

美和學校財團法人美和科技大學

105 年度教師產學合作計畫 結案報告書

計畫名稱：可可發酵過程菌種篩選

計畫編號：105-GI-DBT-IAC-R-005

計畫期間：2016/10/01~2016/12/31

計畫主持人：吳裕仁

共同主持人：顏宏愷、胡淳怡

研究助理：

經費總額：320,000 元

經費來源：行政院農業委員會

一、計劃中文摘要：

中文摘要(內容應包括研究目的、研究方法、主要發現、結論及建議事項，並填寫中英文關鍵詞三至五個)。字數以不超過一千五百字為原則。

關鍵詞：可可、序列比對

我們從發酵 167 小時的可可豆樣本中，針對 16S megagenomics 區間進行序列定序，共定序出總長度分別為 13.1 Mb(CC1)及 53.8 Mb(CC2)。結果發現：在 CC2 樣品序列比對結果發現，數量前三大之 OUT 菌群與 CC1 樣品序列分析結果相同，樣品之菌相第一為 Acetobacteraceae (醋桿菌)為最大宗，第二為 Enterobacteriaceae (腸內細菌)，第三為 Paenibacillaceae (類芽孢桿菌)，而三個菌科 OTU 總合佔所有 OUT 之 97%。屬於發酵前期之乳酸菌至發酵終點時，族群數量變少，故不易篩選。以 MRS 培養基在厭氧環境下，篩選出的未知菌株，透過 EMB 鑑別培養基培養後，出現綠色金屬光澤，以此判定為 E. coli，乳酸菌 No1~3 皆為 E. coli。後期多以醋酸菌為主發酵，No1, 10, 11 皆為醋酸菌，經序列比對為 Acetobacter pasteurianus (100% identities)；而 No 9 為 G(+)菌 Bacillus thuringiensis (100% identities)。真菌選殖過程中未出現酵母菌，但出現單一綠黴菌，此菌為果腐黴菌，可能可可樹於種植過程中曾遭受真菌感染。

二、計劃英文摘要：

英文摘要(內容應包括研究目的、研究方法、主要發現、結論及建議事項，並填寫英文關鍵詞三至五個)。字數以不超過一千五百字為原則。

關鍵詞：cocoa、sequence comparison

We sequenced a total of 16.1 Mb (CC1) and 53.8 Mb (CC2) for the 16S megagenomics interval from a sample of 167 hours of cocoa bean fermentation. The results showed that the results of CC2 sequence comparison showed that the number of the first three strains of OUT bacteria was the same as that of the CC1 sample, and the first of the samples was Acetobacteraceae, the second one Enterobacteriaceae (enterobacteria), and the third is Paenibacillaceae (Bacillus species), while the total number of OTU of the three species accounts for 97% of all OUT. The lactic acid bacteria belonging to the pre-fermentation stage to the fermentation end point, the number of ethnic groups become less, it is not easy to filter. In the anaerobic environment, the strain was identified as E. coli and the lactic acid bacteria No1 ~ 3 were all E. coli, after the culture of the unknown strain was identified by the EMB identification medium and the green metallic luster appeared in the MRS medium. Acetobacter pasteurianus (100% identities), and No 9 was Bacillus thuringiensis (100% identities). There was no yeast in the process of fungal selection, but a single green mold appeared. The fungus was fungus, and it may have been infected by fungi during the planting process.

三、研究計劃執行結果之本文

包括研究問題之背景與現況、研究目的、材料與方法、結果、討論、參考文獻。

計畫目的

- 1.完成屏東可可發酵菌群之親緣關係分析樹狀圖，確認風味菌株之來源與種類。
- 2.完成屏東可可發酵菌之目標風味菌，菌株之分離與純化的工作，至少一株。初步建立所純化菌株之可可發酵技術，並針對批次發酵技術之參數進行選擇與文獻探討

結果與討論

樣品前處理

可可豆發酵樣品由可可商(黃小姐)提供，共提供可可豆發酵 137 小時(CC1)及發酵 161 小時(CC2)之樣品；利用採樣瓶採樣後，立即送至實驗室進行樣品前處理及 -80 冷凍保存。為有效萃取可可豆發酵菌，樣品於發酵狀態下，利用液態氮進行快速冷凍(60 秒)，緊接著將樣品回溫後(37°C)再利用液態氮進行快速冷凍，來回 3 至 4 次完成發酵菌的凍融程序，用以提高遺傳物質的萃取回收率及純度。

