



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

中華民國 106 年 3 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

- ◎ 乳酸菌鑑定取得生物領域測試實驗室 ISO 17025 認證
- ◎ 基因改造大豆定性檢測通過 TAF 認證

### 鑑定服務能量簡介 3

- ◎ 乳酸菌菌種產品鑑定
- ◎ 菇菌菌種暨產品鑑定
- ◎ 稻米品種鑑定
- ◎ 人類細胞株複核
- ◎ 環境監控之微生物鑑定
- ◎ 一般性微生物鑑定
  - (1) 細菌鑑定
  - (2) 酵母菌鑑定
  - (3) 絲狀真菌鑑定
  - (4) 放線菌鑑定
  - (5) 微藻藻種鑑定

## 乳酸菌鑑定取得生物領域測試實驗室 ISO 17025 認證



圖：生資中心取得乳酸菌鑑定 TAF 認證之測試實驗室 ISO 17025 認證證書

乳酸菌具有廣泛的產業應用性與生產價值，在商業應用、產品生產管理、產品行銷或申請衛福部健康食品查驗登記等，均需要確認產品成分菌株的菌種學名正確性，以佐證其安全性使用無虞。然而乳酸菌涵蓋許多不同菌種別，有些近緣菌群不僅在菌株型態、生理特性或碳氮源利用性等表現型特徵極為相似，其基因型特徵也高度雷同 (16S rDNA 序列相似性高達 99% 以上)，造成

正確菌種學名不易鑑定。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 17034 等國際品質認證，服務系統與技術能力已獲各界肯定。為了滿足產業實務需求，協助產品認證與行銷，生資中心匯集多年微生物專業研究技術能量和細菌鑑定服務實務經驗，提供整合多相分類鑑定學之乳酸菌學名鑑定

服務。為提升本所菌種鑑定服務之公信力，2016年針對益生菌產品最主要的乳酸菌種類，完成與中國工業微生物菌種保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC) 之實驗室間比對，建立雙方對菌種鑑定能力之互相認可。並與國內2家測試實驗室 (台美檢驗科技有限公司檢驗中心和弘光科技大學食品安全與超微量檢驗總中心) 進

行乳酸菌鑑定之實驗室間比對，完備試驗環境規劃、儀器設備校正與查核、試驗標準操作指導書之確效等，提供完整試驗數據與能力試驗報告，展現本所專業乳酸菌鑑定能力，於2016年11月通過全國認證基金會 (TAF) 之評核，成功取得生物領域測試實驗室 ISO 17025 認證，彰顯本所在乳酸菌鑑定之優良服務品質與技術報告之公正有效性。

(文：生資中心王俐婷 / 黃麗娜研究員)

## 基因改造大豆定性檢測通過 TAF 認證

全球經濟成長且人口持續成長，糧食需求快速成長，因應世界糧食穀物需求大幅增加，基因改造作物自1996年開始種植至今已已有20年，2015年全球基因改造作物種植面積已擴增至1億7,970萬公頃，目前已有28個國家約有1,800萬農民種植基因改造作物。國內市場對於玉米、黃豆的自給率不及1%，99%需仰

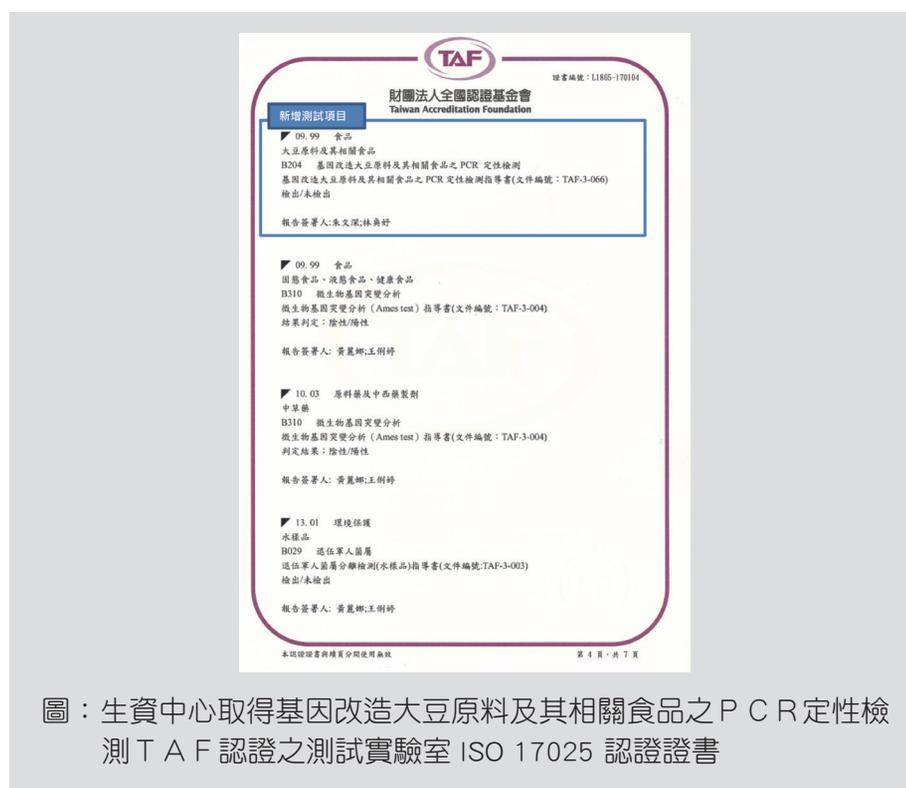
賴進口，2016年我國進口黃豆244萬噸，其中僅9萬噸為非基因改造黃豆，其餘為基因改造黃豆，雖然90%黃豆主要以榨油及作為飼料使用，但仍有10%左右的黃豆為民眾所食用。

近年來食安重大違規案件頻傳，民眾消費意識抬頭，且對食品安全議題日益重視，為強化基因改造食品標示資訊之揭露正確

性，本所自1999年起建立基因改造食品檢測平台，並於2000年開始受理基因改造食品對外委託試驗服務，累積至今超過一千五百多筆基因改造食品委託試驗，服務期間持續不斷精進專業技術與有效品質管理，陸續通過 ISO 9001:2000 及 ISO 9001:2008 等國際品質管理系統驗證，並通過國際能力試驗盲樣檢測，奠定良好實驗品質管理系統，符合台灣法規強制標示與產業服務需求，深受國內外產業佳評與信任。早期從基因改造大豆及玉米之 PCR 定性檢測，陸續增加基因改造稻米 PCR 定性檢測、基因改造馬鈴薯 PCR 定性檢測、基因改造大豆 PCR 定量檢測及基因改造玉米 PCR 定量檢測，更因應衛生福利部之規範，增加基因改造油菜及基因改造甜菜之 PCR 定性檢測。

