

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

有益微生物乳酸菌之 DNA 序列分析

計畫類別：V 個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNFH92-05

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳椒華

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：食品科技系

中華民國 93 年 2 月 1 日

有益微生物乳酸菌之 DNA 序列分析

一、摘要

本研究從市售鮮奶中分離出八株似乳酸菌菌株，經凝乳試驗、革蘭氏染色法、型態觀察及 catalase 試驗等測試，初步判定其為類乳酸菌菌株。經再進一步利用乳酸菌快速鑑定套組 (API 50CHL) 進行菌種鑑定，分別得到與 *Pedio. pentosaceus*、*Lacto. brevis* 及 *Lacto. para. paracasei* 等菌種有高相似度的菌種。為進一步確認所分離乳酸菌之種源性，本實驗再進行 16s rRNA 序列分析。經從 DNA 資料庫分析，選定數株乳酸菌之 16s rRNA gene 保守性序列當 primers，再進行本研究菌株之 PCR 增幅作用，所得 PCR 增幅產物再進行 DNA 序列分析。本研究所分離之類乳酸菌菌株的 16s rRNA gene 序列分析經與 GeneBank(GCG) 裡之乳酸菌 16s rRNA gene 序列進行比對，得到一株與 *Lacto. para. paracasei* 之 16s rRNA gene 序列相似度極高之菌株，其分析結果與 API 50CHL 之分析結果一致。

二、前言

乳酸菌為一群能夠發酵醣類而生成乳酸的細菌，在分類學上，大部分歸類於乳酸桿菌科 (*Lactobacillaceae*)，常成短鏈狀，為革蘭氏陽性菌，無運動性，無莢膜，不產生芽孢，但在體外 (in vitro) 培養時，普遍可見其多形性。厭氧和 5~10% 的二氧化碳常促進菌株於固體培養基上的表面生長。最適溫度一般為 30~40 °C，耐酸性強，一般在 pH5 或更低的情況下仍可生長，極少有致病性。其存在環境通常含有豐富的可溶性碳水化合物、蛋白質分解產物及維生素，且環境中溶氧低，因此在牛乳或乳製品、發酵

食品、秣草、完整或腐敗的蔬菜以及人或動物的腸道或黏膜等環境中可以很普遍地發現它們的存在。

至 1980 年眾所周知的一般乳酸菌有 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Streptococcus* 四個屬 (Frazier and Westhoff, 1978)，廣義的乳酸菌尚包括 *Bifidobacterium* 與 *Sporolactobacillus* 兩個屬。隨著乳酸菌種類之增加，傳統的形狀學、生理學特性做為區別之標準，越來越不敷使用，而且新屬的產生幾乎是依分子分類學的差異而定，球菌與短桿菌也可併再同一屬。在 *Carnobacterium*、*Atopobium* 與 *Weissella* 三屬之間，可以依各屬特性得到初步之區別性，但皆很難與 *Lactobacillus* 區別。另外二個桿菌屬 *Spicolactobacillus* 與 *Bifidobacterium* 都有其獨特之處，尚屬容易區別。目前研究之主要依據為 DNA 相似性和 RNA 序列之相似性，使傳統的形質特性 (形態學與生理學特性等) 無法判別之菌，都可以明確獨立成一類，賦與分類上之位置。

它們已被廣泛應用於食品、飼料及臨床醫學上，進以達到提供飲食中之營養及維持健康等目標。為此我們希望從自然界中尋找出有益於人體健康以及能夠應用於食品工業上之乳酸菌，並藉由利用分子技術之方法配合著傳統的鑑定方法來鑑定乳酸菌。傳統上乳酸菌類緣關係鑑定以生理生化特性，其中包含了革蘭氏染色法、型態觀察、運動性、氣體需求、孢子形成、催化酶試驗及 API 50CHL 快速檢測套組等分析，試驗菌株經屬之初步歸群後，再進行醣類發酵試驗、Esculin 水解試驗及

Tiamine 生長需求等試驗將以上實驗結果再對照著菌種分類手冊 (Bergey's manual of systematic bacteriology) 來判讀，便可得知初步所鑑定出的屬名及種名。另外也可以酵素電泳及 DNA 雜交法來進行鑑定。隨著生物技術之進步，乳酸菌的分類更為清晰，利用多種的分子技術方法，如 Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD analysis) (Du Khaled *et al.*, 1997)、Ribotyping (Zhong *et al.*, 1998)、Pulsed-field electrophoresis (PFGE) (Tenover *et al.*, 1995)、PCR analysis with species-specific primers (Yu-Li Song *et al.*, 2000) 等方法來鑑定菌種為目前較快速及精準之方法。

