

生產澱粉酶的孢子桿菌

陳 琦* 方心芳

(中國科學院菌種保藏委員會)

一. 引 言

有人^[1]把孢子桿菌澱粉酶分為四個類型：枯草桿菌糖化型，枯草桿菌非糖化型，*Bacillus polymyxa* 型及 *Bacillus macerans* 型。我們研究室內曾作過最後一種類型澱粉酶的研究^[2]。最近我們專門研究第二個類型的澱粉酶，因為枯草桿菌非糖化類型澱粉酶的液化力強大，能抗高溫，與穀芽及曲霉的澱粉酶有所不同，是工業上應用的一種重要酶製劑。紡織部門需要此類酶製劑，作脫漿之用，酒精廠內有時也用細菌澱粉酶液化原料澱粉，增進酒精生產率。

福本^[3]、Peltier 及 Beckord^[4]、福岡^[5]、Kneen 及 Beckord^[6]等人都曾作過澱粉酶孢子桿菌的分離鑑定及選種工作；Effront^[7]、福本^[3]、Beckord^[8]等人研究這類菌的培養及酶作用條件都有成就。我們這個工作是依照他們的方法研究中國的材料，分離選擇出了優良的菌種，並研究了這些菌種的最適培養及酶作用條件。

二. 實 驗 方 法

分離用的培養基是豆芽汁 (10%)、澱粉 (2% 的可溶性馬鈴薯澱粉)、瓊脂 (1.5%)，pH 7—7.2。分離方法為將試料 1 克投入 9 毫升無菌水中，煮沸 5 分鐘，即冷卻，稀釋 100—1,000 倍，用二重皿分離之。在 35°C 培養 48 小時，加碘液少許，將具有無色圈的菌落接出。從空氣中分離菌種係將培養基已凝固的二重皿蓋打開 3 分鐘，然後同法培養。菌種的鑑定按 Smith 法^[9]進行。

比較各菌株產澱粉酶活性的大小，分別用靜止培養法與振盪培養法進行。前者用的培養基為豆芽汁 (10%) 加 1% 蛋白胨，pH 7—7.2。250 毫升三角瓶盛培養液 30 毫升，35°C 培養 4 天，濾去菌膜，即得靜止培養澱粉酶液。

振盪培養用的培養液是 5% 豆餅汁 (加 0.2% NaOH 為豆餅的 5%，常壓蒸 30 分鐘) 加 1% 甘藷乾粉，pH 7—7.2，250 毫升三角瓶盛 50 毫升，20 磅殺菌 30 分鐘。振

* 山東大學生物系助教，在菌種保藏委員會進修。

盪培養條件是 35°C，振幅 7 厘米，每分鐘 60—70 次。振盪培養 24 小時後再靜止培養 22 小時，測定培養液的澱粉酶活力。

研究澱粉酶的生成及作用條件時用的是豆芽汁蛋白胨培養液，250 毫升三角瓶盛培養液 30 毫升，35°C 培養 4 天。

用兩種方法測定澱粉酶活力：(1) 糊化法：加不等量的培養澱粉酶液於盛有 10 毫升 2% 的馬鈴薯澱粉液的各試管中(加水使總容積相等)，保溫在 60°C，30 分鐘，然後加 1% 的碘液 1 毫升於各試管內，以呈紅色者為所含的澱粉都水解成糊精作標準，計算每毫升培養澱粉酶液糊化澱粉的克數(稱為糊化度)。(2) 液化法：用 Hoeffler 氏 CH 型粘度計測量澱粉液水解前後的粘度。水解條件是 3% 的馬鈴薯澱粉液(pH6.0) 100 毫升，加 0.5 毫升的培養液，60°C，水解 30 分鐘，加 10% NaOH 1 毫升，停止作用。粘度的表示或用落球時間(秒)或用相對粘度(E°)。

三. 實 驗 結 果

1. 分離 由 22 個樣品(發面、腐爛馬鈴薯、酸飯湯、麵粉、漿糊、大米、糯黃米、甘藷、玉米麵、青豆、虹豆、酸米飯、高粱、穀類飼料、蘿蔔、薑、土壤、灰塵、馬糞、堆肥、枯草和空氣)分離出百餘株生孢子細菌，多產生澱粉酶。但從公園土壤及枯草中分離出的菌種無水解澱粉的能力。樣品中含孢子桿菌較多的是馬糞(20 株)、堆肥(14 株)、腐爛馬鈴薯(14 株)、廚房空氣(10)株、最少的是高粱、青豆、玉米麵等(各一株)。

