



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 110 年 12 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

- ◎ 生資中心取得「優良實驗室操作規範 (GLP) 符合性登錄」之非動物性替代試驗符合性認證

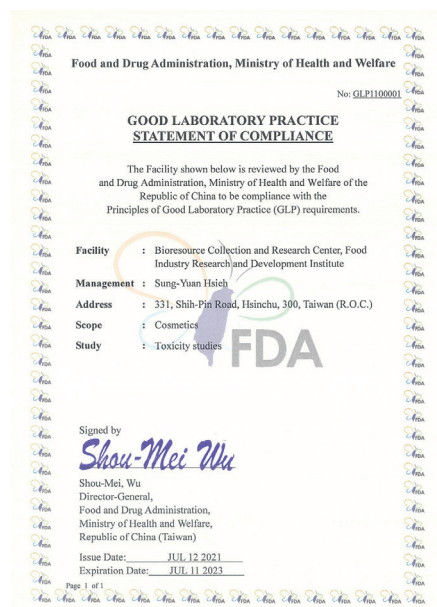
研發成果 1

- ◎ 台灣傳統發酵芥菜製品是探索新穎性乳酸菌的寶庫
- ◎ 乳酸菌作為青貯添加劑之應用
- ◎ 台灣人源本土腸道微生物的新種鑑定、描述與命名發表
- ◎ 建立啤酒酵母菌之高效率基因編輯系統 8
- ◎ 呼吸道黏液中致敏真菌孢子的發芽動態 11

生資中心取得「優良實驗室操作規範 (GLP) 符合性登錄」之非動物性替代試驗符合性認證

國際對於實驗動物福祉與使用倫理的關注與重視，非動物性替代試驗方法的發展和應用已逐漸成世界趨勢。歐盟自 1993 年即開始推動化妝品禁用動物試驗，並在 2013 年正式通過全面禁止使用動物實驗作為化妝品原料和產品的安全性評估。各國國際組織也持續努力地將禁止或減少動物試驗的精神，落實在化妝品產業與化學品的登記上。因應全球化潮流並與國際接軌，目前國內法規在化學品已完全接受 OECD 的 3Rs (減量、精緻化、取代) 替代測試方法，化妝品則因國際市場

仍有部分國家要求須有動物測試報告，故採正向表列的方式。生資中心在豐厚的細胞資源及技術能量，完成體外皮膚敏感性與眼部嚴重刺激性實驗動物替代測試服務平台的建置，並於今年通過財團法人全國認證基金會 (TAF) 查核，取得優良實驗室操作規範 (Good Laboratory Practice, GLP) 符合性登錄，同時獲得衛生福利部認可為化妝品領域毒性測試之 GLP 認證實驗室。目前可接受各界委託提供試驗服務，協助廠商產品加值，走向全球化市場發展並接軌國際法規。



圖、生資中心取得 TAF 與 TFDA GLP 符合性登錄與認證實驗室。

(文：生資中心許璵文研究員)

台灣傳統發酵芥菜製品是探索新穎性 乳酸菌的寶庫

生資中心 / 副研究員
林詩婷

酸菜與福菜都是由台灣的客家族群以芥菜 (*Brassica juncea* Coss.) 為主角，運用傳統自然發酵的方式醃製而成，這類醃製蔬菜產品會產生特殊的酸香風味，形成具有台灣傳統客家文化的民間飲食。台灣客家族群為了長期保存食物，開發許多不同的醃製發酵技術。芥菜通常在 10 月水稻收割後播種供食用，多餘的芥菜則通過發酵醃製進行保存，這些醃製品通常作為湯食用或與肉類一起料理。傳統的酸菜或福菜的發酵流程大致如圖一所示 (Chao *et al.*, 2009)，各地區可能稍有差異。從陽光明媚的早晨採收芥菜開始，將剛採收的芥菜留在田裡讓其稍微枯萎，去除老葉後的芥菜放入桶子中，以一層芥菜一層鹽巴的方式堆疊，鹽巴的最終濃度約為 4% (w/w)，桶子裝滿芥菜後在頂部放置重石，施加壓力來釋放芥菜的汁液，接著在環境溫度約 18 ~ 24°C 下發酵至少 7 天，7 天後的發酵產品稱做酸菜，這樣的發酵狀態可持續約 2 個月。如果要製做福菜，則是在發酵 7 天後將部分發酵的芥菜從發酵桶中取出，以水清洗乾淨後曬 1-2 天，然後發酵至少 2 天。白天曬乾、夜間發酵的兩個步驟重複兩到三次，這種曬乾和發酵的循環有助於防止芥菜變質，接著將部分發酵的芥菜撕成碎片，使用棍子將其緊緊地裝入玻璃瓶或陶罐容器中，不留多餘空間，並加入

鹽巴讓最終鹽濃度約為 12%，然後將芥菜中洩漏出來的汁液去除以防止變質，因此通常會倒置幫助排出發酵的鹵水，這樣的發酵在室溫下進行至少 3 個月，這種方式製造出的產品稱為福菜。

回顧國內傳統發酵芥菜的相關文獻，一篇為銘傳大學陳奕伸老師發表的研究 (Chen *et al.*, 2006)。陳老師等學者們利用雲林縣大埤鄉的酸菜為研究材料，分析芥菜發酵後不同時間點的菌相變化及鹽度變化，結果顯示在酸菜最初的發酵過程中 *Pediococcus pentosaceus* 是主要的乳酸菌 (lactic acid bacterium; LAB)，然後經過 40 天的發酵之後，鹵水中主要的乳酸菌轉變成耐鹽能力高的 *Tetragenococcus halophilus*。研究顯示 *T. halophilus* 在含有高濃度鹽的培養基中其發酵能力更佳 (15% NaCl > 7% NaCl > 3% NaCl)，推測當酸菜中添加的鹽溶解使其鹽分濃度從 9±6% 上升到 12±8% 時，*T. halophilus* 在酸菜中的發酵能力會大大提高。由於這個研究是使用含有高濃度的 6% NaCl 之 MRS 培養基和厭氧環境來篩選乳酸菌，可能限制鹵水中其它乳酸菌之生長，導致最後所分離到的乳酸菌種類只有 *P. pentosaceus* 和 *T. halophilus*。