本所為持續精進專業技術與有效品質管理，2016年針對基因改造大豆原料及其相關食品之 PCR 定性檢測項目，完成實驗室人員能力考核測試及實驗室間比對測試，並參加 FAPAS 能力測驗 GM Proficiency Test GeMMU53 通過基因改造黃豆之定性分析及定量分析考核，確認實驗方法及實驗操作人員對於基因改造食品檢測之能力鑑定；鑒於原試驗操作環境空間動線不佳，2016年重新規畫基因改造食品檢測之分子生物試驗環境，提升試驗環境操作品質及操作流程；同年基因改造大豆原料及其相關食品之 PCR 定性檢測項目通過財團法人全國認證基金會 (TAF) 認證之測試實驗室，成功取得 ISO17025 認證，有效提升基因改造食品檢測品質及技術報告之公正性，持續為客戶提供最優質的服務。

(文：生資中心林奧好研究員)



圖：生資中心取得基因改造大豆原料及其相關食品之 PCR 定性檢測 TAF 認證之測試實驗室 ISO 17025 認證證書

## 乳酸菌菌種產品鑑定

生資中心 / 研究員  
王俐婷

### 背景說明

2014 年台灣保健食品整體產值達 681 億台幣，其中乳酸菌類發酵產品（包括優酪乳、稀釋發酵乳、乳酸菌粉末、膠囊及錠劑等相關產品）產值約 88 億元，在 2016 年更達到近百億元，顯示出乳酸菌產業的應用開發潛力與市場商業價值。在目前已通過健康食品認證的產品中，有將近 1/5 是以乳酸菌作為保健功效成分的產品。由於特定保健功效是特定菌株所持有，攸關產品宣稱之功效和安全性，衛生福利部食品藥物管理署規定上市乳酸菌產品必須標示添加之菌種類別及總菌量，建議應有正確的菌種鑑定資料及具鑑別力的菌株分型方法，以作為產品正確標示及可安全食用的佐證。參考世界衛生組織 (WHO) 及聯合國糧農組織 (FAO) 在 2002 年針對益生菌 (probiotics) 產品提出之評估指引<sup>(1)</sup>，菌株應使用正確且正式的菌種學名，至少要鑑定至種名 (species)，最好可鑑定至菌株 (strain) 層次。應使用最新且驗證過，並能結合表現型特徵及基因型特徵的試驗方法進行鑑定，方法應具有再現性及鑑別力。將菌株寄存於國際級的菌種中心，以維持菌株的特性品質和作為未來追溯驗證菌株特性之參考範本。

乳酸菌 (lactic acid bacteria) 泛指能夠代謝發酵碳水化合物，而以乳酸為其主要產物之細菌。乳

酸菌是一群相當龐雜的菌群，並非學術上微生物分類學領域之用語。隨著分子生物學技術的進展，乳酸菌在菌種命名和分類地位仍有很多變動。參考衛福部公告之「可供食品使用原料彙整一覽表」中所列的乳酸菌菌種<sup>(2)</sup>，有些菌種學名隨著分類鑑定技術的進步而有所變動，如 *Lactobacillus lactis* 和 *Lactobacillus cremoris* 應更名為 *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* 和 *Lactococcus lactis subsp. cremoris*，*Lactobacillus lactis subsp. lactis* 應更名為 *Lactococcus lactis subsp. lactis*，而 *Streptococcus faecalis* 則應更名為 *Enterococcus faecalis* 等，目前有許多公告之學名需要進行更名或修改，建議進行產品驗證和產品標示時應使用當前最正確且有效之菌種學名。

### 項目說明

乳酸菌在商業應用、產品生產管理、產品行銷或申請衛福部健康食品查驗登記等，均需要確認產品成分菌株的菌種學名正確性，以佐證其安全性使用無虞。然而乳酸菌涵蓋許多不同菌種別，有些近緣菌群不僅在菌株型態、生理特性或碳氮源利用性等表現型特徵極為相似，其基因型特徵也高度雷同，造成正確菌種學名不易鑑定。以廣泛使用於乳酸菌產品的嗜酸乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、瑞士乳酸桿菌 (*Lactobacillus*

*helveticus*)、乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus casei*)、副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*)，正式學名為 *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 為例，*L. acidophilus* 和 *L. helveticus* 兩者之間的菌株型態、生理特性或醣類化合物發酵反應等表現型特徵相似，16S rDNA 序列相似性大於 98% 以上，而 *L. casei* 和 *L. paracasei subsp. paracasei* 兩者之間除了表現型特徵極為相似，16S rDNA 序列相似性更高達 99% 以上，極易發生菌名誤判，造成產品標示不符和商譽經濟損失。

食品所生資中心匯集多年微生物專業研究技術能量和細菌鑑定服務實務經驗，提供整合多相分類鑑定學之乳酸菌學名鑑定服務，包含形態觀察、生理生化試驗（發酵反應、碳氮源同化利用性等）及基因型特徵（主要以 16S rRNA 基因作為序列比對分析之標的）。乳酸菌鑑定流程是先確認顧客提供之菌株的純度和生長狀況，再進行鑑定試驗，綜合多相分類鑑定學之數據結果進行菌株分類地位之研判，並給予菌種學名。為展現本所專業乳酸菌鑑定能力，更於 2016 年 11 月通過全國認證基金會 (TAF) 之評核，成功取得生物領域測試實驗室 ISO 17025 認證，彰顯生資中心在乳酸菌鑑定之優良服務品質與技術報告之公正有效性。此外，為了滿足產業實務需求，協助產品認證與行銷，因應顧客不同需求提供客製化鑑定服務，如混合菌株產品中已知標的菌株之分離純化和菌種學名鑑定、菌株品系之分型鑑別 (strain typing) 等，可依服務內容另行洽談。相關服務資訊可至生資中心菌種鑑定服務網頁查詢 (<http://www.bcrc.firdi>).

org.tw/wwwbcrc/c04\_profile.do)。

## 參考文獻

1. FAO/WHO. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the
2. 衛福部。2005。可供食品使用原料彙整一覽表。中華民國 94 年 11 月 4 日公告。

Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.

