呈圖 七 (B)，顯示 *B. amyloliquefaciens* Ker103 產生之酵素分解角蛋白條件偏好中性環境。

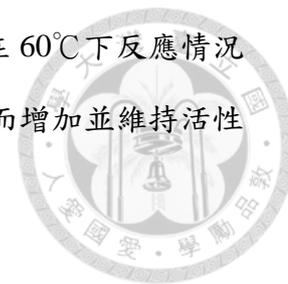
III. 粗萃蛋白於 20-70°C 下活性維持時間

除了瞭解酵素於短時間內之最佳活性，也須了解酵素活性作用之維持時間，若酵素僅能在短時間內具有活性，於長時間下容易失活，顯示酵素不易保存，開發之過程不易監控，則無法在工業上有進一步應用，藉由此測試，得知酵素於長時間下之穩定性，提供儲存酵素及監測酵素製造等資訊。

將上清酵素與基質反應 12 小時後，以反應 1 小時，50°C 下測得之吸光值作為最高活性，其餘條件下吸光值均與其相對，從結果來看，*B. cereus* Ker103 產生之酵素，在 20-70°C 下尚有活性，結果如圖 六 (C)，在 70°C 下活性最低，僅剩 27.74%，較反應 1 小時後之活性減少 20%，在 50°C 下其酵素活性仍為其他作用溫度較高，但其活性較反應 1 小時後之活性減少 21.6%，為所有條件下，活性減少最多，而在 40°C 下反應 12 小時之酵素活性與反應 1 小時測得之活性差異變化不大，其活性差異小於 10%，穩定性為所有反應條件下最佳。

B. amyloliquefaciens Ker103 之上清酵素與基質反應 1 小時呈色反應不明顯，將時間延長至 12 小時，於 30°C、40°C 及 50°C 條件下，其活性較反應 1 小時高，因此延長反應時間可增加與受質反應量，並將反應活性數值作圖，如圖 七 (C)，可看其趨勢，其活性與反應 1 小時之數值差異極小，顯示菌體產生之上清酵素在

短時間內不易失活，並可作用至少 12 小時，於短時作用下，在 60°C 下反應情況最佳，但作用時間則使酵素活性降低，40°C 下作用效益隨時間而增加並維持活性穩定，顯示 40°C 為此酵素最佳維持活性溫度。



五、基因序列分析結果

從 GenBank 獲得 *B. cereus* 及 *B. amyloliquefaciens* 之羽毛分解酵素基因序列資訊，並設計引子，進行 PCR 反應後，偵測此兩菌是否具有相同之功能基因，結果此兩菌所含之酵素基因均與 GenBank 上提供之序列相同，其中 *B. cereus* 已有研究發現其分解羽毛之酵素基因 *vpr* (Ghosh et al, 2009)，其大小為 2754 bp，PCR 偵測後，結果如圖 八，利用蛋白質預測軟體分析後，推估其蛋白質大小為 99 kDa，於 DNA 序列中，第一到二十五的鹼基為 signal peptide sequence，為細胞誘導酵素分泌至胞外之序列，而 *B. amyloliquefaciens* 分解羽毛之酵素基因 *kerk*，序列大小為 1149 bp，以 PCR 偵測後電泳結果如圖 九，以序列預測其蛋白質大小應為 46 kDa，目前已知胺基酸序列中第一到三十六個胺基酸為 signal peptide，顯示此酵素會釋放至胞外，將此序列與蛋白質資料庫進行比對後，發現已有其他針對蛋白質結構之研究，結構立體圖如附錄一，此酵素為 alkaline serine protease，對纖維類蛋白質構造如羽毛，具有高度活性及專一性，其中第 37 個胺基酸到 107 個胺基酸序列為 propeptide，結構如附錄一 (A)，蛋白質折疊完畢送出胞外後，此部分會自行截切，亦不具任何功能，而實際具有酵素活性之部分為第 108 到第 382 個胺基酸序列，如附錄一 (B)。

六、大腸桿菌蛋白質表現及純化情形

利用 pET21a 作為載體，接合 *kerk* 基因，因酵素之活性端位於 C 端，因此設計引子時於 N 端加入 his-tag 序列，避免影響作用活性，構築成新質體，如圖 十，送入菌株 BL21 大量表現，以 Ni-NTA 管柱純化，其結果如圖 十一，在 68、28

及 28 kDa 位置下方各有條帶產生，在 28 kDa 之位置之蛋白量最多，圖中最右邊條帶為破菌後未經純化之粗蛋白質，從電泳結果來看，比較純化前後之情況，未經純化之粗蛋白質非目標蛋白質極多，使電泳條帶無法分明，於管柱流洗後，僅剩 4-5 條蛋白質條帶，且各條帶分明，顯示純化後去除大部分非目標蛋白質，大幅提升產物純度，實驗加入不同濃度 BSA 作為對照，整體情況觀察，表現蛋白產生量約在 0.125 mg/mL 之濃度，實驗中培養菌液體積為 300 mL，但提高培養體積後，產生濃度並未增加，顯示酵素表現量有其極限，並同時取出純化蛋白質與菌體產生之粗萃液，滴於酪蛋白質培養基上，以水作為對照組，觀察降解圈之產生，實驗結果顯示純化後蛋白質亦能降解酪蛋白質，結果如圖 十二，因此藉由此方式，可初步分辨純化後蛋白質之活性，接著可進行其他不同條件下之降解 keratin azure 之情形。

七、純化後之酵素活性測試

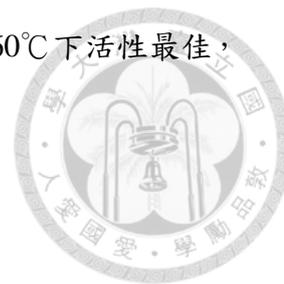
實驗同時將管柱流洗純化後酵素置於不同酸鹼、不同溫度、不同化學試劑及不同介面活性劑下，加入 keratin azure 反應 1 小時及 12 小時，探討管柱流洗後酵素降解活性及穩定性等，以此獲得酵素最佳反應條件。

I. 管柱流洗之酵素於 20-70°C 下活性測試

本研究探討溫度對酵素活性之影響，由此得知產生之酵素之溫度耐受範圍，以作為後續應用價值之參考，探討最佳反應條件，使分解羽毛具有最佳效能，並提供酵素於其他方面應用之資訊，得知酵素最佳反應條件可提供商品於應用上開發之建議。

實驗將酵素置於 pH 9.0 Tris-HCl 緩衝液中進行溫度測試，於 1 小時作用後，在 60°C 下有最佳作用活性，以此作為 100% 相對活性，其餘數值與其換算，而於 20°C 作用下，活性極低，僅有 30.17% 相對活性，在 30、40、50 及 70°C 下，其活性結果接近，為 63.79%、67.24% 及 69.83%，結果如圖 十三 (B)，與 60°C 反應

數值相比，於這幾種溫度下反應之相對活性至少有 60%，但以 60°C 下活性最佳，顯示於短時間下 60°C 提供最佳溫度反應條件。



II. 管柱流洗之酵素於 pH 3.0-10.0 下活性測試

本研究探討酸鹼對管柱流洗後酵素活性之影響，由此得知產生之酵素之酸鹼耐受範圍，以作為後續應用價值之參考，探討最佳反應條件，使分解羽毛具有最佳效能，並提供酵素於其他方面應用之資訊，並了解最佳反應條件，可提供在應用開發上配方及成分之添加及調整酸鹼環境之探討。

實驗將酵素置於 50°C 下，並以 pH 3.0-10.0 分別與酵素混合後加入天藍角蛋白作為受質，於反應 1 小時後收取數據，結果如圖 十三 (A)，其中以 pH 9.0 條件下反應活性最佳，以此為 100% 最高活性，其餘數值與其對比，結果顯示在 pH 3.0 條件下則活性最低，僅有 13.9% 相對活性，pH 7.0、8.0 及 10.0 結果接近，為 82.35%、83.42% 及 79.14%，顯示酵素在中性至鹼性範圍活性變化不大，但不適合於酸性環境 (pH<6.0) 下作用。

III. 管柱流洗後酵素於 20-70°C 下活性維持時間

於溫度測試中以得知於短時間下，酵素最佳反應溫度，接著以瞭解酵素活性之持續時間，探討酵素是否具長時間作用能力，以作為儲藏及長時穩定能力探討，並提供在不同溫度下穩定性之參考。

實驗延長作用時間至 12 小時，同樣將酵素置於 pH 9.0 Tris-HCl 中與天藍角蛋白混合後，置於 20-70°C 下反應，測試吸光值並同時與反應 1 小時之結果比對，作成圖 十三 (C)，結果顯示作用 12 小時後，50°C 之反應條件提供最佳活性，而 30 及 40°C 反應條件下測得之結果與 1 小時之結果無顯著差異，20 及 70°C 反應測得之結果則較 1 小時結果微幅上升，其中於 12 小時反應後，20°C 反應測得之相對活性較 1 小時增加近 1 倍，由 30.17% 上升至 47.33% 相對活性，而於 1 小時下

有最高活性之 60°C 反應條件則在 12 小時作用後，酵素活性減少 30.17%。



八、經管柱流洗之酵素添加不同化學藥劑之活性分析

本實驗於活性作用中額外添加 SDS、乙醇、NaCl 及 EDTA，為環境常見或常接觸物質，藉由探討酵素於這些物質中活性變化，了解酵素是否亦受化學藥劑之影響及酵素於藥品中耐受性，由於化妝品或介面活性劑配方中常會額外添加化學藥品，因此藉由此測試，可提供未來於應用及保存上之參考。

實驗於 60°C 下反應 1 小時，並以未添加任何藥劑之酵素反應值作為對照，將各藥劑之相對活性作成如圖 十四，結果顯示此四種藥品皆會影響酵素正常活性，其中 SDS 影響最大，使酵素僅剩 5.61% 活性，EDTA 對其影響最小，尚有 61.73% 相對活性，酵素活性減少 38.27%，於 5% NaCl 中則僅有 19.48% 相對活性，於 5% 乙醇中剩 13.33% 活性，顯示酵素在高濃度鹽類溶液中不易作用，於乙醇及 SDS 此兩者會影響蛋白質結構之藥劑中亦受極大影響。

九、管柱流洗後酵素於不同介面活性劑下活性分析

由於目前市面上已有部分產品添加不同酵素增加洗滌效果，因此本實驗欲測試酵素於不同介面活性劑中之活性，探討介面活性劑對酵素是否產生任何影響，已習是否增進活性或抑制活性，以提供未來此酵素應用於介面活性劑及任何使用相關成分產品中之參考。

實驗以 60°C 反應 1 小時之結果進行分析及比較，以未添加任何介面活性劑成分之酵素反應值為對照組，如圖 十五，結果發現添加 Tween 20 及 PEG-3350 後，酵素相對活性大於對照組，添加 Triton X-100 之酵素活性剩餘 82.53%，其中肥皂對酵素活性抑制程度最大，僅剩餘 48.33% 相對活性，因此結果顯示 Tween 20 及 PEG-3350 有利於增加酵素活性，而添加一般肥皂及 Triton X-100 作用則抑制酵素活性，關於介面活性劑對酵素活性之影響則於討論中作更進一步探討。

十、pPICZ α A 質體構築

目前一般生產酵素方法常利用大腸桿菌 BL21 系統表現蛋白，因此本研究中嘗試以 pPICZ α A 作為載體，並接合 *kerk* 基因構築質體，嘗試送入並利用 *Pichia pastoris* 表現 KerK 蛋白質，目前已構築一完整質體，結果如圖 十六，目前尚未篩選出有效表現蛋白質之轉殖株。



