



財團法人
食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute

生物資源保存及研究簡訊 第28卷第2期

中華民國 104 年 6 月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎ 韓國與日本專家來訪，為未來可能合作奠基

研發成果 2

- ◎ 菌種鑑定技術協助產品驗證與拓展行銷
- ◎ 生物資源品管：複核加值生物資源保存庫及 DNA 複核資料管理系統
- ◎ 細菌蛋白質指紋快速鑑別分析
- ◎ 優質生物資源流通平台與產業服務

科技新知 9

- ◎ 微生物危害因子之檢測平台

韓國與日本專家來訪，為未來可能合作奠基



上圖右：韓國菌種中心 KCTC Dr. Doo-Sang Park 主任（右）與本中心 Dr. 袁國芳主任（左）簽署合作意向書。

上圖左：日本特許廳前田仁志課長（右三）、田邊正樹係長（左三），及日本交流協會五閑統一郎主任（左二）等人來訪。

下圖：日本生物資源中心 NBRC Dr. 川崎浩子課長（前排左二）、Dr. 藤田克利（前排右二）來訪。

韓國菌種中心 KCTC (Korean Collection for Type Cultures) Dr. Doo-Sang Park 主任及古生菌負責人 Dr. Byun Chan Kim 等二人於 3 月 30 日至 4 月 1 日來訪。來訪期間，Park 主任等二人透過實地與講解之參觀了解本所生資中心之業務，並以專題演講向同仁介紹 KCTC 及其在人體微生物菌相之研究，最後經過熱絡的座談討論溝通彼此合作之可能性。參訪結束前，Park 主任與本中心主任簽署合作意向書，為未來之實質合作奠基。

繼 103 年 11 月 20 日我國與日本專利生物材料寄存相互承認簽署合作備忘錄，日本特許廳前田仁志課長、田邊正樹係長，及日本交流協會五閑統一郎主任等人於 2 月 2 日參訪本所生資中心。來訪期間，本中心以簡報說明我國專利寄存程序以及分讓等業務體制，並安排參觀有關專利生物材料寄存之設施。前田課長等人並於座談時間與相關同仁進行交流，增進雙方對彼此制度之了解，並就專利寄存業務之進一步合作進行意見交換。隨後，日本生物資源中心 NBRC (Biological Resource Center, NITE) 產業創新課川崎浩子課長及 DNA 資源部門藤田克利博士來訪，藉著對本中心實地之參觀及與本中心同仁之座談，評估合作之可能方案。

（文：生資中心陳玉芬管理師）

菌種鑑定技術協助產品驗證與拓展行銷

生資中心 / 研究員
黃麗娜 / 謝松源

菌種鑑定平台支援微生物衍生產品安全驗證

菌種鑑定科技是確認微生物身分的關鍵技術，攸關產品價值之評估。在整體生技產業中，微生物是不可或缺的一項生物資源，也是產品製程中可能危害風險之一，正確的菌種學名鑑定，可提供產品安全性以及相關法規符合性要求之佐證，目前各國對於微生物類保健食品或健康食品之功效成分菌株，均要求須要出具正確的菌種鑑定報告，以益生菌類健康食品為例，甚至要求須達到不同菌株品系 (strain) 鑑別程度。選擇適當菌種以生產相關產品是許多生技公司最基本的決策與命脈，因此菌種正確鑑定對於產業界所生產的相關產品之成功與否具有重大影響，甚至影響商譽至鉅。菌種鑑定為一項專業技術，各項數據之判讀須具備豐富分類知識與專業能力，鑑定結果方可正確無誤。生資中心累積多年菌種分類鑑定知識與技術能量，對各界提供最具公信力的菌種鑑定服務，每年度均完成 250 案以上，服務產學研超過 90 個廠家單位；積極協助產業界解決生產菌種之正確學名鑑定，協助產品外銷及產業發展。專業的菌種鑑定服務除可支持國內生技食品產業菌種衍生產品之品質保證與安全驗證，也可協助 GMP 藥廠完備環境微生物監控與清潔確效，以符合國際 PIC/S GMP 查驗要求，建立專業製造形象，擴展

產品行銷與國際競爭力。

乳酸菌功效菌株分子分型鑑別技術，協助生技食品業者申請健康食品查驗登記，提升產品價值

根據 BCC Research 公司 2011 年市場研究報告顯示，益生菌原料、保健食品及其相關食品的全球市場，在 2010 年已達 216 億美元，以年複合成長率 7.6% 估算，在 2015 年全球產值可望達 311 億美元。其中食品類佔 90%，益生菌補充劑約佔 6.4%，足見益生菌相關產品在保健醫療市場之龐大商機與發展潛力。而在台灣乳酸菌相關保健食品的產值每年可達 75 億，且有逐年增加的趨勢，可見消費者對乳酸菌的保健功效是深具信心的。由於含有乳酸菌之益生菌產品廣為一般消費者視為對健康有益處並具安全性，而產品中所使用菌株品系，攸關產品所宣稱之功效與其安全性評估之適切性，目前國內外食品相關法規已經要求對益生菌保健產品之主成分菌株須要有正確的菌種鑑定資料及建立品管分析方法，以作為產品正確標示及可安全食用的佐證。世界衛生組織 (WHO) 及聯合國糧農組織 (FAO) 在 2002 年針對益生菌產品提出指導性原則，其中在菌種鑑定的部份要求菌株至少要鑑定至種名 (species)，最好可鑑定至菌株名 (strain)。而由歐洲食品安全局 (EFSA) 所制定之歐盟食用安全認定框架 Qualified Presumption

of Safety (QPS)，要求針對用於食品及飼料相關的微生物進行安全性評估，若符合 QPS，即可免去進行安全性評估，目前台灣與美、加、日、中等各國健康食品管理相關法規也有類似之規範。微生物之安全性評估需建立在明確的分類地位上，而正確的學名鑑定作為符合安全使用之正面表列菌株之佐證，將可大幅減少產品研發成本及加速商品化時程。由於益生菌的功效通常都具有菌株專一性，目前本國「健康食品申請許可辦法」第二條第五項要求申請健康食品查驗登記者須檢具「保健功效成分鑑定報告及其檢驗方法」，在 2014 年 242 項台灣健康食品認證產品中有 62 項與乳酸菌有關，約佔 26%。由於乳酸菌之保健功效是在菌株 (strain) 層次，因此衛生福利部食品藥物管理署要求業者，除了需提交產品端分離之成分菌株正確菌種鑑定報告之外，另需繳交產品成分菌株分型鑑別 (strain typing) 檢驗方法並提供檢驗結果，所提供之產品功效菌株次分型數據需以多株菌比較為基礎（一般至少 5 株同種名菌株做比較）方可確認保健功效成分菌株之專一性。因此，針對乳酸菌類產品申請健康食品認證，業界急需菌株品系鑑別之技術服務，使能完備產品查驗登記之要求。本所生資中心具備專業菌種鑑定核心能力，以微生物多相分類鑑定學為基礎，結合先進分子鑑定技術，運用具有鑑別力的特殊持家基因定序分析，以多重序列比對展現相關菌株之分型鑑別能力，協助業者建立其產品菌株專屬之身分識別分子標識，可確認產品符合健康食品查驗登記審查規格，亦可強化其產品品質管理，確保產品功效菌株