列 (internal transcribed spacer, ITS)，能有效鑑別親緣關係近的植物種。

## 項目說明

本所目前採用形態特徵分析 (如子實體形態、培養基質上產孢構造之顯微形態等特徵之觀察) 搭配 DNA 分子序列比對來鑑定菌種。但現今菇菌菌種產品除了一般常見的市售食藥用菇菌菌種及子實體外 (例如牛樟芝、靈芝、桑黃、冬蟲夏草、北蟲草、金針菇、香菇、巴西蘑菇等)，同時還有各種不同菌種發酵生產所製成的乾燥顆粒粉末等產品形式，根據不同產品形式其鑑定方式略有不同：

### (1) 子實體樣品

除根據子實體外觀型態特徵外，同時進行子實體的分離純化，之後再依據純化分離菌株的菌落特徵、產孢構造之顯微形態等特徵，搭配 DNA 分子序列比對進行菌株鑑定。

### (2) 菌絲體樣品

根據其在培養基質上的菌落特徵、產孢構造之顯微形態特徵以及搭配 DNA 分子序列比對進行菌株鑑定。

### (3) 顆粒粉末

這類產品主要多為子實體乾燥粉碎顆粒或固液態發酵菌絲體乾燥之粉末顆粒等形式，因可供鑑定之形態特徵常為破碎的菌體，影響其形態分析判斷，故主要是依據 DNA 分子序列比對進行鑑定，有時需輔以掃描式電子顯微鏡觀察以確定其生產的原料。

## 菇菌菌種暨產品鑑定

生資中心 / 副研究員  
李涵筠

## 背景說明

菇類是大型、高等的真菌，子實體通常肉眼可見，除了少數的子囊菌外，絕大多數都是擔子菌類，而擔子菌中又以傘菌目中的食用菇及多孔菌目中藥用菇最受矚目，其次非褶菌目中也有許多藥用菇種。由於多數食用菇的營養價值高，其子實體及菌絲體富含不同的胺基酸、礦物質及維生素，其蛋白質含量介於肉類和蔬菜之間，但沒有肉類高脂肪及高膽固醇的缺點，故在西方素有「蔬菜牛排」的美稱。許多食藥用菇常具有一些特殊生理活性的多醣類物質，可增強人體的免疫力，抑制腫瘤的生長等功效，因此成為現今倍受關注的機能性食品。由於食藥用菌之應用價值高亦導致現今學術及產業界對於菇類的分類、育種、栽培、生產、加工都做了不少研究，許多新興菇種亦如雨後春筍般冒出，但由於菇菌會受不同栽培條件及環境因子而影響其子實體的形態，因此常造成在分類命名上的混淆不清，鑑定困難。

一般物種鑑別需要相當專門的知識與經驗，尤其微生物之

鑑定需要更多的專業知識，並且更為困難且耗時，但在許多應用領域上，正確及快速的鑑定菌種顯得極為重要，例如在食品檢驗、食藥用菌種鑑定、防疫及檢疫、生產履歷之建立等方面的應用，更具時效的迫切性。近十多年來，以 DNA 為基礎的分子生物技術被應用在高等真菌的親緣分類研究，使得菌種鑑別之主要依據已由形態層次進步到使用生化甚至分子層次，尤其是聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 技術被開發後，以此為基礎之種間鑑定技術普遍被使用。因為所有的真菌都有核糖核酸 (ribosomal DNA, rDNA)，故可從核酸序列之演化差異來了解真菌系統之間的親緣關係。這個方法能有效解決真菌屬 (genus) 和目 (order) 間的親緣關係，並驗證形態鑑定之結果。屬以上分類階層的研究主要使用相似度高的序列區間，其彼此間會有相似的結構及功能，暗示它們可能源自共同的祖先，進而能將其分類為不同的分類群，而針對屬以下的分類階層，則必須使用變異性較高的基因序列，例如核醣體轉錄外區間序

## 稻米品種鑑定

生資中心 / 研究員  
林奐好

### 背景說明

本所自民國 94 年由台大農藝所引進「稻米品種 DNA 指紋鑑定技術」，經本所計畫進行稻米品種鑑定技術之改良，同時接受行政院農業委員會農糧署計畫「稻米品種 DNA 指紋鑑定技術之改良」補助改良稻米品種鑑定技術，建立單一米粒抽取 DNA 技術及組合式 PCR 鑑定方法。於 96 年起將檢驗方法及委託檢驗流程標準化，並陸續通過 ISO 9001:2000 及 ISO 9001:2008 之品質管理系統驗證，以確保提供優良的稻米品種鑑定檢測服務。

本所稻米品種之標準品來源為台大農藝系、國家作物種原中心、農糧署、農試所嘉義分所、高雄農改場、台東農改場及台中農改場等機構，目前共收集 76 個品種，包含國內 65 個品種及國外 11 個品種，國內品種包含：台稈糯、台稈、台農、台農糯、台農秈、台南糯、台南、桃園、高雄、高雄秈、花蓮、台東、台東糯、台中秈糯、台中秈、台中、台中糯、吉野、台秈、台秈糯、台中在來、紅糯及黑糯。國外品種包含：美國加洲米、日本秋田、日本越光米、泰國茉莉香米、泰國香米、埃及米、大陸盤錦、澳洲上光及越南米。

近年來本所除了辦理稻米品種鑑定委託試驗案件，自民國 95 年開始承接農糧署「CAS 食米驗證管理工作」計畫，其中包含稻

米品種鑑定項目。101 及 102 年配合農糧署進行「市售食品抽檢及稻米產銷專業區水稻品種純度檢測」，抽樣確認稻米品種符合性確定。已連續多年參與農糧署舉辦之食米品種 DNA 檢驗盲樣測試，為農糧署公告之測試合格廠商，並與農糧署長期簽訂「市售食米品種委託檢測」。

### 項目說明

稻米品種鑑定之原理是利用稻米之染色體基因含有簡單重複序列 (Simple Sequence Repeat, SSR)，其重複次數因品種而異。利用 PCR 增生 SSR 可得到大小各異之 DNA 片段，具品種特異性。本所自行篩選 170 組以上之 SSR 引子，建立稻米標準品種 SSR 資料庫。品種判讀時會先以特定引子之 SSR 綜合圖譜與稻米標準

品種 SSR 資料庫比對鑑別，如果有相近之品種會再以其它引子之 SSR 圖譜鑑別。將本所蒐集之 76 種稻米標準品種，利用特定之 SSR 引子建立其 SSR 之 PCR 增生 DNA 片段圖譜資料庫 (SSR 資料庫)，即可進行稻米品種之比對，進而鑑定送驗稻米樣品之品種。