遺傳物質 (DNA) 萃取純化技術開發

因可可豆發酵基質複雜，應用傳統 DNA 之萃取方法 (Miller et al., 1999)發現，DNA 的純度不佳，若不串聯由實驗室開發出來之純化管柱 (clean up column)技術，則 260 nm / 280 nm 比值皆遠低於 1.8 DNA 總量雖大於 100 ng，但其濃度卻小於 5 ng/μl 顯示後段 DNA 濃縮純化技術的重要性。應用實驗室所開發出之 DNA 萃取套件進行可可豆發酵菌之 DNA 萃取工作，並輔以 DNA 之純化濃縮技術，可以發現 (表一 CC1 與 CC2 樣品所萃取濃縮之 DNA 樣品其 260nm/280nm 比值皆大於 1.8(分別為： 1.81±0.05 及 1.93± DNA 總量大於 100 ng(分別為：297±9 及 378± 且濃度大於 5 ng/μl(分別為 6.59±0.20 及 8.39± 相較於應用 Miller 技術串聯 DNA 之純化濃縮技術所得到之樣品品質結果，雖然與僅用 Miller 技術進行 DNA 萃取的樣品比較來說，品質較佳，但仍不比實驗室所開發之 DNA 萃取套件串聯 DNA 純化濃縮技術之樣品品質，過程中若不嚴謹地針對樣品 DNA 品質進行把關，將大大影響次世代定序之最終結果。

表一、可可豆發酵樣品兩種不同萃取純化技術之 DNA 總量、濃度及品質比較

表

樣品編號	Miller DNA 萃取技術串聯 DNA 純化管柱			實驗室自有 DNA 萃取套組串聯 DNA 純化管柱		
	比值 (260 /280)	DNA 總量 (ng/L)	DNA 濃 度(ng/L)	比值 (260 /280)	DNA 總量 (ng/μL)	DNA 濃度 (ng/μL)
	CC1	1.16±0.08	95±7	2.11±0.15	1.81±0.05	297±9
CC2	1.57±0.08	221±11	4.91±0.25	1.93±0.04	378±9	8.39±0.18

次世代定序 (NGS)

次世代定序技術平台具有相當地多元性，而本計畫中所使用的次世代定序技術平台為 Ion Torrent 定序技術，該技術被稱為 2.5 代之定序平台，於 2012 年 09 月由著名之生技公司 Ion Proton™ System 正式發表的新一代次世代定序技術，其原理主要為：將待測之 DNA 樣品切成小片段後，搭配乳糜化核酸擴增技術 (emulsion PCR)，將 DNA 擴增的片段置於球型載體表面後，於半導體晶片中進行 DNA 定序的工作。計畫中，我們選擇 16S megagenomics 區間進行高通量 DNA 序列的定序工作，將萃取純化後之 CC1 及 CC2 等 DNA 樣品進行 multiplex PCR 用以擴增目標之基因片段 (Ion 16S Metagenomics Kit, Life Technologies)，實驗室中針對序列擴增子進行複製及合成之方式則依據 Ion Torrent 定序平台的要求 (the protocol of Ion Ampliseq Library Kits DNA 擴增的片段置於球型載體表面之操作方式亦依照平台的要求 (the protocol of Ion OneTouch 200 Template Kit v.2.)，而 CC1 及 CC2 樣品之序列條碼 (Barcode)，分別為 IonXpress_003(CC1) 及 IonXpress_005(CC2)，條碼序列整理如表二所示。NGS 所使用定序設備為 Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies)，樣品在設備上定序之過程則依據設備的標準操作步驟 (the protocol of Ion PGM Sequencing 400 Kit)，每條 DNA 序列定序出之序列長度最長為 400 bp，序列資料完成後則利用 Torrent Suite software v5.0. Data analysis 進行序列的整合工作，最後利用 MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 資料庫及 Greengenes v13.5 資料庫進行序列的比對工作，完成樣品作，完成樣品 CC1 及及 CC2 之序列分析工作。