討論



一、羽毛降解結果探討

藉由結果來看，此兩菌分解羽毛的效果均非常明顯，培養基中只提供微量離子及羽毛原體誘導生長，接種高濃度菌體後一天即可看出羽毛有明顯斷裂情形，顯示此兩菌於菌數繁多狀態下，具高度分解效率，但一般於自然界中微生物受到環境壓力、營養競爭及族群競爭等影響，在繁殖數量上不一定充足，因此羽毛分解效率不明顯，且由羽毛接種菌源後才有斷裂之現象，所以可初步推測其所產生之酵素為胞外酵素，直接收取上清液進行硫酸銨沉澱，收集蛋白，進行電泳後，*B. amyloliquefaciens* Ker103 之粗萃蛋白僅有三條蛋白條帶，*B. cereus* Ker103 則只有一條，顯示直接使用羽毛培養基培養菌體在產生酵素具一定程度之專一性，但尚需進一步轉殖基因並表現蛋白質，才能確認所產生酵素之大小，另外 *B. cereus* Ker103 產生之上清液，進行電泳後有些微拖尾現象，且條帶大小位置在 100 kDa 以上，較預測值 99 kDa 為大，根據 G. Taylor 等人於 1986 年之研究指出，蛋白質形成內含體後其密度會較原預測值大，因而蛋白質電泳所顯示之條帶大於 100 kDa 而非預測之 99 kDa，應是因形成內含體之原因 (Taylor et al., 1986)，而 Abhrajyoti Ghosh 等人於 2009 年針對 Vpr 酵素探討其性質，發現此酵素容易形成內含體，難溶於水 (Ghosh et al., 2009)，若需溶解內含體則需要高濃度尿素，但此法易造成酵素失活，且步驟繁雜也可能造成產物損失多等問題 (Singh and Panda, 2005)，而研究中亦嘗試純化此酵素，但其最終結果發現一般方法不易純化，且獲得最終酵素產量極少，顯示此酵素之開發價值尚需探討，且此菌亦為致病菌 (Bottone, 2010)，實驗中也證實所分離之菌株，具有病原性，因此不再另外作深入探討，另一方面，*B. amyloliquefaciens* Ker103 之上清液進行電泳，條帶明顯，而 *B. amyloliquefaciens* 之 KerK 蛋白質結構雖已有研究 (Gallagher et al., 1995. Peng et al., 2003)，但對此蛋白質在不同狀態下之活性仍少有探討，因此本篇研

究中針對此菌及其產生之酵素於不同環境下設計實驗，結果顯示菌體直接產生之粗萃酵素已有活性，亦不易失活，而 *B. amyloliquefaciens* 也為促進根圈生長之微生物 (Qiao et al., 2014) ，除其對生物無害之外，亦有益植株生長，使用此菌並與羽毛交互作用後，羽毛降解產生之胺基酸及碳氮源等，可提供植物作為微生物肥料之用途。

二、粗萃酵素活性探討

此兩菌所獲得知酵素均在偏高溫下 (40-50°C) 活性良好，在較低溫時 (20°C) 則活性極低，而於長時間作用下 (12 小時) ，亦不易因溫度影響而喪失活性，說明酵素具穩定性，而在低溫狀態下酵素不作用，只在高溫時才發揮活性，此結果亦說明酵素具保存之可能，在商品開發上，良好活性、不易失活及可儲存性為酵素或蛋白質中重要優點 (The Soap and Detergent Association, 2005) ，而又於此兩種結果亦顯示由此兩種菌產生之酵素都具備這些特性，另外此兩種酵素最佳反應酸鹼值偏鹼性及中性，且於弱酸至弱鹼性範圍可作用亦維持穩定，若用於農業或生技上，可避免使用強酸或強鹼而引起汙染或危害，例如添加於保養品中，由於人體肌膚為敏感而又為弱酸性 (Lambers et al., 2006) 因此使用之商品酸鹼適用範圍不宜過酸或過鹼，而保養品或是化妝品等也因配方不同而酸鹼範圍不同，但未來若開發此酵素之產品之構想來看，從酵素在 pH 6.0-8.0 反應活性接近 7 成之結果來看，尚有開發價值，且酵素又不易受環境影響而失活，亦為另一優點。

但 KerK 之上清酵素活性測試之結果中，實驗顯示 pH 7.0 條件下具有最佳活性，但先前研究則顯示，此酵素為 alkaline protease，在 pH 9.0 條件下有最佳活性 (Peng et al., 2003) ，此兩種結果差異極大，推測可能原因為粗萃蛋白質中，因純度不高，可能具有其他物質影響，而使活性結果不相同，因此需再探討酵素於不同酸鹼值下反應活性，才可推敲，而先前研究中使用 casein solution 作為測試活性之基質，與實驗中使用 keratin azure 不同，因此是否由於基質不同，而使最

佳作用之酸鹼條件不同，亦可進行探討。



三、酵素活性反應條件探討

實驗使用大腸桿菌 BL21 系統表現並純化蛋白質，進行電泳後以純化前破菌粗萃液作為對照，從結果來看，至少 80% 非目標蛋白質均可被流洗，純化結果良好，電泳結果顯示在非預期大小 63-48 kDa 間、35-28 kDa 及小於 28 kDa 仍有條帶可偵測到，而位於 28 kDa 位置之蛋白產量最多，此情況與文獻之結果 28.8 kDa 相近 (Peng et al, 2003)，推測應為目標蛋白質，而其餘可能為與 Ni-NTA 管柱有弱鍵結之非目標蛋白質，純化後之酵素進行活性測試之結果中，純化後之酵素最佳反應酸鹼值為 pH 9.0，短時間下最佳反應溫度為 60°C，根據文獻結果亦顯示此酵素於 pH 9.0 條件下有最佳活性 (Peng et al., 2003)，適用酸鹼條件與預期相符但溫度則較預期高 10°C，但文獻中亦發現實驗以 casein 作為受質測試活性，與本研究中以天藍角蛋白為受質，角蛋白質在結構上是極不易降解的物質，因此在高溫環境下受質亦保持穩定，顯示受質材料使用差異應為影響反應溫度因子之一，而在 60°C 下 casein 又會稍微溶解 (Ye and Harte, 2013)，因此實驗結果上應該是因受質不同而影響反應溫度，而大多實驗並未進行長時間之酵素活性穩定測試，但於本實驗中發現，短時間下 60°C 為最佳條件，但長時間反應卻以 50°C 活性最佳及最穩定，因此推測高溫條件下加快反應速率，但不易維持酵素活性。

四、化學藥劑對活性之影響

添加化學藥劑於酵素反應中，觀察酵素表現情形，所有藥品均對酵素活性產生抑制，其中又以 SDS、NaCl 及 EtOH 抑制情況最為明顯，而本實驗中所使用之藥劑 SDS 及 EtOH 根據研究指出，在一定濃度下會使蛋白質或酵素變性或是抑制其活性 (Bhuyan, 2009. Herskovits et al., 1970)，實驗中使用 5% SDS 及 EtOH 對酵素活性已有明顯抑制，顯示酵素無法在含 5% SDS 及 EtOH 下作用，但部分

文獻提到若於 1% 濃度下作用，則對酵素活性抑制之影響小 (Muga et al., 1993)，因此未來若欲實際應用，應避免添加此兩種物質或是使用較低濃度減少影響。

實驗中也添加鹽類 NaCl 觀察鹽類是否抑制酵素活性，結果顯示在 5% NaCl 下明顯抑制酵素活性，根據 James C. Warrant 及 Elena V. Usova 等人研究指出，於酵素反應中添加高濃度鹽類會抑制酵素活性 (Warrent and Cheatum, 1966. Usova and Ekiksson, 1997)，於一般環境中，鹽類濃度高於 5% 即為高鹽環境，而實驗結果亦顯示 *B. amyloliquefaciens* Ker103 之 KerK 酵素在高鹽濃度下，活性大幅下降，因此應用 KerK 酵素時，應避免接觸過高濃度之鹽類。

因 EDTA 為多種產品中如保養品及介面活性劑等產品中之添加成分，因此實驗中額外添加 50 mM EDTA，觀察酵素活性之表現，結果顯示酵素活性降低 40%，探討 Saeda Bano 等人研究，於酵素反應中添加 EDTA 後對活性之影響，此實驗中亦指出 EDTA 對酵素活性有抑制之情形 (Bano et al., 2014)，其添加之最高濃度僅至 10 mM，使酵素活性降低 40%，此結果與本實驗中以 KerK 酵素反應結果比較後顯示，KerK 酵素對 EDTA 是否具有較高耐性，或者將添加之 EDTA 濃度降低後，KerK 之活性減少幅度較小，因此未來在應用上可注意或調整 EDTA 之濃度，以期獲得 KerK 之較高應用效益。

五、添加介面活性劑對酵素應用之探討

實驗中挑選一般市售肥皂、TritonX-100、Tween 20 及 PEG-3350 等常見介面活性劑成分進行添加，結果顯示除肥皂及 Triton X-100 降低酵素活性外，Tween 20 及 PEG-3350 對酵素活性有正向影響，目前已有研究指出由 *B. pumilus* K9 產生之羽毛分解酵素活性不受介面活性劑或介面活性劑等成分影響，可共同作用並增加額外清潔效果，研究中利用 pGEM-T 載體表現酵素，同時提及其產生之酵素在 pH 3.0-10.0 及 20-70°C 之間活性均維持穩定，且可維持至少 5 小時作用時間，實驗中加入介面活性劑 Triton X-100、Tween 20、Tween 80 等後均對活性有提升

之效果 (Gong et al., 2015)，而本論文中使用 Tween 20 及 PEG-3350 也發現對酵素活性產生正向影響，提升將近 10 及 20% 之酵素活性，針對介面活性劑性質及結構等探討，其中 Triton X-100 屬於 polyethylene glycol 類，PEG-3350 為 polyoxyethylene glycol 類，Tween 20 則屬於 polysorbate 類 (Salager, 2002)，Tween 20 及 PEG-3350 對酵素活性有正向影響，原因可能為此兩種成分之結構中，一端有 -OH 基或是此幾種成分在性質上有明確差異，而實驗中所設定之反應溫度及酸鹼值為酵素反應時間最短條件，比照 Sigma 之產品物質安全資料表後發現，Triton X-100 熔點為 6°C 而 PEG-3350 的熔點約 60°C，而此三種介面活性劑又各自有適合作用酸鹼值，因此推測可能是各藥劑本身性質而影響酵素反應，將此三種介面活性劑結構整理成如附錄二，可比較結構上之差異。

六、kerk 基因

於 1984 年時，已有文獻針對 *B. amyloliquefaciens* 之 protease 進行探討，研究中提到 *B. amyloliquefaciens* 含有多中 alkaline 及 neutral protease，作者篩選兩種酵素基因 *apr* 及 *npr*，而將 *apr* 比對後發現，*apr* 之基因序列與 *kerk* 高度相同，實驗中將此基因轉殖到 *B. subtilis* 表現蛋白 (Vasantha et al., 1984)，其結果亦顯示 *apr* 蛋白大小約為 30 kDa，與本實驗中 *kerk* 大小相仿，*kerk* 除降解酪蛋白之功能外，在本實驗中亦得知其降解羽毛之能力，且本實驗將此酵素加入 His-Tag 標記，建立純化及生產之系統，結果亦顯示經管柱流洗後，酵素萃取液之純度提高，可提供未來於生產高品質純化蛋白質之參考。

kerk 基因胺基酸序列在 2015 年發表於 GenBank 資料庫中，在 1995 年已有研究針對其第 37 到 108 胺基酸序列進行研究並解析此段序列之結構 (Gallagher et al., 1995) 及 2003 年亦有研究針對同菌種但不同來源之相同酵素進行活性測試 (Peng, et al., 2003)，研究中提出此酵素可降解線狀蛋白質，但未提及具降解羽毛之功能，亦未設計其他環境測試酵素活性，對此酵素可分解羽毛之功能並未有進

一步探討，此酵素含有 382 個胺基酸序列，雖預測其大小為 46 kDa，但其中第 1 到 36 個胺基酸為 signal peptide，僅為使酵素釋放到胞外之功能，並非酵素構成之一，第 37 到 107 個胺基酸序列為 propeptide，其功能為協助酵素摺疊而產生活性，於酵素摺疊完畢後，自動截切，因此最終也非酵素構成，因此酵素之實際大小應小於 46 kDa，預估為 28.8 kDa，從上清液粗萃蛋白進行電泳結果，並與 marker 比對後，可發現接近 48 到 35 kDa 位置具有兩條條帶，在 28 kDa 左右位置亦有條帶，其中最有可能位酵素蛋白的應是接近 28 kDa 的條帶，而藉由 Ni-NTA 管柱純化後發現，在 28 kDa 大小亦偵測到條帶，佐證 *B. amyloliquefaciens* Ker103 含降解羽毛之酵素基因 *kerk*。

而本研究中經定序後發現，於第 29 及 180 個胺基酸序列與前人研究序列相異，前人研究中，第 29 個胺基酸為 glutamine，第 180 個胺基酸為 alanine，而本研究中定序後之序列第 29 個胺基酸為 histidine，第 180 個胺基酸為 valine，有兩種胺基酸相異，但實驗結果來看，顯示酵素活性不具差異。

結論



目前對於微生物產生之羽毛分解酵素已有多篇深入之研究，使用微生物降解之方式具有減少使用化學藥劑降解之汙染及降解之產物再利用等優點，而研究中除了針對酵素性質探討之外，亦探討酵素在其他方面之功能，依酵素性質不同，所作用形式亦不同，主要皆打斷多肽鏈之間鍵結並水解成更小分子之胺基酸，而蛋白質類之物質在自然界中普遍存在，因此羽毛分解酵素除降解羽毛外，應有更多功能，因此羽毛分解酵素相當具有研究價值。