稻米品種鑑定之流程為先將送驗樣品使用穀物分樣器均分至抽樣粒數 2 倍內之米粒後，隨機取樣，分別抽取各米粒之 DNA，再以特定 SSR 引子進行 PCR，並與送驗樣品所陳述品種之標準品一同進行洋菜膠電泳分析，確認送驗樣品品種是否為其所陳述之品種。如不是，則將送驗樣品之電泳分析圖譜與稻米標準品種 SSR 資料庫比對，找出最可能之品種，再與送驗樣品分別重新進行 PCR 及洋菜膠電泳，所得之電泳分析圖譜若仍無符合之品種，則判定為未知品種。

稻米品種鑑定有三種規格 (10 粒、32 粒及 40 粒)，依照客戶需求選擇。稻米樣品至少 1 公斤以上，以提高分樣之準確率，並提升鑑定之精準度。

## 人類細胞株複核

生資中心 / 研究員  
許璿文

### 背景說明

細胞培養為現代生命科學、生醫研究和生物技術產業的發展奠定相當重要的基礎，使用正確且沒有污染的細胞是研發得以成功最基本的重要關鍵因素。有別於常見的微生物污染，當實驗室使用已被證明錯誤的細胞株

(misidentification)，或是操作過程中發生不同細胞間的交互污染 (cross-contamination)，甚至是錯誤標示 (mislabeling) 而產生混淆時，研究人員往往無法即時發現改正，因而影響實驗結果的正確性，造成龐大研究資源的浪費。因此，現在已有許多國際知名期刊要求作者需提供研究使用細胞

株的複核資料，做為論文送審的先決條件。美國國家衛生研究院 (NIH) 自 2016 年起，也開始要求研究人員在向 NIH 提出計畫申請時，就必須同時出具研究使用細胞株的身分證明文件。

目前常用於細胞株之鑑定 / 複核技術包括：同功酵素分析技

術 (isozyme analysis)、染色體核型分析 (chromosome karyotyping)、DNA 指紋分析 (DNA fingerprinting) 和短序列重覆片段聚合酶連鎖反應 (short tandem repeat polymerase chain reaction, STR-PCR) 等。其中，STR-PCR 因具有高準確性 (accuracy)、可靠性 (reliability)、

耐用性 (robustness)、低成本和快速之特性，因此是目前應用在人類細胞株複核鑑定的主要技術。美國標準菌種保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 標準發展組織也建立了 STR-PCR 分析的標準化規範，且已成為美國國家標準 ANSI/ATCC ASN-0002-

表一、IJC 官方網頁表列可提供人類細胞株鑑定服務之國際細胞庫機構與分析實驗室單位

**IJC**  
International Journal of Cancer

### Addresses of cell culture collections and DNA profiling laboratories for cell line authentication

	Website	E-mail
American Type Cell Culture Collection (ATCC-USA), Molecular Authentication Resource Center (MARC)	<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>	<a href="mailto:MARC@atcc.org">MARC@atcc.org</a>
Australian Cell Bank	<a href="http://www.cellbankaustralia.com">http://www.cellbankaustralia.com</a>	<a href="mailto:info@cellbankaustralia.com">info@cellbankaustralia.com</a>
China Center for Type Culture Collection (CCTCC)	<a href="http://www.cctcc.org">http://www.cctcc.org</a>	<a href="mailto:cctcc202@whu.edu.cn">cctcc202@whu.edu.cn</a>
Chinese Academy of Sciences Cell Bank of Type Culture Collection (CBTCCCAS)		<a href="mailto:xiruige@sunm.shcnc.ac.cn">xiruige@sunm.shcnc.ac.cn</a>
Colorado Cancer Center's DNA Sequencing & Analysis Core	<a href="http://loki.uchsc.edu/">http://loki.uchsc.edu/</a>	<a href="mailto:christopher.korch@ucdenver.edu">christopher.korch@ucdenver.edu</a>
Coriell Institute for Medical Research	<a href="http://www.coriell.org">http://www.coriell.org</a>	
European Culture Collection of Cell Cultures (ECACC)	<a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>	
German Cell Culture Collection	<a href="http://www.dsmz.de">http://www.dsmz.de</a>	
Hong Kong Cell Culture Collection (HKUCC)		<a href="mailto:kdhyde@hkucc.hku.hk">kdhyde@hkucc.hku.hk</a>
IdenticeLL, Dept of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Denmark	<a href="http://www.identiceLL.eu">http://www.identiceLL.eu</a>	<a href="mailto:contact@identiceLL.dk">contact@identiceLL.dk</a>
Italian Cell Bank		<a href="mailto:paolo.romano@istge.it">paolo.romano@istge.it</a>
Japan Cell Bank	<a href="http://cellbank.nibio.go.jp/">http://cellbank.nibio.go.jp/</a>	
Multiplexion	<a href="http://www.multiplexion.de">http://www.multiplexion.de</a>	<a href="mailto:info@multiplexion.de">info@multiplexion.de</a>
RIKEN Resource Centre, Japan	<a href="http://www.brc.riken.jp">http://www.brc.riken.jp</a>	
South-Korean Cell Bank		<a href="mailto:bokghee@nih.go.kr">bokghee@nih.go.kr</a>
Taiwan Bioresource Collection and Research Centre (BCRC)	<a href="http://www.bcrc.firdi.org.tw">http://www.bcrc.firdi.org.tw</a>	<a href="mailto:gfy@firdi.org.tw">gfy@firdi.org.tw</a> ; <a href="mailto:llc51@firdi.org.tw">llc51@firdi.org.tw</a>

(轉載修改自 <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291097-0215/homepage/ForAuthors.html#AUCEL>)

2011。

生物資源保存及研究中心 (BCRC) 自 2009 年起便開始推動 STR-PCR 作為細胞複核鑑定的分析服務，同時在許多研習活動當中積極向研究人員宣導細胞株複核在科學研究領域的重要性，建立使用正確細胞株的必要觀念。BCRC 也在 IJC (International Journal of Cancer) 的官方網站上，被公開認可為國際上具有提供細胞株身分鑑定能力的機構之一 (表一)，協助研究人員進行人類細胞株複核的服務。

## 項目說明

人類細胞之 DNA 具有許多短片段重複序列 (STR)，而這些 DNA 短片段在個體間有著不同的重複次數，即為 DNA 之多型性。本試驗服務係利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術，增幅放大短片段重複序列基因，並經高解析度毛細管電泳對擴增片段進行分離後確定擴增片段之長度，再以軟體分析統計和進行資料庫比對。根據不同個體在特定基因座上之 STR 重複次數不同，即可將不同的細胞加以鑑別區分，完成人類細胞株身分的複核與鑑定。