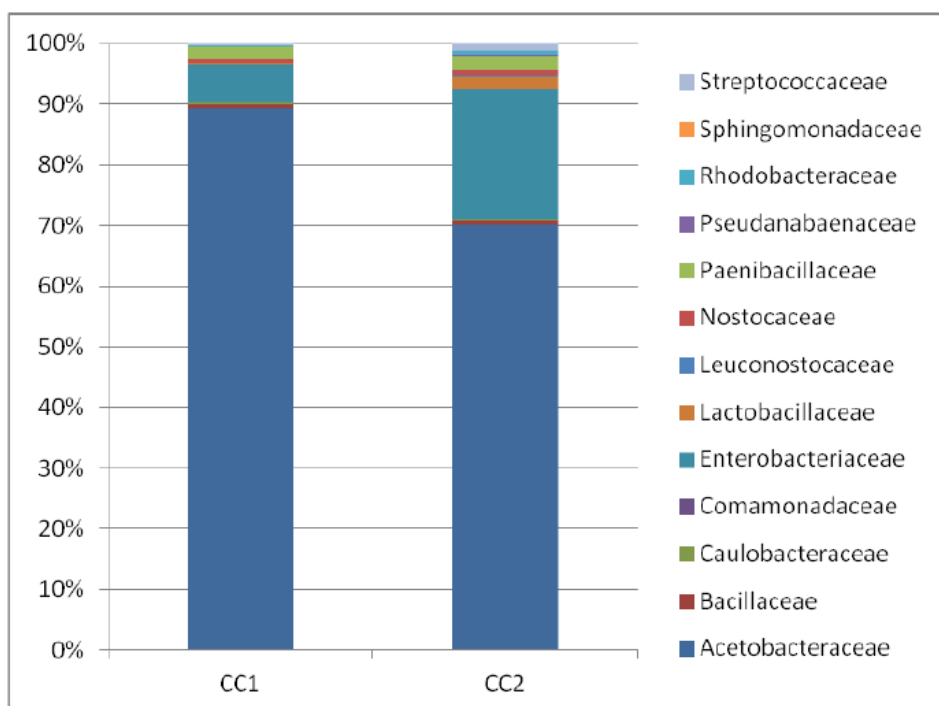
表二、萃取純化後 DNA 樣品於次世代定序所使用之條碼基因一覽表

樣品編號	條碼基因編號	條碼基因序列
CC1	IonXpress_003	AAGAGGATTC
CC2	IonXpress_005	CAGAAGGAAC

在次世代分析結果方面(表三)，針對 16S megagenomics 區間進行序列定序，共定序出總長度分別為 13.1 Mb(CC1)及 53.8 Mb(CC2)，所讀出之序列總數分別為 64,340 OUT (CC1)及 273,077 OUT (CC2)，依據軟體參數判定有效序列為 39,870 OTU (CC1)及 156,597 OTU (CC2)，分別佔總數之 62.0%(CC1)及 59.4%(而序列成功與兩個資料庫完成比對 (mapping)的分別佔 43.0%(CC1)及 42.0(CC2)。在有效的序列中，依據資料庫既有序列資訊進行比對，結果發現：將比對的 OUT 進行分類學分類，在科(Family)的階層方面(圖一) CC1 樣品之菌相第一為 Acetobacteraceae (醋桿菌)為最大宗，第二為 Enterobacteriaceae (腸內細菌)第三為 Paenibacillaceae (類芽孢桿菌)，而三個菌科 OTU 總合佔所有 OUT 97%，其餘 OUT 分屬為 Bacillaceae (1%)、Nostocaceae (0.5%)、Caulobacteraceae (0.3%)、Lactobacillaceae (0.3%)、Rhodobacteraceae (0.3%)、Streptococcaceae (0.3%) 及 Pseudanabaenaceae (0.1%)。

表三、次世代定序平台輸出參數整理一覽表

樣品編號	完成定序序列總長度 (Mb)	完成定序序列數 (OTU)	有效序列數 (OTU)	完成比對數 (OTU)
CC1	13.1	64,340	39,870	27,662
CC2	53.8	273,077	156,597	114,660