符合產品標示之宣稱。在 103 年度生資中心共計提供 6 家食品生技公司 13 件乳酸菌類保健產品成分菌株分離純化與菌種鑑定，及 17 株乳酸菌功效菌株之分型鑑別服務，協助相關業者建立產品功效菌株專一性鑑別身分條碼，可應用於與其他產品做鑑識區別，維護生產業者之權益，也能保障產品優良品質與消費者權益，並符合全球益生菌類機能性食品認證國際趨勢，將有利於開拓全球行銷以提升產品價值。

精準菌種鑑定佐證法規符合性，拓展海外行銷

本所以專業菌種鑑定技術成功協助產業解決產品菌名爭議，使蟲草產品可順利銷往香港及中國，某生技公司蟲草產品向香港衛生單位申請 "*Cordyceps Mycelia* CS4 (*Paecilomyces hepiali*)" 中成藥註冊時，被香港衛生單位認為該產品所使用的菌株之菌名不確定(使用菌株 *Paecilomyces* sp. 擬青黴屬)，該產品面臨停售下架問題，請本所生資中心協助進行菌種鑑定至種名。經本所以 rDNA 序列及形態特徵鑑定為蝙蝠蛾擬青黴 *Paecilomyces hepiali* (屬於中國普遍認可和使用，並被中國列入「保健食品真菌菌種名單」)。期間香港方面將產品另送香港一鑑定單位進行鑑定，該單位依 rDNA 序列鑑定為蟲草束棒孢 *Isaria farinosa*；另外該生技公司亦將菌種送至原菌種購買單位 - 中國食品工業發酵研究院 / 微生物菌種保藏管理中心 (CICC) 進行鑑定，CICC 以 ITS 及 β -tubulin 基因序列進行判讀，序列分析結果顯示可能是 *Isaria farinose* 或 *Paecilomyces hepiali*，與兩者的

rDNA 序列相似度都高達 99%。經本所協助該生技公司進一步與 CICC 專家討論鑑定結果差異，並小心檢視各項形態與基因序列數據，兩方獲得共識，形態特徵為真菌重要分類鑑定依據之一，當序列相似度高，無法僅由 rDNA 序列區別其歸屬時，應以形態特徵為主要的鑑定依據，因此雙方同意，該菌株應鑑定為蝙蝠蛾擬青黴 *Paecilomyces hepiali*，符合正面表列保健食品真菌菌種，該產品終可順利銷往香港及中國，達成產品外銷之擴展。

本所生資中心歷年執行經濟部科技專案計畫，已整合微生物及細胞之形態、生理生化、超微結構與基因型等特性，建立系統性菌種鑑定技術，提供產業界最具公信力之菌種鑑定服務，有效解決業者在生產與行銷上的關鍵問題，對公司之營利與商譽影響甚鉅。2012 年台灣生技製藥產業產值高達近 900 億，其中微生物

類保健食品產值超過 110 億，而在 2009 至 2014 年間食品所生資中心提供之菌種鑑定服務委託者類別中，36% 為生技應用領域，17% 為食品產業，16% 為醫藥研發，其次為生命科學教育和農林畜牧業，足見菌種鑑定技術可支撐生技、食品及醫藥產業發展，具體影響產值可達百億之上。食品所生資中心於 2000 年成為第一個將國際品質認證系統導入經營管理之生物資源中心，迄今持續擁有 ISO9001、ISO/IEC17025 與 ISO Guide 34 (參考物質生產機構) 等國際品質認證，服務系統與技術能力已獲各界肯定。未來將持續精進各項菌種鑑定技術，並加強商用菌種產品分子分型鑑別技術之開發，以協助提升食品及生技產業重要菌種鑑定與篩選效率，加速產品研發時程，強化產品製程品保，符合國際法規要求，以利產業界擴展出口優勢，提升品牌價值。

生物資源品管：複核加值生物資源保存庫及 DNA 複核資料管理系統

生資中心 / 研究員 / 管理師
邱世浩 / 李士瑛

複核加值生物資源保存庫

菌種鑑定是確認微生物身分的關鍵技術，正確學名將作為微生物分類演化及生理代謝等科學研究上的重要參考資料外，近年來亦為整體生技產業中產品價值的評估關鍵。新穎性分生技術可建立有效鑑別性並具有穩定再現性，逐漸降低的分析成本也讓大量複核及再鑑定工作具可行性，因此計畫性複核保存庫中

的生物材料，為全球重要生物資源中心近年來之重要品質管理工作。龐大保存量所衍生之試驗工作、品管查核及巨量資料維護等高額成本，都是大型生物資源中心面臨的新挑戰。在生物資源中心 (BCRC) 已保存近 3 萬株微生物，現行之生物材料保存管理體系，除記錄外觀形態、生理特徵等表現型特徵 (phenotypic characteristics) 外，並在本期計畫中新增擴充生物資源 DNA 複

表 1、100-103 年產業用菌株複核結果統計

DNA 複核結果		絲狀真菌	酵 母 菌	細 菌	放 線 菌	總 計
全程計畫複核數量		820	294	1,230	710	3,054
菌種 正確	菌名符合	703	287	1,186	614	2,790
	依據最新分類系統更名	96	3	23	57	179
菌名不符，更新庫房菌株		21	4	21	39	85
菌種正確百分比 (%)		98.0%	98.7%	98.3%	94.5%	97.2%
更新庫房菌株百分比 (%)		2.0%	1.3%	1.7%	5.5%	2.8%

核資料管理系統，以分子分類法建立基因型特徵 (genotypic characteristics)，系統性進行保存生物資源之身份標記與複核紀錄，以克服傳統分類鑑定法難以區別的菌種。

由於菌株特性品質要求與日漸增，正確學名與菌株安全管理密切相關，也連帶影響新穎性微生物相關產品的管理發展，這項系統性複核工作對產業界更形重要。本所生資中心對於生物資源的品管標準，採用目前國際上公認最具代表性的 DNA 序列比對法進行生物資源的身分確認。在細菌類生物資源主要以 16S 核糖體 RNA 作為辨識依據，不足者以其它 DNA 片段輔助，如 *gyrB* 基因片段等。真菌類生物資源則以 ITS (Internal Transcribed

Spacer) 為品管標準，另外也參考如 D1D2、 β -tubulin 等序列之資訊。本期計畫持續應用 DNA 分子複核技術優化生物資源銀行，優先選定各類標準參考菌株及產業用菌株，包括傳統發酵食品用菌、益生菌、酵素產業用菌、蟲生真菌、二次代謝產物及生物製劑用菌種等，將早期依據形態或生化特徵鑑定之學名，結合 DNA 序列比對法鑑定其正確性，加強菌株提供服務之品質保證。在本期科專 100-103 年間計畫工作中，已完成 3,000 株以上產業用微生物菌株之分子複核，統計生物資源保存庫菌株之複核正確率為 97.2 % (表 1)。