另一篇是陽明交通大學蔡英傑老師發表的研究 (Chao *et al.*, 2009)。蔡老師等學者們利用酸菜或福菜製作過程中，5 個不同加

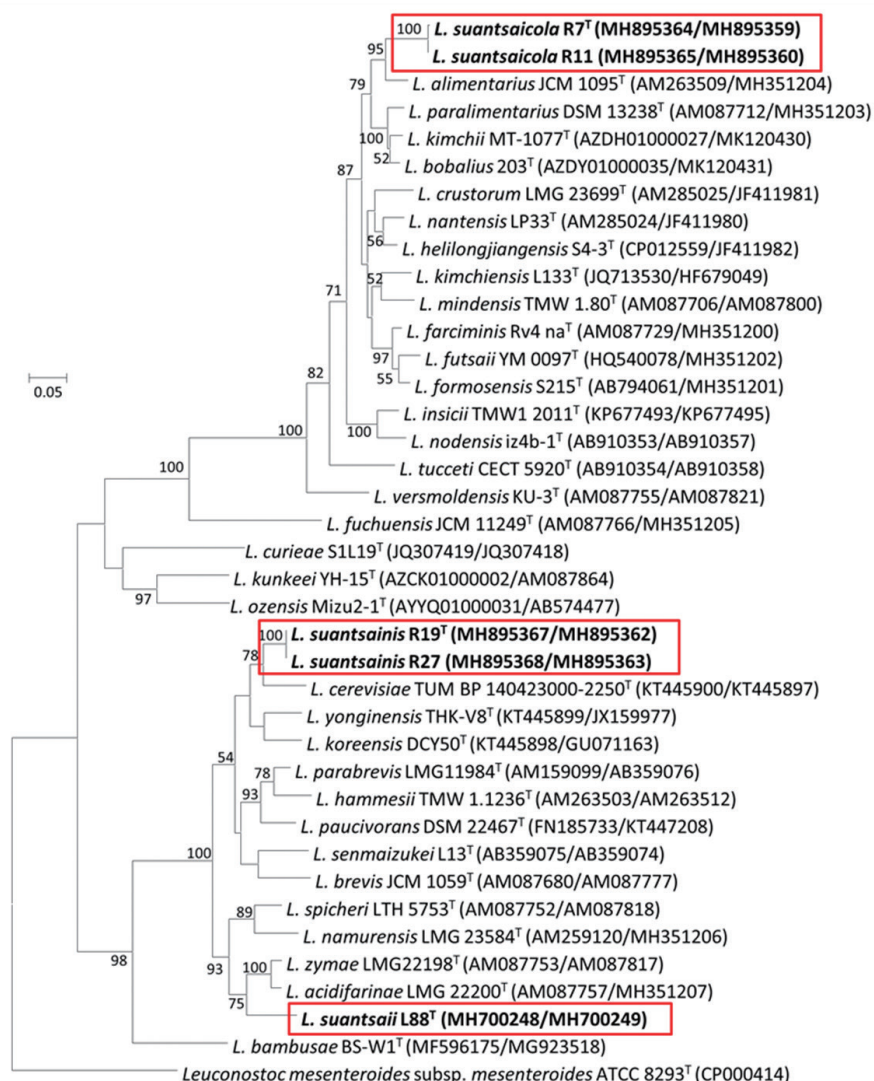
工階段產生的產品來進行分析，樣品分析後得到的乳酸菌分離株，利用 16S rRNA 基因定序進行分析，總共分離到 500 株乳酸菌分離株，鑑定出 5 個屬 18 個種共 119 株之代表性菌株，包含 *Enterococcus* (1 種)、*Lactobacillus* (11 種)、*Leuconostoc* (3 種)、*Pediococcus* (1 種) 和 *Weissella* (2 種)。國外文獻曾提到在酸菜發酵初期，主要是靠 *Leuconostoc mesenteroides*、*Weissella* 屬和 *Leuconostoc citreum* 這些乳酸菌菌株引起的發酵反應，隨著鹵水的酸鹼值降低，它們的數量便開始下降減少。蔡老師的研究中以發酵三天的芥菜樣品 (Mu) 可分離出最多樣化的菌種，共有 11 種乳酸菌被鑑定出來，並沒有一種乳酸菌屬於優勢菌種，而 *L. mesenteroides* 只是其中的一種乳酸菌而已，與國外之研究推測有差異。蔡老師研究中所分析的酸菜只添加 4% 的鹽，在發酵的過程，Mu 樣品之酸鹼值從 5.8 下降到最終酸菜產品 (Su) 的 3.8，在酸鹼值低於 4 的酸菜樣品 (Su) 中，可以發現 *Lactobacillus brevis* 和 *Lactobacillus plantarum* 成為優勢菌群。因此，用於發酵的初始鹽濃度不僅會顯著影響微生物種群結構，也會有微生物生長。在福菜的成熟階段，蔡老師等學者們分離到高度耐鹽 (達 12% NaCl) 的乳酸菌分離株，包括 *Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus versmoldensis*、和 *P. pentosaceus*，這些物種能夠在高鹽環境中生長。利用 16S rRNA 基因序列分析所有的分離株，這些菌株分布在 *Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、

Lactobacillus alimentarius、*L. plantarum*、*Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus salivarius* (表一)。進一步利用持家基因序列分析如 *dnaA*、*pheS* 和 *rpoA*，可發現 5 種可能的新穎性乳酸菌。這些研究結果揭示了酸菜和福菜在生產的過程中，不同發酵階段的乳酸菌具有高度的多樣性，其中也可能存在一些新穎性的乳酸菌。

乳酸菌為一相當龐雜的菌群，在醫藥保健業中，可作為食品補充劑，用來改善人體腸道細菌相，調節免疫作用促進宿主健康。在食品加工業中，可應用於生產各式發酵食品，其主要功能有產生特殊香味、去除異味、提高產品營養價值及增加食品保存性等，因此，尋找新穎性的乳酸菌以提供作為食品加工或醫藥保健之研發材料，是生資中心收集保存菌株的首要目標之一。從上述文獻回顧中可知在芥菜發酵生成酸菜的過程中具有多樣性且菌相豐富的乳酸菌分布，根據統計，大約 70% 的客家人居住在新竹縣，很容易從傳統市場上買到自製的客家發酵產品，因此在 2016 至 2017 年期間分別從新竹縣收集到 13 個發酵約兩周的酸菜或鹵水樣品。所有的樣品經系列稀釋後接種在含有 0.001% sodium azide 和 cycloheximide 的 MRS 培養基、30℃、厭氧環境的培養條件下篩選乳酸菌。利用 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因定序分析，初步鑑定所分離到的 71 株乳酸菌分離株，其中 66 株乳酸菌屬於 4 個屬共 11 個種，包括 *L. alimentarius*、*L. brevis*、*Lactobacillus farciminis*、*Lactobacillus musae*、*Lactobacillus*

pentosus、*L. plantarum*、*L. sakei*、*L. mesenteroides*、*P. pentosaceus* 和 *Weissia cibaria*，另外有 5 株分離株 L88^T、R7^T、R11、R19^T 和 R27，根據 16S rRNA 基因序列分析結果，無法歸類為乳酸桿菌屬的已知種，推測可能是新穎性的乳酸菌。這五株乳酸菌分離株利用多相分類學方法，如表型表徵、全基因體定序、16S rRNA 基因和兩個持家基因 (*pheS* 和 *rpoA*) 的序列分析、醣類發酵產酸試驗、細胞壁脂肪酸組成、細胞壁肽聚醣結構分析等研究其分類地位。綜合各項數據結果，顯示

這五個分離株可分類成三個乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 的新種 (圖一)，投稿至國際分類期刊 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 並被接受核可為有效學名，分別命名為 *Lactobacillus suantsaii* (L88^T)、*Lactobacillus suantsaicola* (R7^T, R11) 和 *Lactobacillus suantsaiihabitans* (R19^T, R27) (Liou et al., 2019; Lin et al., 2020)。Zheng 等人於 2020 年發表乳酸桿菌屬的分類變動，根據全基因體定序資訊、微生物體生理指標和生態學，將乳酸桿菌屬重新分類成 25 個菌屬別 (Zheng et