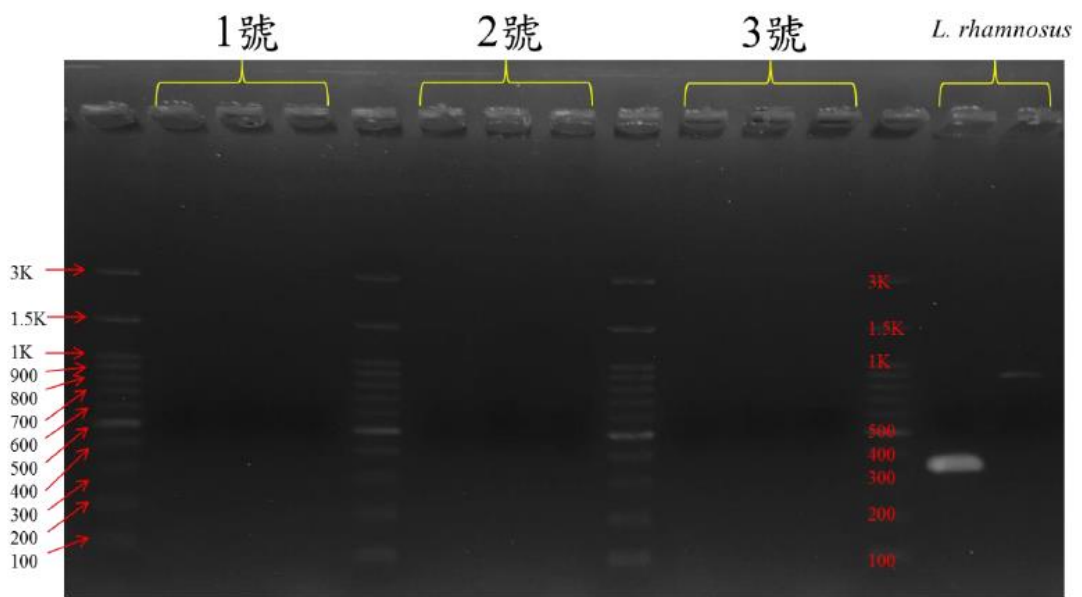
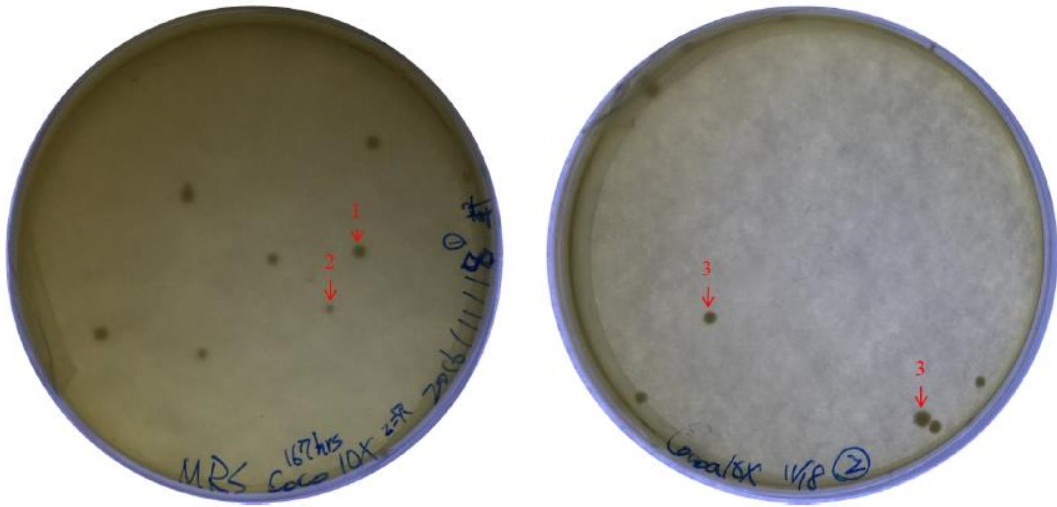
圖一、次世代定序序列(OTU)分析結果[科(family)分類]

在 CC2 樣品序列比對結果發現 (圖一)，數量前三大之 OUT 菌群與 CC1 樣品序列分析結果相同(表四)，分別為 Acetobacteraceae (70%)、Enterobacteriaceae (21.5%)、Paenibacillaceae (2.2%)，佔所有 OUT 之 93.7%，其餘 OTU 分屬為 Lactobacillaceae (70%)、Streptococcaceae (1.2%)、Nostocaceae (1.1%)、Rhodobacteraceae (0.6%)、Bacillaceae (0.6%)、Caulobacteraceae (0.3%)、Leuconostocaceae (0.2%)、Pseudanabaenaceae (0.1%)、Sphingomonadaceae (0.05%)及 Comamonadaceae (0.01%)。各發酵菌群英文與中文名稱對照為：Acetobacteraceae 醋桿菌、Bacillaceae 芽孢桿菌、Caulobacteraceae 柄桿菌、Comamonadaceae 叢毛單胞菌、Enterobacteriaceae 腸內細菌、Lactobacillaceae 乳桿菌、Leuconostocaceae 明串珠菌、Nostocaceae 念球藻、Paenibacillaceae 類芽孢桿菌、Pseudanabaenaceae 假魚腥藻及 Rhodobacteraceae 紅細菌等。