2. 鑑定 經鑑定結果，枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)最多，78 株；*Bacillus subtilis* var. *alterrimus* 3 株，*Bacillus cereus* 19 株，*B. cereus* var. *mycoides* 1 株。

3. 選種 用靜止培養法比較 110 株菌產生澱粉酶的活力：糊化度 1 的有 1 株菌(S₁₇ *Bacillus subtilis*)，糊化度 0.5 的有兩株菌(S₅₆ 及 S₉₀ 都是 *Bacillus subtilis*)，糊化度 0.33 的有 6 株，0.25 的有 9 株，0.2 的有 3 株，0.17 的有 2 株，0.14 的有 8 株(內有 1 株是本會原來保存的枯草桿菌)，0.12 的有 6 株，0.11 的有 7 株，其餘的是 0.1 度。

靜止培養法不能應用於工廠生產，但深層培養可以機械化。深層培養用的菌種都是用振盪培養法選擇出的，所以我們又用此法加以選擇。蒸餾水的玻球落下時間為 6.5 秒，3% 可溶性澱粉液的玻球落下時間為 240 秒，我們分離的細菌前 3 名(S₅₆, S₄₇ 及 S₁₇ 皆是枯草桿菌)的液化 3% 可溶性澱粉液的玻球落下時間為 10.7 及 12.7 秒。其餘 13.5—18.7 秒者 14 株，21—28.5 秒者 28 株，其他更次。用同一方法，另外作了兩次試驗，也都是以 S₅₆ 號菌的液化力最強。

4. 孢子桿菌澱粉酶的生成及作用條件。由以上選種結果，可知靜止培養時 S₁₇ 號菌最好，因此就用此菌研究澱粉酶的形成及作用條件。

(1) 先測驗了一下 60°C，pH6，澱粉酶與作用時間的關係，結果見圖 1。

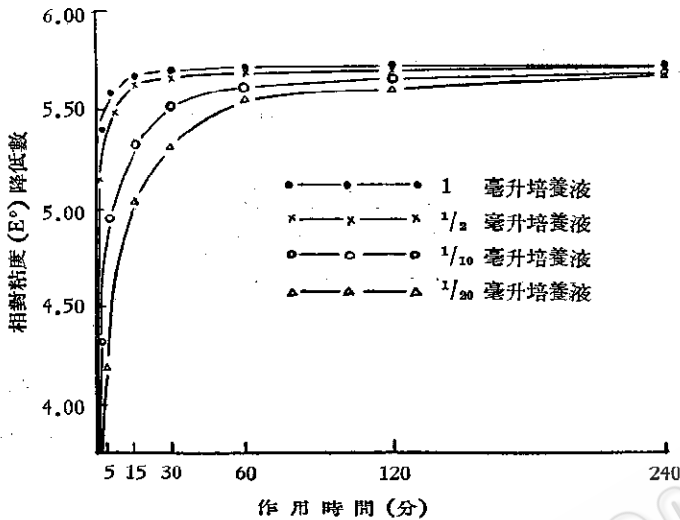


圖 1 S_{17} 號細菌澱粉酶濃度與作用時間的關係

由圖 1 可見在我們的試驗範圍內酶濃度越淡，作用時間越短，曲線的高低差別越大。但我們為操作方便計，以後試驗均用 0.5 毫升澱粉酶液及作用 30 分鐘。

(2) 培養溫度與澱粉酶生成的關係。澱粉酶生成的最適溫度為 $35-37^{\circ}\text{C}$ ，但 42°C 培養，澱粉酶未顯著減小（圖 2）。另一個試驗中， 50°C 培養時澱粉酶的活力大大減弱。

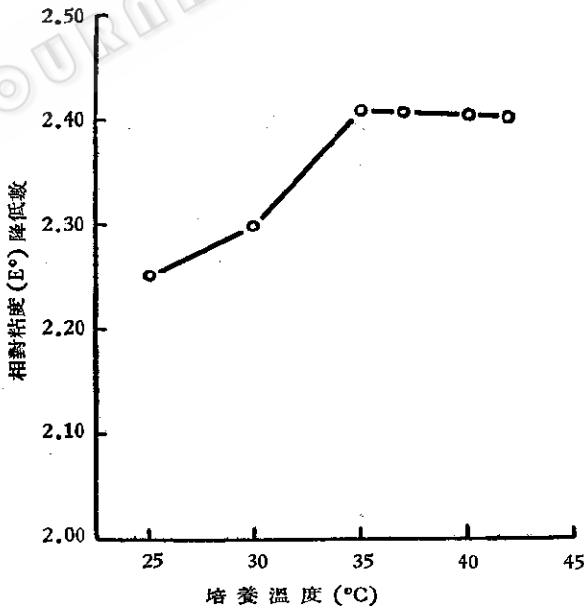


圖 2 S_{17} 號細菌培養溫度與澱粉酶產生的關係

(3) 培養時間與澱粉酶生成的影響。在我們培養的條件下，培養 2 天，澱粉酶已達到最大量，延續培養到 10 天，酶的活力未見消長（見圖 3）。但是在一定的時間內，酶生