近十年來，因 16s rDNA 數據之大量累 (Du Khaled *et al.*, 1991)，尤其是在能迅速比對出最接近的種名之功能上，具有重大之意義。在此研究中欲依據乳酸菌之 16s rRNA gene 設計具保守性之核苷酸引子，以 PCR 方式增幅合成特定之 DNA 產物片段，進而分析 DNA 產物片段的序列，如果再與傳統方法比對所鑑定出之結果，則更能增加鑑定結果的準確性以及可信度。

三、材料與方法

1、類乳酸菌之分離方法

分離乳酸菌所用的培養基 *Lactobacilli* MRS broth (Difco 0881)。從市售鮮奶中取樣，將之懸浮於 MRS 液體培養基增殖培養後，然後適當稀釋菌液並畫線培養於 MRS 固體培養基上。

2、類乳酸菌的初步鑑定

由 MRS 培養基所分離之類乳酸菌再培養於 12% 的脫脂乳做凝乳試驗。

3、類乳酸菌之傳統生理生化鑑定

(1) 革蘭氏染色法、型態觀察：菌體以無菌牙籤塗抹固定於載玻片上，先以數滴 crystal violet 染色一分鐘後，用水洗去染料，再加數滴 iodine solution 固定 crystal violet 一分鐘後，用 95% 乙醇沖洗玻片，直到無色為止，再用數滴 safranin 染色 45 秒，用水洗去染料並用紙吸乾殘餘水分，靜置風乾，用光學顯微鏡觀察結果。

(2) Catalase 試驗：菌株培養於 MRS broth 取 37°C 培養 18 小時的菌液，塗抹於在玻片上，在滴上過氧化氫 (H_2O_2)，若有大量氣泡產生者為「陽性」反應，無氣泡產生者為「陰性」反應。

4、類乳酸菌之 API 50CHL 菌種鑑定

採用 API 50 CHL，API 50 CHL 收錄了 *Abiotrophia* *Bifidobacterium*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 與 *Weissella* 八屬之資料，故併用各種鑑定方法，可以鑑定出絕大部分之菌屬與菌種。本實驗採用 API50CHL 套組進行菌種鑑定，操作步驟如下：取單一菌落，在 MRS 培養基上以 37°C 厭氧環境下培養 24 小時，將培養盒中加入約 10ml 的無菌水，使盒中保持濕度，將 API 50CH strip 放入盒中，將培養基上所有菌落挑入 2ml 無菌水中混合均勻為濃菌液 s。再將 s 菌液滴入 5ml 無菌水中，調整濃度 2McFarland，記下所滴入的滴數為 n。接著 API50CHL medium 中滴入 2n 滴的 s 菌液，混合均勻使其最終濃度成 2McFarland。將此菌液加滿 API 50 CHL strip 各個試驗孔的 tube 部分，在各個試驗孔的 cupule 部

分覆蓋無菌礦物油。在厭氧環境下 37°C 培養，於 24 及 48 小時進行判讀。用 APILAB software 系統鑑定受試菌株之屬別。

5、類乳酸菌之 16s rRNA 鑑定

(1) 選定乳酸菌群 16s rRNA 之保守性 DNA 序列作為 primer

只用傳統鑑定方法比較不易區別某些新屬，而且目前主要是以 16s rDNA gene 序列比對來界定其屬名，本實驗是利用乳酸菌群中的 16s rDNA gene 之高度保留區設計出 primers，以 *Lactobacillus acidophilus* 之 16s rRNA gene (accession number m58802) 來設計出多對 PCR Primers (表一)，經 PCR 增幅作用後，以增幅出之 PCR 產物片段來分析出類乳酸菌的基因序列。

(2) PCR 增幅試驗

將培養在 MRS 平版上所分離的類乳酸菌，取單一菌落放入無菌水中，加熱煮沸進行 DNA 粗水解，取其上清液 5 μ l 當 DNA 模版，加入 10mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 1 μ l，primer 1、primer 2 (35 pmole/ml) 1.8 μ l 及 10 \times PCR buffer 5 μ l、1.25u 的 Taq DNA polymerase，補充無菌水至總量為 50 μ l，進行 PCR 反應 (Perkin Elmer 2400)，反應條件為 94°C 30s、55°C 30s 以及 72°C 30s，經過 35 cycles 後，以 1.5% agarose gel 進行電泳分離，以 ethidium bromide 染色，置於 UV 觀察。

