

第十四屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA14-243

作品名稱：開發常溫超高壓新方法於環境
及食品中微生物的快速精確檢測

姓名：徐碩飛

關鍵字：常溫超高壓、生物多樣性、
食品安全

研究動機與目的

在環境微生物多樣性探勘與食品安全課題中病原菌的研究，目前的方法限制，仍在難以快速有效的揭露全樣本中的各個體與多型多樣性。環境中超過九成以上的微生物無法或非常難以培養分離，目前常改以直接探勘 total DNA 取代純系分離培養，但主要限制在每次能處理的樣本量相當有限而仍難虧全貌。在需求日益增加的食品安全研究中，亦因複雜的食品組成限制，難以快速的分離偵測病原菌的存在，常須曠日費時的篩選分離與純系培養過程，且經常又會掛一漏萬。

近年來在食品產業，發展了常溫超高壓加工技術，利用常溫下的超高壓力取代高溫滅菌，以維持商品更大的原始色香味及營養機能特性。本研究即擬跨領域的開發利用這種簡易便捷的新方法，於生物多樣性及食品安全的利用。簡言之，以常溫超高壓快速、大量、並有效的處理土壤樣本或食品樣本，取得全樣本中的所有微生物的總去氧核糖核酸成份 (total DNA) 後，即可以各種已成熟的 PCR 技術放大增幅並分析其中的所有微生物物種。這種方法將能顯著增益生物多樣性探勘與食品安全檢測，突破先前以化學破碎樣本細胞方法中的可處理樣本量有限，與揭露代表性不足等兩方面的限制；這種新方法的另一項好處在於為物理性破碎取代化學藥劑，對於環境生態保護與操作人員安全等的環安衛層面也有相當大的附帶好處。

研究設計以土壤、麥麩中生物多樣性，與非包裝飲食品中微生物安全為實證模式。研究發現並證實，利用常溫 30°C、300 Mpa 超高壓一次大量的破碎土壤、麥麩與食品樣本並釋出全部所含全部微生物 DNA，經以細菌 16s rDNA V3 區域與真菌 18s rDNA NS2 區域專一引子對放大，並以變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 檢測微生物多型性，結果顯示此新方法可於農場耕作與休耕中土壤、麥麩樣品與市售飲品，分別較現行化學分解萃取方法，能得到多達 66%、50%、47%、80% 的細菌多樣性，與 166%、133%、25%、66% 的真菌多樣性條帶圖譜的增加，明確顯示本方法之可行性與優異性。

背景說明

生物多樣性所提供的豐富遺傳資源與穩定生態環境的功能等，是永續發展的重要基石。隨著生物科技蓬勃發展，許多研究紛紛以分子層次對各類環境中的遺傳多樣性探勘並開拓了前所未見的新視野與新發現。以環境樣本中微生物多樣性為例，傳統純系篩選培養方法僅能成功檢視分離不足 10%甚至在某些極端樣本中不足 0.1%的物種。利用現行分子生物學方法包括 total DNA 定序等，則可大幅提高可篩檢辨識比例，若再輔以新興的 metagenomics, next generation sequencing (NGS) 等高速高通量技術方法，則成效更彰顯。但是，嚴重的限制因素仍存在於目前所有慣用的自環境中萃取 DNA 等核酸遺傳物質的方法，都僅能每次處理極少、極有限的環境樣本，使得代表性與涵蓋面都深受限制。環境微生物多樣性研究的一個重要前端前提，在於儘可能分離提取所有樣本中的遺傳物質。目前在抽取微生物遺傳物質(genomic DNA)時，破壞微生物細胞以釋出遺傳物質之最常用的酵素溶解法，每次能處理的樣品量極為有限且費時耗工，又有化學物質對環境與人員的潛在威脅。

食品及其加工產品常易受到病原菌的汙染而造成食物中毒，目前傳統檢測方法有選擇性培養基培養法、生化鑑定等，常需要數天才能檢測出結果，常緩不濟急，因此有效且快速檢測食品中可能存在的食品病原菌，開發一套快速的檢測法對目前食品安全問題是十分重要，同時食品中可能包含一種以上之病原菌，如何找到可以同時、快速、方便的方法來鑑定多種不同病原菌是相當的重要。近年來，利用 DNA 探針及相關技術發展的微生物檢測方法（PCR-RFLP、RAPD...等）雖已陸續用於病原菌檢測之用，但這些方法同樣也面臨如何克服大量樣品時的操作方便性，同時能否鑑定出不同的物種菌株等問題，因此發展一套更靈敏的檢測方法作為快速篩選食品病原菌是相當重要的。

目前食品工業界為尋求避免熱加工殺菌破壞營養成份與風味但又能確保滅菌完全不生安全危害，近年來已發展並在部份高價敏感產品中商業實施「常溫超高壓加工技術」。高壓加工技術（High Pressure

Processing, HPP) 又稱高靜水壓加工技術 (High hydrostatic pressure processing) 為新穎性的食品非熱加工技術，其特殊的加工方式是將任何形態的食品經由軟性包材密封後置於密閉的絕熱容器中，在常溫（或略高但低於 50°C 下）下以 100-600 MPa 的超高壓力，藉由通常是以簡單普通水為介質的壓力傳導（示意如圖 1），使食品中的微生物及酵素於極短時間內產生不可逆的物理破壞並失活，殺菌效果不受到包裝形態與體積大小的影響，但都能保持原有的風味與營養價值。該方法已被美國食品及藥物管理局 (US Food and Drug Administration, FDA) 列為可代替巴斯德殺菌法 (Pasteurization) 之非加熱殺菌技術。

