

題目名稱：環境中多醣分解細菌及其分解酵素的生產調控機制

一、摘要

本研究旨在探討土壤中最終分解者之一的細菌如何通過精細調控澱粉酶的分泌來降解澱粉，進一步影響碳循環。實驗中採用不同來源土壤樣本分離菌株，利用 LB 培養基及專用澱粉（amylose）培養基進行篩選與功能測定。利用分子生物學技術進行 16S rDNA 鑑定，確定篩選細菌株均屬 *Bacillus* 屬。在進一步分析其中之一 *Bacillus thuringiensis* 的澱粉分解機制及其對外部碳源的反應後發現，該菌僅在存在澱粉的環境下才會分泌澱粉酶，而當培養基中添加葡萄糖時，澱粉酶表現受到顯著抑制。由此得知，因澱粉是葡萄糖鏈接而成的，所以澱粉酶分解澱粉不會完產生葡萄糖。進一步試驗中，因推測澱粉酶的作用會將澱粉（多糖）降解成二糖，我們選用麥芽糖（二糖），此二糖在誘導酶表達上有顯著效果。研究結果不僅闡明了細菌在碳循環中分解有機物的微妙策略，亦為工業發酵及有機廢棄物資源化提供了實驗依據和新思路。

二、探究題目與動機

隨著工業革命以來，大氣中二氧化碳濃度持續上升，全球暖化問題日趨嚴峻，而生態系統中的碳循環在緩解此問題上扮演著關鍵角色 (Falkowski P et al, 2000; Gougoulias C et al, 2014)。二氧化碳透過兩種途徑被固定（轉化為有機化合物），並在環境中循環。一種是陸生生物的碳固定，稱為綠碳（Green Carbon）；另一種是海洋中的碳固定，稱為藍碳（Blue Carbon），而兩種方法所生產的物質皆為葡萄糖，大部分情況下這也就是光合作用將二氧化碳轉化為葡萄糖的過程(Barcelos MCS et al, 2018)。固定後的有機物最終必須經由生物分解轉化，重新釋放為二氧化碳，完成碳循環。而植物儲存能量的主要多醣澱粉，也是有葡萄糖組成的化合物。澱粉對我們人類來說是重要的碳源之一，而對其他生物也一樣，但是由於澱粉分子太大無法直接攝取到細胞內，因此細胞會分泌酵素（澱粉酶），在細胞外把澱粉分解成較小的分子再攝取(Peters D, 2006)。例如在口中咀嚼米飯會有甜味就是因為口中分泌澱粉酶把米飯中的澱粉分解了。

本研究從森林土壤環境中分離出能分解澱粉的細菌，並探討該細菌如何產生分解酵素，以及這些酵素如何分解澱粉。研究結果顯示，細菌能夠以聰明且高效的方式產生澱粉酶，避免浪費能量。

三、探究目的與假設

1.森林環境中存在各式各樣的植物、昆蟲，甚至可能有動物糞便，因而假設會有各種細菌棲息於此，並嘗試進行這些細菌的分離。

2.另外，由於預期這類環境中有許多細菌具備分解多醣的能力，因此觀察了所分離菌株的多醣分解活性，並進行了細菌的鑒定。

森林環境因降雨、氣溫變化，有時候食物豐富、有時候稀缺，狀況不斷變化。我們假設細菌

會根據這些情況有效率地攝取營養，因而探討了影響多醣分解酵素產生的條件。

四、探究方法與驗證步驟

1、土壤樣本採集與菌落分離

在農地和森林環境中，我們認為各種細菌透過分解多醣，對碳循環產生重大影響。為此，我們從校內的森林環境中採集了各種土壤樣本。具體而言包括枯葉、落葉、濕土、椰子鬚、蚯蚓糞與樹根乾土等，將採集到的土壤樣本泡在滅菌水中，取其上清液稀釋至 1/100，再塗佈於 LB 寒天培養基上，並在 30 度下培養 20 小時。

從得到的菌落中，用滅菌的牙籤採取細菌細胞，並將其塗在 LB 寒天培養基及 LB + 澱粉寒天培養基上，在 30 度下培養 20 小時。接著用水沖洗培養出來的菌，並滴加 1% 碘液以觀察顏色變化。澱粉被分解的區域會呈現白色，而未被分解的部分則會染成青黑色。呈現白色區域的菌株具有分泌澱粉酶的能力，進而選拔出分解能力特別高的菌株。