圖一、利用合併 *pheS* 和 *rpoA* 基因序列所繪製的系統發育樹，顯示菌株 R7^T、R11、R19^T、R27、L88^T 和乳酸桿菌屬相關菌種的關係。

al., 2020)。參照國際原核生物系統分類委員會公告的 Notification List, *Lactobacillus suantsaii* 已更名成 *Levilactobacillus suantsaii*、*Lactobacillus suantsaicola* 已更名成 *Companilactobacillus suantsaicola*、*Lactobacillus suantsaii*habitans 已更名成 *Levilactobacillus suantsaii*habitans (Oren et al., 2020)。通過本研究和以往的研究，我們發現台灣的芥菜發酵製品存在多種乳酸菌，綜合結果可發現涵蓋 5 個屬 20 種與酸菜發酵有關連。因此，酸菜這種傳統發酵食品可視為尋找乳酸菌菌株的潛在寶庫，值得繼續探索。

參考文獻

1. Chen YS et al., 2006. J Appl Microbiol. 101: 125-130.
2. Chao SH et al., 2009. Int. J. Food Microbiol. 135: 203-210.
3. Chao SH et al., 2012. Int. J. Syst Evol Microbiol. 62: 489-494.
4. Liou JS et al., 2019. Int. J. Syst Evol Microbiol. 69: 1484-1489.
5. Lin ST et al., 2020. Int. J. Syst Evol Microbiol. 70: 2972-2980.
6. Zheng et al., 2020. Int. J. Syst Evol Microbiol. 70: 2782-2858.
7. Oren et al., 2020. Int. J. Syst Evol Microbiol. 70: 4050-4060.

丙酸和丁酸、1,2- 丙二醇、乳酸 / 乙酸比和 NH₃-N 等含量和數值。餵飼期會將儲存青貯的密封容器打開，青貯接觸到空氣後改變原有的厭氧狀態，此時被厭氧條件所抑制的好氧菌會開始生長，兼性厭氧的酵母菌先出現，會消耗青貯中的乳酸使 pH 值上升，腐敗菌開始生長，進而影響到青貯的穩定性 (Soundharajan et al., 2021)。

附著於植物表面上的附生微生物群落種類具有很高的多樣性，原料的種類 (草或豆類)、收成時的生長階段和環境因素 (溫度、土壤、收穫方法和農業技術) 皆會影響微生物群落的組成。附生微生物主要屬於厚壁菌門 (Firmicutes) 和變形菌門 (Proteobacteria)，在自發性青貯發酵過程中，最重要的微生物是附生乳酸菌，主要作用於厭氧發酵期。腸桿菌科 (Enterobacteriaceae)、醋酸菌、產孢菌 (芽孢桿菌和梭狀芽孢桿菌)、李斯特菌、黴菌和酵母菌在青貯生產過程中是不受歡迎的菌種，會造成青貯品質的下降。

乳酸菌在發酵過程中由醣類製造乳酸的過程稱為乳酸發酵，可依其代謝產物種類分為同質乳酸發酵 (Homofermentative) 及異質乳酸發酵 (Heterofermentative)。同質乳酸發酵的發酵產物僅有乳酸，異質乳酸發酵除了乳酸外，還會產生二氧化碳、乙酸及乙醇等，前者的乳酸產量較後者高。一般來說，高濃度的乳酸是良好青貯飼料的品質指標，但異質發酵所產生的醋酸可抑制真菌生長，使青貯在開封後暴露於空氣中時，能夠儲存更長時間，故目前同型和異型發酵乳酸菌皆被廣泛用於青貯飼料的製造。

乳酸菌作為青貯添加劑之應用

生資中心 / 副研究員
吳琰奇

青貯是一種保存飼料的方式，藉由微生物厭氧發酵所產生的乳酸來保存新鮮植物原料的方法，用以提供給動物穩定、可靠和可預測的飼料供應來源。青貯的營養價值取決於青貯作物的種類、植物部位、收穫時期以及是否能有效地控制發酵過程。植物原料經天然微生物發酵後所產生的代謝產物種類及產量，決定了青貯的品質，同時也影響其最終的穩定性。

植物收穫後，會裝填於青貯槽、青貯袋或青貯桶等容器內，將空氣排出密封，經過發酵即為青貯成品。青貯發酵過程可分為 4 個階段，好氧期、發酵期、穩定期及餵飼期，附著於植物表面的附生微生物群落 (epiphytic microorganism) 決定每個階段的

青貯狀態。好氧期為植物收穫至儲存環境中的空氣被好氧菌消耗後成為厭氧狀態的階段，由於植物和好氧菌的呼吸作用，青貯溫度會上升至 32℃。隨著 pH 值及氧氣濃度下降，好氧菌、酵母菌及黴菌逐漸被抑制。發酵期主要作用菌種為厭氧乳酸菌，此為製作青貯的重要關鍵步驟。乳酸菌利用植物原料中的水溶性碳水化合物作為生長基質產生大量的有機酸，能完好地保存植物的營養，並降低青貯飼料的 pH 值 (pH 4.0-4.5)，防止梭狀芽孢桿菌、李斯特菌及丁酸菌的污染，使青貯能夠長期地儲存。在穩定期，生物反應量最少，青貯飼料的 pH 值介於 3.8 和 4.0 之間。青貯飼料的發酵特性受儲存時間的影響。儲存時間會影響 pH、乳酸、乙酸、

依發酵菌種的不同，青貯中乳酸與醋酸的比值可由 1:1 至 1:6。主要的同質發酵乳酸菌包含有 *Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactobacillus acidophilus*、*Enterococcus faecium*、*Pediococcus acidilactici* 及 *Pediococcus pentosaceus*，可生產高量的乳酸，降低 pH 值，抑制其他微生物的生長，並能減少植物原料蛋白質及糖類的分解。參與青貯發酵過程的異型發酵乳酸菌主要為 *Lentilactobacillus buchneri*、*Limosilactobacillus reuteri* 及 *Lactocaseibacillus casei*，其他次要的菌種有 *Levilactobacillus zymae*、*Apilactobacillus kunkeei*、*Levilactobacillus acidifarinae*、*Levilactobacillus namurensis*、*Levilactobacillus brevis*、*Levilactobacillus spicheri*、*Fructilactobacillus fructivorans*、*Fructilactobacillus fructivorans* 及 *Levilactobacillus hammesii* 等。異型發酵乳酸菌除了生產有機酸外，也會合成抗菌物質，增加青貯開封後的好氧穩定性，如 *L. buchneri* 會產生水楊酸、兒茶酚、苯甲酸及對氫基苯甲酸，*L. hilgardii* 會產生苯乙酸及對氫基苯甲乙酸 (Valerio *et al.*, 2004)。除此之外，*L. buchneri* 生產的阿魏酸，可以促進動物對纖維的消化能力 (Soundharajan *et al.*, 2021)。

附生乳酸菌在青貯原料中是相對較少量的微生物族群，在植物總附生微生物群落中所占的比例小於 1%。若能控制青貯的含水量及厭氧條件，乳酸菌通常能自然成為優勢菌種，但植物原料成份若具較低量的水溶性碳水化合物或半纖維素，或具有較高的酸鹼緩衝能力 (如豆類或禾本科植物)，就無法誘導青貯產生

足量的乳酸。此時會需要額外接種乳酸菌作為青貯的添加物，用以增加其發酵的品質。每公斤植物原料的乳酸菌接種量達 2×10^8 CFU，就能有效地進行青貯的發酵 (王等人, 2017)。添加乳酸菌進行發酵的青貯，無論是在營養的保存、乾物的損失，或是適口性的改善上，其表現皆優於自然發酵的青貯 (王等人, 2017; 王等人, 2018)。