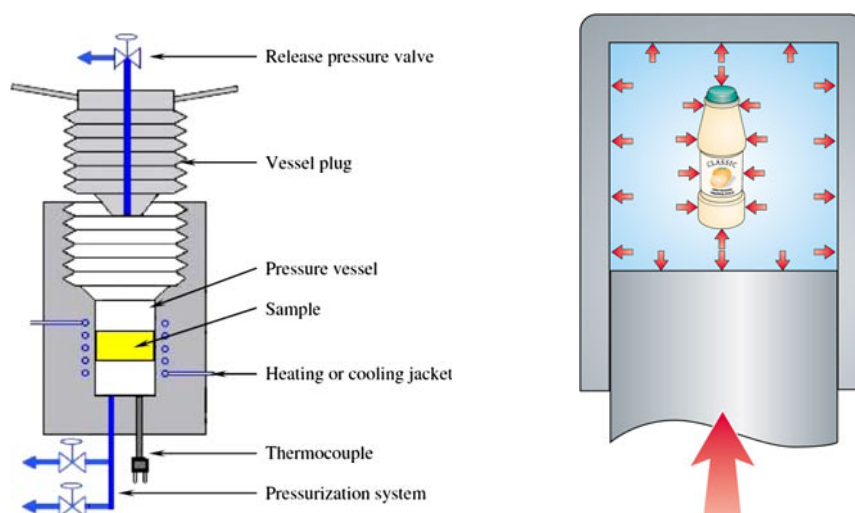


圖 1、常溫超高壓工作示意圖

超高壓過程破壞物質內非共價性鍵結（如 H 鍵、疏水鍵、離子鍵等），達到使酵素失活、或破壞菌體等目的。雖然各種環境的組成份與微生物因生理特性之不同而有不同的耐壓特性，並隨著壓力之增加可對微生物造成不同程度之影響，如 50MPa 壓力下可抑制微生物蛋白質的生合成、減少核糖體數量，200MPa 可造成細胞膜與細胞結構的破壞，當壓力達 300MPa 以上時會使酵素與蛋白質產生不可逆的變性、細胞膜破裂使細胞內滲漏，造成菌體的死亡（圖 2）(王，2013)。但本研究主要目的為證實新方法的可行性與有效性，因此對各種超高

壓力組合的最佳條件並未於現階段進一步探究，但已列入後續研究方向。

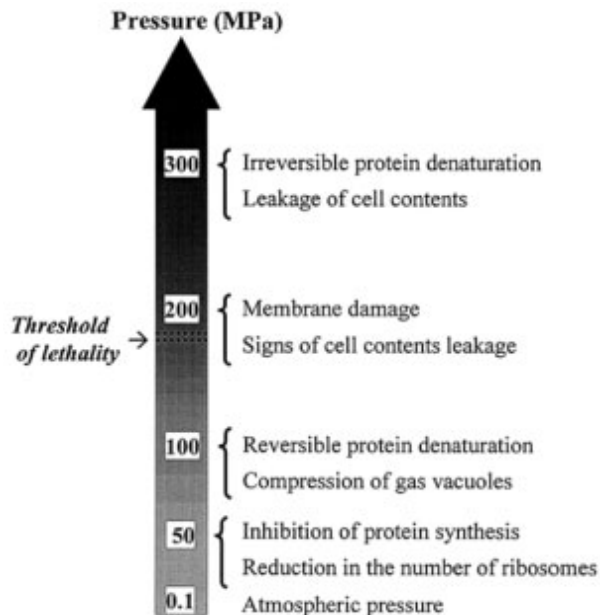


圖 2、不同壓力下造成微生物不同程度的傷害。(註，一般液壓設備油泵壓出的壓強約在 10~30 MPa，最深的馬裏亞納海溝底部水壓壓強為 1086 MPa，切割大理石的水刀的最高額定壓力不超過 400 MPa)

本研究所要分析環境微生物之多樣性與食品微生物安全檢測，將採以聚合酶連鎖反應(PCR)為基礎，結合變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)為研究。此設備為一種可以檢測擁有相同大小，不同序列混合 DNA 片段，彼此間差異的電泳方法。DNA 分子因鹼基對序列的不同，而有不同的 T_m (Melting temperature)值，而 DNA 序列變性程度與其 melting temperature 有關(圖 3)，一般含有較高 GC 鹼基對比例的序列有較高的溫度，因此低 T_m 值的 DNA 序列會在低濃度的變性劑作用下產生變性，而高 T_m 值的 DNA 序列則必須在較高濃度的變性劑作用下才會發生變性作用。DGGE 電泳膠體主要利用 urea 與 formamide 兩種電性物質製成濃度由低到高的變性梯度膠體，可將不同序列片段做分離(圖 4)。目前可應用範圍很廣，針對自然環

境中微生物進行種源鑑別、族群結構建立即遺傳歧異度分析，快速增加我們對複雜環境微生物之多樣性解析。現今 PCR-DGGE 技術已廣泛用於土壤、海洋、河流、湖泊水域、腸胃道、廢水處理生物反應器、蟲害、臨床樣本及食品的研究等。