B. cereus Ker103 及 *B. amyloliquefaciens* Ker103 產生之羽毛分解酵素對酸鹼及溫度均具有良好耐性，顯示酵素在應用上之可行性，但基於 *B. cereus* Ker103 具有病原性且其產生之 Vpr 酵素易形成內含體，一般方法不易生產並純化，在應用上效能低且問題克服不易，所以本實驗主要針對 *B. amyloliquefaciens* Ker103 深入探討。

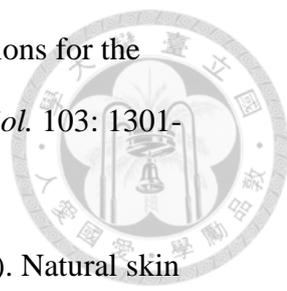
本研究中以大腸桿菌 BL21 生產酵素並加上 His-tag 進行純化，雖純化效果良好，但研究中培養體積僅限於 250mL，在生產規模上遠小於實際工業之應用規模，因此未來可再放大生產體積，增加產量，而亦可對培養條件進行調整，增加生產之蛋白質濃度，更具應用潛力，而 *B. amyloliquefaciens* 此菌種亦有促進植株生長之特性，均具可在生技工業或農業上利用之優點，未來可利用羽毛及此菌添加於土壤中，將羽毛轉化為碳氮營養源，作為肥料應用，因此本研究期望提供較完整之酵素特性及應用範圍，作為開發利用之參考。

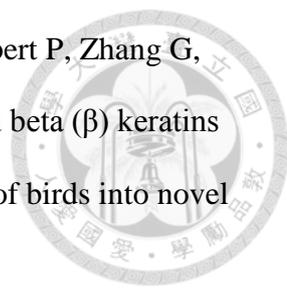
參考文獻

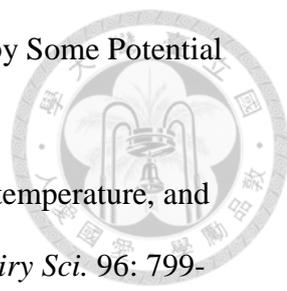


1. LATEEF A, Oloke JK, Kana EBG, Sobowale BO, Ajao SO, and Bello BY. (2010). Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 64: 162-165.
2. Abdel-Razek AS, Refaat BM, Abdel-Shakour EH, Zaher R, and Mohamed MK. (2015). Biodegradation of Phenol by *Microbacterium terregenes* Isolated from oil field norm soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 63-69.
3. Ghosh A, Chakrabarti K, and Chattopadhyay D. (2009). Cloning of feather-degrading minor extracellular protease from *Bacillus cereus* DCUW: dissection of the structural domains. *Microbiology* 155: 2049-2058.
4. Acda M. (2010). Waste Chicken Feather as Reinforcement in Cement-Bonded Composites. *Philipp J Sci.* 139: 161-166.
5. Amina H, Boudjema S, Bassem J, Soumaya H, Bilal K, Mokhtar B, Abdelmalek B, and Ali L. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J. Biosci. Bioeng.* 117: 413-421.
6. Muga A, Arrondo JLR., Bellon T, Sancho J, and Bernabeu C. (1993). Structure and Functional Studies on the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with β -Galactosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 451-457.
7. Selvam B, and Vishnupriya K. (2012). Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. *Int J Pharm Biol Arch.* 3: 267-275.

- 
8. Bhuyan AK. (2009). On the Mechanism of SDS-Induced Protein Denaturation. *Biopolymers*, 93: 186-199.
 9. Bottone J.E. (2010). *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 382-399.
 10. Williams CM, Richter CS, Mackenzie JM, and Shih CH. (1990). Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1509-1516.
 11. Welker NE, and Campbell LL. (1967). Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 94: 1124-1131.
 12. Usova VE, and Ekiksson S. (1997). The effects of high salt concentrations on the regulation of the substrate specificity of human recombinant deoxycytidine kinase. *Eur. J. Biochem.* 248: 762-766.
 13. Iruolaje FO, Ogbeba J, Tula MY, Ijebor JA, and Dogo BA. (2016). Isolation and Identification of Keratinolytic Bacteria that Exhibit Feather-degrading Potentials. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 5: 1-9.
 14. Hasan F, Shah AA, Javed S, and Hameed A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 4836-4844.
 15. Taylor G., Hoare M., Gray DR, and Marston FAO. (1986). Size and Density of Protein Inclusion Bodies. *Biotechnology* 4: 553-557.
 16. Potvin G, Ahmad A, and Zhang Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem. Eng. J.* 64: 91-105.
 17. Gong J, Wang Y, Zhang D, Li H, Zhang X, Zhang R, Lu Z, Xu Z, and Shi J. (2015). A Surfactant-stable *Bacillus pumilus* K9 α -Keratinase and Its Potential Application in Detergent Industry. *Chem. Res. Chin. Univ.* 31: 91-97.
 18. Radha S, and Gunasekaran P. (2007). Cloning and expression of keratinase gene

- 
- in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1301-1311.
19. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, and Finkel P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flor. *Int J Cosmet Sci.* 28: 359-370.
20. Bragulla HH, and Homberger DG. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anat.* 214, 516-560.
21. Lin HH, Yin LJ, and Jiang ST. (2009). Cloning, Expression, and Purification of *Pseudomonas aeruginosa* Keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3) pLysS Expression System. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3506-3511.
22. Nagal S, and Jain PC. (2010). Feather Degradation by Strains of *Bacillus* Isolated from Decomposing Feathers. *Braz. J. Microbiol.* 41: 196-201.
23. Warrent CJ, and Cheatum GS. (1966). Effect of Neutral Salts on Enzyme Activity and Structure. *Biochemistry* 5: 1702-1707.
24. Qiao JQ, Wu HJ, Huo R, Gao XW, and Borriss R. (2014). Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. *Chem. biol. technol. agric.* 1: 1-14.
25. Kannappan S and Bhaarathi D. (2012). Exploration on Amino Acid Content and Morphological Structure in Chicken Feather Fiber. *JTATM.* 7: 1-6.
26. Nwaogu LA, Onyeze GOC, and Nwabueze RN. (2008). Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Biotechnol.* 7(12): 1939-1944.
27. Cortezi M, Contiero J, Lima de CJB, Lovaglio RB, and Monti R. (2008). Characterization of a Feather Degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* Protease: A New Strain. *WJAS.* 4, 648-656.

- 
28. Greenwold MJ, Bao W, Jarvis DE, Hu H, Li C, Thomas M, Gilbert P, Zhang G, and Sawyer RH. (2014). Dynamic evolution of the alpha (α) and beta (β) keratins has accompanied integument diversification and the adaptation of birds into novel lifestyles. *BMC Evol. Biol.* 14: 249-265.
29. Mozammel H., Khandaker AZS, Hiroko K, and Tatsuji S. (2005). Keratinolytic Activity of Some Newly Isolated *Bacillus* species. *J. Biol. Sci.* 5: 193-200.
30. Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI, and Kim KS. (2015). Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 872-880.
31. Molyneux GS. (1959). The digestion of Wool by a keratinolytic *Bacillus*. *Aust J Biol Sci.* 12: 274-281.
32. Vasantha N, Thompson DL, Rhodes C, Banner C, Nagle J, and Filpula D. (1984). Genes for Alkaline Protease and Neutral Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* Contain a Large Open Reading Frame Between the Regions Coding for Signal Sequence and Mature Protein. *J. Bacteriol.*, 159: 811-819.
33. Jeevana Lakshmi P, Kumari Chitturi Ch M, and Lakshmi VV. (2013). Efficient Degradation of Feather by Keratinase Producing *Bacillus* sp. *Int J Microbiol.* 2013: 1-7.
34. Mokrejs P, Svoboda P, Hrcirik J, Janacova D, and Vasek V. (2010). Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Manag Res.* 1-8.
35. Talboys JP, Owen WD, Healey RJ, Withers JAP, and Jones LD. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol.* 14: 51.
36. Fraser RDB, Macrae TP, Parry DAD, and Suzuki E. (1971). The structure of feather keratin. *Polymer* 12: 35-57.

- 
37. Sapna R, and Yamini V. (2011). Study of Keratin Degradation by Some Potential Bacteriol Isolates from Soil. *J. Soil Sci.* 1: 01-03.
38. Ye R, and Harte F. (2013). Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *J. Dairy Sci.* 96: 799-805.
39. Bano S, Lateef M, Iqbal S, Naqvi B, and Iqbal L. Role of Protein Denaturing Agents and Edta on α -Amylase Activity from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *IJPCBS.* 4: 411-415.
40. Salager JL. (2002). *Surfactants Types and Uses* (2^{ed.}): Laboratorio FIRP, Escuela de Ingenieria Quimica, Universidad de Los Andes, and Mérida 5101 Venezuela.
41. Cho SJ, Oh SH, Pridmore RD, Juillerat MA, and Lee CH. (2003). Purification and Characterization of Proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Traditional Soybean Fermentation Starter. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7664-7670.
42. Cheng SW, Hu HM, Shen SW, Takagi H, Asano M, and Tsai YC. (1995). Production and Characterization of Keratinase of a Feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2239-2245.
43. Gopinath CBS, Anbu P, Lakshmipriya T, Tang TH, Chen Y, Hashim U, Ruslinda AR, and Arshad MK. (2015). Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *Biomed Res Int.* 2015: 1-10.
44. Singh SM, and Panda AK. (2005). Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 99: 303-310.
45. Sivakumar T, Shankar T, Vijayabaskar P, and Ramasubramanian V. (2011). Statistical optimization of keratinase production by *Bacillus cereus*. *GJBB.* 6: 197-202.
46. Paul T, Das A, Halder KS, Pati RR, Mandal A, Dasmohapatra PK, and Mondal KC. (2013). Biochemical and structural characterization of a detergent stable

- alkaline serine keratinase from *Paenibacillus Woosongensis* TKB2: A potential additive for laundry detergent. *Waste Biomass Valorization* 5: 563-575.
47. Herskovits TT, Gadegbeku B, and Jaillet H. (1970). On the structural stability and solvent denaturation of proteins *J. Biol. Chem.* 245: 2588-2598.
48. Gallagher T, Gilliland G, Wang L, and Bryan P. (1995). The prosegment-subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific 'foldase'. *Structure* 3: 907-914.
49. Matikevičienė V, Masiliūnienė D, and Grigiškis S. (2009). Degradation of keratin containing waste by bacteria with keratinolytic activity. Paper presented at the environment technology resources proceedings of the 7th international scientific and practical conference.
50. Williams CM. (2013). Poultry waste management in developing countries. *Poultry Development Review*, 46-50.
51. Bergfeld FW, Belsito VD., Hill AR, Klaassen DC., Liebler CD, Marks GJ, Shank CR, Slaga JT, and Snyder WP. (2015). *Safety Assessment of Inorganic Hydroxides as Used in Cosmetics*. Retrieved from Washington, DC
52. Lin X, Kelemen WD, Miller SE, and Shih CH. (1995). Nucleotide Sequence and Expression of kerA, the Gene Encoding a Keratinolytic Protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1469-1475.
53. Peng Y, Huang Q, Zhang Rh, and Zhang YZ. (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol.* 134: 45-52.
54. Zhang X. (2012). Applying the mutation of *Bacillus subtilis* and the optimization of feather fermentation medium to improve Keratinase activity. *Adv Biol Chem.* 2: 64-69.

55. *Risk Assessment Guidance for Enzyme-Containing Products*. (2005).

Washington,DC: The Soap and Detergent Association.

56. 陳明汝、鍾之儀、黃如婕. (2010). 角蛋白分解酵素應用於非反芻動物飼料之研究. *動物與水產生技*. 22: 21-29.