本所目前提供之 STR-PCR

分析鑑別能力之總排除率可達一萬兆分之一。依據客戶需求，客戶可提供細胞株冷凍管、培養中之細胞或待檢測細胞之 DNA。本所提供 ISO 9001:2008 之測試服務報告，已為眾多國際期刊論文所接受，亦可作為人類細胞治療產品製程管制項目：純度 (purity) 測試之放行報告依據。相關服務資訊可洽詢生資中心服務窗口，或至生資中心「菌種鑑定與人類細胞複核」服務網頁查詢 ([http://www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/c04\\_profile.do](http://www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/c04_profile.do))。

趨勢，且廣為國際知名菌種中心所採用，食品所生資中心 BCRC 也新增此項技術平台，可應用於環境監控微生物之快速鑑別服務。

## 項目說明

BCRC 所提供的菌種委託鑑定服務，除了完整學名鑑定外，另有單獨針對菌種表現型特徵分析之服務，包括 API 鑑定套組分析，及 Biolog、Vitek 2 等微生物鑑定系統，提交報告中所載之菌種名稱是以各受測菌株樣品之生理生化反應結果與各鑑定套組分析內建資料庫所比對之最接近菌名。若未比對到該鑑定套組界定可接受的菌名，則於報告中註記為無法鑑定出菌名。由於 Biolog 及 Vitek 2 兩個鑑定套組系統依據菌種類別不同，各有適用之試驗卡片，顧客需於委託單註明顧客指定之試驗卡片類別。若顧客無指定使用試驗卡片，則由本中心依據顧客樣品之菌株形態及進行革蘭氏染色所得結果，再選擇適合的試驗卡片，進行試驗分析。此外，BCRC 也提供微生物脂肪

## 環境監控之微生物鑑定

生資中心 / 研究員  
古家榮 / 黃麗娜

## 背景說明

台灣氣候高溫潮濕，容易孳生各類微生物。自然界中空氣微生物是以氣膠的形式存在於環境中，細菌易吸附在塵埃粒子表面，真菌則多以孢子型態存在空氣中。因為一般微生物具有微小、生長快速的特性，只需要一點基礎的營養即可存活，若在食品或產品生產製程中操作人員稍有疏漏並不易即時查覺，一旦污染微生物大量增生，後續易造成產品腐敗或變質、環境污染甚或人員受感染等負面影響，成為製造面或環境面的風險來源之一，因此在製程中必須對環境微生物進行有效的控管，才能確保產品之衛生安全與維持穩定的產品品質。依現行西藥藥品優良製造規範 (PIC/S GMP)、美國藥典 USP

<1116> 章節 (無菌製程環境之微生物管制與監控) 與 ISO 14644 潔淨室規範等，對於環境微生物的監測與控制均有載明相關規範。因應生技藥廠於 103 年底全面適用 PIC/S GMP 國際規範，對於微生物污染管制有特別要求，凡於環境監測所分離之微生物必須加以鑑定，至少要到屬名的層級，以利判別其危害等級 (Risk Group)，進行趨勢分析及採取對應的風險控制等。目前菌種學名鑑定採用多相鑑定技術，包括傳統微生物形態、生理生化試驗與 DNA 定序分析等，試劑耗材與人工成本均大，一般案件處理時間長，花費也較貴，無法滿足產業界對菌種快速鑑別之需求。目前利用 MALDI-TOF 質譜儀分析微生物全細胞蛋白質體以作為菌株快速鑑別，已成為最新菌種鑑定

酸組成分析，是採用氣相層析儀配合 MIDI 鑑定系統來執行。

而 MALDI-TOF 質譜儀，是藉由測定菌株全細胞的蛋白質指紋圖譜，與資料庫中已知菌種身分的質譜訊號比對，從而對未知菌種進行學名鑑定。比較其時效性，質譜儀遠快於上述鑑定套組及鑑定系統。API 鑑定套組以一個樣品為例，最快能鑑定出菌種名字的時間為 24 小時，大部分平均都需至少 48 小時。以鑑定系統來看，最快則為 6 小時 (Vitek 2 系統)，而 MIDI 系統雖然也

可於 6 小時內鑑定出菌種，但樣品製備時間卻需近 4 小時才能完成。若以質譜儀進行分析，幾乎不需經過樣品製備，只要取正常生長的微生物單一菌落即可為分析樣品，將樣品塗抹於樣品盤，經過乙酸及與基質混合乾燥後即可上機分析。每個樣品盤一次上樣最多分析 94 個樣品，可於 2 小時內完成，很適合應用於樣品量較多的環境監控微生物之快速鑑別，且分析成本較符合經濟效益。MALDI-TOF 可適用於多樣化菌種之檢測，不受限於特定培養基

種類。儀器內建微生物資料庫含有超過 5000 多筆菌株標準圖譜可供比對，涵蓋大於 2000 多個不同菌種別，解析度佳。BCRC 曾於 2016 年執行某生技業者委託為期半年之環境監控微生物快速鑑別，總計分析近 1300 個樣品，以 MALDI-TOF 進行蛋白質質譜指紋分析，並配合自建資料庫比對，平均成功鑑別率可達 91.4%。目前 BCRC 提供針對環境監控微生物之快速鑑別屬於客製化服務，有相關需求者請另與本中心服務窗口依個案洽談。

## 一般性微生物鑑定：(1) 細菌鑑定

生資中心 / 研究員  
王俐婷

### 背景說明

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 2012 至 2016 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、食品及醫藥產業之發展，具體影響產值達百億之上。在整體生技產業中，微生物是重要的生物資源，而使用正確的學名是評估微生物安全性和其產品價值的首要工作。確認微生物身分可協助了解其特性，對於醫療、環境維持、產品管控及菌種開發等皆具有直接的影響性，而分類鑑定技術是確認微生物身分的關鍵技術。

早期細菌是依靠形態學、

生理學、生物化學等觀點加以分類鑑定。隨著生物化學和分子生物學等科技方法的進步，傳統分類鑑定方法輔以化學分類法與分子生物分類法的應用，有助於釐清傳統分類方法無法判斷之菌種，以及種內 (intraspecies) 和種間 (interspecies) 菌株之間的關係，可使分類鑑定工作更加準確可靠，並賦與細菌分類上之正確地位。細菌最有系統且完整的分類鑑定方法是同時考慮其外觀形態、生長特性、生理特性、化學組成、生化反應等表現型特徵 (phenotypic characteristics) 以及分子生物分類法的基因型特徵 (genotypic characteristics) 等多相數據，即為多相分類學 (polyphasic taxonomy)。使用最新、有效且經驗証過的鑑定方法，結合表現型試驗和基因型試驗等多相分類數據，審慎判斷，