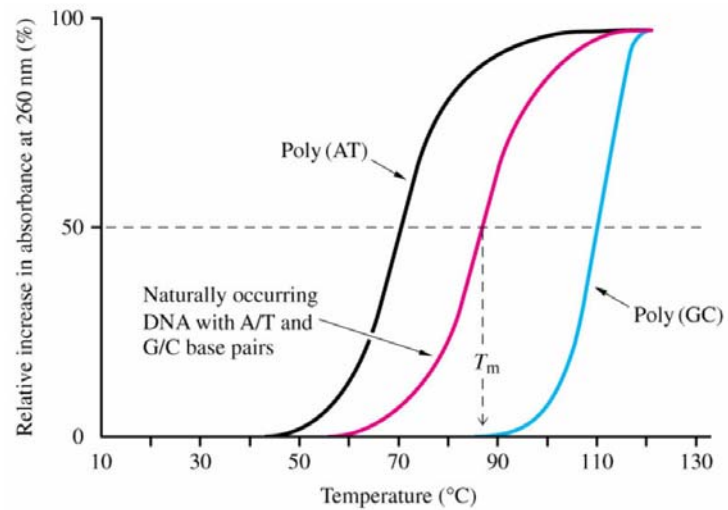


圖 3、DNA 分子的 T_m 值受到不同序列的影響

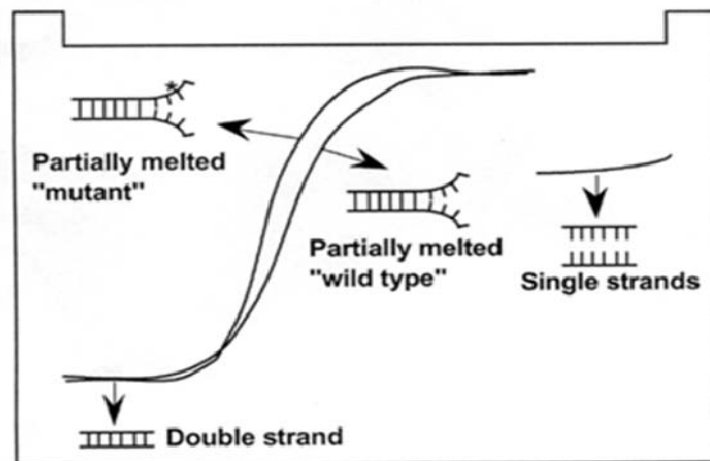


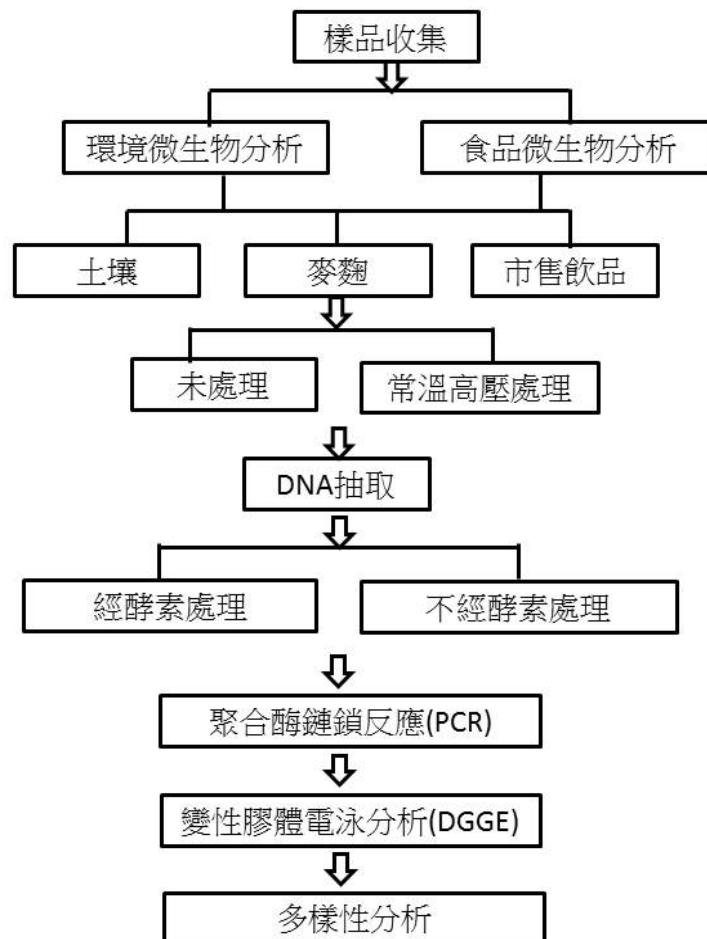
圖 4、DGGE 示意圖

本研究目的希望能利用常溫超高壓新方法，結合分子生物技術開發一套更能了解環境微生物多樣性與食品中微生物安全檢測之研究方法。本次研究採用土壤樣品與製酒之麥麴樣品做為環境微生物多樣性研究，因細菌與真菌為普遍存在於自然界之土壤微生物，種類繁多，於製酒之麥麴中更是豐富，且這兩種樣本都已有先前實作經驗可供比對確信度較高。於食品微生物安全檢測上，將採用市售非包裝果汁飲料為樣本，以此兩方向做為常溫超高壓新方法對於提升環境微生物多樣性與食品微生物安全檢測之實證模式。

研究方法與過程




一、 試驗設計架構

本研究採用土壤、製酒之麥麩、與市售果汁飲料做為實證模式樣本並設計對比試驗流程如下。

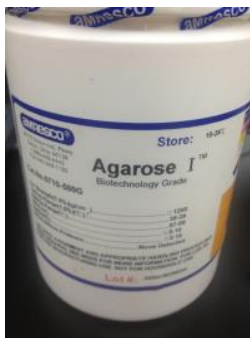


二、 採樣

土壤採樣地點為臺灣大學實驗農場，分別採集耕作中的 A 土壤，與休耕中的 B 土壤，土壤樣本採集自地表面 15 公分以下。市售飲料購買於公館夜市飲料攤販，將取得的樣本送回實驗室，同樣品分裝兩袋後，其中一半送食品工業研究所南部中心進行常溫超高壓處理，剩餘樣品即冰存於 4°C 備用。