在青貯乳酸菌的開發上，由於本土菌株較能適應當地環境及發酵條件，探勘本土新穎性青貯菌株也是目前的主要發展趨勢。生資中心採集台灣本土的青貯樣品，在堆置 3 個月的啤酒粕中，分離出一株新穎性乳酸菌，命名為 *Vagococcus silage* 2B-2^T，投稿至國際分類期刊 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 並被接受核可為有效學名 (Wu *et al.*, 2020)。

Vagococcus 屬包含 16 個種，主要分離自動物來源，如牛絞肉、傷口、動物腸胃道及動物屍體等，部份菌株可能與動物病原體有關，僅有 *Vagococcus teuberi* 分離自酸奶。*V. silage* 2B-2^T 是

Vagococcus 屬中第一株分離自植物來源的菌種。透過 16S rRNA 基因序列 (圖二)、*hsp60* (444 bp) 與 *pheS* (401 bp) 持家基因合併序列、全基因體序列的 ANI (average nucleotide identity) 及 *isDDH* (*in silico* DNA-DNA hybridization) 等方法 (圖二、表一)，確認 *V. silage* 2B-2^T 為 *Vagococcus* 屬中的新種。在生理生化特性上，*V. silage* 可生長於 10-37 °C、pH 6-11、鹽度 1-6% 間，會利用 D-ribose、D-tagatose、maltose 及 α -cyclodextrin 等醣類發酵產酸，不會利用 trehalose、raffinose、sucrose、melibiose 及 melezitose 等醣類。以葡萄糖為基質時，*V. silage* 2B-2^T 會產生琥珀酸、醋酸及檸檬酸，最特別的是不會產乳酸。根據生產的有機酸類型，推測 *V. silage* 2B-2^T 在青貯發酵中所扮演的角色應類似於異型發酵乳酸菌，維持青貯餵飼期的好氧穩定性。但若要了解 *V. silage* 2B-2^T 青貯發酵過程的功能，則需進行更多的研究來確認。

在青貯發酵時，乳酸菌可以有效利用水溶性碳水化合物並將其轉化為有機酸，從而增加周圍環境的酸化，快速酸化有助於

表一、*V. silage* 2B-2^T 與 *Vagococcus* 屬相近菌種之 ANI 及 *isDDH* (%) 分析結果。

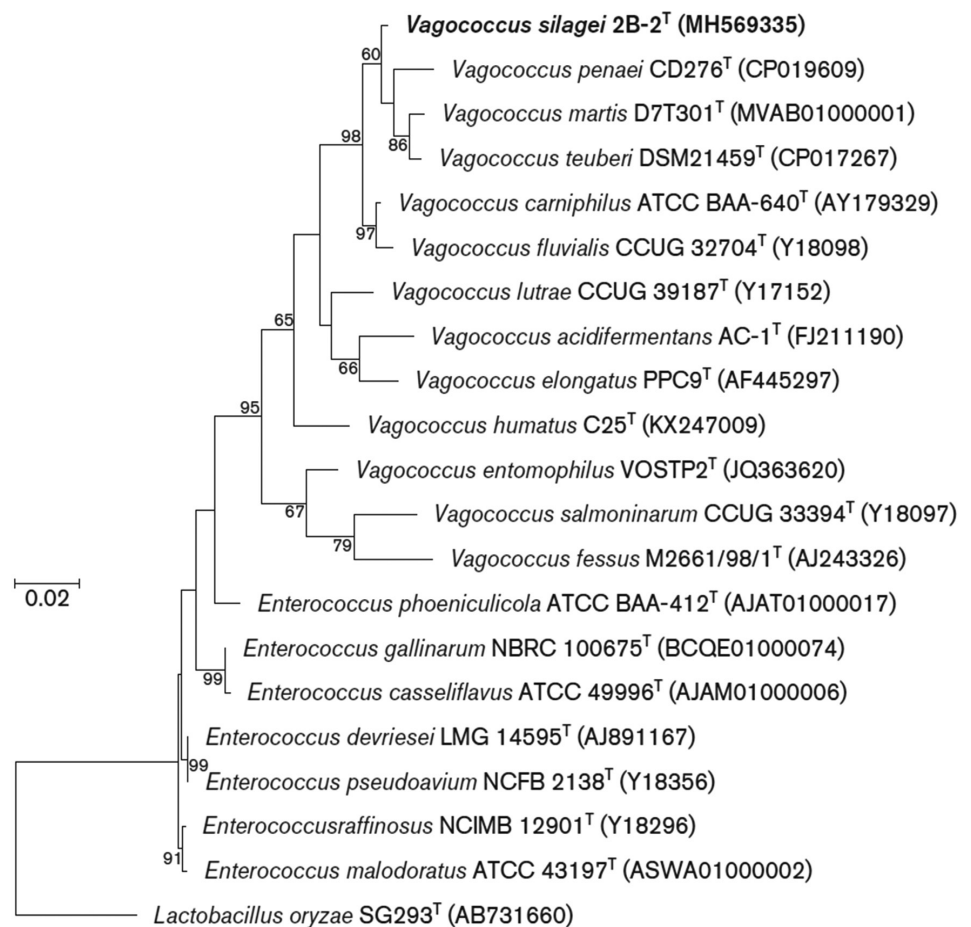
Strain	Accession No.	1	2	3	4	5	6
1	SDGV00000000	100	21.6	19.7	21.0	20.9	19.9
2	CP017267.1	72.5	100	20.2	66.0	21.4	19.6
3	NGKB01000001.1	72.8	73.4	100	20.1	19.8	20.8
4	MVAB01000001.1	72.3	95.8	73.4	100	20.8	19.6
5	CP019609.1	72.8	72.6	72.6	72.6	100	20.5
6	QPV01000001.1	72.9	73.4	77.0	73.4	73.0	100

Strains: 1, 2B-2^T; 2, *Vagococcus teuberi* DSM 21459T; 3, *Vagococcus carniphilus* CDC SS1714T; 4, *Vagococcus martis* D7T301^T; 5, *Vagococcus penaei* CD276^T; 6, *Vagococcus fluvialis* DSM 5731^T。右上方為 *isDDH* 分析數值 (%), 左下方為 ANI 分析數值 (%)。

抑制不良微生物的生長和有毒次級代謝物的分泌。乳酸菌菌種的選擇上，會同時搭配同型發酵及異型發酵乳酸菌共同使用。本土菌株因為具有適應本土環境的特性，也頗具開發的潛力。傳統上乳酸菌被視為是安全的，且具有益生菌的潛力，可促進人類及動物的健康。故以乳酸菌作為青貯生產的添加劑時，不僅能抑制有害微生物，保存飼料的營養價值，還能增加胃腸道中有益微生物的數量，有助於維持動物健康。

參考文獻

1. Soundharajan I, *et al.*, 2021. Appl. Sci. 11: 8127.
2. Valerio F, *et al.*, 2004. FEMS Microbiol. Lett. 233: 289–295.
3. Wu YC, *et al.*, 2020. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70: 1953–1960.
4. 王紓愍等人。2017。畜產研究 50: 134-139。
5. 王紓愍等人。2018。畜產研究 51: 286-292。