(3) 16s rRNA PCR 產物片段的 DNA 序列分析

以 PCR 方式將乳酸菌群中的 16s rDNA gene 增幅後，進行基因定序 (ABI PRISM 377 sequencer)，將所之 DNA 序列與 GeneBank 之 16s rDNA 基因庫做比對。

四、結果

1. 類乳酸菌株篩選之初步確認

本實驗取市售鮮奶，將之懸浮於 MRS 液體培養基增殖培養後，由 MRS 平板培養基所挑出之類乳酸菌菌落，再培養於 12% 的脫脂乳做凝乳試驗。凝乳反應為“+”者 (脫脂乳凝固) 即可初步判定為類乳酸菌，本實驗所分離出之八株類乳酸菌皆具凝乳反應。(表二)

2. 革蘭氏染色法、型態觀察、catalase 試驗

在本實驗中所篩選出之八株類乳酸菌，再進一步的作革蘭氏染色法、型態觀察及 catalase 試驗 (表三)，所有菌株之革蘭氏染色皆呈陽性，catalase 試驗皆為陰性反應，在型態上的觀察有球菌及短桿型態，根據以上之結果可更進一步的確認所篩選出的八株菌為類乳酸菌。

3. 類乳酸菌之 API 50CHL 菌種鑑定

經過初步的測試、觀察後，本實驗所分離出的八株類乳酸菌，用 API 50CHL 套組進行菌種鑑定，經過厭氧環境下 37°C 培養 24 及 48 小時後，將所得到的結果，以 API LAB software 系統鑑定受試之類乳酸菌株之屬別，得到之結果如表四，所鑑定出的屬別有三種分別為 *Pedio. pentosaceus*、*Lacto. brevis* 及 *Lacto. para. paracasei*，在這八株類乳酸菌中，其中以 L1 之菌株，其 ID % (percentage of identification) 鑑定百分比高達 99.2%，其餘菌株之鑑定百分比也有 90% 以上。

4. PCR 增幅作用後進行序列分析

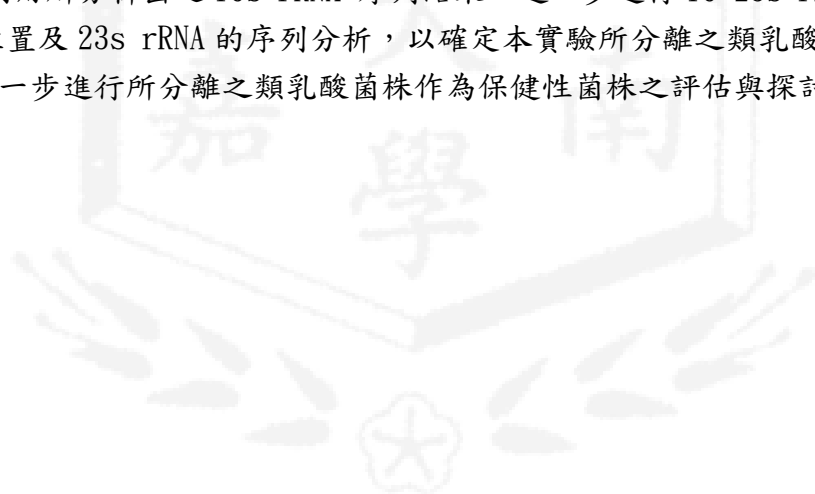
利用 *Lactobacillus acidophilus* 之 16s rRNA gene 所設計出的 primers，經增幅作用所產生的產物大小分別為 L16S-1/ L16S-2 359bp、L16S-1/ L16S-3 766bp、L16S-1/ L16S-4 1129bp、L16S-1/ L16S-5

1533bp (圖一) 將所得之 PCR 產物進行類
乳酸菌 DNA 之基因定序，將所得到的 DNA
序列 (表五) 與 GeneBank 之 16s rDNA 基