			
耕作中土壤樣品採 集地點	休耕中土壤樣品採 集地點	麥麩樣品採集	市售果汁樣品
			
樣品分裝			

三、 研究設備及器材



Agarose



Health View™ Nucleic
Acid Stain & 100bp
Ladder DNA marker



鑄膠台



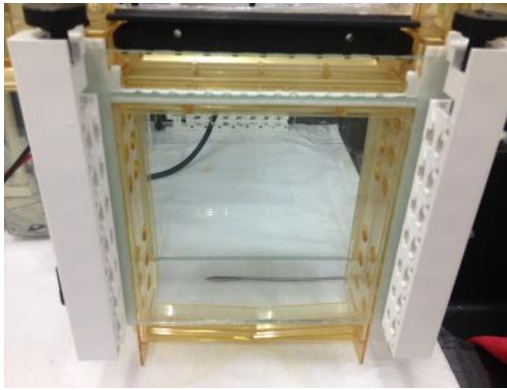
聚合酶鏈鎖反應機器



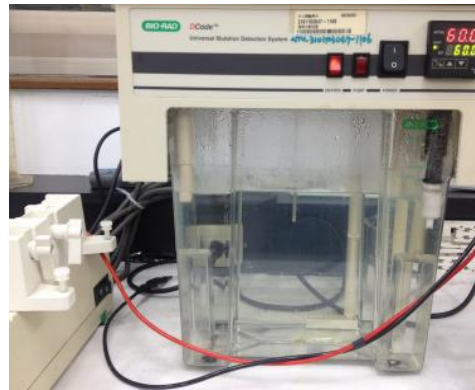
引子&PCR Taq



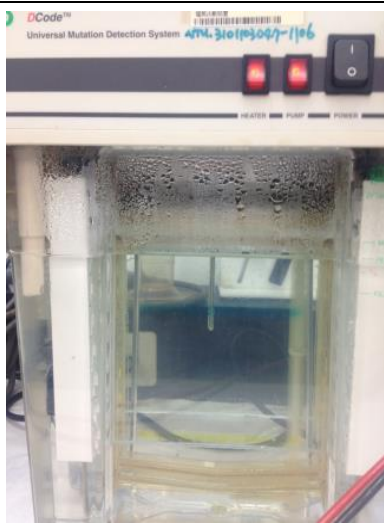
水平式電泳槽
(Mupid®-2plus, Cosmo Bio)



DGGE 膠片製備



DGGE 電泳槽



DGGE 電泳跑膠中



照膠系統



高壓儀器外觀



真空包送入高壓艙

四、 樣品高壓處理

將 10 克的土壤、麥麩樣品和 10 毫升果汁樣品分別裝入不同聚乙烯袋中，以真空包裝機密封後進行高壓處理，接著以 300 MPa 的超高壓力處理 5 分鐘，溫度設定在 30°C 之間，處理完成後，取出樣品保存在 4°C 以備後續的 DNA 萃取純化步驟

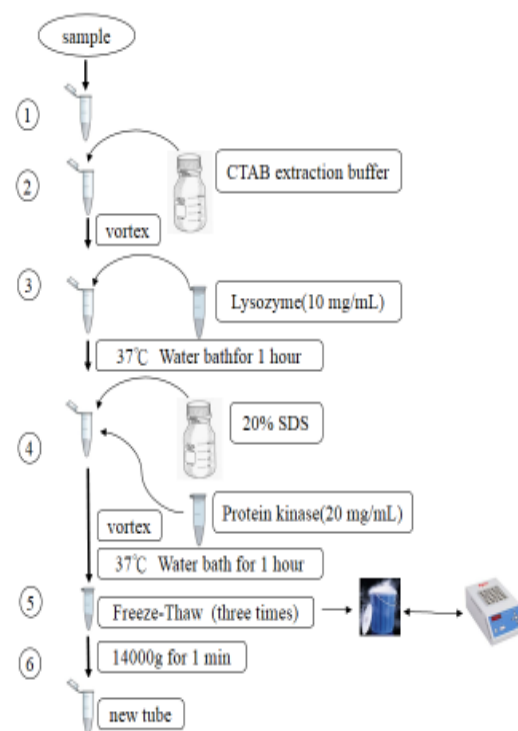
五、 樣品 DNA 抽取

將常溫超高壓處理完後的樣品迅速寄回實驗室做 DNA 萃取實驗。並探討高壓處理後對 DNA 萃取時有無添加 lysozyme 酵素處理，對 DNA 溶出之影響。在萃取微生物時，輔以溶菌酶(lysozyme)處理，主要功能用於將細菌細胞壁之 peptidoglycan 水解，使得菌體無法承受滲透壓逆境而破裂，可幫助 DNA 之萃取，但溶菌酶價格昂貴，本研究希望藉由常溫高壓技術能取代溶菌酶的添加，減少分析檢測樣品的成本開銷。樣品編號與處理方式如下：

樣品	樣品編號	樣品前處理+萃取DNA前處理
耕作中土壤	A0	未前處理+ lysozyme處理
休耕中土壤	B0	未前處理+ lysozyme處理
麩粉	C0	未前處理+ lysozyme處理
果汁	D0	未前處理+ lysozyme處理
耕作中土壤	A1	超高壓處理+ lysozyme處理
休耕中土壤	B1	超高壓處理+ lysozyme處理
麩粉	C1	超高壓處理+ lysozyme處理
果汁	D1	超高壓處理+ lysozyme處理
耕作中土壤	A2	超高壓處理
休耕中土壤	B2	超高壓處理
麩粉	C2	超高壓處理
果汁	D2	超高壓處理

(一) 萃取 DNA 法

1. 取適量 sample 至 eppendorf tube
2. 加500 μL 之CTAB extraction buffer ，vortex混合均勻
3. 加100 μL 之Lysozyme (10 mg/mL) ，37 $^{\circ}\text{C}$ 1小時
(此步驟依上述條件做修正)
4. 加30 μL 之20% SDS 及20 μL proteinase K (20 mg/mL) ，vortex混合均勻，37 $^{\circ}\text{C}$ 1小時
5. 以液態氮及65 $^{\circ}\text{C}$ 連續進行Freeze – Thaw step
(反覆三次)

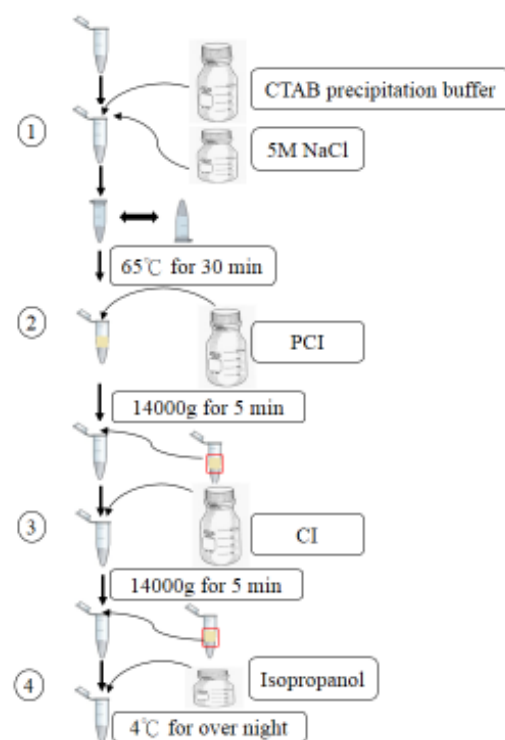


6. 14000 g離心1分鐘，取上清液至新的ependorf tube

◎土壤中含腐植酸與富啡酸，於萃取步驟加入polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)將之去除。