圖表集

表一、本論文使用之菌株

Table 1. Strains used in this study

Strains	Description	Source of reference
<i>Bacillus cereus</i> strain Ker103	Wild type	This study
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Strain Ker103	Wild type	This study
<i>Pichia pastoris</i> strain X-33	Wild type	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	Stratagene
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i>	Stratagene

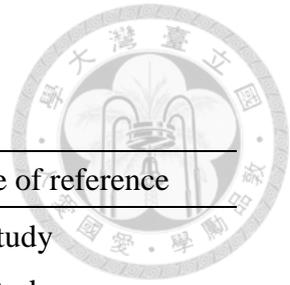


表 二、本論文使用之質體

Table 2. Plasmid used in this study

Plasmid	Description	Source of reference
pET21a	<i>ori</i> (PBR322), T7 promoter, <i>amp^r</i>	Novagen
pPICZ α A	P _{AOX1} , α -factor signal sequence, <i>Zoe^R</i> ,	Invitrogen

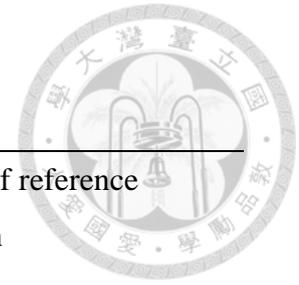
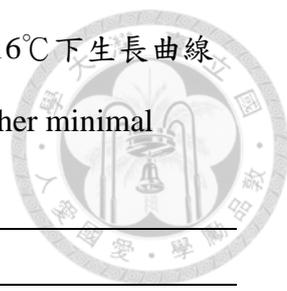


表 三-1、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於羽毛微量培養基 16°C 下生長曲線

Table 3-1. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under 16°C.

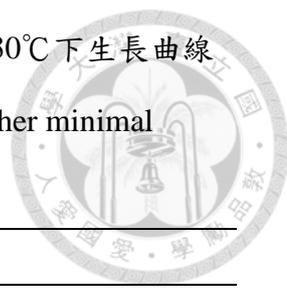


Hours	OD ₆₀₀
0	0.007 ± 0.000
4	0.012 ± 0.001
8	0.037 ± 0.001
12	0.084 ± 0.003
16	0.254 ± 0.008
20	0.641 ± 0.013
24	0.749 ± 0.005
28	0.755 ± 0.004
32	0.767 ± 0.007

Mean ± standard deviation (n=9)

表 三-2、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於羽毛微量培養基 30°C 下生長曲線

Table 3-2. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under 30°C.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.007 ± 0.000
4	0.019 ± 0.001
8	0.057 ± 0.002
12	0.477 ± 0.010
16	0.804 ± 0.008
20	0.996 ± 0.005
24	1.078 ± 0.013
28	1.076 ± 0.012
32	1.069 ± 0.008

Mean ± standard deviation (n=9)

表 三-3、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於羽毛微量培養基 45°C 下生長曲線

Table 3-3. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under 45°C.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.014 ± 0.001
8	0.040 ± 0.001
12	0.101 ± 0.002
16	0.403 ± 0.006
20	0.810 ± 0.003
24	0.875 ± 0.009
28	0.893 ± 0.005
32	0.882 ± 0.007

Mean ± standard deviation (n=9)

表 四-1、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於 pH 5 羽毛微量培養基生長曲線

Table 4-1. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under pH 5.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.016 ± 0.000
8	0.033 ± 0.001
12	0.106 ± 0.004
16	0.423 ± 0.012
20	0.687 ± 0.010
24	0.814 ± 0.005
28	0.809 ± 0.004
32	0.808 ± 0.002

Mean ± standard deviation (n=9)

表 四-2、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於 pH 6 羽毛微量培養基生長曲線

Table 4-2. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under pH 6.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.020 ± 0.001
8	0.059 ± 0.002
12	0.202 ± 0.004
16	0.681 ± 0.006
20	0.868 ± 0.007
24	0.996 ± 0.010
28	0.994 ± 0.013
32	0.989 ± 0.009

Mean ± standard deviation (n=9)

表 四-3、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於 pH 7 羽毛微量培養基生長曲線

Table 4-3. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under pH 7.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.029 ± 0.001
8	0.086 ± 0.002
12	0.261 ± 0.007
16	0.902 ± 0.007
20	1.080 ± 0.025
24	1.100 ± 0.007
28	1.088 ± 0.008
32	1.073 ± 0.009

Mean ± standard deviation (n=9)

表 四-4、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於 pH 8 羽毛微量培養基生長曲線

Table 4-4. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under pH 8.



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.274 ± 0.001
8	0.083 ± 0.001
12	0.247 ± 0.003
16	0.745 ± 0.012
20	1.010 ± 0.028
24	1.060 ± 0.008
28	1.048 ± 0.007
32	1.027 ± 0.020

Mean ± standard deviation (n=9)

表 四-5、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於 pH 9 羽毛微量培養基生長曲線

Table 4-5. The growth curve of *B. amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium under pH 9



Hours	OD ₆₀₀
0	0.008 ± 0.000
4	0.025 ± 0.001
8	0.075 ± 0.001
12	0.212 ± 0.004
16	0.636 ± 0.011
20	0.880 ± 0.006
24	0.949 ± 0.005
28	0.936 ± 0.007
32	0.919 ± 0.016

Mean ± standard deviation (n=9)

表 五、*Bacillus cereus* Ker103 菌體粗萃酵素於不同酸鹼值下環境之 OD₅₉₅ 吸光值
及相對活性



Table 5. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different pH of

Bacillus cereus Ker103 crude enzyme

pH	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
3	0.322 ± 0.034	63.10
4	0.376 ± 0.067	73.53
5	0.406 ± 0.053	79.53
6	0.458 ± 0.021	89.43
7	0.478 ± 0.022	93.48
8	0.512 ± 0.037	100.0
9	0.440 ± 0.021	85.91
10	0.390 ± 0.057	76.27

Mean ± standard deviation (n=9)

表 六-1、*Bacillus cereus* Ker103 菌體粗萃酵素於不同溫度下反應 1 小時之 OD₅₉₅
吸光值及相對活性



Table 6-1. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different
temperature of *Bacillus cereus* Ker103 crude enzyme for 1 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
20	0.245 ± 0.011	42.18
30	0.340 ± 0.009	58.52
40	0.406 ± 0.005	69.75
50	0.582 ± 0.002	100.0
60	0.395 ± 0.005	67.85
70	0.287 ± 0.004	49.40

Mean ± standard deviation (n=9)

表 六-2、*Bacillus cereus* Ker103 菌體粗萃酵素於不同溫度下反應 12 小時之 OD₅₉₅
吸光值及殘餘活性



Table 6-2. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different
temperature of *B. cereus* Ker103 crude enzyme for 12 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Residual activity (%)
20	0.178 ± 0.087	30.66
30	0.289 ± 0.076	49.63
40	0.368 ± 0.071	63.33
50	0.456 ± 0.082	78.40
60	0.296 ± 0.062	50.83
70	0.161 ± 0.015	27.74

Mean ± standard deviation (n=9)

表 七、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 菌體粗萃酵素於不同酸鹼值下環境之
OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 7. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different pH of

Bacillus amyloliquefaciens Ker103 crude enzyme

pH	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
3	0.190 ± 0.007	30.32
4	0.317 ± 0.039	50.53
5	0.372 ± 0.027	59.31
6	0.480 ± 0.070	76.60
7	0.627 ± 0.110	100.0
8	0.433 ± 0.022	69.15
9	0.036 ± 0.014	57.45
10	0.237 ± 0.011	37.77

Mean ± standard deviation (n=9)

表 八-1、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 菌體粗萃酵素於不同溫度下反應 1 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 8-1. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different temperature of *B. amyloliquefaciens* Ker103 crude enzyme for 1 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
20	0.107 ± 0.005	38.09
30	0.173 ± 0.005	61.90
40	0.193 ± 0.004	69.04
50	0.223 ± 0.004	79.73
60	0.280 ± 0.006	100.0
70	0.243 ± 0.003	86.90

Mean ± standard deviation (n=9)

表 八-2、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 菌體粗萃酵素於不同溫度下反應 12 時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 8-2. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different temperature of *B. amyloliquefaciens* Ker103 crude enzyme for 12 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
20	0.086 ± 0.009	68.42
30	0.110 ± 0.008	86.84
40	0.127 ± 0.012	100.0
50	0.120 ± 0.008	94.74
60	0.100 ± 0.008	78.95
70	0.120 ± 0.008	94.74

Mean ± standard deviation (n=9)

表 九、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 管柱流洗後酵素於不同酸鹼環境反應 1 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 9. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different pH of

B. amyloliquefaciens Ker103 purified enzyme for 1 hr.

pH	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
3	0.087 ± 0.027	13.9
4	0.220 ± 0.019	35.29
5	0.210 ± 0.019	33.69
6	0.363 ± 0.063	58.28
7	0.513 ± 0.037	82.35
8	0.520 ± 0.074	83.42
9	0.623 ± 0.023	100.0
10	0.493 ± 0.023	79.14

Mean ± standard deviation (n=9)

表 十-1、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 管柱流洗後酵素於不同溫度環境反應
1 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 10. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different
temperature of *B. amyloliquefaciens* Ker103 purified enzyme for 1 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
20	0.233 ± 0.050	30.17
30	0.493 ± 0.078	63.79
40	0.520 ± 0.079	67.24
50	0.540 ± 0.028	69.83
60	0.773 ± 0.119	100.0
70	0.553 ± 0.065	71.55

Mean ± standard deviation (n=9)

表 10-2、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 管柱流洗後酵素於不同溫度環境反 12 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 10-2. Relative activity and absorbance under 595 nm incubate in different temperature of *B. amyloliquefaciens* Ker103 purified enzyme for 12 hr.

Temperature	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
20	0.237 ± 0.020	47.33
30	0.293 ± 0.110	58.67
40	0.327 ± 0.022	65.33
50	0.500 ± 0.062	100.0
60	0.370 ± 0.051	74.0
70	0.440 ± 0.046	88.0

Mean ± standard deviation (n=9)

表 十一、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 管柱流洗後酵素在添加不同化藥藥劑後，反應 1 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 11. Relative activity and absorbance under 595 nm after adding different compounds of *B. amyloliquefiens* Ker103 purified enzyme for incubating 1 hr.

Compounds	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
EDTA	0.158 ± 0.0113	61.73
EtOH	0.034 ± 0.0075	13.33
NaCl	0.050 ± 0.0141	19.48
SDS	0.014 ± 0.0042	5.61
Control	0.214 ± 0.0411	100.0

Mean ± standard deviation (n=9)

表 十二、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 管柱流洗後酵素在添加不同介面活性劑成分後，反應 1 小時之 OD₅₉₅ 吸光值及相對活性

Table 12. Relative activity and absorbance under 595 nm after adding different detergent of *B. amyloliquefaciens* Ker103 purified enzyme for incubating 1 hr.

Deteregnt	OD ₅₉₅	Relative activity (%)
Soap	0.124 ± 0.0172	48.33
Triton X-100	0.177 ± 0.0259	82.53
Tween 20	0.238 ± 0.0344	111.3
PEG-3350	0.230 ± 0.0225	107.5
Control	0.214 ± 0.0411	100.0

Mean ± standard deviation (n=9)

表 十三、本實驗所用之引子對

Table 13. Primers used in this study

Primers	DNA sequence (5'→3')	Description
16s rDNA F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	a
16s rDNA R	CGGTTACCTTGTTACGACTT	a
ppic vpr F	<u>GGGGAATTCATGAAAAAACTACA</u> TCTACACTAT	b
ppic vpr R	<u>GGGGGTCTAGATTATTTCACTTCTAA</u> A TTAACAG	b
Kpn1 forward vpr	<u>GGGGTACCATGAAAAAACTACATC</u> TACTACTAT	b
Sac2 reverse vpr	<u>GCGCCCGCGGTTATTTCACTTCTAAA</u> T TAACAG	b
BamH1 forward vpr	<u>GGGGATCCATGAAAAAACTACATC</u> TA CACTAT	c
Xho1 vpr reverse	<u>GGGGCTCGAGTTACACCACCACCA</u> <u>CCACC</u> ACTTTCACTTCTAAATTAAC AG	c
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	a
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	a
HBLA-F	GTGCAGATGTTGATGCCGAT	d
HBLA-R	ATGCCACTGCGTGGACATAT	d
L2-F	AATGGTCATCGGAACTCTAT	d
L2-R	CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	d
nheB-F	CTATCAGCACTTATGGCAG	d
nheB-R	ACTCCTAGCGGTGTTCC	d
nheC-F	CGGTAGTGATTGCTGGG	d
nheC-R	CAGCATTCGTACTIONGCCAA	d
hlyA-F	CGTGAGAAAGCAAAACGC	d
hlyA-R	TCAACAGAACTGGAGAATGAT	d
panB forward	ATGCCTGAAGTAACCCTGAC	d
panB reverse	CATGCGCTGAATCCGTGTTTC	d



kerK gene forward	<u>GGGGGTACCGTGAGAGGCAAAAAG</u>	e
	GTA	
kerK gene reverse	<u>GGGCCGCGGTTACTGAGCTGCCGCC</u>	e
	TG	
kerk F pet21a	<u>GGGGGATCCGTGAGAGGCAAAAAG</u>	f
	GTA	
kerk R pet21a	<u>GGGGCTCGAGTTACACCACCACCA</u>	f
	CCACCACCTGAGCTGCCGCCTG	
kerK pET F his tag	<u>GGGGGATCCGTGCACCACCACCAC</u>	f
	CACCACAGAGGCAAAAAGGTA	
kerK pET R	<u>GGGGCTCGAGTTACTGAGCTGCCGC</u>	f
	CTG	
kerk Forward	<u>GGGGGATCCATGCACCACCACCAC</u>	f
pET21a ATG	CACCACAGAGGCAAAAAGGTA	