複核結果不符合之處理原則與說明

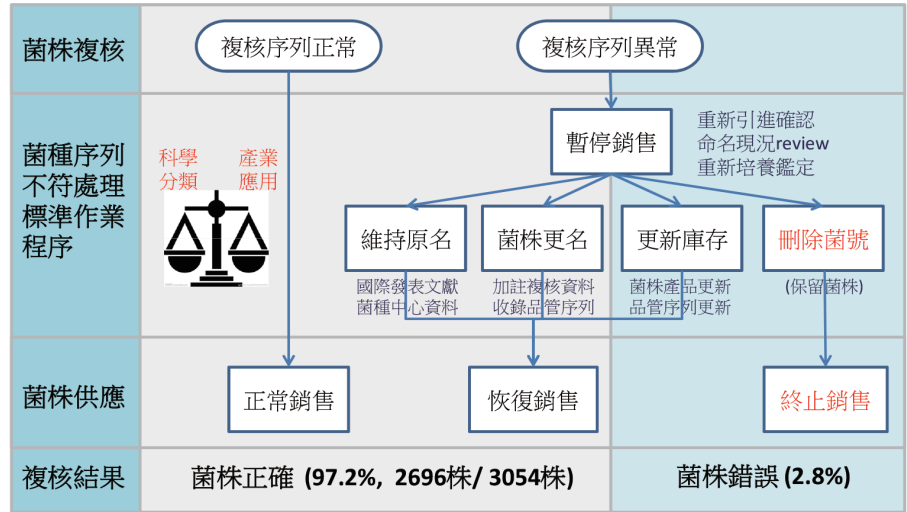


圖 1、生資中心複核菌株之菌種序列不符處理標準作業程序

因生物技術發展加速鑑定技術之進步，複核計畫中不可避免地發現複核菌名與原始紀錄登錄學名資料不符的情形，斷然地宣判菌株錯誤並刪除庫存，將可能影響菌株之產業可利用性。為兼顧科學分類正確與產業應用的管理平衡，BCRC 多次在亞洲及國際菌種聯盟會議中與德、日、荷等國分享複核品管經驗，已內化建立生資中心之「菌種序列不符處理標準作業程序」，累積銷售菌株處理回饋並使研究人員的菌株複核處理原則更符合顧客的期待 (圖 1)。

當複核序列結果顯示異常時，標準作業程序中除了暫停銷售服務外，並準備重新自外部引進菌株再行確認；同時研究人員橫向確認菌株的國際分讓脈絡，查詢世界生物資源中心的複核發表資料，並收集最新鑑定技術與分類文獻，準備重新培養鑑定。重新引進的生物材料建立包含 rDNA 複核之分類學數據，藉由品管記錄資料補充及國際鑑定分類文獻的佐證，BCRC 將更新保存菌株的學名資料，必要時需發表完整鑑定試驗結果以獲得有效支持。然而在該屬種分類演化資料並不詳盡時，BCRC 亦可能與全球專家相仿，選擇維持原學名繼續銷售分讓，但仍將持續關注鑑定分類趨勢，並針對不足鑑定

數據繼續研究。

早期保存工作受限於品管技術的不足，特殊類別生物材料亦容易發生錯誤保存的情形，若重新引進保存並透過培養鑑定程序釐清庫存菌株之問題時，需遵行「更新庫存」標準作業程序，進行不良品銷毀並重新製作菌株產品，同步更新菌株所有品管記錄及品管序列，當完成品質資料審查後，重新將正確訊息上架公開恢復銷售服務。其中，若確認菌株已無法重新引進更新時，我們將自菌種目錄中刪除保存編號，不再對外提供。本期複核計畫中約有 2.8% 保存菌株錯誤率，並已完成更新庫存之處理。

DNA 複核資料管理系統

為有效收集這些具辨識生物材料身分的序列，自 101 年起著手以電子化流程建置序列收集平台，使從實驗室端所產出之複核資料經審核端查驗後，可以順利串聯至後端資料庫。電子化平台可以將序列資訊的格式統一，也具日後可追溯的優點，之後更可將菌株之歷年複核資料擷取比對。

在目前生資中心所建置的電子工作流程架構下（圖 2），實驗室人員可在生物材料收集、生物材料抽驗以及庫房補菌等之例行性複核作業進行 DNA 複核資料之產出與儲存。而在菌株分讓與銷售作業時，庫房管理人員可根據菌株之 DNA 複核紀錄決定是否進行生物材料之出庫作業。在後端資料庫的管理與更新部分，目前區分為儲存資料庫與比對資料庫，儲存資料庫主要功能為儲存、管理由實驗室端傳入的序列資料，而比對資料庫則提供序列

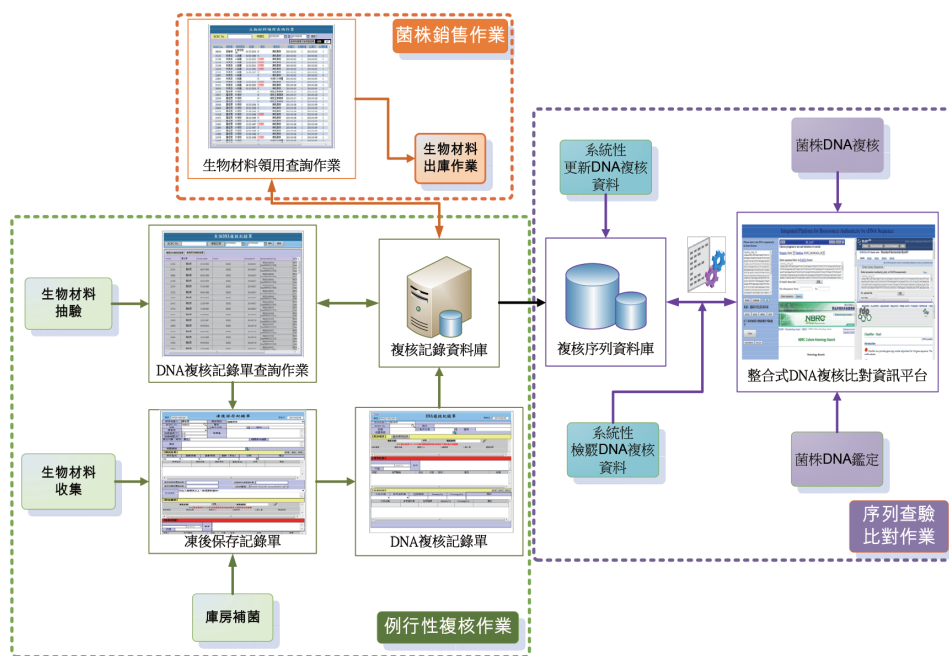


圖 2、DNA 複核資料管理系統

比對程式使用，目前已建置自動化更新程式可每日檢查是否有新增序列，同步更新至比對資料庫並寄發通知信給使用者。在序列比對系統建置部分，採用目前被廣泛使用的 NCBI blast 序列比對程式架構本地端比對系統，並利用權限管理，保護序列資料不被任意存取。目前在此序列比對系統已提供 15 種序列片段共萬餘筆序列資料給實驗人員進行菌株複核之工作。