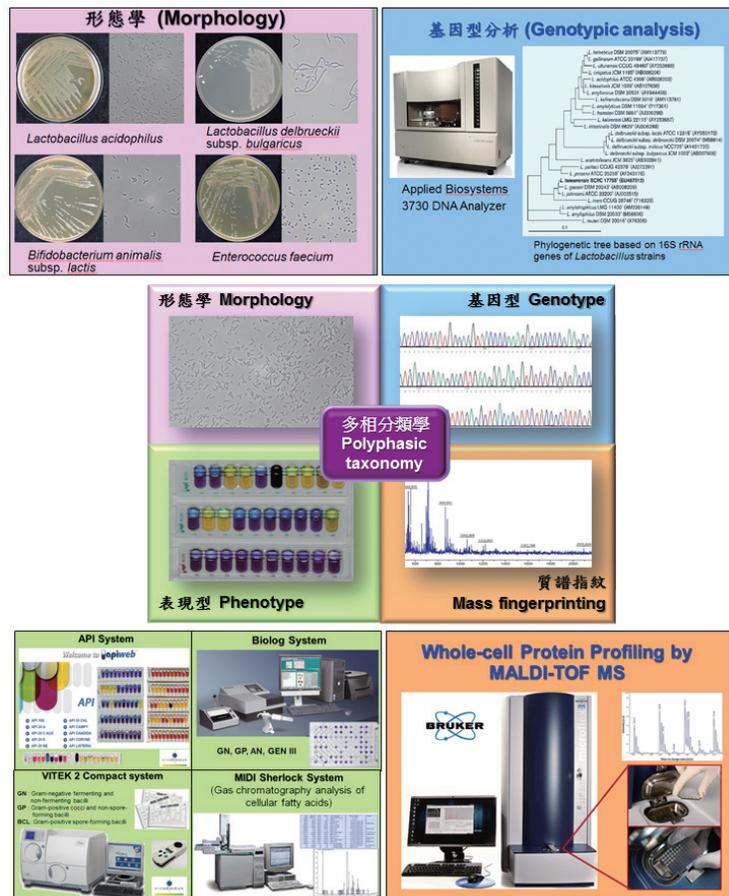
才能完整且正確的鑑定菌名，不能單就一種方法鑑定菌株，避免造成菌名誤判的可能性。

細菌需使用當前認可且經過驗證的學名。以最常使用於乳酸菌產品產生特殊風味和凝乳作用的保加利亞乳桿菌為例，保加利亞乳桿菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 是人類使用數百年以上的俗名，其當前正式的學名為德氏乳桿菌保加利亞亞種 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)。細菌的分類學和命名法由 International Code of Nomenclature of Bacteria (於 1992 年成立) 所規範。細菌學名需發表於國際分類期刊 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 才被視為有效，只要是發表於 IJSEM 的細菌學名 (Validly published) 會列在 IJSEM 的 Approved List of Bacterial Names 清單中，如果是發表在 IJSEM 以外之學術期刊的細菌學名 (Effectively published)，則需要經過 IJSEM 審核確認並公告於 IJSEM 的 Validation Lists 清單之後，才能成為有效學名。

## 項目說明

細菌鑑定流程是先確認顧客提供之菌株的純度和生長狀況，再進行鑑定試驗，綜合多相分類鑑定學之數據結果進行菌株分類地位之研判，並給予菌種學名。由於細菌鑑定是複雜且需以多相分類學方法相互佐證才能達到正確鑑定出菌種學名的技術，而且分類地位也會隨著分析方法進步而隨時更動，學名之研判需定期更新，因此生資中心持續精進開拓和應用多相分類鑑定技術(圖一)，以因應產學研各界對菌種分類鑑定的需求，協助委託者提昇產業效益，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，包括顧客潛力菌株之正確學名判定、專利菌株的申請或保護、衛福部健康食品查驗登記或申請、產品之行銷(國內和國外)以及協助藥廠環境微生物之監控與清潔確效，以符合國際 PIC/S GMP 查驗要求等。

生資中心提供的細菌鑑定服務項目有菌種學名鑑定、DNA G+C 含量分析、DNA-DNA 雜交分析、16S rDNA 序列分析、持家基因序列分析、脂肪酸組成分析、微生物鑑定套組分析(API、Biolog、Vitek、MIDI)、微生物快速鑑別(MALDI-TOF 質譜分析)等。另有因應顧客不同需求的客製化鑑定服務，如混合菌株產品中已知標的菌株之分離純化和菌種學名鑑定、菌株品系之分型鑑別(strain typing)、混合菌株產品之細菌快速鑑別等，可依服務內容另行洽談。相關服務資訊可至生資中心菌種鑑定服務網頁查詢([http://www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/c04\\_profile.do](http://www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/c04_profile.do))。



圖一、細菌多相分類鑑定技術

## 一般性微生物鑑定：(2) 酵母菌鑑定

生資中心 / 研究員  
黃建勳

### 背景說明

傳統鑑定酵母菌的方式主要是根據菌株表現型特性(phenotypic characteristics)，係集合形態特徵、芽孢分生方式、生理特性或藉由特定培養基之生長特性來加以判別。然而這些表現型數據只能反映出有限的遺傳信息，有些酵母菌細胞形態會改變，生理特性也可能受到基因突變而發生變異，因此，單純依照表現型特徵差異作為酵母菌鑑定是不太可靠的。隨著分子生物學

及基因體學的發展，利用 DNA 層次輔以傳統分類學已成為現今酵母菌鑑定之主要方式，目前鑑定酵母菌的分生技術包含有染色體 DNA 雜交(hybridization)、DNA 指紋(RAPD, AFLP, SSR, DGGE, SSCP, RFLP)及比較序列分析(comparative sequence analysis)等。上述分生技術中，一般公認唯有利用 DNA 雜交(為界定種名層次之黃金標準)才能最正確判定菌株的學名，但此技術費時分析、成本高、無法進行資料庫建立及一次進行大量分析

近。以 *Saccharomyces* 菌群 (包括 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus*、*S. bayanus*、*S. pastorianus*、*S. cariocanus*、*S. mikatae*、*S. kudriavzevii* 及 *S. arboricolus* 等) 為例, 其 26S rRNA 基因序列相似度範圍高達 97.5~100%, 但 DNA 雜交試驗卻清楚證實為不同菌種別, 此時就需要再輔以其他持家基因序列之分析 (如  $\beta$ -tubulin), 才可清楚鑑別出 *Saccharomyces* 菌群之相關菌種。