成量與培養液的深度有密切關係，見表 1。

表 1 酶的生成與培養液深度的關係

培養液深度(厘米)	空 白	1.4	2.7	5.2	8.0
相對粘度 (E°)	3.46	1.08	1.09	1.12	1.14

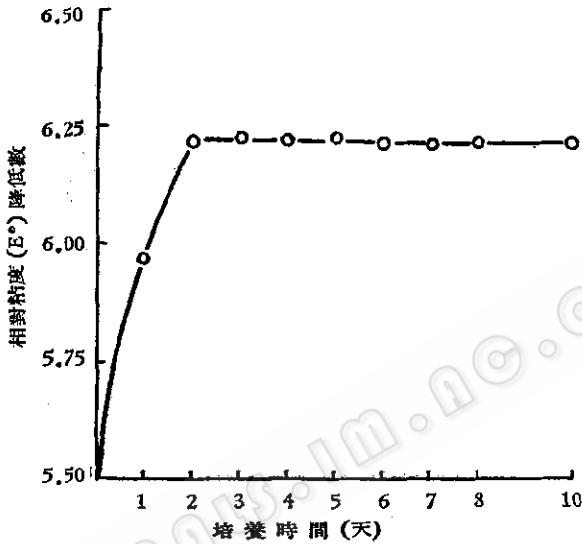


圖 3 S₁₇ 號細菌培養時間與澱粉酶產生的關係

(4) 培養基的反應與澱粉酶生成的影響。pH 4.4 以下及 pH 8 以上，顯著影響酶的生成，pH 4.4—8 的培養液中培養的桿菌澱粉酶液化力活性無大的差別（見圖 4）。

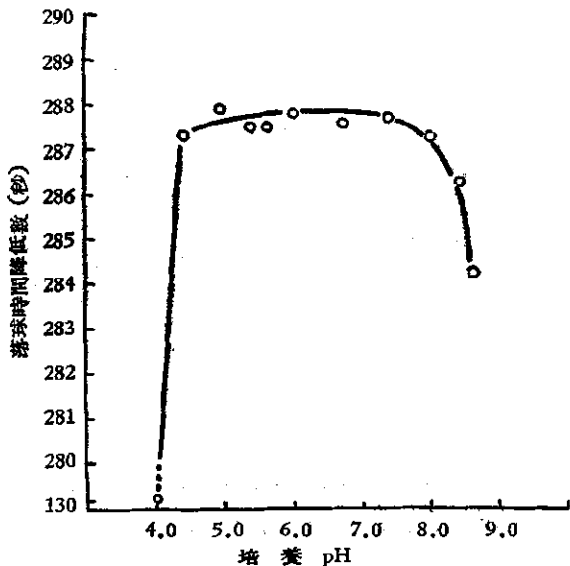


圖 4 S₁₇ 號細菌培養 pH 與澱粉酶產生的關係

(5) 澱粉酶液化力活性與溫度的關係。孢子桿菌澱粉酶的作用溫度相當的高，80 度以上才急速的下降（見圖 5），最適溫度為 60—65°C，但 20—80°C 內活性強度相差不太懸殊。

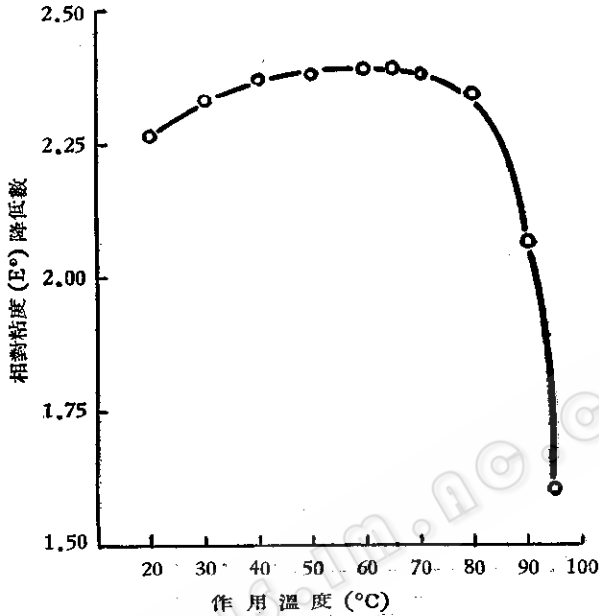


圖 5 S₁₇ 號細菌澱粉酶液化作用與溫度的關係

(6) pH 對澱粉酶活性的影響。孢子桿菌澱粉酶液化力在 pH 4 時甚小，pH 4.6—8 時相差不多，鹼性增加，活力有顯著的減退，但最適 pH 為 5—5.6（見表 2）。