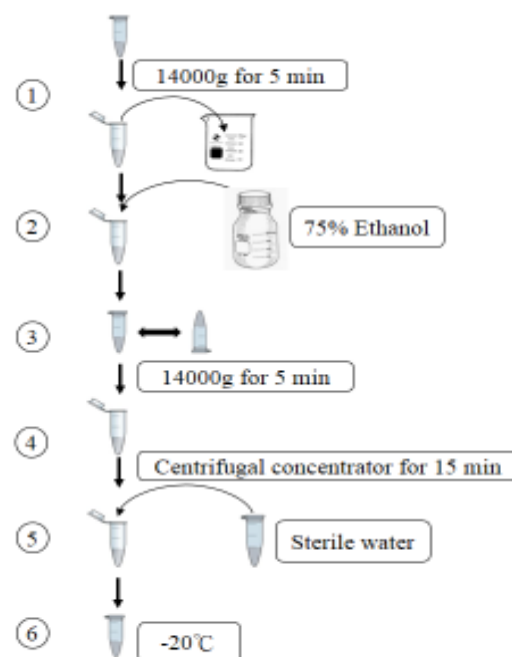
(二)分離沉澱

1. 加80 μL 之CTAB precipitation buffer與100 μL 之5M NaCl，
2. 上下翻轉數次混合均勻，65 $^{\circ}\text{C}$ 下反應30分鐘
3. 加一倍體積之PCI (Phenol:chloroform:Isoamyl Alcohol)，上下翻轉數次混合，14000離心5分鐘，取上清液至新的ependorf tube (此步驟重複數次，直到兩層介面中間無白色物質)
4. 加入等體積之CI，翻轉數次，14000離心5分鐘，取上清液至新的ependorf 加1~2倍的isopropanol溶液，上下翻轉混合置於4 $^{\circ}\text{C}$ 中沉澱over night



(三)DNA回收

1. 14000xg離心5分鐘，去除上清液
2. 加500 μL 之70%乙醇沖洗DNA沉澱物，上下翻轉數次
3. 14000xg離心5分鐘，小心去除上清液 (step2、3個重複1次)
4. 以真空減壓濃縮機離心15分鐘
5. 加入20-50 μL 之無菌水回溶DNA
6. -20 $^{\circ}\text{C}$ 貯存備用



六、 聚合酶鏈鎖反應

合成專一放大細菌 338Fgc-518R 區域的引子，及真菌 EF4-NS2 區域的引子。將引子濃度稀釋成 100 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ，分別加入 PCR 反應試劑 GoTaq Green Master Mix 12.5 μL ，引子各 0.5 μl (5 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$)，DNA 1 μL ，最後用去離子水將體積補至 25 μL 。PCR 反應條件如下

表 1、 Bacteria-338Fgc-518R 引子序列

16S rDNA V3 region			
Primer	Sequence(5'-3')	Target site	Production length
338Fgc	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG	16S (341-518)	220bp
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG		

表 2、 338Fgc-518R 片段 PCR 擴增條件設定

Temperature		Cycle numbers	Reaction
Stage 1	94°C , 5 min	1 cycle	Denature
Stage 2	94°C , 1 min	35 cycle	Denature
	52°C , 1 min		Annealing
	72°C , 3 min		Extending
Stage 3	72°C , 7 min	1 cycle	Extending

表 3、 Fungal— EF4-NS2 引子序列

18S rDNA			
Primer	Sequence(5'-3')	Target site	Production length
EF4	GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG	18S	400bp
NS2	TGC TGG CAC CAG ACT TGC		

表 4、EF4-NS2 片段 PCR 擴增條件設定

Temperature		Cycle numbers	Reaction
Stage 1	95°C , 9 min	1 cycle	Denature
Stage 2	95°C , 1min	35 cycle	Denature
	56°C , 1 min		Annealing
	72°C , 2 min		Extending
Stage 3	72°C , 7 min	1 cycle	Extending

七、瓊脂膠體電泳檢視

為確認 PCR 反應之產物大小，以電泳分析方法可檢視目標產物長度正確性。Agarose 加熱溶解後，隨著溫度降低會形成具有孔洞的結構，並且孔洞大小會隨著 Agarose 的濃度而改變。DNA 分子越大移動速度越慢，分子越小則移動速度越快，利用此一特性，達到分離純化 DNA 片段。

本研究將 PCR 反應後的產物，以 1% 的 Agarose 膠片進行電泳分析，即 0.4 g agarose 加入 40 mL 1X TAE buffer，微波加熱至完全溶解，稍待冷卻後加入 1.4 μ L Health View™ Nucleic Acid Stain(Genomics Biosci & Tech)並且混和均勻後倒入電泳膠片模型中，避光靜待 30 分鐘以上，以 100 伏特電壓水平式電泳槽 (Mupid®-2plus, Cosmo Bio)進行電泳，並以 100bp Ladder DNA marker (Yeastern Biotech Co., Ltd)做為 marker。電泳結束後將膠片取出置於電泳膠片截取系統(GBox/EF syngene)，確認產物分子量大小與專一性。

八、DGGE 電泳分析

(一)垂直電泳

鑄梯度膠時，需以 Dcode 系統中之 Model 475 Gradient Former 進行鑄膠。將 PCR 所得產物混合，取 100 μ L 並加入 2X Gel Loading Dye，當電泳槽 buffer 溫度到達 60 °C 時，將樣品注入電泳膠片

上，以 120V、5 hr 進行電泳。將電泳膠片取出後以染劑進行染色 15 min，而後進行退染 10 min，再以電泳膠片影像截取系統觀察之。

(二)水平電泳

鑄梯度膠時，需以 Dcode 系統中之 Model 475 Gradient Former 進行鑄膠。取 PCR 產物 40 μ L，當電泳槽溫到達 60 °C 時，將樣品注入電泳膠片上，以 120 V、5 hr 進行電泳。將電泳膠片取出後以染劑進行染色 15 min，而後進行退染 10 min，再以電泳膠片影像截取系統觀察之。