因庫做比對，結果顯示所分離之類乳酸菌
株 L1 與目前 GeneBank 中已知菌種間有 99
% 相似度 (表六)。

五、討論

- 1、本研究從鮮奶中分離出 8 株類乳酸菌菌株，經過凝乳試驗、革蘭氏染色法、
型態觀察及 catalase 試驗等，檢測結果顯示所採用之菌株皆為不具運動性、
革蘭氏陽性、catalase 為陰性之球菌或桿菌，初步判定為類乳酸菌菌株。
經利用乳酸菌快速鑑定套組 (API 50CHL) 進行菌種鑑定，分別得到與 *Pedio*
.pentosaceus、*Lacto. brevis* 及 *Lacto. para. paracasei* 等菌種有高相似度的菌種。
- 2、本研究選定乳酸菌 16s rRNA 之保守性 DNA 序列作為 primers，進行 PCR 增幅作用，
所得之 PCR 產物與預期的產物大小結果一致。
- 3、本研究所分離之類乳酸菌菌株的 16s rRNA gene 序列分析經與 GeneBank(GCG)裡
之乳酸菌 16s rRNA gene 序列進行比對，得到一株與 *Lacto. para. paracasei* 之
16s rRNA gene 序列相似度極高之菌株，其分析結果與 API 50CHL 之分析結果一致。
- 4、本實驗將利用所分析出之 16s rRNA 序列結果，進一步進行 16-23s rRNA intergenic
spacer 位置及 23s rRNA 的序列分析，以確定本實驗所分離之類乳酸菌株之種源性，
未來將進一步進行所分離之類乳酸菌株作為保健性菌株之評估與探討。



表一、選定乳酸菌 16s rRNA gene 之保守性 DNA 序列作為 primers

Primer	Sequence 5' - 3'	Length	direction
L16S-1	AGACTTTGATCCTGGCTCAG	20	forward
L16S-2	ATGTCCCAATGTGGCCGAT	19	reverse
L16S-3	GCCACTGGTGTTCCTCCATA	20	reverse
L16S-4	CATCTCACGACACGAGCTG	19	reverse
L16S-5	TCATCTGTCCCACCTTAGAC	20	reverse

表二、所分離類乳酸菌菌株之凝乳試驗結果

菌株編號	37°C 凝乳試驗 (培養 24 小時)
M28	+
M51	+
M42	+
M43	+
Lac01	+
L10	+
S1	+
L1	+(培養 72 小時)

表三、所分離類乳酸菌菌株之革蘭氏染色、型態觀察及 catalase 活性試驗

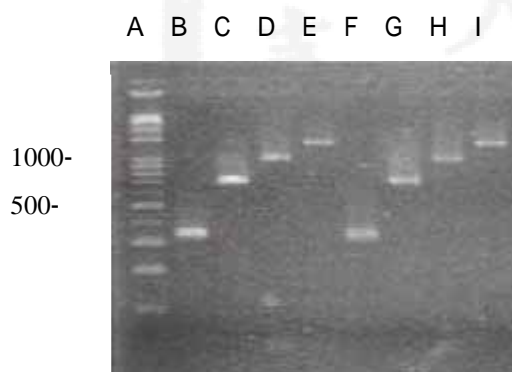
菌株編號	革藍氏染色	型態觀察	catalase 試驗
M28	+	短桿菌	—
M51	+	球菌	—
M42	+	球菌	—
M43	+	球菌	—
Lac01	+	短桿菌	—
L10	+	球菌	—
S1	+	短桿菌	—
L1	+	短桿菌	—

表四、利用 API 50CHL 鑑定套組鑑定本實驗所分離出之類乳酸菌菌株

菌株編號	API 50 CHL results	
	Taxon	%id ^a (comments) ^b
M28	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
M51	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
M42	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
M43	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
Lac01	<i>Lacto. brevis</i>	97.8% (good)
L10	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
S1	<i>Pedio. pentosaceus</i>	93.0%(good)
L1	<i>Lacto. para. paracasei</i>	99.2%(very good)

^a% id=percentage of identification

^b Identification of selected taxon : excellent=% id 99.9 and T 0.75 ; very good=% id 99.0 and T 0.5 ; good=% id 90.0 and T 0.25 ; acceptable=% id 80.0 and T 0.0



圖一、本實驗所分離出之類乳酸菌菌株，經選定乳酸菌 16s rRNA 之保守性 DNA 序列作為 primers，進行 PCR 增幅所得到的產物大小分別為 (A) 100bp DNA ladder ; (B) M28 L16S-1/L16S-2 359bp ; (C) M28 L16S-1/L16S-3 766bp ; (D) M28 L16S-1/L16S-4 1129bp ; (E) M28 L16S-1/L16S-5 1533bp ; (F) L1 L16S-1/L16S-2 359bp ; (G) L1 L16S-1/L16S-3 766bp ; (H) L1 L16S-1/L16S-4 1129bp ; (I) L1 L16S-1/L16S-5 1533bp