表 2 pH 對澱粉酶液化力的影響

pH	空白	4.0	4.6	5.0	5.6	6.0	6.6	7.0	8.0	9.0	10.0
相對粘度 (E°)	4.73	2.1	1.135	1.082	1.082	1.095	1.097	1.102	1.133	1.345	1.4

5. 為促使選擇出來的優良菌種應用於工業，曾作了幾個試探性的擴大培養條件試驗。花生餅、大豆餅、棉子餅及麩皮的糞汁，分別靜止培養 S₁₇ 號菌的結果，花生餅培養基中酶活性最強，豆餅次之，麩皮最差。用振盪培養 S₅₆ 號菌的結果是在 3—5% 豆餅粉中加 5% 的豆餅糞汁，產生酶的情況較好，加甘藷乾粉影響不大。若在豆餅糞汁中加多量的甘藷乾粉，酶的活性反而降低。

S₁₇ 號菌及 S₅₆ 號菌的生活力頗強，培養時害菌侵入的危險性不大。連續開口培養 S₁₇ 號菌至第三次（移植 3 次），S₅₆ 號菌至第四次，其酶活性未見降低，也未見有何顯著的雜菌侵入現象。

少量鐵離子的存在與澱粉酶的生成無影響,量大時有抑止作用。

四. 結 論

(1) 產生澱粉酶的孢子桿菌普遍存在於自然中,但各菌的酶活性相差甚大,我們選出的兩株優良菌種 S₁₇ 號菌得自廚房空氣中, S₅₆ 號菌得自馬鈴薯中。

(2) 我們所分離出的產生澱粉酶的孢子桿菌 80% 為枯草桿菌, 20% 為 *Bacillus cereus*。所選出兩種優良菌種都是枯草桿菌。

(3) 在靜止培養狀態產生澱粉酶較多的菌種是 S₁₇ 號, 而振盪培養時却為 S₅₆ 號菌; 培養的情況不一樣須要不同的菌種。

(4) 產生澱粉酶最適的培養條件是 35—37°C, pH 4.4—8。花生餅煮汁較豆餅、棉子餅及麩皮煮汁優越。

(5) 孢子桿菌澱粉酶作用的最適條件是 pH 5—5.6, 溫度為 60—65°C, 80°C 時作用仍強大。

參 考 文 獻

- [1] Tauber, H.: The Chem. Techn. Enzymes, Chapman & Hall, London, 1950.
- [2] 淡家麟, 方心芳: 黃海發酵與菌學雙月刊, 12 (2): 29, 1951.
- [3] 福本壽一郎: 日本農藝化學會誌, 19: 487, 634, 689, 789, 853, 1943.
- [4] Peltier, G. L. and Beckord, L. D.: *J. Bact.*, 50: 711, 1945.
- [5] 福岡甲子郎: 發酵工學雜誌, 28: 241, 1950.
- [6] Kneen, E. and Beckord, L. D.: *Cereal Chem.*, 10: 41, 1946.
- [7] Effront, G.: *Chem. Abst.*, 11: 1841, 1917.
- [8] Beckord, L. D.: *Ind. Eng. Chem.*, 38: 232, 1946.
- [9] Smith, N. R. and Gordon, R. E.: Aerobic mesophilic sporeforming Bacteria, Misc. publ. 559, U. S. Dept., Agric, 1946.

STUDIES ON THE AMYLASE-PRODUCING BACTERIA

CHEN CHI and FANG HSIN-FANG

Type Culture Commission, Academia Sinica

From different sources, we have isolated 110 cultures belonging to the species *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Of these, 2 strains formed considerably more α -amylase (S₁₇ and S₅₆) than the other strains.

The optimum conditions for the cultivation of strains S₁₇ were 35—37°C and pH 4.4—8. Cultivated in the extract of peanutseed cake liquid medium, the strain formed amylase more than that in the extracts of soyabean cake, cotton seed cake and wheat brain. The amylase was most active in pH 5—5.6 and at 60—65°C.