研究結果與討論

一、 樣本超高壓處理

超高壓萃取條件依設備額定參數可調整進樣體積與不同壓力。本次研究為新方法可行性的實證，因此以一般操作法處理，將分裝後的樣品分別取 10 克的土壤、麥麩與市售飲品裝入聚乙烯袋中，再以真空包裝機密封後進行超高壓處理，設定條件為 300 MPa 的超高壓力處理 5 分鐘，溫度設定於 30°C，處理完成後，即進行研究室分析。這次處理條件已明顯看出實驗結果的差異性，也證明此種前處理方法確實能提升微生物多樣性的更多揭露。至於測試研究最佳與最大揭露遺傳多樣性的超高壓處理條件組合，則將另列為未來研究方向。

二、 DNA 萃取

本實驗在 DNA 萃取時，將傳統未經超高壓處理的樣品(A0、B0、C0、D0)依慣行方法秤取 0.25g 土壤加入 Lysozyme 處理，幫助細胞壁的打破。而經常溫高壓處理的樣品(A2、B2、C2、D2)則不用 Lysozyme 處理，同時將多達 40 倍的 10g 樣品溶於 20mL 水中，直接取上清液進行 DNA 萃取。測定抽取的 DNA 品質可利用 260 / 280 監測核酸樣品中蛋白污染情形。因為蛋白的吸收峰是 280 nm。對於純淨的 DNA 樣品，比值大於 1.8。如果比值低於 1.8 或者 2.0，表示存在蛋白質或者酚類物質的影響。較純淨的核酸樣品 260 / 230 的比值大於 2.0。該比值小於 2.0 表示樣品中存在一些污染物，如 Tris，EDTA 和其他在 230 nm 有吸收的鹽類，以及含肽鍵的物質（如碳水化合物，多肽，苯酚等）。由 DNA 數值測定的結果（表 5）可明顯看出，經高壓處理後的 DNA 比未經任何處理所能萃取出來的 DNA 濃度更高，且在 260 與 230 比值都具有提升的效果，實驗更發現經超高壓處理並且純化 DNA 時不添加 Lysozyme 處理也能將 DNA 純化出。此研究結果證

實，超高壓處理可減少抽取 DNA 時使用 Lysozyme 的使用成本，同時也能用更大的樣品量去分析微生物多樣性，不再侷限於使用 kit 只能用微量克數進行 DNA 萃取。後續多樣性分析將取未處理樣品(A0、B0、C0、D0)與高壓處理樣品(A2、B2、C2、D2)進行 DGGE 分析。

表5，各種前處理方法所得到的DNA濃度

樣品編號		DNA濃度 ng/ μ l	260/280	260/230
耕作中土壤	A0 未前處理+ lysozyme處理	34.78	1.85	0.45
休耕中土壤	B0 未前處理+ lysozyme處理	34.04	1.91	0.46
麵粉	C0 未前處理+ lysozyme處理	168.15	1.69	1.12
果汁	D0 未前處理+ lysozyme處理	62.8	1.95	0.82
耕作中土壤	A1 超高壓處理+ lysozyme處理	216.65	1.38	0.77
休耕中土壤	B1 超高壓處理+ lysozyme處理	92.28	1.51	0.94
麵粉	C1 超高壓處理+ lysozyme處理	320.45	1.92	1.36
果汁	D1 超高壓處理+ lysozyme處理	162.1	1.72	0.86
耕作中土壤	A2 超高壓處理	62.87	1.41	0.86
休耕中土壤	B2 超高壓處理	78.20	1.56	1.05
麵粉	C2 超高壓處理	175.66	2.01	1.76
果汁	D2 超高壓處理	92.2	1.86	0.94

三、細菌與真菌引子 PCR 擴增結果

細菌引子對 338F-gc/518R 經 PCR 擴增後，以膠體電泳檢視擴增的片段大小是否正確以及是否具專一性，由圖 5 可得知此引子對擴增之片段 220bp 大小正確，同時此引子對專一性相當好。

真菌引子對 EF4-NS2 經 PCR 擴增後，由圖 6 可得知此引子對擴增的片段大小為 400bp，同時此引子對專一性相當好，將這兩片段產物作為後續 DGGE 電泳分析，分析其細菌與真菌之多樣性。

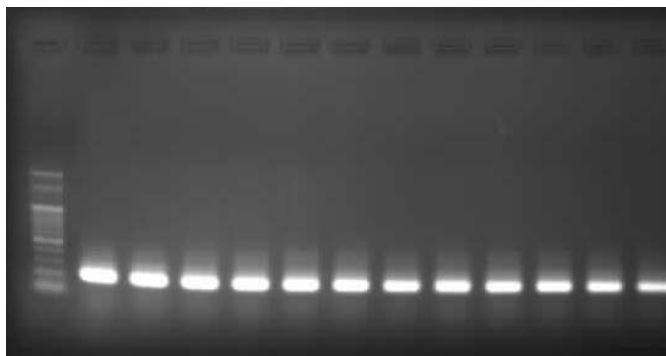


圖5、338F-gc/518R細菌引子擴增之片段大小比對

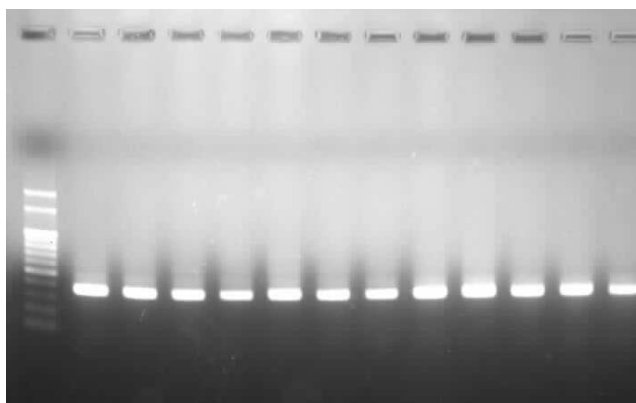


圖6、EF4-NS2真菌引子擴增之片段大小比對

四、變性膠體電泳分析結果

在細菌分析上，將樣品擴增的產物混和，先進行電性膠體濃度 0~100%的 DGGE 垂直電泳，在 35-55%的變性膠體濃度範圍中(圖 7)，樣品菌株之鑑別度最大，以此濃度範圍進行細菌菌株的 DGGE 水平電泳。由圖 8 與表 6 顯示，耕作中土壤樣品 A 在未高壓處理下呈現出的條帶為 6 條，經超高壓處理後呈現出 10 條，其提升率為 66%，未耕作土壤樣品 B 在超高壓處理下呈現出的條帶為 10 條，經超高壓處理後呈現出 15 條，其提升率為 50%，麥麩樣品 C 在超高壓處理下呈現出的條帶為 15 條，經超高壓處理後呈現出 22 條，其提升率為 47%。樣品 D 市售飲品在