表五、類乳酸菌 L1 16S rRNA 序列分析之結果

1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	ACGAAC GAGTTCTCGT
51	TGATGATCGG	TGCTTGCACC	GAGATTCAAC	ATGGAACGAG	TGGCGGA. CG
101	GGTGAGTAAC	ACGTGGGTAA	CCTGCCCTTA	AGTGGGGGAT	AACATTTGGA
151	AACAGATGCT	AATACCGCAT	AGATCCAAGA	ACCGCATGGT	TCTTGGCTGA
201	AAGATGGCGT	AAG. CTATCG	CTTTTGGATG	GACCCGCGGC	GTATTAGCTA
251	GTTGGTGAGG	TAATGGCTCA	CCAAGGCGAT	GATACGTAGC	CGAACTGAGA
301	GGTTGATCGG	CCACATTGGG	ACTGAGACAC	GGCCAAACT	CCTACGGGAG
401	GCAGCAGTAG	GGAATCTTCC	ACAATGGACG	CAAGTCTGAT	GGAGCAACGC
451	CGCGTGAGTG	AAGAAGGCTT	TCGGTTCGTA	AACTCTGTT	GTTGGAGAAG
501	AATGGTCGGC	AGAGTAACTG	TTGTCGGCGT	GACGGTATCC	AACCAGAAAG
551	CCACGGCTAA	CTACGTCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG	GTGGCAAGCG
601	TTATCCGGAT	TTATTGGGCG	TAAAGCGAGC	GCAGGCGGTT	TTTTAAGTCT
651	GATGTGAAAG	CCCTCGGCTT	AACCGAGGAA	GCGCATCGGA	AACTGGGAAA
701	CTTGAGTGCA	GAAGAGGACA	GTGGAACTCC	ATGTGTAGCG	GTGAAATGCG
751	TAGATATATG	GAAGAACACC	AGTGGCGAAG	GCGGCTGTCT	GGTCTGTAAC
801	TGACGCTGAG	GCTCGAAAGC	ATGGGTAGCG	AACAGGATTA	GATACCCTGG
851	TAGTCCATGC	CGTAAACGAT	GAATGCTAGG	TGTTGGAGGG	TTTCCGCCCT
901	TCAGTGCCGC	AGCTAACGCA	TTAAGCATTG	CGCCTGGGGA	GTACGACCGC
951	AAGGTTGAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGG	CCCGACAAG	CGGTGGAGCA
1001	TGTGGTTTAA	TTCGAAGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCAGGT	CTTGACATCT
1051	TTTGATCACC	TGAGAGATCA	GGTTTCCCCT	TCGGGGGCAA	AATGACAGGT
1101	GGTGCATGGT	TGTCTTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCG
1151	CAACGAGCGC	AACCCTTATG	ACTAGTTGCC	AGCATTAGT	TGGGCACTCT
1201	AG. TAAGACT	GCCGGTGACA	AACCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT
1251	CATCATGCCC	CTTATGACCT	GGGTTACACA	CGTGCTACAA	TGGATGGTAC
1301	AACGAGTTGC	GAGACCGCGA	GGTCAAGCTA	ATCTCTTAAA	GCCATTCTCA
1351	GTTCCGACTG	TAGGGTGCAA	CTCGCCTACA	CGAAGTCGGA	ATCGCTAGTA
1401	ATCGCGGATC	AGCACGCCGC	GGTGAATACG	TTCCCGGGCC	TTGTACACAC
1451	CGCCCGTCAC	ACCATGAGAG	TTTGTAACCA	CCGAAGCCGG	TGGGGTAACC
1501	.. TTTT. GGA	GCGAGCCGTC	TAAGGTGGGA	CAAATGATTA	GG

表六、類乳酸菌 L1 之 16S rRNA 序列分析比對之結果

BestFit Results	
Refine	
BESTFIT of: <u>L1-16Snew</u> check: 7360 from: 1 to: 1456	
to: <u>d79212.gb_ba</u> check: 1875 from: 1 to: 1522	
WPDEF	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene for 16S rRNA, partial
LOCUS	LBA16SRRNA 1522 bp DNA linear BCT 28-JAN-2003
DEFINITION	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei gene for 16S rRNA, partial sequence.
ACCESSION	D79212
VERSION	D79212.1 GI:1808583 . . .
Symbol comparison table: <u>swgapdna_cmp</u> CompCheck: 2335	
Gap Weight:	50 Average Match: 10.000
Length Weight:	3 Average Mismatch: -9.000
Quality:	14200 Length: 1457
Ratio:	9.786 Gaps: 4
Percent Similarity:	99.655 Percent Identity: 99.655