綜合而言, 目前酵母菌學名鑑定是以多相分類學 (polyphasic taxonomy) 為基礎, 整合表現型和基因型數據, 進行與相關菌種類緣關係之釐清與分類地位之確認, 才能明確定義出菌種名稱。

## 項目說明

酵母菌鑑定包含形態觀察 (液態和固態培養特徵、菌絲和孢子觀察等)、生理生化試驗 (發酵、碳源和氮源同化利用性、生長溫度等) 及基因型特徵 (主要是以比較序列分析法, 包括 26S rRNA 基因、特定持家基因與非編碼基因 internal transcribed spacer 等作為序列比對標的)。一般酵母菌鑑定流程是先確認顧客提供菌株之純度和生長狀況, 之後再進行後續試驗。配合使用特殊的培養基以觀察是否產生偽菌絲或有性孢子。也可使用全自動快速鑑定系統 (VITEK 2) 或是進行發酵、碳源和氮源同化利用性之測定等。所得分析結果除了與內建資料庫進行比對外, 亦可參考酵母菌鑑定專書 *The Yeasts: A taxonomic study*<sup>(1)</sup>, 同時與標準菌株進行列表相互比對。基於 DNA 定序和序列相似性比對分析結果, 當待測菌株與其近似種之 26S rRNA 基因序列相似性大

於 99%, 則表示可能是同種, 但近似種若是由數個不同菌種別組成, 則必須再輔以其他持家基因進行逐一的鑑別區分。根據多相分類鑑定數據結果, 進行綜合研判並給予菌種學名。

## 一般性微生物鑑定：(3) 絲狀真菌鑑定

生資中心 / 副研究員  
魏育慧

### 背景說明

真菌與人類的生活十分貼近, 從食品發酵、藥品生產、酵素生產、微生物肥料等都有廣泛應用, 在遺傳學研究上也有重要的貢獻。真菌菌種學名的鑑定對於真菌之開發與應用十分重要。傳統的真菌鑑定上是以形態為主要之基準, 而生理與生化特性、植物病原性等作為輔助依據。但真菌種類眾多, 且某些表型特徵不穩定, 易受環境影響, 以外觀差異性進行鑑別的方法, 很容易忽略內部遺傳訊息, 導致錯誤的分類, 使真菌鑑定過程複雜且耗時。

近代科學的進步, 為菌種的鑑定帶來新的演進, 尤其自 1980 年代, 因為 PCR 技術的突破, 更進一步可以比較 DNA 序列的異同來作為分類的依據, 分類鑑定正式進入了分子分類學 (molecular taxonomy) 的時代。現代真菌鑑定方法傾向於結合傳統形態特徵 (產孢構造、孢子大小、形狀、飾紋及菌落形態等) 及分子技術 (DNA 序列等) 兩者同時進行比較分析。

本所在真菌鑑定上, 具有長足的經驗, 同時整合真菌傳統分

### 參考文獻

1. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. 2011. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Fifth edition. Elsevier.

類學基礎, 並融入分子生物學技術, 提供最正確的真菌鑑定結果。

### 項目說明

生資中心目前的絲狀真菌鑑定服務項目, 依常見之客戶需求, 細分為下列幾個項目:

#### (一) 真菌學名鑑定

依據菌種培養特性、形態觀察、生理生化特徵以及序列分析 (DNA barcode 片段) 等資料, 進行多相分類學分析, 並參考菌種現行分類狀況, 提供專業、完整且可靠的菌種學名鑑定報告。

#### (二) ITS rDNA 序列分析

ITS 被認為是目前真菌所能使用的理想標識 DNA 片段, 生命條碼聯盟 (CBOL) 於 2011 年在荷蘭召開的國際會議中, 統合各領域真菌學者的意見, 決定 ITS 為真菌條碼的標準識別基因。ITS rDNA 序列分析服務, 可為客戶提供菌株快速與正確的鑑別和複核服務。

#### (三) 客製化鑑定服務

服務內容可依據客戶需求而調整, 因應客戶不同的需求狀況, 例如實驗菌株快速篩選、藥廠或生技廠環境監控菌株快速鑑別等, 提供客戶最佳且最適宜之菌種鑑定或鑑別服務。

## 一般性微生物鑑定：(4) 放線菌鑑定

生資中心 / 研究員  
曾敏

### 背景說明

由於放線菌具有產生多種生理機能的次級代謝產物的能力，因此在醫藥工業、食品產業及環保領域都扮演十分重要的角色，與我們的生活息息相關。放線菌與其他微生物一樣，包含許多種類，不同種類其特性差異也很大，從抗生素生產菌、酵素生產菌到植物、動物、人體病原菌等，因此身分的確認極為重要。而身為重要的藥物開發來源，在人類面臨環境變遷、人為破壞導致的新疾病、新抗藥性病原菌等等棘手問題，對於新藥物的需求更為殷切，而新菌種是開發新藥物的重要來源，因此在藥物開發過程中，很重要的是如何快速排除已知菌株，以利後續的開發過程。此外，菌株在許多產業生產鏈上扮演舉足輕重的角色，因此菌株身分之確認是開發生產的首要之務。

放線菌的鑑定可以利用表現型及基因型特性來進行，一般常用的形態、生理生化及化學特性屬於表現型特徵 (phenotype)，而 DNA 的 G(鳥嘌呤)C(胞嘧啶)含量、16S rDNA 序列、DNA 雜交等則屬於基因型特徵 (genotype)，必須綜合兩者的表現，所謂的多形性特徵 (polymorphic characteristics) 作為判斷的依據。

截至目前為止，放線菌被承認的屬多達 200 個以上，由於鏈黴菌 (*Streptomyces*) 屬的菌種最早被開發應用及研究，因此鏈黴

菌幾乎是放線菌的代表，而鏈黴菌以外的菌屬通稱為稀有放線菌 (rare actinomycetes)，這些稀有放線菌的鑑定，主要以形態特徵搭配細胞的化學特徵，即可做到屬 (genus) 的鑑定，再輔以生理生化、基因序列就能做到種名的鑑定。由於早期的分類鑑定多以表現型特徵為主，鏈黴菌可以產生的次級代謝產物種類非常多且廣，因此被命名的種 (species) 超過 1000 種，被承認的種亦多達 500 種以上，造成鑑定上極大的困擾，雖然後來加入基因型特徵，許多人嘗試用各種基因序列來輔助，但依然無法解決許多同種異名及分類上的問題，因此目前在鏈黴菌的鑑定尚無一套快速且準確的系統可供依循。雖然陸續有