未高壓處理下呈現出的條帶為 5 條，經超高壓處理後呈現出 9 條，其提升率為 80%，以上實驗均證實高壓處理能提升微生物多樣性之研究，成功開發快速高效與簡易環保的新方法應用於環境微生物多樣性的研究，顯著突破先前可處理之環境樣本量的限制。

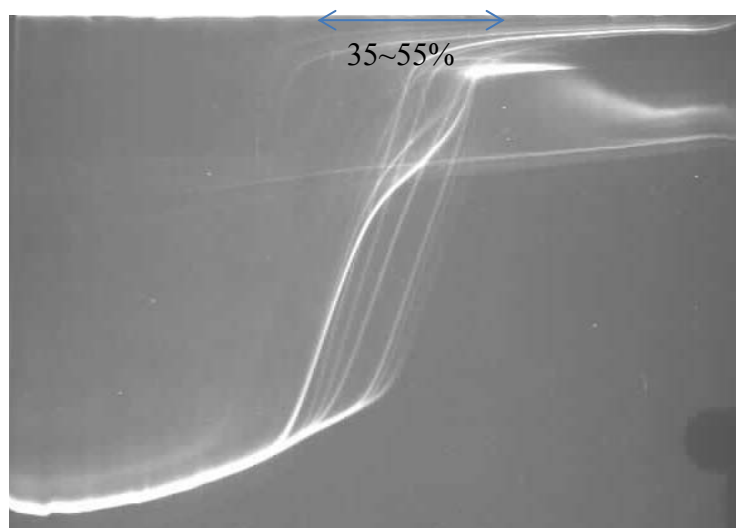


圖7、細菌PCR產物DGGE垂直電泳分析

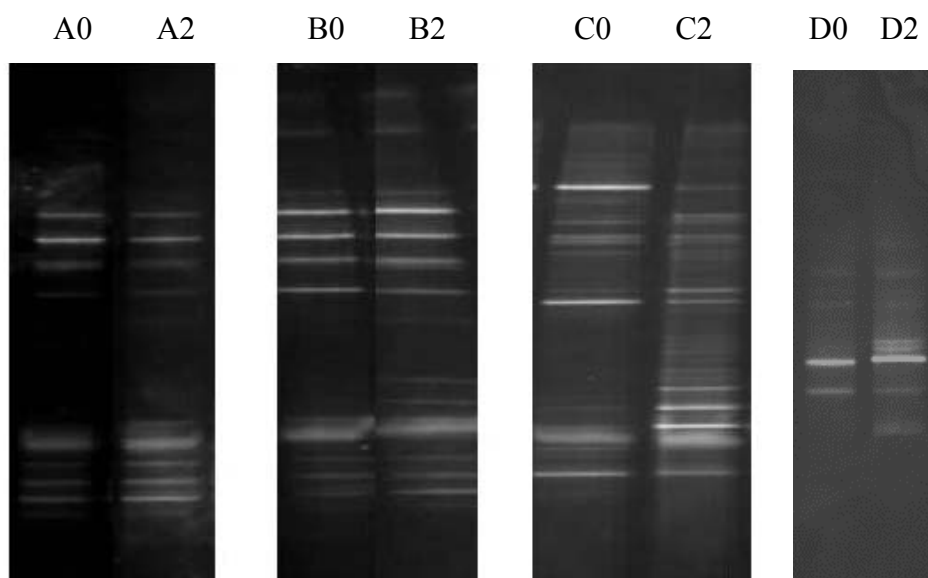


圖8、細菌338F-gc/518R引子擴增區域DGGE圖譜分析

表6、分析處理前後細菌多樣性之提升率

樣品編號	未高壓處理條帶數	超高壓處理條帶數	提升率%
A	6	10	66%
B	10	15	50%
C	15	22	47%
D	5	9	80%

在真菌分析上將樣品擴增的產物混和，先進行電性膠體濃度 0~100%的 DGGE 垂直電泳，在 40-60%的變性膠體濃度範圍中(圖 9)，樣品菌株之鑑別度最大，以此濃度範圍進行真菌菌株的 DGGE 水平電泳。由圖 10 與表 7 顯示，耕作中土壤樣品 A 在未高壓處理下呈現出的條帶為 3 條，經高壓處理後呈現出 8 條，其提升率為 166%，未耕作土壤樣品 B 在高壓處理下呈現出的條帶為 3 條，經高壓處理後呈現出 7 條，其提升率為 133%，麥麩樣品 C 在高壓處理下呈現出的條帶為 8 條，經高壓處理後呈現出 10 條，其提升率為 25%，樣品 D 市售飲品在未高壓處理下呈現出的條帶為 3 條，經超高壓處理後呈現出 5 條，其提升率為 66%。

經土壤、麥麩與市售果汁飲品 DGGE 菌相分析結果可明確的證明，利用此超高壓技術作為抽取 DNA 前處理步驟，確實能反應在菌相多型性分析之結果上。在 DGGE 的系統中，不同位置的條帶代表不同的菌株，而相同位置之條帶不一定代表同一菌株，還需進一步對其序列做確認，未來可將此菌株送生技公司進行菌株鑑定，並了解環境土壤的微生物菌種有哪些。

最後檢測市售果汁經高壓處理是否同時可達到抑菌效果，在微生物存活試驗中，果汁經高壓殺菌處理 30 分鐘，總生菌數均小於 2.3 log CFU/ml，符合了飲料衛生標準，高壓加工技術應用於果汁殺菌不但能維持原有果汁外觀、風味及品質，對未來果汁加工產業應用潛能無限。