由於全球已有多個序列資料庫，其中不乏有專家校正過之序列資料，為使本所生資中心自行建置之 DNA 複核資料庫可與其它序列資料庫相互參考，並提供實驗人員更完整的資訊，因此於 103 年規劃建置整合式 DNA 複核比對資訊平台。目前此平台整合了與生物材料鑑定相關的序列資料庫共 6 個，分別為本所自行建置、SILVA、Mycobank 序列資料庫，NCBI 序列資料庫、NBRC 序列資料庫、RDP。其中 Mycobank 是一個記錄各種真

菌的學名與形態描述的線上資料庫，目前有提供真菌身分鑑別的序列比對工具。SILVA 是個核糖體 RNA 的基因序列資料庫，主要提供細菌、古細菌和真核生物之 small subunit (SSU)、large subunit rRNA gene (LSU) 序列資料比對服務。而 RDP (Ribosome Database Project) 也是個核糖體 RNA 的基因序列資料庫，早期是以收集細菌、古細菌 16S 核糖體 RNA 基因序列，但自 2014 年 8 月起也開始提供真菌 ITS 序列比對服務。而本所自建序列資料庫、NCBI 序列資料庫、NBRC 序列資料庫則可以同時比對細菌、真菌序列資料。在這個整合式 DNA 複核比對資訊平台中，使用者只須貼上序列資料，即可同時比對四個主要序列資料庫，當結果回傳後，使用者可同時比較這四個資料庫的比對結果是否一致，透過這個平台，使用者可以更客觀判斷生物材料的真實身分。目前這平台並未對外開放，只限於本所生資中心內部使用。

細菌蛋白質指紋快速鑑別分析

生資中心 / 研究員
黃建勳 / 黃麗娜

菌種鑑定科技為確認微生物身分的關鍵技術，其攸關產品價值之評估，並可提供作為產品安全性以及相關法規符合性要求之佐證。現行菌種鑑定是採取多相分類學概念 (polyphasic taxonomy)，即結合形態學、生理生化特性與分子生物學數據加以判定⁽¹⁾，故具備技術多樣性，然而在分析速度與準確度無法同時兼顧下，經常會影響微生物品管及菌種開發時效，因此生物科技產業對於菌種鑑定的正確性及時效性之提昇需求殷切。

利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF MS) 進行微生物蛋白質指紋分析，是近年發展的新興菌種鑑定技術；藉由測定菌株全細胞的蛋白質指紋圖譜，並與資料庫中已知菌種身分的質譜圖比對，從而對未知菌種進行學名鑑定（操作流程簡示如圖 1）。一般而言，使用直接塗抹法 (direct-smear) 進行樣本處理，每個樣品盤放置 96 個樣品點，約在 2 小時內可完成所有分析，每一個樣品點所需使用的試劑耗材花費低於新台幣 100 元，相較於市售的微生物鑑定套組 (API) 與微生物鑑定系統 (BIOLOG、VITEK 2、MIDI 等)，在操作上更加簡便且成本更低，因此非常適用於大量樣品之初步快速分群鑑別分析；以全細胞質譜分析微生物的大分子解析範圍約在 2000~20000 Da 左右，此範

圍之蛋白質有很高比例是由核糖體蛋白 (ribosomal proteins) 及結構蛋白 (structural proteins) 系列的持家蛋白 (housekeeping protein) 組成⁽²⁻⁴⁾，其中核糖體蛋白不易受到外在培養條件影響，所以能保持良好重複性和再現性的質譜訊號以作為菌種鑑別之依據，又經由持家基因 (housekeeping gene) 所編碼的持家蛋白，對於一般微生物都能達到種層次之鑑別，或是近緣物種 (closely related species) 之區分，甚至是菌株品系 (strain level) 之分型，以及開發生物標記 (biomarker) 進行特殊品系之鑑定等，都有相當多的文獻佐證其解析能力，因而被認為具有取代細菌 16S rRNA 基因定序比對或輔助多基因座序列分析 (multi-locus sequence analysis, MLSA) 之潛力⁽⁵⁻⁹⁾。基於該技術分析時間短、成本低、解析度佳、高通量及可自行擴建質譜指紋比對資料庫等優點，廣泛運用於國際知名菌種中心 (如美國 ATCC、德國 DSM、

日本 NBRC、荷蘭 CBS 等) 之微生物複核品管、分類鑑定和大量菌株的快速篩選鑑別，故利用蛋白質質譜指紋分析已漸成為國際趨勢，將可作為微生物快速鑑別之利器。

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心積極迎合國際趨勢發展，於 2014 年引進由德國 Bruker Daltonics 公司所開發的 MALDI Biotyper 微生物鑑定系統，目前內建菌種資料庫含有 5627 株微生物蛋白質指紋資料 (涵蓋 380 菌屬及 2290 菌種別)，其中主要以臨床微生物居多，此平台已獲得歐盟、美國 FDA 及台灣 TFDA 體外診斷醫療器材 (IVD) 之驗證，可用於臨床病原菌之快速檢測。然而，相較於完備的臨床微生物比對資料庫，有關產業用菌株資料部分則尚未齊備有待加強，因此，本所生資中心將特別針對重要食品及生技產業用菌，如保健功效、品管監控、酵素生產與綠能環保等用途，建立相關參考菌株標準蛋白質質譜指紋資料庫，透過加強產業用微生物蛋白質指紋資料庫之建置與方法驗證，本中心將新增細菌快速鑑別服務，其可應用在益生菌產品之成分菌快速鑑別及計數、

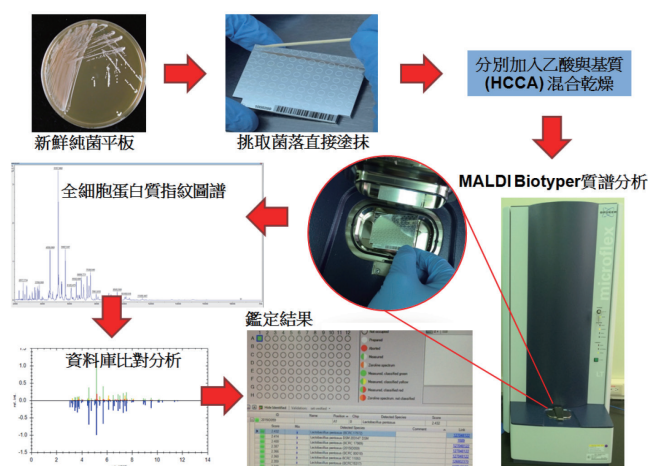


圖 1、以 MALDI Biotyper 進行菌種快速鑑別之流程示意圖

生產製程中微生物品管、食品污染病原菌檢測及生技製藥廠環境微生物監控等領域。

參考文獻

1. O. Prakaash , M. Vema, P. Sharma, M. Kumar, K. Kumari, A. Singh, H. Kumari, S. Jit, S. K. Gupta, M. Khanna, R. Lal. Indian J Microbiol. 47, 98 (2007).
2. A. Wieser, L. Schneider, J. Jung. Appl Microbiol Biotechnol. 93, 965 (2012).
3. C. C. Kem, R. F. Vogel, J. Behr. Food Microbiol. 40, 18 (2014).
4. R. Dieckmann, R. Helmuth, M. Erhard, B. Malorny. Appl Environ Microbiol. 74, 7767 (2008).
5. M. Welker, E. R. Moore. Syst Appl Microbiol. 34,2 (2011).
6. M. F. Lartigue. Infect Genet Evol. 13, 230 (2013).
7. O. Prakaash , M. Vema, P. Sharma, M. Kumar, K. Kumari, A. Singh, H. Kumari, S. Jit, S. K. Gupta, M. Khanna, R. Lal. Indian J Microbiol. 47, 98 (2007).
8. O. Sedo, A. Vadurova, L. Tvrzova, Z. Zdrahal. Rapid Commun Mass Spectrom. 27, 2729 (2013).
9. S. Ruiz-Moyano, N. Tao, M. A. Underwood, D. A. Mills. Food Microbiol. 30, 432 (2012).