2、分子生物學鑑定與系統發生分析

我們選擇了一株有高澱粉酶活性的菌株，並利用 PCR 放大了該菌株全長的 16SrDNA (使用引物：27F, 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ; 1492R, 5'-TACGGYACCTTGTTACGACTT-3')，隨後對放大的 DNA 片段進行了鹼基序列解析。將獲得的序列通過 NCBI BLAST 與已知數據庫中的序列進行比對，從而確定取得菌株的分類學位置。結果顯示，本菌株的 16SrDNA 序列與 *Bacillus thuringiensis* 的序列具有 99.72% 的相似性。而若 16SrDNA 的解析結果相似性達到 98.7% 以上，即可認定為同一菌種，因此將本菌株認定為 *Bacillus thuringiensis*。*Bacillus* 屬細菌普遍存在於土壤中，且已知會分泌各種分解多醣的酵素 (Mandic-Mulec I et al, 2015)。此外，*Bacillus thuringiensis* 也被發現會生產殺蟲蛋白，並在生物技術應用研究方面被廣泛的研究 (Jouzani GS et al, 2017)。

3、不同碳源對澱粉酶表達的影響

為了研究在何種條件下會產生澱粉酶，我們將分離得到的 *B. thuringiensis* 在含有各種糖的培養液中進行培養，並檢測其培養上清液中是否含有澱粉酶。液體培養條件如下。為使添加的糖類成為主要的碳源，使用了稀釋至 1/16 的 LB 培養液：

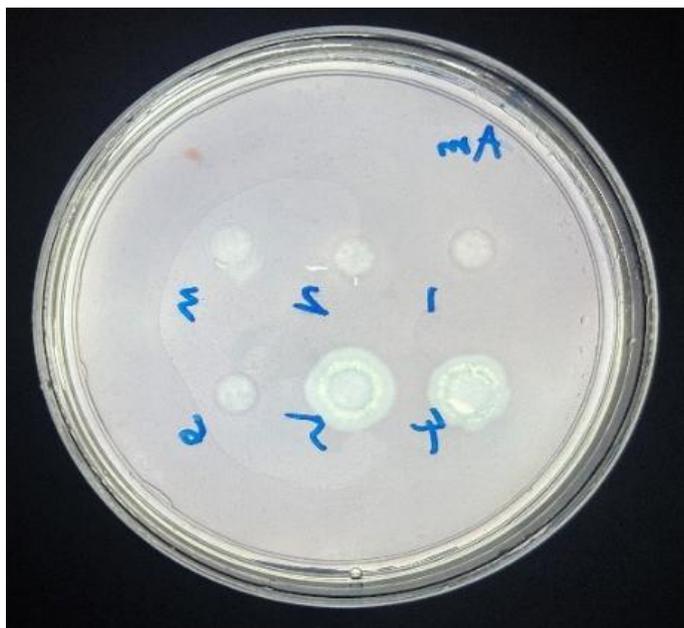
- (1) 1/16 LB + 0.2% 馬鈴薯澱粉 + 0.1% 葡萄糖
- (2) 1/16 LB + 0.2% 麥芽糖 + 0.1% 葡萄糖
- (3) 1/16 LB + 0.1% 葡萄糖
- (4) 1/16 LB + 0.2% 馬鈴薯澱粉

(5) 1/16 LB + 0.2% 麥芽糖

(6) 1/16 LB

將此液體培養上清液透過離心機採集後滴加於含有澱粉的寒天培養基上，藉由觀察澱粉分解的情形來判斷是否有產生澱粉酶。該培養基包含 0.2% 澱粉、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 及抗生素 (Kanamycin)。具體做法為：在寒天培養基上放置滅菌圓盤濾紙 (paper disc)，吸附 15 μ l 的培養上清液，並於 30°C 下反應 20 小時，隨後以 1% 碘液對澱粉進行染色

結果如圖一所示，6 號的 1/16 LB 培養基中培養的上清液僅觀察到一個小白色區域，可知若不添加糖類，便不會生產澱粉酶。而 4 號添加澱粉的培養上清液則顯示出大面積的分解區，說明當澱粉存在時，細菌會生產澱粉酶。然而，澱粉是一種大分子，不會進入細胞內。我們推測為了使細胞能感知澱粉的存在，需要由澱粉經澱粉酶分解後產生的產物參與調控。因此我們在 3 號實驗中添加葡萄糖，發現並未生產澱粉酶，反而在 1 號同時添加澱粉和葡萄糖的培養上清液中也沒有澱粉酶的生成，這一現象與細菌學中著名的乳糖操縱子相似 (Bechwith J, 2013)，即使存在澱粉，只要有葡萄糖，細菌便會優先利用葡萄糖而不分解澱粉。另外，這也暗示著即使澱粉被澱粉酶分解，其分解產物也不會完全分解成單糖葡萄糖。那麼，究竟是何種分解物質誘導了澱粉酶的生產呢？因此，我們以二糖麥芽糖進行了 5 號實驗。結果顯示，即使不添加澱粉，只需添加二糖麥芽糖，細菌就會生產澱粉酶，證明該物質能夠誘導澱粉酶的生產。也就是說，澱粉酶僅將澱粉分解至二糖麥芽糖，而不會完全分解成單糖葡萄糖，從而區分了對葡萄糖和多糖的利用。另外，在 2 號同時添加麥芽糖和葡萄糖的實驗中，未觀察到澱粉酶的生成，此結果也符合上述推論。



(圖一)