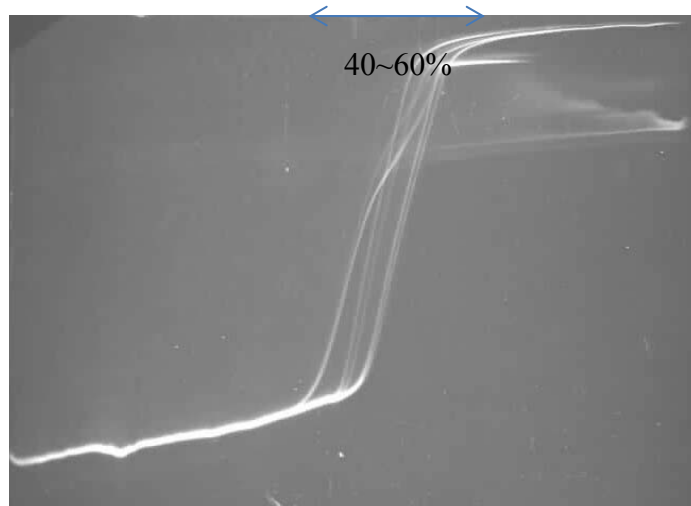


圖9、真菌PCR產物DGGE垂直電泳分析

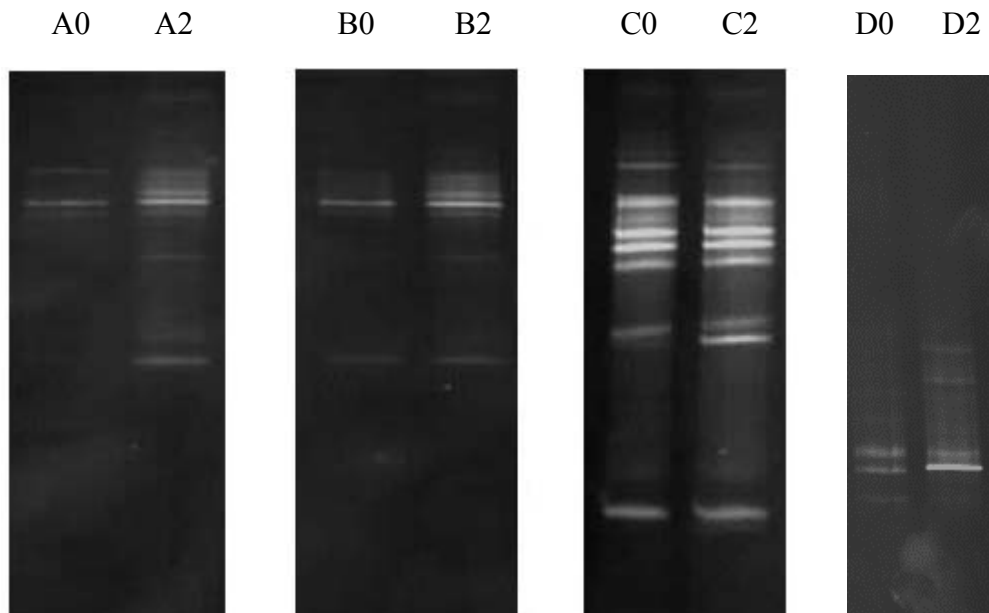


圖10、真菌EF4-NS2引子擴增區域DGGE圖譜分析

表7、分析處理前後細菌多樣性之提升率

樣品編號	未高壓處理條帶數	高壓處理條帶數	提升率%
A	3	8	166%
B	3	7	133%
C	8	10	25%
D	3	5	66%

結論與應用

1. 本研究以實證證明，利用超高壓處理方法可以一次大量獲得樣本中更具完整代表性的微生物遺傳物質；結果顯示僅以常溫 30°C、300 Mpa 超高壓處理，即可獲得品質與量都較現行以 lysozyme 處理的方法為佳的樣本中微生物組成 DNA，再經細菌真菌引子片段 PCR 放大後以 DGGE 檢視，更證明此新方法可更完整的揭露樣本中微生物族群相。此成功開發的快速高效與簡易且環保的新方法應用於環境微生物多樣性的研究，顯著突破現行可處理之環境樣本量與可偵測多型性等的限制。
2. 此新方法的理論基礎在於利用操作簡易並已應用於食品工業冷殺菌的常溫超高壓處理技術，物理破碎環境樣本中的微生物細胞並釋出其中遺傳物質。
3. 一般在環境土壤樣本抽取 DNA 時多僅能每次處理小於 1g 的樣品，且須添加化學藥劑並耗時費工。本常溫超高壓新方法則可極為簡單並於極短時間內，輕易處理數百至數千公克的環境樣本，不但可完全破碎釋出其中所有細胞中的 DNA，且過程中不須使用化學藥劑可另收保護環境與研究人員安全的附加效益。
4. 利用土壤、麥麩與市售飲品中細菌與真菌菌相多型性的研究實證，證實利用此新方法，確可顯著提升對環境樣本中微生物多型性與遺傳多樣性的揭露。

參考文獻

1. 王鐘毅。2013。微生物之耐壓特性。食品工業研究所專題報告。第45卷第8期。P44-51。
2. 王鐘毅。2013。食品高壓加工技術之應用現況。食品資訊 包裝與加工專刊。第256期。P68-71
3. Horton R., Moran L. A., Scrimgeour G., Perry M., Rawn D. 2005. Principles of Biochemistry. Pearson prentice Hall Company.
4. Wang C. Y., Huang H. W., Hsu C. P., Shyu Y. T. and Yang B. B. 2013. Inactivation and Morphological damage of *Vibrio parahaemolyticus* treated with high hydrostatic pressure. Food Control. 32, 348-353.
5. Wang C. Y., Ng C. ., Chen T. W. Wu S. J. and Shyu Y. T. 2007. Microbial diversity analysis of former salterns in southern Taiwan by 16S rRNA-based methods. Journal of Basic Microbiology 2007, 47, 525–533 525.