的生物資源整合服務。生物資源流通服務平台為複合式科學服務管理技術之應用，包含生物資源相關法規研究、越境移轉與運輸、生物安全管理等管理模組，提供生物材料技術專家和長期維護之最佳保存環境、生物資源引進、儲存管理、生物安全管理支援和生物材料專業鑑定等重要基磐服務。

引進多樣化國際生物資源

本計畫長期與歐洲菌種聯盟、亞洲菌種聯盟、及國際菌種聯盟保持合作關係，提供國人便利之生物材料跨國移轉服務。全程四年透過生資中心流通平台自國外30餘家生物資源中心/菌種中心引進1,010株生物材料，其中以細菌650株最多、其次為人類及動物細胞97株、藻種86株，約占整體引進生物材料的80% (圖1-2)。國際生物資源引進後將交付委託人，在跨國移轉契約之約範下使用這些重要研發材料，部分資源則可進入生資中心長期保存管理體系，提供日後各界分讓使用。以103年引進數量來觀察，細菌研究在國內應仍屬重要標的且題材多樣化，研究成本較低且應用技術成熟，故而相對引進需求也較高。103年細胞株委託訂購數量居次，委託者包括學術界及業界，顯示細胞株研究需求與研發潛力不容小覷。96年起新增藻類代購

優質生物資源流通平台與產業服務

生資中心 / 管理師
李士瑛

生物資源保存及研究中心(BCRC)為亞洲最具規模之國際級生物資源中心，以世界前十大的營運能力提供多樣化的生物資源、資訊及相關技術服務。截至103年的統計，BCRC已累計收存28,068株微生物資源、19,688株細胞資源、120萬個選植株之基因資源，建立超過160項試驗服務能量，在71國678家菌種保存機構組成之世界菌種聯盟

中，是唯二可提供ISO9001、ISO17025及ISO Guide 34等國際品質管理系統認證之生物資源中心，為亞洲菌種中心領先標竿。

BCRC在科專計畫支持下，以永續維運、擴充加值、安全管理與應用服務四面向持續優質化生物資源銀行之經營管理，以生物資源流通服務平台支援我國生物經濟發展所需之生物資源長期安全保存服務，及相關產業重要

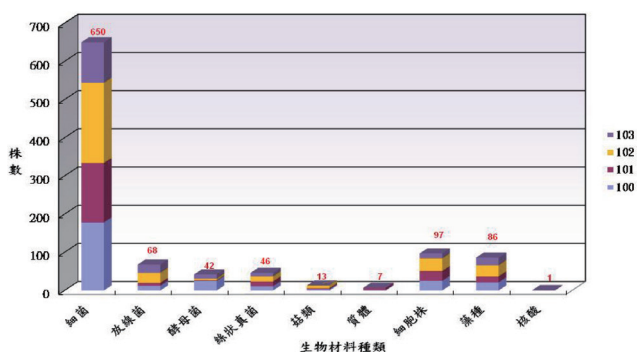


圖1、100-103年度引進生物材料之類別分析

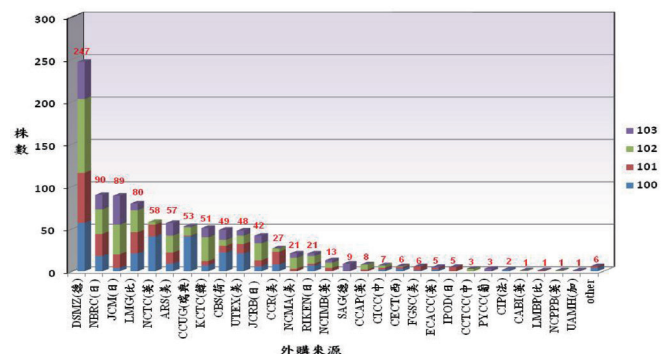


圖2、100-103年間生物材料引進來源分析

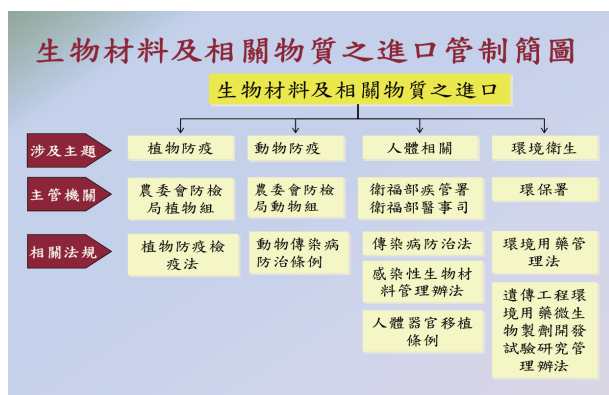


圖 3、生物材料及相關物質進口管制整理

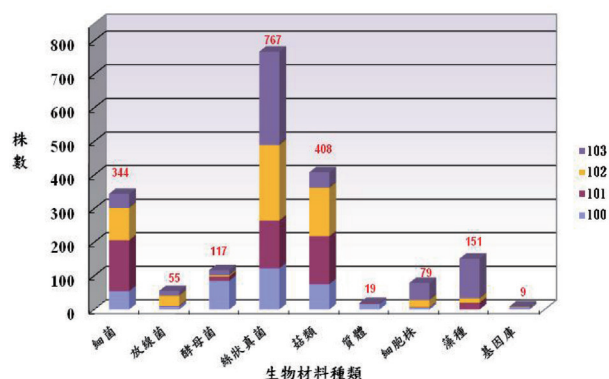


圖 4、100-103 年度寄存生物材料之類別分析

服務，迄今引進數量仍持續增加，顯示微藻類生物材料在未來生物經濟年代之應用性持續看好。有鑑於各界對於新興生物材料的需求趨勢，本中心於 102 年度開始建立藻種保存技術，希冀未來能供應各界需求之潛力資源。

在引進生物材料時，需整體考量對人體動植物及環境之危害風險評估。在我國對於生物材料及其相關物質之進口，分別因涉及植物防疫、動物防疫、人體相關與環境衛生等主題，分屬農委會防檢局、衛福部疾管署、衛福部醫事司及環保署等等不同機關管轄，相關作業皆須符合我國法令規章 (圖 3)。而生物材料進口後的流通也必需遵循我國之管理要求，以及已簽署之生物材料移轉契約要求，因此生物資源中心在生物材料管理之法令規範等領域均可提供各界諮詢協助。