圖二、*V. silagei* 2B-2^T 與 *Vagococcus* 屬菌種之 16S rRNA 基因類緣關係圖。

台灣人源本土腸道微生物的新種鑑定、描述與命名發表

生資中心 / 研究員 / 副研究員
黃建勳 / 劉忠憲

近年來最熱門且深受關注，並已完成商品化的次世代益生菌種 *Akkermansia muciniphila*，目前於國際菌種中心能公開提供菌株分讓的數量十分有限（以標準菌株為主，分離株甚少），又加上生物多樣性公約的影響，使得公開流通菌株大多僅限研究使用，無法進行商業化產品開發。另一方面，存在人體腸道的厭氧性微

生物組菌相複雜，不易自檢體被分離純化，也不易進行純菌培養。這些被稱為暗物質 (dark matter) 的微生物，目前多以 DNA 核酸資訊 uncultured OTUs 出現在一般的菌相分析數據中，至今仍有將近 7 成尚未能於體外被成功培養出單一活菌。事實上，不管是微生物基本形態構造，是否具有特殊生理特性，以及如何與其他腸

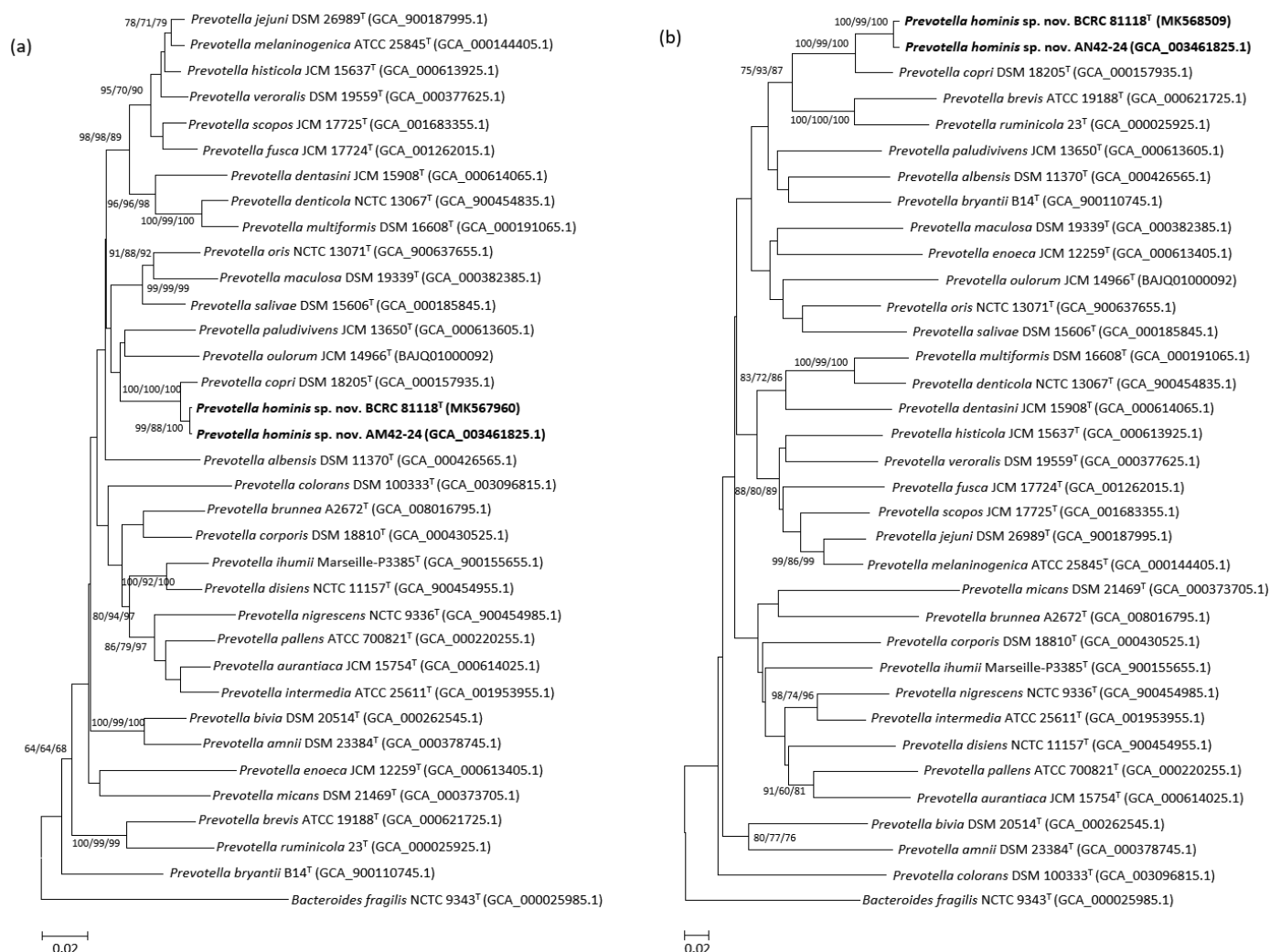
道菌群進行協同作用以產生對宿主有益或有害的代謝物質等相關研究，單從 DNA 分析得到的資訊實有其限制。看得到卻吃不到的窘境，成為現今腸道微生物組科學研究與產業發展面臨最大挑戰。

今年 8 月行政院舉行生技產業策略諮議委員會議 (Bio Taiwan Committee, BTC)，台大醫院吳明賢院長指出人體微生物相是精準醫學的關鍵拼圖，為產官學值得投入的新領域，而微生物研究最重要的還是要回歸培養，唯有分離出指標菌種，並精準到菌株品系層次 (strain-level)，才能確認功能有無與其活性強弱，據以作為探討因果關係和作用機

轉之依據，透過轉譯醫學臨床研究，最終朝向藥用食品 (medical food) 或藥品之商品化邁進。*Dysosmobacter welbionis* J115T 是一株自人體糞便所發現的新穎性菌種 (亦為新菌屬)，於 2020 年正式發表於國際系統與進化微生物學期刊 (IJSEM) 成為有效學名，2021 年則更進一步被發現與人的體重、血糖呈負相關，並經由動物試驗證實具有抗肥胖的功效，相關成果最後發表於 Gut 期刊 (Impact Factor: 19.819)，該菌株目前已完成多國專利佈局。藉由培養與鑑定人體腸道微生物之新菌種與新菌株，必定是未來腸道微生物體發展活菌藥物 (live



圖三、台灣本土腸微菌新種菌株 *Prevotella hominis* BCRC 81118T 之顯微構造。



圖四、台灣本土腸微菌新種 *Prevotella hominis* BCRC 81118T 之類緣演化分析
(a) 16S rRNA 基因序列 (b) *hsp60* 基因序列。

biotherapeutic products, LBP) 或是新興益生菌的重點所在。

為解決台灣發展腸道微生物組在培養上的技術缺口，近年食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC) 積極發展腸道微菌培養體平台 (microbial culturomics)，透過厭氧腸道菌分離純化、菌株鑑定、純菌培養和長期保存等關鍵技術之建立、整合與優化，藉以探索加值台灣本土腸道微菌新資源。本年度完成新增 26 株本土腸微菌新種收存，其中 1 株新種 *Prevotella hominis* BCRC 81118^T，完成多相分類學鑑定、命名、描述與寄存，依照 IJSEM 規範，順利發表並成為國際認可有效名菌種 (<https://lpsn.dsmz.de/species/prevotella-hominis>)。該文獻為台灣首篇人體腸微菌新種發表，對於彰顯 BCRC 腸道微菌