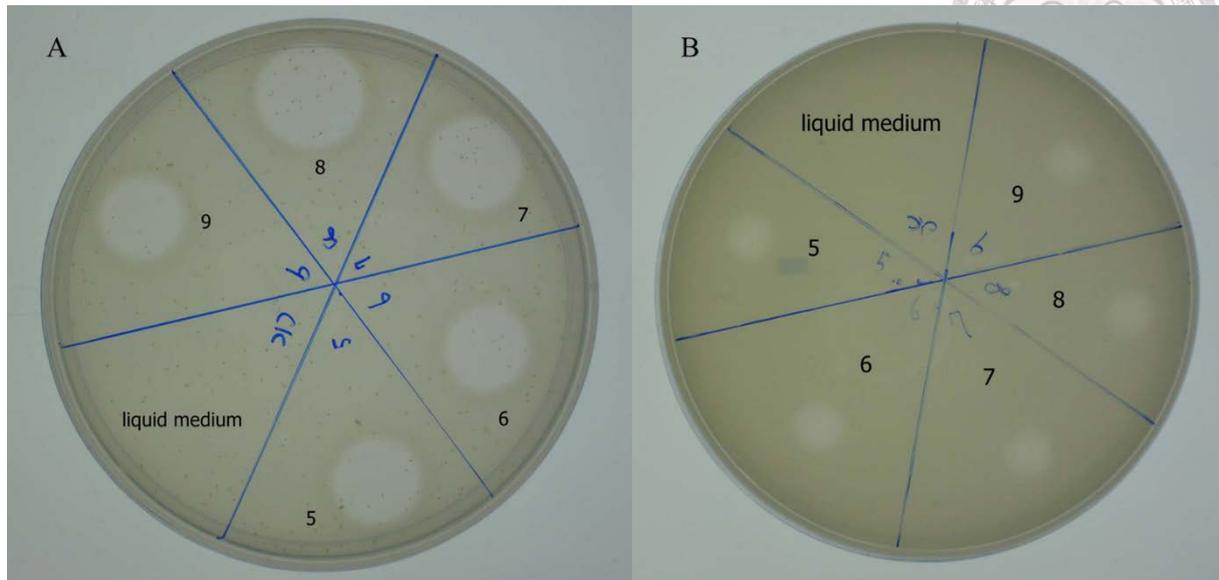


- a. DNA used for sequencing
- b. *vpr* insert into pPICZ α A
- c. *vpr* insert into pET21a
- d. virulence factor of *Bacillus cereus*
- e. kerk insert into pPICZ α A
- f. kerk insert into pET21a



圖 一、將在酪蛋白培養基上產生降解圈之微生物挑選單一菌落，單獨繼代至酪蛋白培養基上之生長情形。

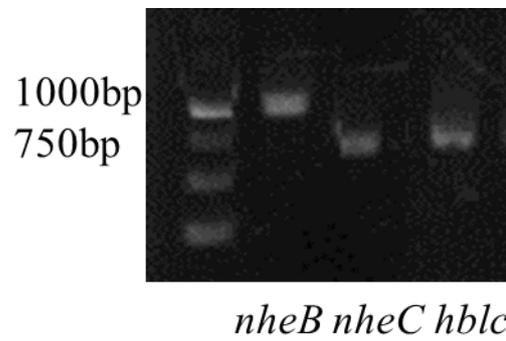
Figure 1. Result of subculture single colony with transparent circle from casein medium.



圖二、*B. cereus* Ker103 及 *B. amyloliquefaciens* Ker103 接種於不同酸鹼環境之羽毛微量培養基中誘導酵素表現，收取上清液後滴於酪蛋白培養基上，觀察降解情形。

(A)為 *B. cereus* Ker103 之粗萃酵素降解情形；(B)為 *B. amyloliquefaciens* Ker103 之粗萃酵素降解情形。

Figure 2. After incubating *B.cereus* Ker103 and *B.amyloliquefaciens* Ker103 in feather minimal medium with different pH. The formation of permeabilization ring from collection of supernatant. (A)The formation of permeabilization ring of supernatant produced from *B. cereus* Ker103. (B)The formation of permeabilization ring of supernatant produced from *B. amyloliquefaciens* Ker103.



圖三、*Bacillus cereus* 經 PCR 偵測，得知其含有溶血毒素之基因，其中 *hblc* 為 hemolytic enterotoxin，*nheB* 及 *nheC* 為 nonhemolytic enterotoxin complexes 之 subunit。

Figure 3. Detection of virulence factor of *Bacillus cereus* Ker103. The result indicates that *hblc* is hemolytic enterotoxin, *nheB* and *nheC* are nonhemolytic enterotoxin complexes subunit.

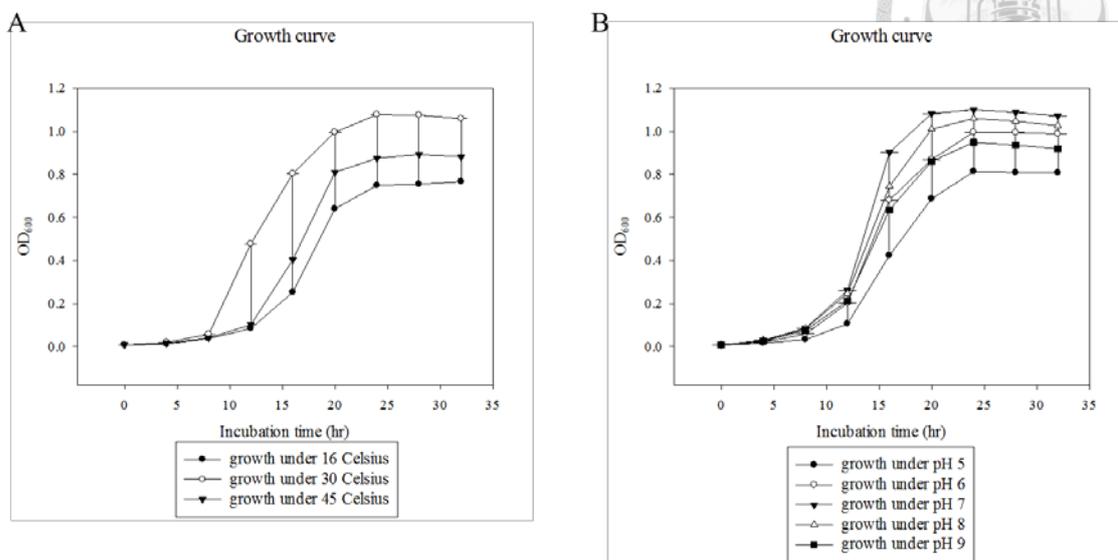


圖 四、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 於不同溫度及不同酸鹼值下之生長情形，

實驗中以微量培養基並添加羽毛作為碳氮源，培養 32 小時後之結果。

(A) 不同溫度下生長結果；(B) 不同酸鹼值下生長結果。

Figure 4. The growth curve of *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 in different pH and temperature after 32 hours. Feather was added as carbon and nitrogen source.

(A)The growth curve in different temperature. (B)The growth curve in different pH.

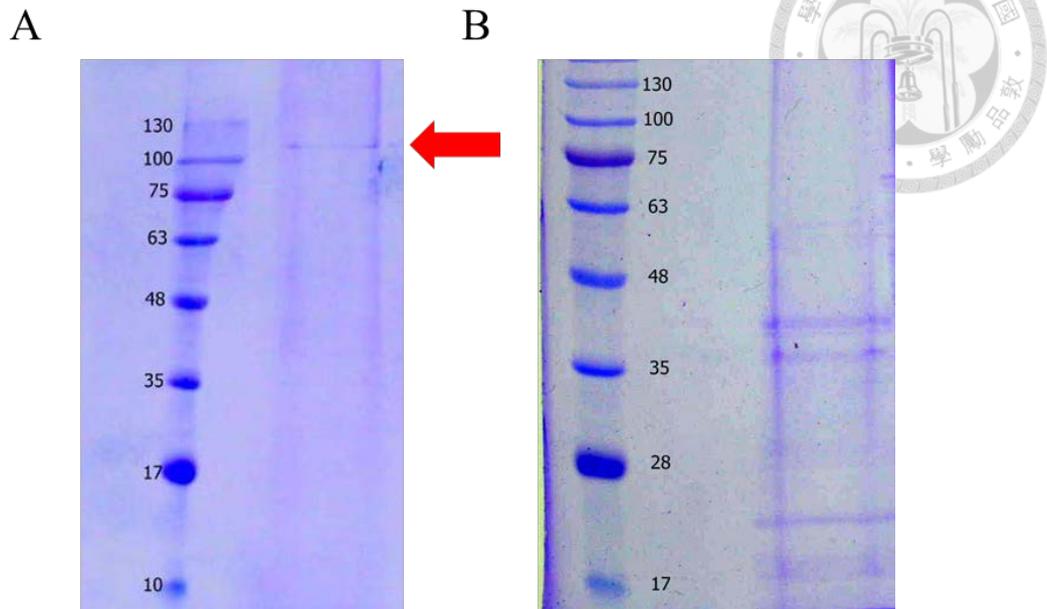
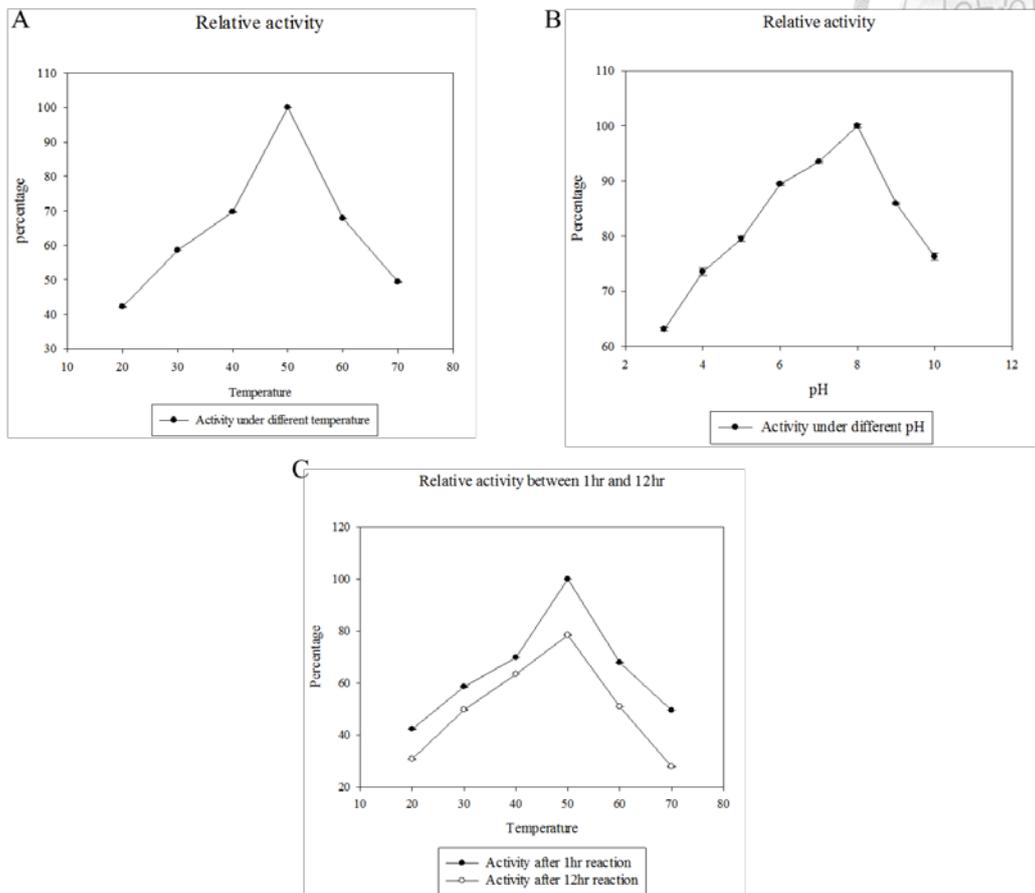


圖 五、將菌體培養於羽毛培養基 24 小時後直接收取上清液進行電泳之結果。

(A)為 *Bacillus cereus* Ker103 *ceruus* 培養後之上清液電泳結果，在 100 kDa 位置有條帶〔箭頭所指處〕；(B) *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 培養後之上清液電泳結果，可看出有三條明顯條帶，其中兩條分別位於為 48-35 kDa 間，及 28-17 kDa 間有一條。

Figure 5. SDS-PAGE of cultural supernatant from minimal medium.