收存經營國人研發菌種資源

菌種中心提供菌株寄存收藏已有百年歷史，目前在世界菌種聯盟近 700 個菌種中心保存中的微生物 (<http://www.wdcm.org>) 約有 2,391 萬菌株。在這些保存機構提供了長期穩定的最佳環境和技術專家，在生物資源的專業鑑定與管理、生物安全和國際航運等實務上提供整體解決方案；

然而在學術或其他研究環境，礙於人力與設施的維護不易，重要研究資源或相關資料很容易死亡或佚失，相較之下，生物資源中心既有的專業在面對新興生物材料或珍貴資源上，提供了較佳的整合解決方案。

臺灣雖小卻擁有豐沛的生物多樣性資源，在微生物領域中仍然保有許多珍貴資源亟待探勘利用，因此持續收存經營國人研發之生物資源，開發本土生物資源之產業應用深具意義。生物資源中心在 100-103 年共受理 1,940 株生物材料、細胞株及 9 個基因庫之寄存 (圖 4)，這些珍貴的研究資源來自國內優秀學者，包括中興大學楊秋忠教授、陳啟予教授、台大曾顯雄教授、中央研究院朱崇敏教授、中央大學羅南德老師、高雄海洋大學陳文明教授、新竹教育大學李清福教授、科博館吳聲華教授等多位專家之研究成果。其中至少有 120 株以上寄

存材料已於 100-103 年間經由期刊論文發表確定為新種，刊載於 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Antonie van Leeuwenhoek, Applied Microbiology and Biotechnology, FEMS Microbiology Letters, Current Microbiology, International Journal of Food Microbiology... 等九種期刊。

這些台灣分離之世界新種以及國外引進的生物材料，依據生物資源中心的優良作業規範，通過生物安全管理程序進入長期保存管理體系，並將陸續公開提供各界分讓使用。統計 100-103 年共新收保存 4,268 批次微生物資源，包括各類微生物菌種 1,748 株及專案保存 2,520 株，BCRC 生物資源保存庫新增 139 屬 651 種之生物多樣性特色 (表 1)。藉由生物資源流通平台之提供服務，資源探勘者及資源使用者間皆可獲致最佳品質之科學服務。

表 1、100-103 年間新增保存之生物材料數量分析

類別	新增公開保存	新增專案保存 (Special collection)	新增屬種說明
細菌	510	297	新增 70 屬 280 種
酵母菌	144	260	新增 1 屬 55 種
放線菌	14	75	新增 5 種
絲狀真菌	726	1,621	新增 80 屬 212 種
菇類	297	267	新增 36 屬 63 種
藻種	50	0	新增 32 屬 36 種
質體	7	0	
合計	1,748	2,520	

微生物危害因子之檢測平台

Detection of virulence factors in microorganisms

生資中心 / 研究員

陳倩琪 / 邱世浩

一、摘要

近年來基因定序技術的創新，帶動科研界在實驗方法的革命性改變，從單一標的基因的探索轉變成為系統性研究，完整地建構物種中基因之間的作用機制。國內保健食品的產值這三年來，追求健康的市場風潮，促成每年的產值約 600 億，而其中以微生物類作為食品原料所開發的保健約佔整體市場的 24%，且多數由國內自行開發產品。國際上因為基因體科技及轉譯科學的研究方式，已有多個案例以微生物基因體資訊轉譯基因安全性，提交作為食用安全認定 (GRAS) 之佐證，以輔助說明無長期食用的健康危害，特別是致病性及毒性基因，在人體腸胃道複雜的環境中，是否因此受誘導表現或者在腸道微生物菌叢間發生水平移轉。此外，微生物為對抗環境所攜帶的抗生素抗性基因，也將可能造成環境的污染也成為國際上對於微生物開發產品受關注的焦點，因此微生物作為產品原料或添加物，檢測危害因子在國際上已成為安全性評估的一環。

二、健康訴求的發展與管理趨勢

全球正面臨人口快速老化與非傳染病日益嚴重的威脅，而非傳染病的 4 大危險因子為菸草、酗酒、不健康飲食與缺乏運動，這些不僅是個人自身的責任，也受到整體週遭環境、社會因子與

經濟的影響。Health in All Policies 是 2013 年由世界衛生組織提出的一種全球應共同發展，由政府部門、決策者與政策制定者共同擔起健康促進與非傳染病防治的全球責任。健康的促進從疾病預防、營養食品、到健康維護與提升，甚至於早期診斷、治療、復健、到居家護理和老年安養等，整體規畫應從政策進行垂直整合。其中保健食品或健康食品是在健康範疇中針對疾病的預防來維持健康。

保健食品泛指具有保健功效之食品，包括傳統食品食材、中草藥屬性食材、生物科技加值食品等，現已成為近年食品產業中極具發展潛能之專業領域。健康食品係指提供特殊營養素或具有特定之保健功效，特別加以標示或廣告，而非以治療、矯正人類疾病為目的之食品。國內在保健或健康食品的市場，於這三年來，每年約佔 600 億的產值。而其中以微生物類作為食品原料所開發的保健約佔整體市場的 24%，且多數由國內自行開發產品。依據我國評估健康食品之安全性，依健康食品管理法第三條第二項規定，申請健康食品須經科學化之安全及保健功效評估試驗，證明無害人體健康，且成分具有明確保健功效。而國際上相關法規，則有中國食品安全法中的特殊食品（針對真菌類與益生菌類保健食品），聯合國食品農業組織及世界衛生組織 FAO/WHO 提出益生菌類食品的評估框架，歐洲食品安全管理局 EFSA 對微生物之安全評

估框架 QPS 及美國食品藥物管理局 FDA 在食用安全認定 (GRAS)。目前國際的發展趨勢是建立人體臨床試驗之食用安全及應用新科技提供安全性資料。尤其是人體健康危害潛在因子難以從國內現有之安全評估機制取得。

三、微生物類保健 / 健康食品之相關法規

在中國食品安全法中特別定義特殊食品，並說明國家對於保健食品、特殊醫學用途配方食品和嬰幼兒配方食品等特殊食品實行嚴格監督管理。條文中也定義保健食品所聲稱保健功能，應當具有科學依據，且不得對人體產生急性、亞急性或者慢性危害。而關於保健食品原料目錄和允許保健食品聲稱的保健功能目錄，乃由國務院食品藥品監督管理部門會同國務院衛生行政部門、國家中醫藥管理部門制定、調整並公布。保健食品原料目錄應當包括原料名稱、用量及其對應的功效，而對於列入保健食品原料目錄的原料只能用於保健食品生產，不得用於其他食品生產。在微生物類保健食品中，真菌目錄共計十一種，包括釀酒酵母、產朊假絲酵母、乳酸克魯維酵母、卡氏酵母、蝙蝠蛾擬青黴、蝙蝠蛾被毛孢、靈芝、紫芝、松杉靈芝、紅麴黴、紫紅麴黴。可用於保健食品的益生菌種目錄共計十種，包括雙歧桿菌、嬰兒雙歧桿菌、長雙歧桿菌、短雙歧桿菌、青春雙歧桿菌、德氏乳桿菌保加利亞種、嗜酸乳桿菌、乾酪乳桿菌乾酪亞種、嗜熱鏈球菌、羅伊氏乳桿菌。但僅有嗜酸乳桿菌、動物雙歧桿菌、乳雙歧桿菌、鼠李糖乳桿菌四種益生菌可用於嬰幼兒食品。