培養體平台的研發服務能量深具代表性，以下僅就 *P. hominis* 新種特徵做簡要概述。

BCRC 81118^T 是一株會產生醋酸及琥珀酸，屬於絕對厭氧革蘭氏陰性的桿菌 (圖三)，藉由 16S rRNA 與 *hsp60* 基因序列分析，顯示其演化上最接近的菌種為 *Prevotella copri* (圖四)。基因體大小約為 4.1 Mb，GC 含量為 42.9%，可註解出 3,500 個基因，其中有 2,883 個基因可歸群於 20 種功能分類中，以及 170 個基因推測可能與碳水化合物代謝有關。與其近似種相比，此新種菌株可利用 D-Sorbitol 和 D-Mannose，具有 Leucine arylamidase、N-acetyl- β -glucosaminidase、 α -Fucosidase 與 β -Galactosidase-6-phosphat 等酵素活性。

參考文獻

1. Le Roy T, Van der Smissen P, Paquot A, Delzenne N, Muccioli GG, Collet JF, Cani PD. 2020.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70: 4851-4858.
2. Le Roy T, Moens de Hase E, Van Hul M, Paquot A, Pelicaen R, Regnier M, Depommier C, Druart C, Everard A, Maiter D, Delzenne NM, Bindels LB, de Barse M, Loumave A, Hermans MP, Thissen JP, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Mucciolo GG, Cani PD. 2021. Gut. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323778
3. Liou JS†, Huang CH†, Nao I, Lee AY, Chen IC, Blom J, Chen CC, Chen CH, Lin YC, Hsieh SY, Huang L, Ohkuma M, Watanabe K, Sakamoto M. 2020.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70: 4767-4773.

前言

近年基因編輯技術發展快速，尤其是 CRISPR-Cas 系統因成本便宜及技術門檻較低，讓各界都紛紛投入基因編輯的領域，而發現基因編輯 CRISPR-Cas9 技術的伊曼紐夏彭提耶 (Emmanuelle Charpentier) 及珍妮佛道納 (Jennifer A. Doudna) 兩位女科學家，更因為此技術榮獲 2020 年諾貝爾化學獎的殊榮。CRISPR-Cas 系統可造成標的基因雙股 DNA 斷裂 (double strand break, DSB)，再經由細胞內非同源末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重組 (homology directed repair, HDR) 機制進行 DNA 修復，以進行目標基因之修改編輯 (Sander and Joung, 2014)。

啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中除了使用傳統基因

建立啤酒酵母菌之高效率基因編輯系統

生資中心 / 副研究員
陳柏洲

摘要

CRISPR 技術因為成本低且易於操作而成為目前最受歡迎且用途最廣的基因編輯技術，此項技術可以精準地在目標基因上進行任何編輯，包括刪除、插入或置換。相對於細菌，啤酒酵母菌是人類利用最早且最廣泛，也是可直接食用的微生物之一，在食品工業上的應用歷史已超過數百年，包括烘焙、釀造、製酒等，因此利用 CRISPR 技術於啤酒酵母菌進行基因編輯具有其應用加值之潛力，透過建立啤酒酵母菌

之基因編輯技術，提升基因編輯效率，使經過基因編輯的菌株能具備更高之應用價值。由於啤酒酵母菌之 *ade2* 基因被剔除後會使菌落呈現紅色，本研究使用 CRISPR-Cpf1 系統，並以 *ade2* 基因作為目標基因，藉此建立視覺辨識化之基因編輯效率分析系統，分析不同實驗條件對於基因編輯效率之影響，其中以單股 DNA 模版進行基因編輯之效率可高達 67.4%，本研究建立最佳化之高效率基因編輯系統，將有助於往後啤酒酵母菌於食品工業之應用發展。

工程技術外，近年來也有多種基因編輯技術被加以研究發展 (Yang and Blenner, 2020; Malcı *et al.*, 2020)。CRISPR-Cas9 技術於 2013 年首次應用於酵母菌，科學家以營養缺乏基因作為篩選標的，成功篩選到基因編輯酵母菌 (DiCarlo *et al.*, 2013)。然而，基因編輯 CRISPR-Cas9 系統若應用於啤酒酵母菌，仍有尚待改善之處，有研究發現酵母菌的生長會被過量表現 Cas9 加以抑制 (Ryan *et al.*, 2014)，且 CRISPR-Cas9 系統在不同啤酒酵母菌株基因編輯的效率差異大 (Ronda *et al.*, 2015)，甚至少數 gRNA 可能因 DNA 構型而無法順利引導 Cas9 進行切割。Cas 家族除了 Cas9，也有其他類型的 Cas 蛋白質被陸續發現，其中 Cpf1 又稱為 Cas12a，Cpf1 帶有 ribonuclease 活性，與 crRNA 結合進而切割標的基因 (Zetsche *et al.*, 2015)。Cpf1 與 Cas9 具有兩個不同的特性，包括在切割 DNA 的斷裂方式與所辨認之 PAM (protospacer adjacent motif) 序列，Cpf1 將 DNA 斷裂成 sticky end，而 Cas9 是 blunt end；Cpf1 辨認 PAM 序列為 TNN，而 Cas9 為 NGG。在啤酒酵母菌基因體中，TNN 序列比例是 NGG 序列的兩倍，若使用 CRISPR-Cas9 系統，平均每 1 kb 的酵母菌基因序列，能用以設計 crRNA 的 PAM 位置經推算只有 53 處 (DiCarlo *et al.*, 2013)，因此 Cpf1 所辨認 T-rich 的 PAM 序列將有助於在酵母菌基因體中設計適合的 crRNA。此外 PAM 序列若為 TNN，亦能避免 nucleosome 佔據目標位置而影響編輯效率的問題。CRISPR-Cpf1 系統的另外一個優點是所需要的 RNA 片段長度較 CRISPR-Cas9 系統為短 (Verwaal *et al.*, 2017)。

根據上述分析，在啤酒酵母菌進行 CRISPR 基因編輯系統，使用 Cpf1 核酸內切酶具有較佳優勢。

本研究於啤酒酵母菌建構基因編輯平台，透過基因編輯 CRISPR-Cpf1 技術，針對標的基因 *ade2* 精準剔除，以視覺辨識紅色菌落加以區分，證明 CRISPR-Cpf1 系統在啤酒酵母菌 BCRC 21447 進行基因編輯之可行性，透過進一步分析並取得高編輯效率之實驗條件，此平台之建置提升了 CRISPR-Cpf1 基因編輯工具於啤酒酵母菌之應用性。