(A) The result of supernatant from *Bacillus cereus* Ker103. Only one band with size 100 kDa is detected. (B) The result of supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103. We found 3 clear bands, two of these bands is located between 48-35 kDa, and the rest one is located under 28 kDa.



圖六、*Bacillus cereus* Ker103 之上清粗萃酵素於 595nm 吸光值下，進行活性分析之結果，並將吸光值換算，縱軸為相對活性百分比，橫軸為反應條件 (A)為酵素於 20-70°C 下反應 1 小時之結果；(B)為酵素分別於 pH 3.0-10.0 之間反應之相對活性值；(C)為將酵素分別至於 20-70°C 下反應 1 小時及 12 小時之結果比較圖。

Figure 6. Relative activity of supernatant from *Bacillus cereus* Ker103 under 595 nm absorbance. Vertical axis represents percentage, and horizontal axis represents reaction condition. (A)The result under 20-70°C after 1 hour incubation (B)The result under pH 3.0-10.0 after 1 hour incubation. (C)Comparison of activity between 1 and 12 hours incubation under 20-70°C.

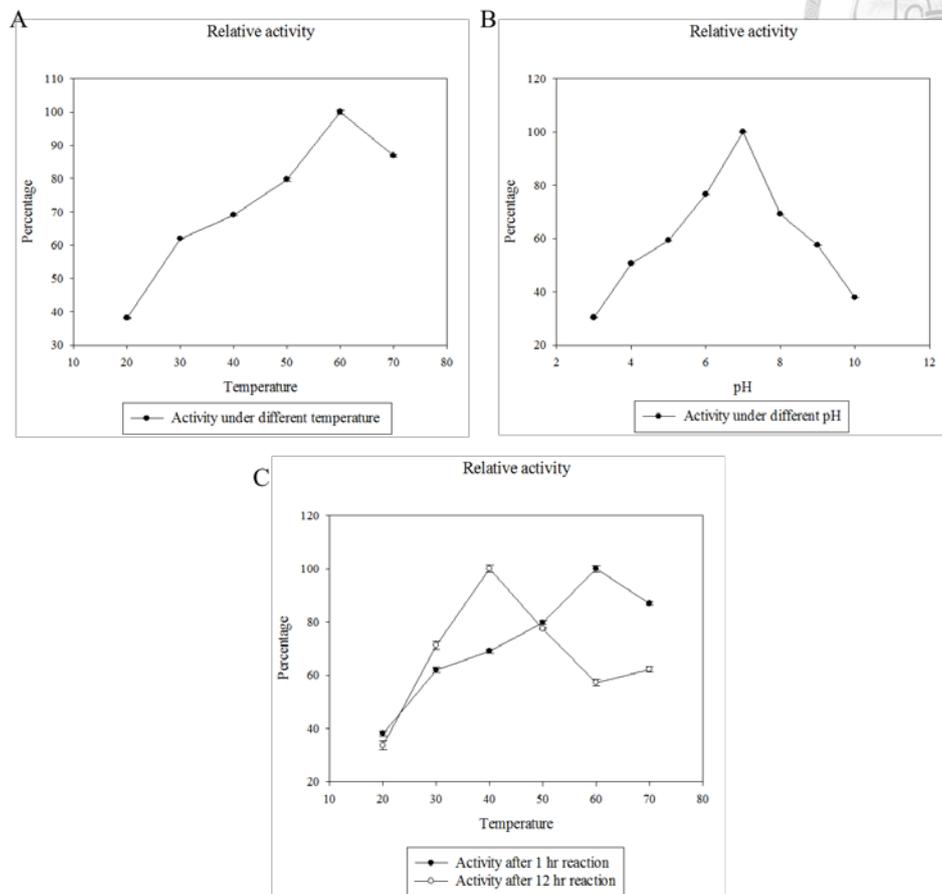
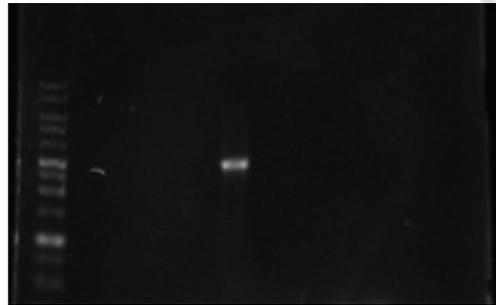


圖 七、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 之上清粗萃酵素於 595nm 吸光值下，測得之活性分析之結果，其中反應 1 小時後測得之活性以百分比呈現，於不同時間點測得之各溫度活性則以活性單位呈現。

(A)不同溫度下之相對活性值；(B)不同酸鹼值下之相對活性值；(C)於不同時間點下各溫度之相對活性。

Figure 7. Relative activity of supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 under 595 nm absorbance. Vertical axis represents percentage, and horizontal axis represents reaction condition. (A)The result under 20-70°C after 1 hour incubation. (B)The result under pH 3.0-10.0 after 1 hour incubation. (C)Comparison of activity between 1 and 12 hours incubation under 20-70°C.

3000 bp →



圖八、設計引子以 PCR 偵測 *Bacillus cereus* Ker103 中 *vpr* 基因之結果，*vpr* 基因大小為 2754 bp，PCR 結果顯示在 3000 bp 位置有條帶，顯示分離得之 *Bacillus cereus* 菌株 Ker103 中具有 *vpr* 基因。

Figure 8. PCR detection of *vpr* gene in *Bacillus cereus* Ker103. The size of detected band is 2754 bp which is *Bacillus cereus* Ker103 *vpr* gene.

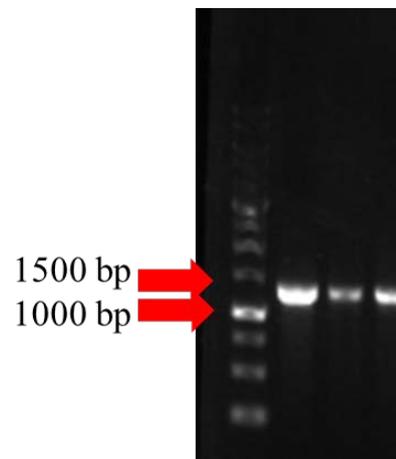


圖 九、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 以 PCR 反應偵測羽毛分解酵素基因 *kerk* 之結果，此三條帶皆為相同反應條件下之結果，PCR 偵測所得之序列應為 *kerk* 基因。

Figure 9. PCR detection of *kerk* gene in *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 with 3 replicas. The result represents that *kerk* gene is detected.

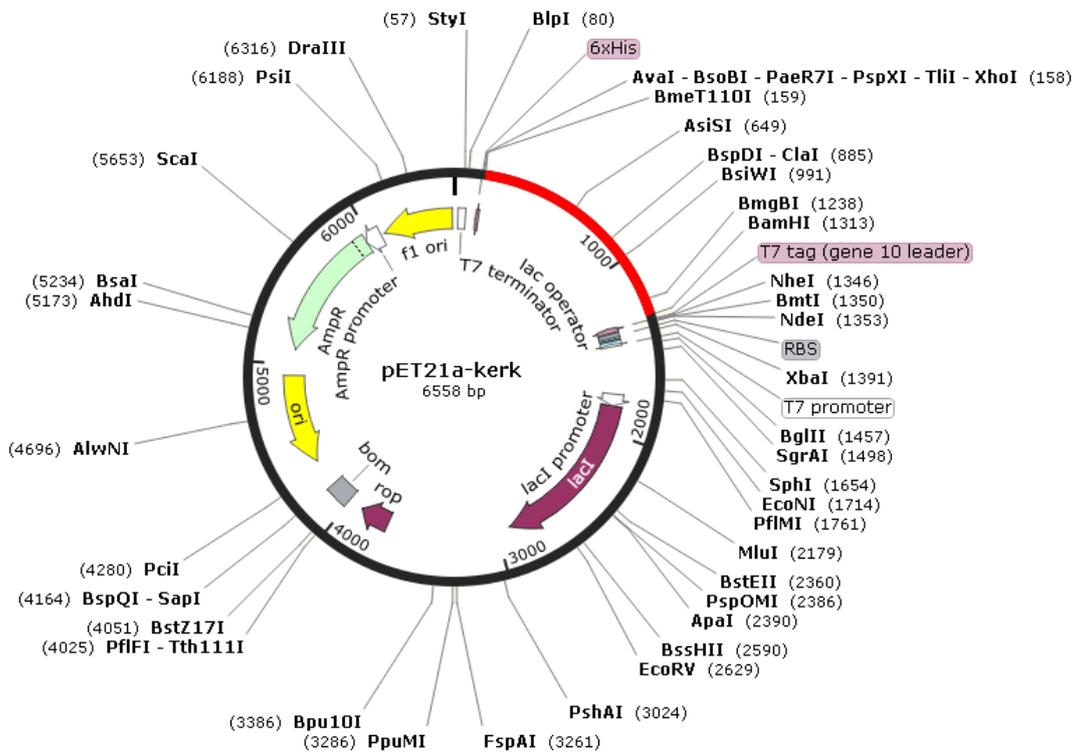


圖 十、利用 snapgene 軟體進行繪圖，pET21a 與 *kerk* 基因之構築，圖中紅色區塊為轉殖基因，質體大小為 6.5 kb。

Figure 10. Illustration of pET21a and *kerk* construct by using snapgene, region in red represents insert. The size of construct is 6.5 kb.

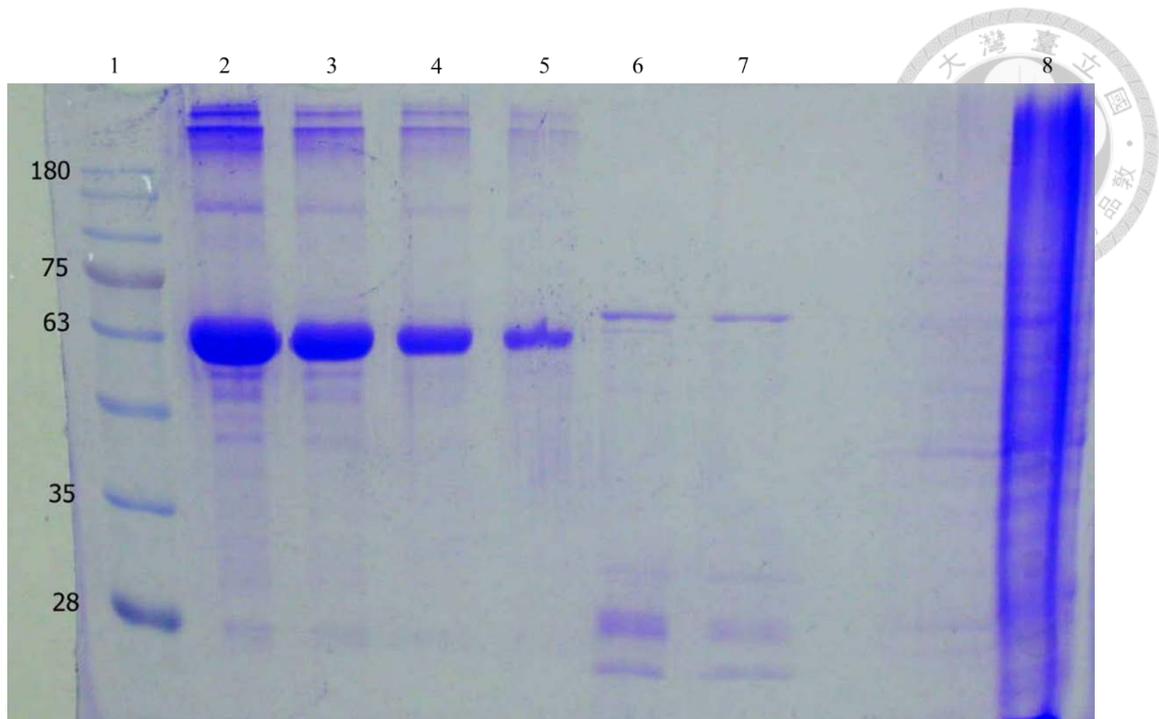


圖 十一、KerK 基因藉由 *E.coli* BL21 大量表現後，以 Ni-NTA 管柱純化後之 SDS-PAGE 結果，從左開始，第一條為 marker，圖片上標記相對蛋白大小，第二條至第五條為不同濃度 BSA，分別為 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL 及 0.125 mg/mL，第六及第七條皆為純化後之蛋白萃取液。

Figure 11. SDS-PAGE of Ni-NTA purification of KerK expressed from *E.coli* BL21.