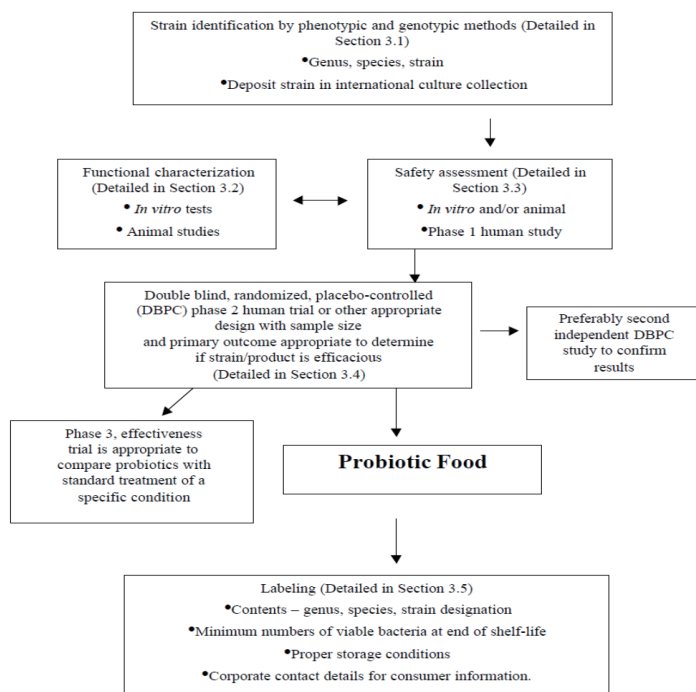


圖 1、聯合國食品農業組織 (FAO/WHO) 評估食品中益生菌之準則 (Joint FAO/WHO Working Group Report, 2002)

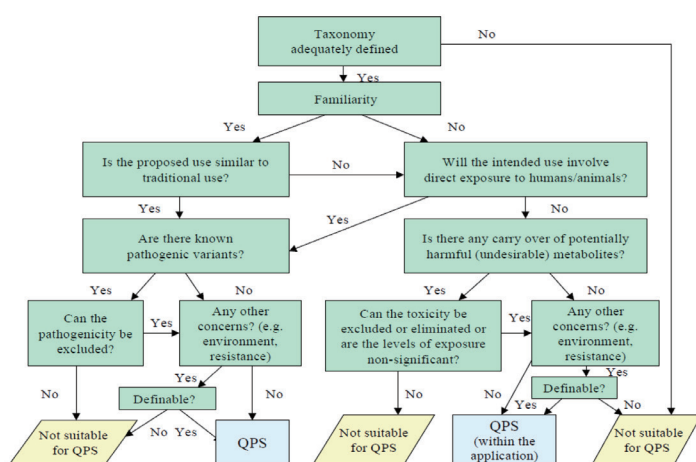


圖 2、歐盟對微生物是否符合 QPS 狀態之評估方法 (EFSA, 2003)

及酵素等，是否可以在食品或動物生產鏈中的任何過程添加使用，提出品質認定為安全 QPS (Qualified Presumption of Safety) 的評估方法 (QPS 網站, 2015)。第一份符合 QPS 狀態的清單被定義出來後，每年為維持清單上的符合性及新增清單，歐洲食品安全局會定期檢視評估相關文獻及科學性資料來檢討是否有食用安全之風險。評估方法主要是針對菌種的分類鑑定、對此物種的認知及相關文獻記載、可能的危害風險尤其是否具病原性及最終產品的使用範圍，當中特別提出抗生素抗性對環境之影響須提出科學性之說明 (圖 2)。歐洲食品安全局認為 QPS 跟美國藥物食品管理之安全認定 GRAS 有相當的不同，因為 QPS 是架構在隨時都有可能因為環境變遷或者特殊事件發生，或有新的文獻提出食用安全之風險，所以是一種假設性認定安全，會隨時會召開委員會進行檢討修訂 (EFSA Journal 2013; 11(11):3449)。

美國在食品管理上，對於食品原料及添加物則是必須通過美國食品藥物管理局核准使用，管理表列清單。而對於安全認定 GRAS 的物質，是以逐案審查的方式，非經過食品藥物管理局核准，而是根據所提出之科學性證據來說明物質之安全性提出申請，食品藥物管理局才給予不反對函，以個案申請之案例來公告 GRAS 清單 (GRAS notice inventory) 進行管理，目前清單上有 572 件申請案，每一案給予 GRN 編號代表不同的申請個案，每一案的資料皆公布在食品藥物管理局的網站上 (GRAS Notices)。關於微生物部分每一案都必須進行菌種的分類與鑑定，

在台灣健康食品的定義是指具有保健功效，並標示或廣告其具該功效之食品，既然謂之食品，因此以可供食品使用原料彙整一覽表，來管理可申請之品項。以微生物及其來源製取之原料，屬於乳酸菌共計 64 個菌種的菌體可供為食品原料或食品加工使用。另外屬於真菌類，包括紅麴菌啤酒酵母及一些帶有豐富金屬離子 (如鋅、硒、鉻、鐵、鎂、鉀、鈔) 的酵母菌株。

聯合國食品農業組織及世界衛生組織 (FAO/WHO) 對於益生菌用於食品中，其評估準則首要是對於所使用菌株以基因型或表現型的方法來進行鑑定，且須鑑定屬種名稱及菌株分型，除此之外尚須寄存到國際菌種保存中心 (圖 1)。

歐洲食品安全局 EFSA (European Food Safety Authority) 是歐盟的一個確保食品安全的組織，針對微生物本身包含代謝物

確定其名稱才能知道是否屬於常見之病原菌或有危害之風險。

四、全性評估

國際上所有法規之規範主要著重在如何建立技術進行有效之安全性評估，提供之科學數據須不得對人體產生急性、亞急性或者慢性危害。包含我國的管理，申請相關產品為證明無害人體健康，因此建立健康食品安全性評估方法，依照分類進行不同層次的毒理試驗。但因近年來基因定序技術的創新，帶動科研界在實驗方法的革命性改變，從單一標的基因的探索轉變成為系統性研究，完整地建構物種中基因之間的作用機制。包括有數個細菌性危害因子的收集與建置資料庫的研究工作，透過病原性資料庫的分析，可以大規模的比較目前已定序的細菌基因體，並以此判斷新型微生物是否具致病性及長期危害風險。因此國際上已有完成基因體定序及分析後，提交申請美國 GRAS 安全認定。案例中 GRN429 申請 *Lactobacillus casei* strain Shirota 做為發酵乳的食品原料，由養樂多公司申請做為發酵乳產品，其含量為每毫升 4×10^8 ，於 2012 年獲得 FDA 的不反對函 (FDA has no questions)，也就是所提出的科學性證據足以說明這株菌用於發酵乳產品的安全性評估結果是被認可的。案例報告中以全基因體中的 16S 序列結果來確認其菌種名稱外，也用於說明菌株的個別差異性，用全基因體序列比對目前現有同物種的序列來做菌株分型。