結果

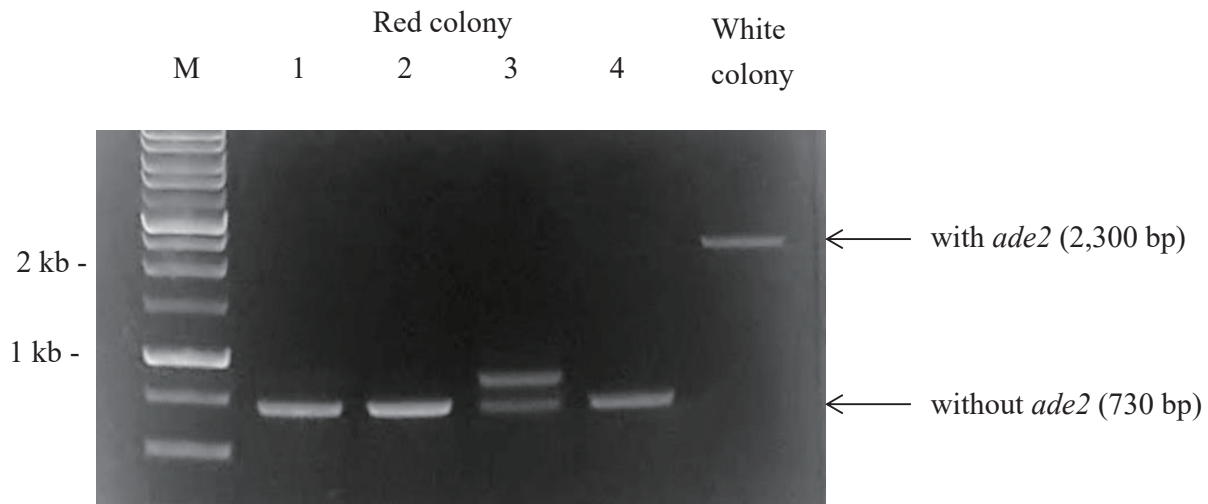
1. 建立啤酒酵母菌 CRISPR-Cpf1 系統

ade2 在啤酒酵母菌中主要參與腺嘌呤 (adenine) 的合成途徑，若 *ade2* 基因被剔除，則菌體產生紅色的嘌呤代謝物 phosphoribosylaminoimidazole (AIR)，使細胞呈現紅色菌落 (Dorfman, 1969)。我們以 *ade2* 作為標的基因建構啤酒酵母菌之 CRISPR-Cpf1 系統，質體 pBCo1 帶有 FnCpf1 之片段及具有 crADE2 和 kanMX 抗性基因；DNA 模版則為 *ade2* 基因上游 500 bp 及下游 500 bp 所組裝成 1 kb 之 DNA 序列。將質體 pBCo1 與 DNA 模版同時電轉形至啤酒酵母菌 BCRC 21447 中，菌液培養於含 G418 抗生素的 YPD 培養基上，剔除 *ade2* 基因之酵母菌呈現紅色菌落。挑取紅色及白色菌落進行 colony PCR 分析，白色菌落仍含有完整之 *ade2* 基因，PCR 片段為 2,300 bp，紅色菌落因已剔除 *ade2* 基因，其 PCR 片段較小為 730 bp，確認紅色菌落之啤酒酵母菌已成功剔除 *ade2* 基因 (圖五)。由於剔除 *ade2* 基因會

使啤酒酵母菌呈現紅色菌落，因此接下來將利用此特色計算基因編輯效率 (基因編輯效率 (%) = (紅色菌落數目 / 全部菌落數目) × 100%)，探討基因編輯效率最佳化條件。

2. 探討基因編輯效率最佳化條件

已有研究顯示啤酒酵母使用同源重組 HDR 機制進行修復之基因編輯效率較高，同源重組 HDR 機制與非同源末端接合 NHEJ 機制最大的不同在於過程中是否使用 DNA 模版，DNA 模版的選擇除了雙股 DNA (dsDNA) 外，另有單股 DNA (ssDNA)，DNA 的長度亦會影響基因編輯之效率。首先探討同源重組 DNA 模版的長度及種類對於啤酒酵母基因編輯效率之影響，DNA 模版皆設計在 *ade2* 基因上游及下游之同源 DNA 片段，雙股 DNA 長片段模版為上下游各 500 bp 之同源序列，雙股 DNA 短片段模版為上下游各 60 bp 之同源序列，另設計單股 DNA 短片段模版。將 250 ng pBCo1 質體及 1,000 ng 三組不同類型之 DNA 模版，送進啤酒酵母菌，經電轉形作用 24 小時，取菌液塗於含 G418 抗生素的 YPD 培養基上，放置於 30°C 培養。若比較不同長度之雙股 DNA 同源重組模版對於基因編輯效率影響，結果顯示長片段 DNA 模版之基因編輯效率優於短片段 DNA 模版，兩組之基因編輯效率具有顯著差異 ($p < 0.05$)，表示較長的同源 DNA 模版，有助於提升以 HDR 機制進行 DNA 修復之效率 (表二)；若比較單股或雙股 DNA 模版，使用雙股 DNA 短片段模版之基因編輯效率僅有 3.8%，而使用單股 DNA 短片段模版之效率可提高至 47.8%，基因編輯效率大幅提升 13 倍，兩



圖五、PCR 確認紅色菌落之啤酒酵母菌成功剔除 *ade2* 基因 (Chen *et al.*, 2021)。

組之基因編輯效率具有顯著差異 ($p < 0.05$)，使用單股 DNA 模版之基因編輯效率遠優於雙股 DNA 模版 (表二)。

由於電轉形作用會對細胞造成傷害，需要時間修復，無法修復之細胞則死亡，因此接著探討啤酒酵母菌電轉形作用對 CRISPR-Cpf1 基因編輯效率之影響，比較電轉形後細胞修復時間及電轉形使用 DNA 質體量。結果顯示，電轉形後細胞修復時間對基因編輯效率影響很大，僅修復 5 小時，其基因編輯效率只有 30.1%，而修復時間拉長至 48 小時，則基因編輯效率可提高至 55.0%，兩組之基因編輯效率具有顯著差異 ($p < 0.05$)。此外，電轉形使用 DNA 質體量亦會影響

基因編輯效率，當提高 DNA 質體送入量至 500 ng，其效率可提高至 67.4% (表二)。電轉形使用 DNA 質體量越多且細胞修復時間越長，皆有助於啤酒酵母菌之基因編輯之效率提升。

結論

本研究於啤酒酵母菌建構基因編輯 CRISPR-Cpf1 技術平台，以視覺辨識紅色菌落作為篩選依據，探討基因編輯之最佳化條件，發現使用同源重組之單股 DNA 短片段模版可得到最高之編輯效率。此平台可大幅增加啤酒酵母菌 CRISPR-Cpf1 基因編輯工具之應用性，開發特殊功能性之啤酒酵母菌，提升食品工業之產業價值。

參考文獻

1. Chen BC, Chu WS, Lin HY. 2021. Enhancement of CRISPR-Cpf1 genome editing efficiency using ssDNA homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science 59: 4-10.
2. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res. 41: 4336-4343.
3. Dorfman BZ. 1969. The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. Genetics 61: 377-389.

表二、啤酒酵母菌 CRISPR-Cpf1 基因編輯條件最適化比較 (Chen *et al.*, 2021)

#	DNA 模版 (length, type)	修復時間	質體量	菌落數目 (red/total CFU)	基因編輯效率
1	1 kb, dsDNA	24 h	250 ng	2450/9400, 4750/16200, 4150/13900	28.4 ± 2.1%
2	120 bp, dsDNA	24 h	250 ng	600/15250, 400/10000, 350/9900	3.8 ± 0.3%
3	120 bp, ssDNA	24 h	250 ng	1850/3750, 3200/6550, 2300/5100	47.8 ± 2.3%
4	120 bp, ssDNA	5 h	250 ng	1550/4900, 2300/7450, 1750/6300	30.1 ± 2.0%
5	120 bp, ssDNA	48 h	250 ng	1800/3000, 1750/3300, 2550/4900	55.0 ± 4.3%
6	120 bp, ssDNA	48 h	500 ng	3150/4700, 5100/7300, 4500/6900	67.4 ± 2.3%

4. Malc K, Walls LE, Rios-Solis L. 2020. Multiplex genome engineering methods for yeast cell factory development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 589468.
5. Ronda C, Maury J, Jakočiūnas T, Jacobsen SAB, Germann SM, Harrison SJ, Borodina I, Keasling JD, Jensen MK, Nielsen AT. 2015. CrEdit: CRISPR mediated multiloci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 14: 97.
6. Ryan OW, Skerker JM, Maurer M J, Li X, Tsai JC, Poddar S, Lee ME, DeLoache W, Dueber JE, Arkin AP, Cate JHD. 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife* 3: e03703.
7. Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32: 347-350.
8. Verwaal R, Buiting-Wiessenhaan N, Dalhuijsen S, Roubos JA. 2017. CRISPR-Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 35: 201-211.
9. Yang Z, Blenner M. 2020. Genome editing systems across yeast species. *Curr. Opin. Biotechnol.* 66: 255-266.
10. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163:759-771.