由圖可以看出只加澱粉和只加麥芽糖的培養液的上清液有明顯分解澱粉。

五、結論與生活應用

【結論】

從森林環境的土壤樣本中培養出各種菌落，顯示該環境中存在多樣的細菌。然而，也可能有部分細菌因不適應本次的培養條件而未能生長。若能成功培養更多種類的細菌，或許可以分離出更具應用價值的菌株。因此，為了獲取更多的細菌，可能還需要進一步優化培養條件。

利用分離得到的 *B. thuringiensis* 進行澱粉酶生產條件的研究後發現，當培養基中存在葡萄糖時，細菌不會生產澱粉酶。一般而言，對生物來說，葡萄糖是獲得能量最有效率的碳源，因此，細菌優先利用葡萄糖，能夠更有效率地生存 (Papagianni M, 2012)。並且結果顯示，雖然澱粉酶能夠分解澱粉，但其分解產物僅止於二糖麥芽糖，並未繼續分解為單糖葡萄糖。若澱粉被完全分解為葡萄糖，則細菌會停止澱粉酶的生產，導致生產調控機制無法順利運作。因此，這兩種機制的協同作用使細菌能夠靈活適應環境中不同類型的糖類。

【生活應用】

工業發酵與生物轉換：

除了甘蔗等植物累積大量葡萄糖，一般植物是將葡萄糖聚合成澱粉或纖維素進行儲存。如果能夠有效分解這些多醣，則可利用其分解產物來培養微生物，進而生產各種物質。舉例來說，由微生物生產的生物乙醇，在不久可能成為一項重要的能源。為此，高效率的多醣分解技術是必需的 (Vásquez CE et al, 2023)。如本實驗所示，通過加入麥芽糖培養澱粉分解菌，培養上清液中會分泌出澱粉酶，而在上清液中添加澱粉，即可將澱粉分解至麥芽糖。即使乙醇生產菌無法直接分解澱粉，也可以利用得到的麥芽糖來進行培養，從而實現由澱粉轉化為生物乙醇。事實上，在日本酒和生物乙醇的生產過程中，就採用了這種兩段式發酵法 (Watanabe D, 2024)。

有機廢棄物處理：

不僅限於澱粉分解，其他多醣分解酵素也可能可以相似的調控方式生產。通過使用不同的二糖，或許可以分別誘導出各種多醣分解酵素的生成。舉例而言，蝦殼中大量存在的多醣——幾丁質，如果能利用酵素將其分解，就能將工業廢棄物轉化為有用資源，從而實現環境保護與資源回收的雙重目標。

環境保護與碳循環調節：

細菌在環境中的多糖分解不僅對碳循環具有重要調節作用，同時也為維持生態平衡提供了關鍵支持。

生物技術的應用：

未來，若能進一步解析麥芽糖誘導澱粉分解酵素的分子機制，並利用基因破壞等方法破壞本次發現的調控系統，就可能獲得無論使用何種碳源都能最大限度生產多醣分解酵素的突變株。如此一來，大量生產多醣分解酵素將變得更加容易，其應用前景也將進一步拓展。

參考資料

- Barcelos MCS, Lupki FB, Campolina GA, Nelson DL, Molina G. (2018) The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. *FEMS Microbiol Lett.* 365(21).
- Beckwith J. (2013) Fifty years fused to lac. *Annu Rev Microbiol.* 67:1-19.
- Falkowski P, Scholes RJ, Boyle E, Canadell J, Canfield D, Elser J, Gruber N, Hibbard K, Högberg P, Linder S, Mackenzie FT, Moore B 3rd, Pedersen T, Rosenthal Y, Seitzinger S, Smetacek V, Steffen W. (2000) The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science.* 290(5490):291-6.
- Gougoulas C, Clark JM, Shaw LJ. (2014) The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *J Sci Food Agric.* 94(12):2362-71.
- Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. (2017) *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101(7):2691-2711.
- Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. (2015) Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr.* 3(2):TBS-0017-2013.
- Papagianni M. (2012) Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microb Cell Fact.* 11:50.
- Peters D. (2006) Carbohydrates for fermentation. *Biotechnol J.* 1(7-8):806-14.
- Vásquez Castro E, Memari G, Ata Ö, Mattanovich D. (2023) Carbon efficient production of chemicals with yeasts. *Yeast.* 40(12):583-593.
- Watanabe D. (2024) Sake yeast symbiosis with lactic acid bacteria and alcoholic fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 88(3):237-241.

1. 除摘要外，其餘各項皆可以用文字、手繪圖形或心智圖呈現。

2. 格式如下：

- 中文字型：微軟正黑體；英文、阿拉伯數字字型：Times New Roman
- 字體：12pt 為原則，若有需要，圖、表及附錄內的文字、數字得略小於 12pt，不得低於 10pt
- 字體行距，以固定行高 20 點為原則
- 表標題的排列方式為向表上方置中、對齊該表。圖標題的排列方式為向圖下方置中、對齊該圖