抗生素抗性基因存在菌體中，對人或動物甚至環境都會造成傷害，尤其是當食用後，潛在

的危害風險是抗生素抗性基因多存在這些益生菌的質體上，在過去的研究中，這些質體 DNA 容易發生移轉，因此食用這些益生菌，將可能把抗生素抗性基因透過質體移轉到腸道內其他菌叢而造成危害風險。*Lactobacillus casei* strain Shirota 全基因體分析並無任何抗生素抗性基因的存在，包括 GRN502 案例中申請以 *Lactobacillus acidophilus* La-1 作為膳食補充劑，除了歐洲食品安全局將此菌種列於 QPS 狀態清單中，也完成了全基因體定序，從序列解碼的資訊中，並無任何抗生素抗性基因的存在。也從比較基因體序列提出跟市售產品 *Lactobacillus acidophilus* NCFM® 雖屬同一種，但不同菌株因此序列有差異，也提供了菌株分型的證據。

抗生素抗性基因存在於許多益生菌中，而這些益生菌在各個國家都有食用的歷史。研究人員認為從演化的觀點來看，因為人類服用抗生素的歷史悠久，而腸胃道中具抗生素抗性的益生菌存活下來，因此從腸胃道分離之益生菌可能會攜帶這些抗生素抗性基因。

除了抗生素抗性基因的檢測外，案例 GRN429 還提交以基因體檢測是否還有致病因子的結果，包括了與內毒素 endotoxin 相關及溶血性 hemolysin 基因等。在過去 20 年，致病因子 (virulence factor) 是定義為，由病原菌產生，並且會增加病原菌引起人類疾病之能力者，均稱之為致病因子。但由於菌體與宿主開始產生交互作用的過程中，菌體會使用多種的機制，包含吸附、侵入、抗吞噬作用，以及毒素產生。細菌利用這些特別的因子或稱之為致

病因子，使得它可以在宿主內生長、繁殖、傳播、甚至引起宿主的病狀或死亡。學者利用基因表現研究證實在病原性 *Escherichia coli* 和 *Neisseria* spp. 已知的病原基因，在非病原性的 *Escherichia coli*、*Neisseria lactamica* 也會有表現。EFSA 曾經對於益生菌使用 *Enterococcus faecium* 從 QPS 狀態下刪除，主要原因是從文獻中發現 *Enterococcus faecium*，原本是以片利共生型的生活型態存在腸胃道中，但當它經由水平基因移轉到致病基因時，它也變成病原菌。也因此，在複雜的生態環境中，基因彼此的移轉是有可能性，所以非病原菌才可能會具有病原菌的基因。

病原基因之比較基因體研究可以發現細菌性致病因子有很高比例是位於基因島 (genomic island) 上，它是一段具可移動性具有多重抗藥性基因的插入片段，因此常與細菌之致病性有關。後來有學者更進一步發現，細菌間致病基因之水平轉移也因基因島的跳動性而進行。由比較基因體結果，學者更進一步推測位於基因島上的致病基因常是比較有侵略性的因子，如 type III/IV 分泌系統或毒素等。

目前基因體定序成本愈來愈低，而且分析技術已臻成熟，雖然基因體資訊輔助判斷微生物之 GRAS status 仍不是法定必須進行之項目，但有愈來愈多案例包含基因體分析進行基因體分析可徹底了解微生物之基因型，有助確認微生物之安全性。案例 GRN453 以 *Bifidobacterium breve* M-16V 申請用途是烘培食品用添加，除以基因體說明菌株跟其他的差異外，由 16S 序列確認菌名並寄存在國際菌種中心，也由基

因體資料檢測並無抗生素抗性基因的存在，也無質體因此無基因移轉之風險，對於安全性評估資料提供以全基因體用生物資訊工具比對現有的毒性／致病性基因資料庫來說明雖有部分與病原菌基因有高相似性，但這幾個基因普遍存在於其他獲得 GRAS 的益生菌中。

五、危害因子檢測平台

目前有一些利用生物資訊的分法來檢測是否具有危害因子來做為安全性評估的一環，從一些研究歸納出同種不同菌株會有病原性差異是與基因小島有直接相關，因此有研究人員開發出一個 pathogenicity island (PAI) 病原性小島檢測，PAI 有一定的基因結構，因為 PAI 主要特徵是可能透過質體或噬菌體移轉，此外其中還包含危害因子。目前發展出來的檢測工具都是透過比較基因體的研究方法產出如 IslandPick 及 MobilomeFINDER，從不同基因體的比較找出區域的差異，再檢視是否有特殊如 PAI 的基因結構，以推測其潛在具有病原性。

另一種研究方法，是採用比對危害因子資料庫如 MvirDB，例如比對 MvirDB，該資料庫收集了微生物中註解為致病性、產毒及抗生素抗性的基因。將標的微生物基因體利用序列分析工具

BLAST 比對 MvirDB (Zhou et al., 2006)，再以相似性程度來定義是否具有危害。VFDB (Yang et al., 2008) 是透過文獻收集整理出病原性的危害因子基因序列建置的資料庫，也是透過序列分析工具來進行比對檢測其相似性。但是若以資料庫的研究方法來檢測是否具有危害因子，這些資料庫必須經常更新，另外資料庫是為實驗後經過文獻記載整理的結果還是一個以預測為主的資料庫，都會影響到檢測的準確性，而另一個值得加值投入的事，這些檢測並無法釐清檢測的結果的可信度，也就是若要正確成為安全性評估的一項工具，就必須明白指出其危害風險高低跟是否安全性，但無庸置疑，這已經是國際發展的趨勢。

六、結論

現階段透過以往這些案例分析，可以確認提交基因體檢測危害因子已經成為安全性評估的參考機制之一，特別是抗生素抗性基因及其是否具有移轉性，這些尚無法從現有的試驗方法來證明之，但由比對檢測致病因子資料庫，若得到高相似性基因則需要再進一步確認其危害風險，反之，若比對不到相似性致病基因，則可說明以目前的證據顯示是安全的。

七、參考文獻

1. EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Journal 2013;11(11):3449
2. GRAS Notices, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>
3. Ho Sui SJ, Fedynak A, Hsiao WWL, Langille MGI, Brinkman FSL. The association of virulence factors with genomic islands. PLoS One 2009; 4:e8094.
4. Joint FAO/WHO Working Group Report. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002
5. Pallen MJ, Wren BW. Bacterial pathogenomics. Nature 2007; 449:835-42.
6. Yang, J.; Chen, L.; Sun, L.; Yu, J.; Jin, Q. VFDB 2008 release: An enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. Nucleic Acids Res. 2008, 36, D539-D542.
7. Zhou C.E., J. Smith, M. Lam, A. Zemla, M. D. Dyer1 and T. Slezak. MvirDB—a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, Database issue D391-D394.

生物資源保存及研究簡訊 第102期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啟成所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、吳柏宏、許璦文、黃學聰

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路 331 號

電話：(03)5223191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：國大打字行

電話：(03)5264220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

中華郵政新竹誌字第0030號

交寄登記證登記為雜誌交寄