表四、次世代定序序列比對分類(Family)結果一覽表

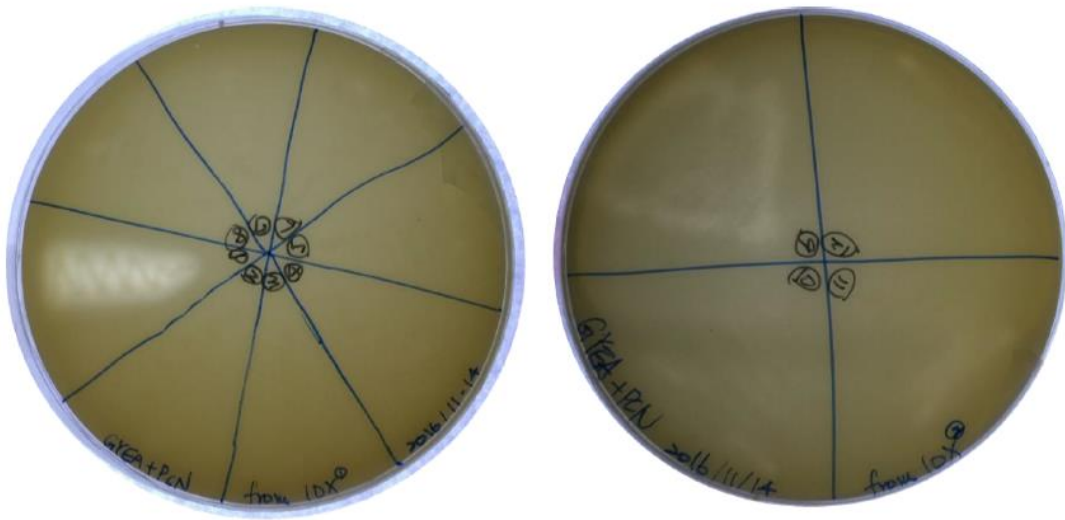
分類 (Family)	序列數量 (OTU)	
	CC1	CC2
Acetobacteraceae	24701	80403
Bacillaceae	197	662
Caulobacteraceae	85	300
Comamonadaceae	0	15
Enterobacteriaceae	1698	24638
Lactobacillaceae	91	2340
Leuconostocaceae	0	247
Nostocaceae	130	1204
Paenibacillaceae	568	2549
Pseudanabaenaceae	17	140
Rhodobacteraceae	88	714
Sphingomonadaceae	0	63
Streptococcaceae	87	1385