Lane 1 is marker, .Lane 2 to Lane 5 represents different concentration of BSA, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, and 0.125 mg/mL. Lane 6 and 7 represent the purified enzyme.

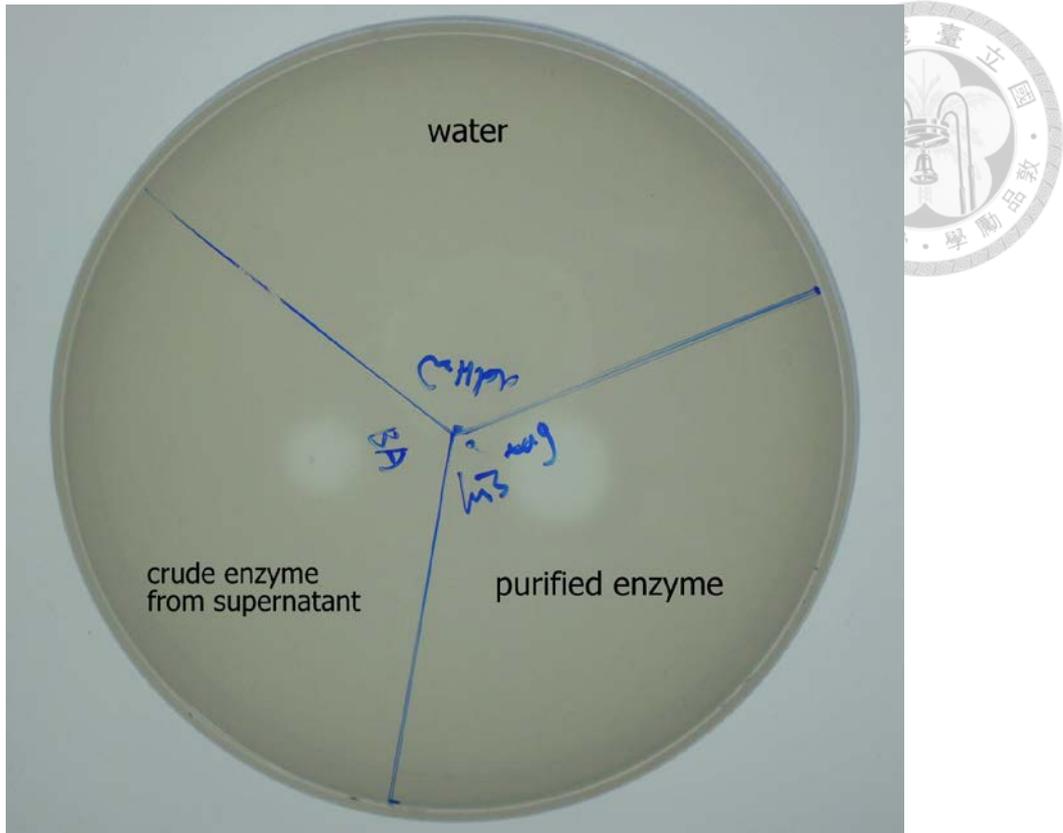


圖 十二、將純化後酵素及菌體產生之粗萃酵素滴於酪蛋白培養基上，產生之降解圈情形，以無菌水作為對照組，圖上標示 crude enzyme 指由菌體產生之粗萃酵素，purified enzyme 為管柱流洗後酵素，其中粗萃酵素及管柱流洗後酵素均產生降解情形。

Figure 12. The formation of permeabilization ring from crude supernatant enzyme and purified enzyme, sterilized water as control. Both of crude enzyme and purified enzyme cause permeabilization ring.

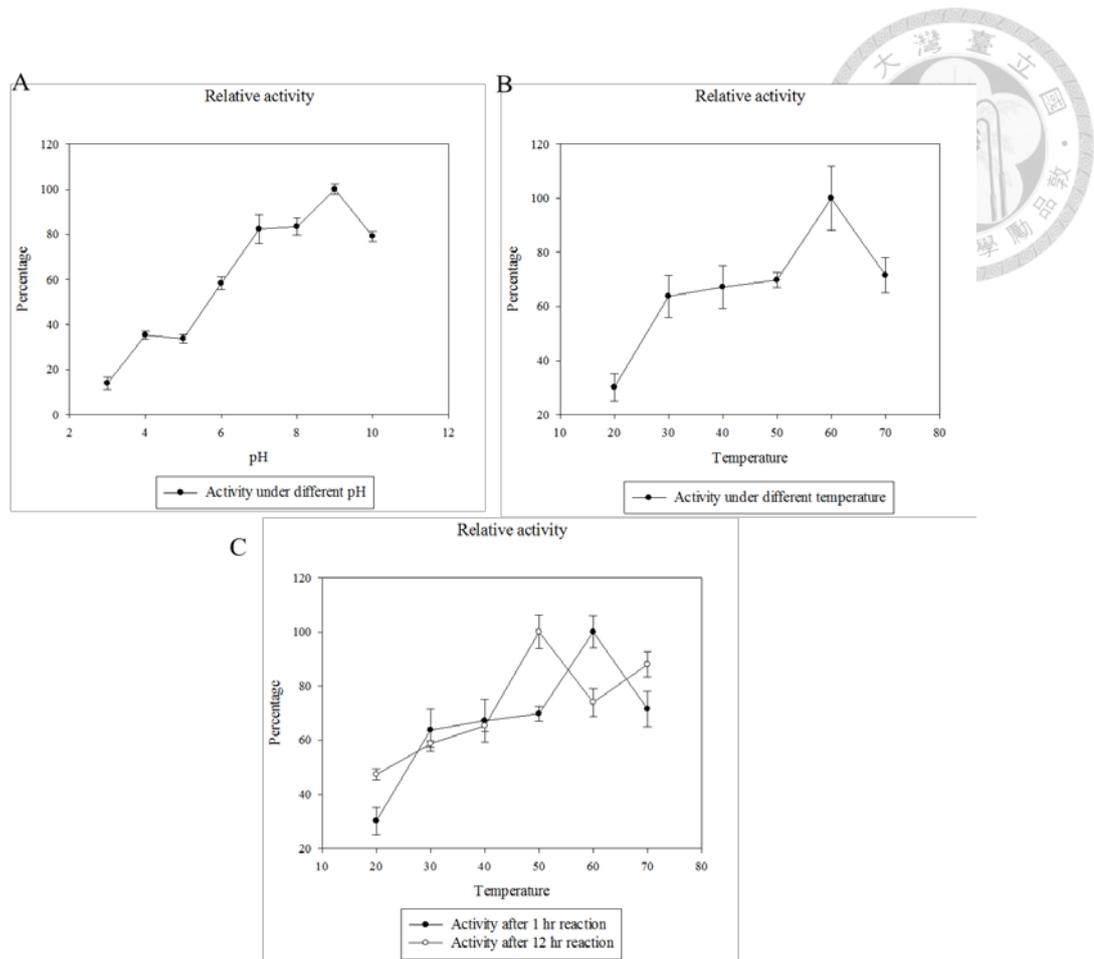


圖 十三、管柱流洗後酵素於不同條件下，加入基質反應後，以 595 nm 測定之吸光值換算之相對活性，以吸光值 0.01 為一單位，縱軸為百分比，橫軸為反應條件。(A)反應 1 小時後，不同酸鹼環境下之相對活性；(B)於不同溫度下反應 1 小時之相對活性；(C)於不同溫度下反應 1 小時及 12 小時之相對活性。

Figure 13. Relative activity of purified enzyme under 595 nm absorbance. Vertical axis represents percentage, and horizontal axis represents reaction condition. (A)The data are shown under 20-70°C after 1 hour incubation. (B)The data are shown under pH 3.0-10.0 after 1 hour incubation. (C) Comparison of activity between 1 and 12 hours incubation under 20-70°C.

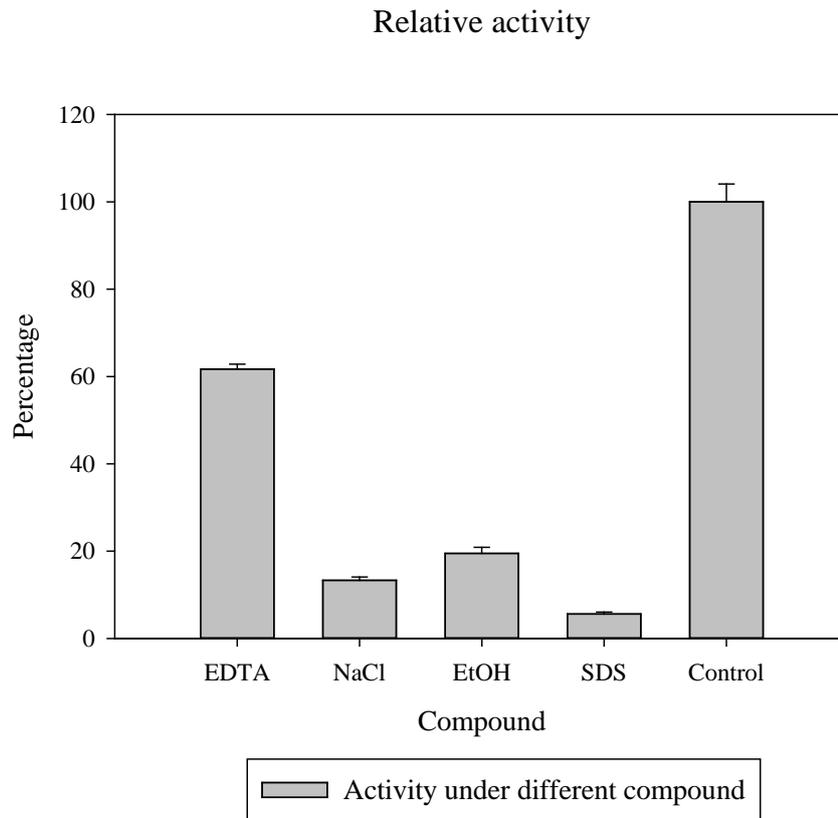


圖 十四、酵素於添加各種化學藥劑下與未加任何藥劑之酵素反應 1 小時後，於 OD₅₉₅ 下測定數值，並將各數值作為相對活性之比較，其中標示 Control 為未加任何化學藥劑之酵素活性。

Figure 14. Activity after adding EDTA, NaCl, EtOH, and SDS for reacting 1 hr. Detect amount under OD₅₉₅ and change into relative activity. Control represents enzyme activity without adding any compound.

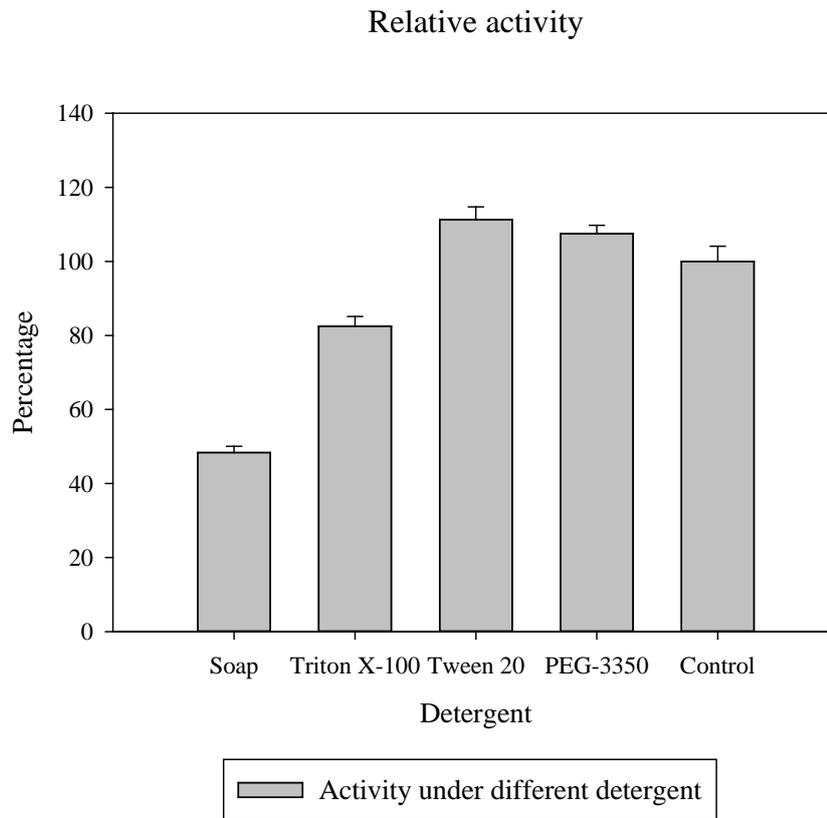


圖 十五、酵素於添加各種介面活性劑成分下與未加任何介面活性劑之酵素反應 1 小時後，於 OD_{595} 下測定數值，並將各數值作為相對活性之比較，其中標示 Control 為未加任何化學藥劑之酵素活性。

Figure 15. Activity after adding soap, Triton X-100, Tween 20, and PEG-3350 for reacting 1 hr. Detect amount under OD_{595} and change into relative activity. Control represents enzyme activity without adding any compound.