## 一般性微生物鑑定：(5) 微藻藻種鑑定

生資中心 / 副研究員  
黃英娥

### 背景說明

微藻是一群會行光合作用的生物，可存在於淡水或海水中，目前可分為原核微藻與真核微藻，具有廣大的應用面。生資中心於 103 年度起增加微藻生物材料之收集與保存，建立藻株的冷凍及繼代保存系統、藻種的鑑定技術及藻株之收集與提供制度，並已導入 ISO 的流程管理，成為

研究團隊嘗試各種方法，例如數值分類、多重基因座序列分型法 (multilocus sequence typing) 等，但尚未有明確的結論。

### 項目說明

本所目前接受放線菌委株鑑定，首先確認菌株無污染後，參照 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 及 ISP (International Streptomyces Project) 步驟，先進行增殖培養，分別進行菌體的各項化學分析，包括細胞壁胺基酸、醣類、全細胞脂肪酸 (fatty acid)、醌 (menaquinone)、枝菌酸 (mycolic acid)、磷脂質 (phospholipid) 等；並以掃描式電子顯微鏡觀察菌株的微細形態特徵，包括孢子鏈、孢子表面、孢子囊等，以確認菌株屬名。同時分析 16S rDNA 序列進行比對，並培養於各種不同培養基以測試菌株的營養菌絲、氣生菌絲、色素及對各種物質的分解、利用等生理、生化特性，綜合各項結果進行菌株鑑定。

我國第一個國際級收存藻種的菌種中心。目前本中心藻株之保存型態主要以繼代保存與超低溫冷凍保存兩種方式，目前微藻庫資源共保存 200 多株微藻。除了開發本土微藻資源，主要服務項目包括藻種保存、藻種鑑定、藻株放大培養、藻株的提供及人員培訓等。近年來本所除了提供保存藻株之相關服務，也參與能源局「新及再生能源計畫」，進行微

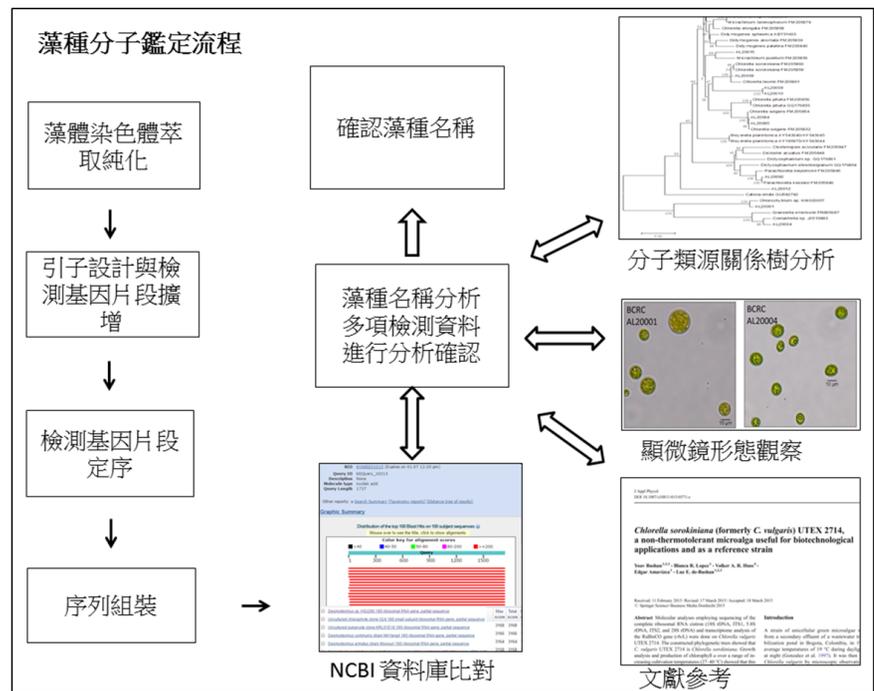
藻資源庫之建置與產油固碳微藻之篩選，分別進行本土淡水微藻與海水微藻收集與保存，建立本土微藻核糖體 DNA 資料庫。篩選高產油藻株與其他潛力微藻進行脂肪酸組成分析，以提供產學相關研究。並積極進行微藻資源推廣，協助微藻培育等相關技術之普及化，以推動微藻產業發展。

## 項目說明

微藻鑑定，傳統的主要方法是利用顯微鏡進行藻體型態特徵的差異與生理生化特性進行檢測，對於微藻型態差異較大的藻屬，形態學描述是最直接明確的方法，可初步區分。但是對於多數微藻其體積微小、結構簡單、型態差異微小，而且同種微藻在不同生長條件下也有形態差異，以形態學進行分類鑑定有其困難度，生理生化檢測由於藻種差異大亦無法有效標準化。越來越多的研究者認為，形態上的差異無法成為藻種鑑定及系統發育關係的指標。由於分子生物學的成熟發展，其利用具有代表性的序列片段作為分類標準，來區分不同屬或是同種不同株之間的遺傳差異，具有方法操作容易和結果明確之優點，在微生物的鑑定上已成為主要的分析方法，如今也被廣泛的應用於微藻的分類鑑定研究中。目前生資中心對於微藻之

鑑定，建立了微藻分子生物鑑定方式(圖二)，依據藻種的多樣性已建立不同藻屬核糖體 RNA 基因 (rDNA) 和轉錄間隔區 (ITS) 序列基因檢測操作，偵測基因包括 16S rDNA、18S rDNA、23S rDNA、ITS 等基因片段及其他特殊基因例如 *rcb L* (RuBisCO 加氧酶) 基因等。將藻株染色體抽取純化後，以檢測基因的特異引子進行 PCR 反應，擴增出檢測基因片段。分別以定序引子與 ABI BigDye V.3.1 試劑進行檢測基因片段的定序 PCR 反應，再以 ABI 3730 定序儀進行 DNA 定序分析。得到的序列先以 Vector NTI

之 ContigExpress 程式進行序列組裝，確認檢測基因片段序列。於 NCBI 生物資訊網站中進行 BLAST 比對分析，可得知藻株與資料庫中最相近的藻種名以作為鑑定參考。對於藻種鑑定，也會加入親源樹的分析方法，利用藻株 DNA 序列進行定量的計算，以 MEGA 分析軟體找出演化關係之親疏，可得到分子類源關係樹，做為微藻鑑定之另一參考。另外亦須輔以顯微鏡鏡檢，比對藻株的形態，並參考相關研究資料以增加其正確性。對於微藻鑑定須經由多重方法分析與專業判斷，以得正確之藻種名。



圖二、藻種分子鑑定流程

## 生物資源保存及研究簡訊 第109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