可可豆中乳酸菌篩選與鑑定

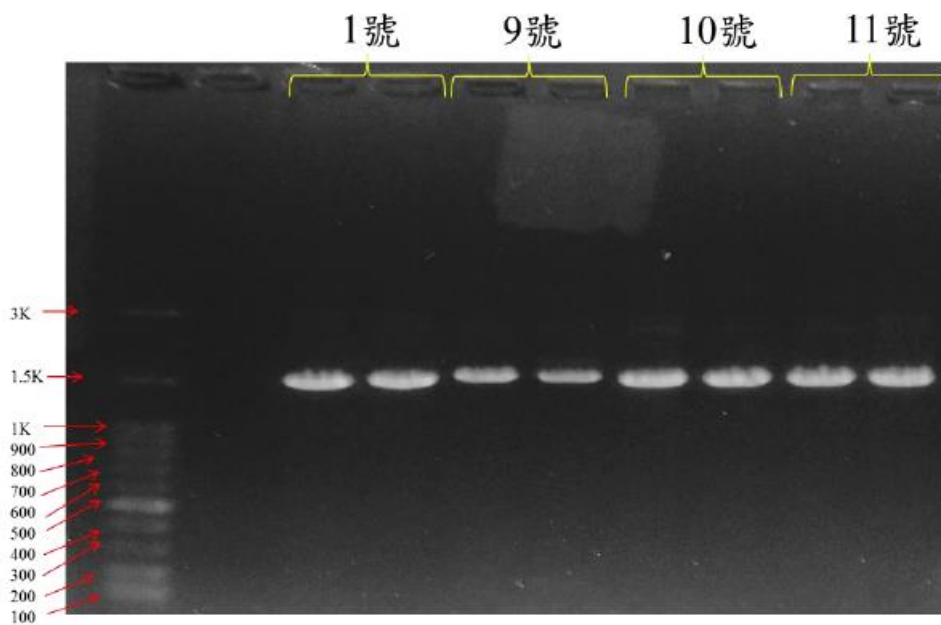


1、2、3號以乳酸菌專用引子並無擴增出片段。

醋酸菌篩選與鑑定



以編號1、9、10及11號產酸效果最佳，所以將其挑出進行篩選是否為AAB菌屬。

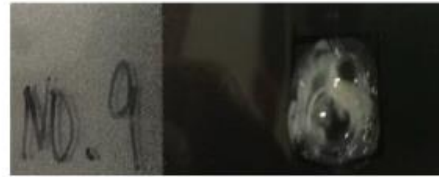


- 觸酶反應測試(Catalase test)

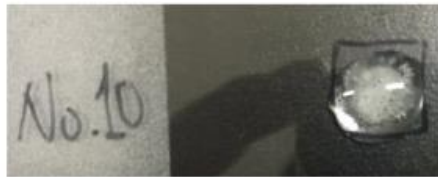
NO.1



NO.9



NO.10



NO.11



1、9、10、11號菌的反應結果都呈現正反應，
以此推測此四株菌均為好氧菌。

CGYC1 : 16S rDNA sequence (*Acetobacter pasteurianus* strain 1HSc 100%identities)

```
ACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGTATCTATCCATGGGTGGGGGATAACACTG
GGAACTGGTGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCTGCGTTTGA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC AAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCTGATC
CAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGAAAAGCACTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCC
GTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGAC
TGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAGCTGCATTG
ATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAG
AACACCGGTGGCGAAGGCGGC AACCTGGCTATTACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTACGTGTCGAGTTA
ACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTGAATGTAGAGGTGCAAGCA
GAGATGTTTTGTTCCCGCAAGGGACCTTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCATCAGGTTGGGCTGGGCACTTAGAGAGACTG
CCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTC ATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGGTGGTGACACCATGCTGATCTCTAAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGC
ACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCTTAAGCCGGTGAGCGAACC GCAAGGACGC
AGCCGACCACGGTTCGGGTACGCGACTGGGGTGAAGTCG
```

NO.1

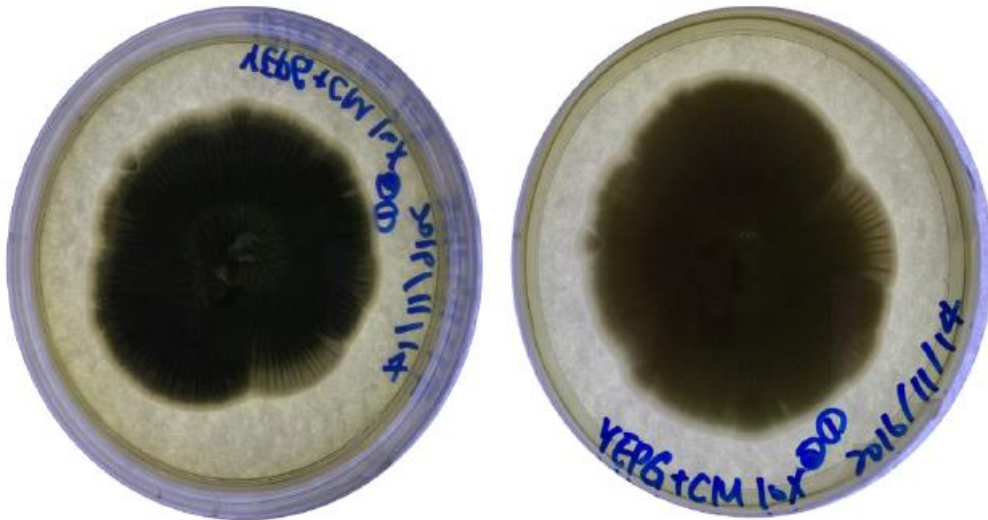
CGYC9 16S rDNA sequence (*Bacillus thuringiensis* Bt18247 100% identities)

```
TCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC  
ATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAA  
GCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCA  
ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGG  
TCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAA  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAG  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTA  
GCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGG  
TTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT  
CCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC  
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGT  
ACAAAGAGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT  
GCCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
ACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAG  
GTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC
```

NO9

真菌篩選與鑑定

- Yeast



篩選出僅一株真菌，根據菌落以及顏色推斷為綠黴菌。