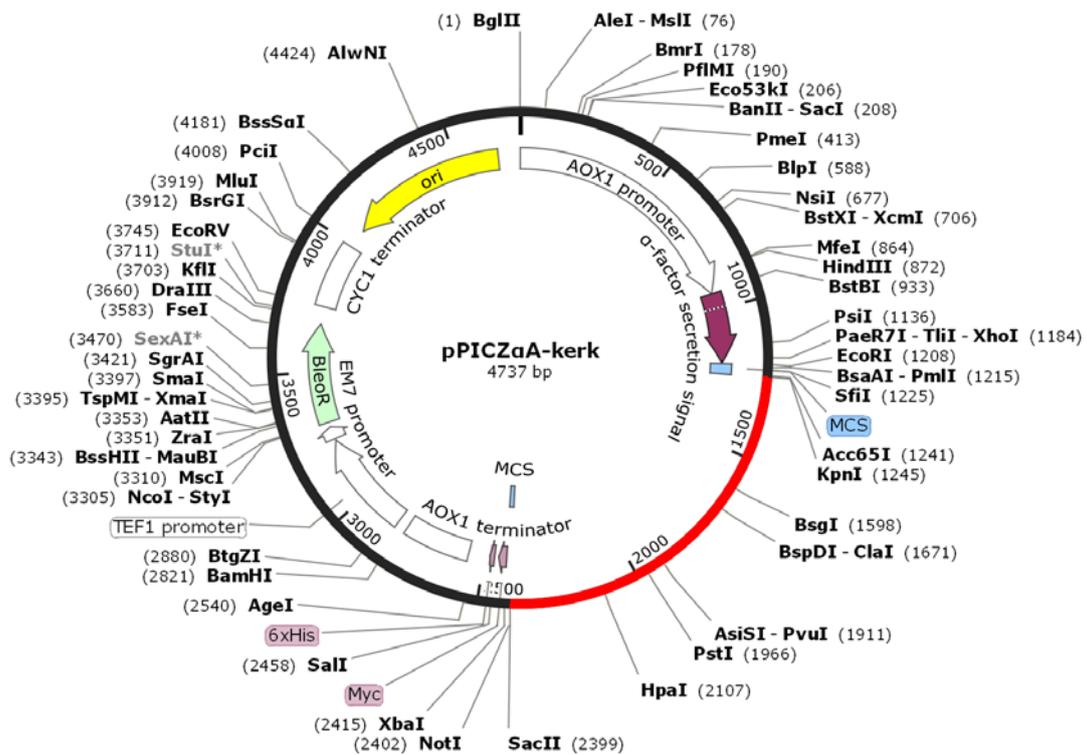


圖 十六、利用 snapgene 軟體繪出 pPICZαA 與 *kerk* 基因構築之質體，圖中紅色區塊為插入之 *kerk* 基因，質體大小為 4.7 kb。

Figure 16. Illustration of pPICZαA and *kerk* construct by using snapgene. Region in red represents *kerk* insert sequence. The size of construct is 4.7 kb.



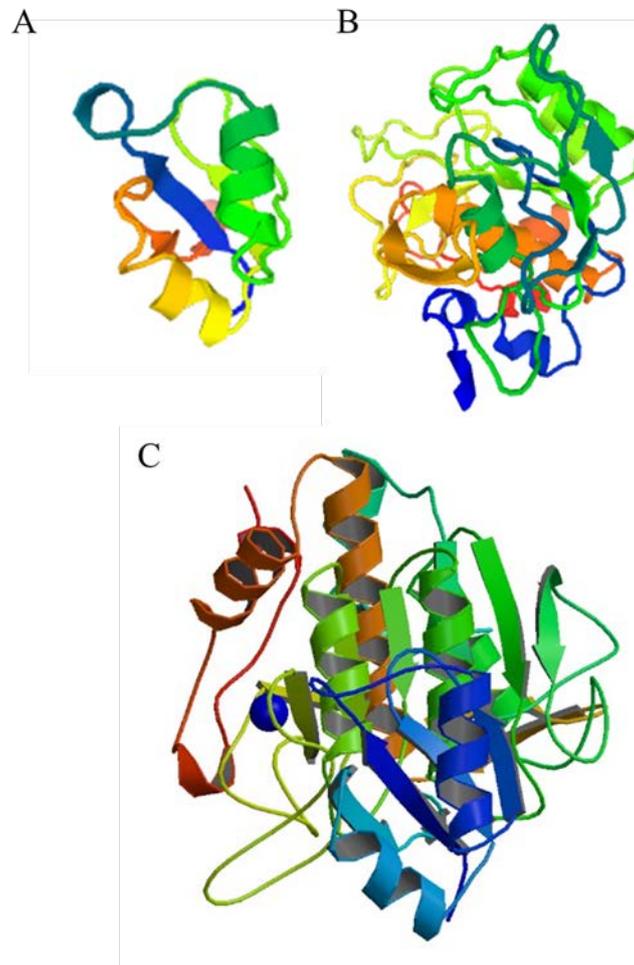
```
gtgcaccaccaccaccaccacagaggcaaaaaggatggatcagtttgctgtttgcttta  
V H H H H H H R G K K V W I S L L F A L  
gCGTtaatctttacgatggcgttcggcagtacgtctcctgcccatgCGcagggaaatca  
A L I F T M A F G S T S P A H A A G K S  
aacggggaaaagaaatacattgtcggattaaacagacaatgagcagatgagcggcgt  
N G E K K Y I V G F K Q T M S T M S A A  
aagaaaaagatgtcatttctgaaaaaggcgggaaagtgcaaaagcaattcaaatatgta  
K K K D V I S E K G G K V Q K Q F K Y V  
gacgcagcttcagctacattaaatgaaaaagccgtaaaagagctgaaaaagaccctagc  
D A A S A T L N E K A V K E L K K D P S  
gtcgttacgttgaaagagatcacgttgacagggcgtacgcgagtcCGTgccttacggc  
V A Y V E E D H V A Q A Y A Q S V P Y G  
gtatcacagattaaagcccctgctctgcactctcaaggcttcaccggatcaaatggttaa  
V S Q I K A P A L H S Q G F T G S N V K  
gtagcgggttatcgacagcggatcgattcttctcatcctgatttaaaggtagcagcggga  
V A V I D S G I D S S H P D L K V A G G  
gccagcatggttccttctgaaacaaatcctttccaagacaacaactctcacggaactcac  
A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H  
gttgccgggtacagttggtcttaataactcagtcggtgtattaggcgttgCGccaagc  
V A G T V V A L N N S V G V L G V A P S  
gcatctctttacgctgtaaaagtctcggcggctgacgggtccggccagctacagctggatc  
A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I  
attaacgggaattgagtgggcgatcgcaacaatatggacgttattaacatgagcctcggc  
I N G I E W A I A N N M D V I N M S L G  
ggaccttctggttctgcagcgttaaaaagcggcagttgacaaaagccgttgcttccggcatc  
G P S G S A A L K A A V D K A V A S G I  
gtagtcggttcggcagcgggtaacgaaggcacttccggcagctcaagcacagtgggctac  
V V V A A A G N E G T S G S S S T V G Y  
cctggtaaatacccttctgtcatgCGgtagggcagttaacagcagcaaccaaaagagca  
P G K Y P S V I A V G A V N S S N Q R A  
tcttctcaagcgtaggttctgagcttgatgtcatggcaccagggcgtctctatccaaagc  
S F S S V G S E L D V M A P G V S I Q S  
acgcttctgaaacaaatagcgcgctacaatggtagctcaatggcatctccgcacggt  
T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V  
gccggagcggctgctttgattcttctaagcaccggaactggacaacactcaagtccgc  
A G A A A L I L S K H P N W T N T Q V R  
agcagtttagaaaacaccactacaaaacttgggtgatgcttctactacggaaaaggcgtg  
S S L E N T T T K L G D A F Y Y G K G L
```

圖 十七、*Bacillus amyloliquefaciens* Ker103 之 *kerk* 胺基酸序列，紅線標示處為與源資料庫基因相異處。

Figure 17. *kerk* amino acid sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* Ker103. Sequence with red line represents the difference between original gene.

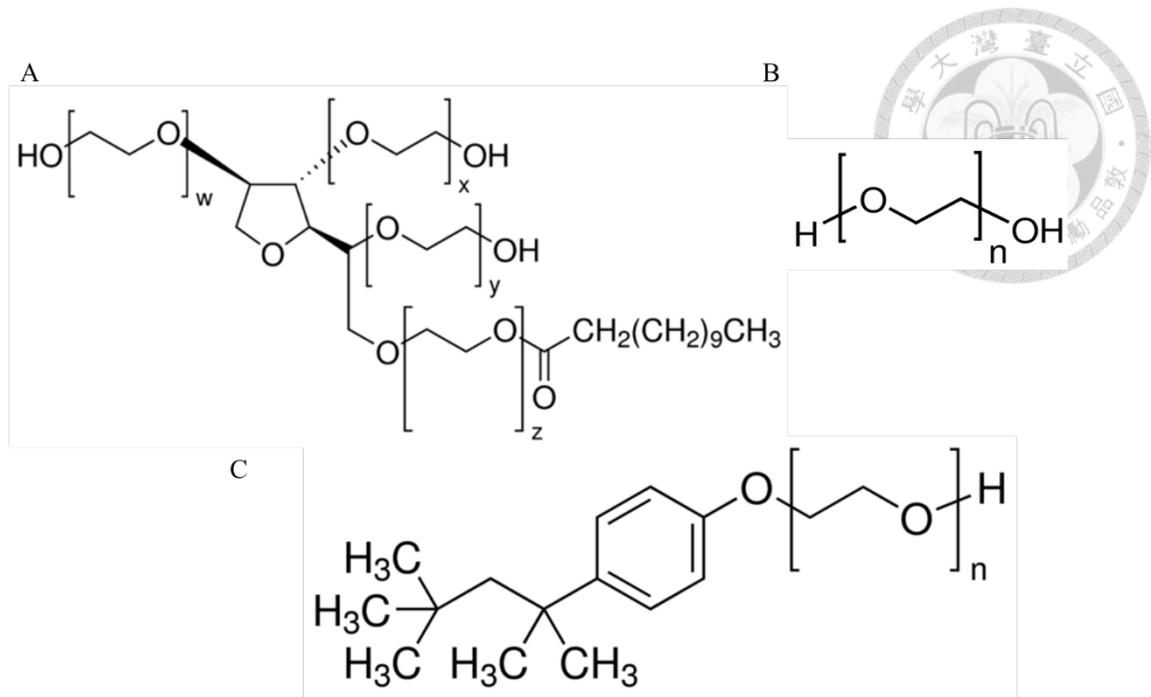


附錄



附錄一、將 *Bacillus amyloliquefaciens* 之 *kerk* 基因與 protein data base 之資料進行比對後，獲得之酵素結構資訊 (Gallagher et al., 1995) (Peng et al., 2003)。
(A)蛋白質序列中第 37 到 107 個胺基酸之結構；(B)蛋白質序列中第 108 到 382 個胺基酸之結構；(C)Kerk 之整體蛋白結構

Appendix 1. The information of structure of KerK protein from Structural Biology Knowledgebase. (A)The structure of KerK from amino acid sequence No.37 to No.107. (B)The structure of KerK from amino acid sequence No.108 to No.382. (C)The whole structure of KerK.



附錄二、Tween 20、PEG-3350 及 Triton X-100 之結構圖。

(A)Tween 20 結構 (B) Polyethylene glycol (PEG)單體結構 (C)Triton X-100 結構

Appendix 2.The structure of Tween 20, PEG-3350, and Triton X-100

(A) The structure of Tween 20 (B)The monomer structure of PEG (C)The structure of Triton X-100