呼吸道黏液中致敏真菌孢子的發芽動態

生資中心 / 研究員
林宛柔

真菌為伺機性病原菌，真菌感染性疾病之發生，大多限於受感染者免疫力低落的時候，例如：糖尿病與免疫缺乏症候群患者等。引起感染症狀之真菌種類以 *Aspergillus* 為主。癌症、器官移植等免疫力低弱的患者感染 *Aspergillus fumigatus* 而導致黃麴病 (Dagenais and Keller, 2009)。*Aspergillus* 感染免疫力缺乏之幼童，會使其產生肝膿腫 (Chen *et al.*, 2001)。其他真菌也會引起感染性疾病，如 *Cryptococcus* 會引起真菌性腦膜炎 (Bretaud *et al.*, 2006) 等。

除感染與過敏外，真菌代謝物例如： β -glucans 或真菌毒素，可刺激或抑制免疫反應，進而影響呼吸系統。這類代謝物可能具有毒性，存在居家環境中，造成頭痛不適，眼睛、鼻子及胸腔的刺激感等症狀的發生，它們不只存在菌絲體內，也會擴散至

真菌生長的基質，可能與大型辦公建築中的病態建築症候群有關 (Laumbach *et al.*, 2005)。

發芽是真菌孢子從休眠狀態，轉化為營養生長的一種機制。當吸入真菌孢子時，未萌發的孢子即可引起患者的過敏反應。真菌孢子發芽是複雜多變的過程，包含感知與訊息傳遞等分子機制，有許多訊號傳遞鏈及蛋白質的合成，藉以啟動萌芽。真菌孢子在發芽期間 (Mitakakis *et al.*, 2001) 或發芽後 (Green *et al.*, 2003) 會釋放更多過敏原，可能引起患者第二階段的過敏。影響真菌發芽與否的因子有許多，包含水份、營養與溫度等等，然而過去相關研究都僅在培養基上探討相關機制，無法真正反映真菌孢子進入鼻腔後所面對的環境。

人體對吸入的外來物質有防禦機制，粘液和體溫是抵禦微生物入侵的第一道防線。呼

吸道表面有初級保護的黏液，當吸入的顆粒沉積在鼻中，呼吸道粘液和體溫可能會影響真菌孢子的萌發並防止病原體感染。為了解這個防禦機制，我們假設呼吸道的粘液和人體體溫可影響真菌孢子的萌發，並利用模擬的上下呼吸道環境來研究台灣中部 7 種優勢過敏真菌，*Cladosporium oxysporum*、*C. cladosporioides*、*Aspergillus flavus*、*A. brunneoviolaceus*、*A. protuberus*、*Penicillium citrinum* 和 *P. oxalicum* 的發芽歷程，研究成果發表於 *Aerobiologia* 期刊 (Lin *et al.*, 2021)，以下將簡述其概要與成果。

Lin *et al.* (2021) 發現，28 °C 的黏液上，僅 *A. protuberus* 不發芽，其他真菌皆發芽。37 °C 時，*C. oxysporum* 和 *C. cladosporioides* 發芽受抑制，但 *A. flavus*、*A. brunneoviolaceus*、*A. protuberus*、*P. citrinum* 和 *P. oxalicum* 不受影響。*P. citrinum* 和 *P. oxalicum* 雖然可在 37 °C 發芽，然而，呼吸道黏液可抑制他們的發芽。無論是 28 °C 或 37 °C 的鼻腔黏液中，*A. flavus* 和 *A. brunneoviolaceus* 皆有很高的發芽率，表明這兩種菌的

發芽不受上呼吸道或下呼吸道粘液的限制，可能造成侵入性感染。

不同菌種的孢子、菌絲及一些細胞片段釋放過敏原的方式各不相同，對於過敏患者的影響也有所不同。在這種情況下，很容易達到閾值，使患者過敏並導致後續症狀。這個研究發現 *A. protuberus* 在呼吸道黏液中不發芽，其過敏原應在孢子表面，有足夠量即可造成急性過敏。吸入許多未發芽的孢子，短時間內可能引發過敏症狀。如果真菌孢子表面周圍的抗原數量是有限的，粘液抑制孢子萌發，抗原水平未達閾值，應不會觸發過敏症狀。但若孢子萌發不受粘液抑制，可釋放孢子發芽過程中產生的抗原。其他 6 種致敏真菌孢子在 28℃ 呼吸道黏液中 12 小時後發芽，如果孢子發芽後釋出過敏原，可能造成慢性過敏。需要進一步評估孢子表面或發芽時釋放的抗原含量。

A. flavus 和 *A. brunneoviolaceus* 的孢子於 37℃ 呼吸道黏液有高發芽率，且菌絲可生長 (Lin *et al.*, 2021)，顯示有在下呼吸道和肺部生長的潛力。這兩種菌可造成免疫低下患者的侵襲性黴菌感染 (Hedayati *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2013)。Aspergillus 為環境中常見的黴菌，臨床上可以在不同免疫力的病人身上

造成肺部不同的疾病。*A. flavus* 和 *A. brunneoviolaceus* 可耐高溫和黏液發芽，可能有助於他們的拓殖與感染。反之，即便 *C. oxysporum*、*P. oxalicum* 與 *P. citrinum* 於 28℃ 的孢子發芽率高達 65% 以上，但於 37℃ 之發芽率均不超過 10% (Lin *et al.*, 2021)，因此感染肺部的可能性不大。這篇研究的結果提供了洞察空氣傳播真菌作為人類病原體的效力。未來需要研究宿主的免疫能力對於真菌孢子發芽與侵入感染的影響。

參考文獻

1. Dagenais TRT, Keller NP. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 447-465.
2. Chen KY, Ko SC, Hsueh PR, Luh KT, Yang PC. 2001. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest* 120: 177-184.
3. Bretaudeau K, Eloy O, Richer A, Bruneel F, Scott-Algara D, Lortholary O. 2006. Cryptococcal meningo-encephalitis in an apparently immunocompetent patient. *Revue neurologique* 162: 233-237.
4. Laumbach RJ, Kippen HM. 2005. Bioaerosols and sick building syndrome: particles, inflammation, and allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5: 135-139.
5. Mitakakis TZ, Barnes C, Tovey ER. 2001. Spore germination increases allergen release from *Alternaria*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 388-390.
6. Green BJ, Mitakakis TZ, Tovey ER. 2003. Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 285-289.
7. Lin WR, Chen SY, Hsiao SC, Wang PH. 2021. Germination dynamics of allergenic fungal spores in respiratory mucus. *Aerobiologia*: 1-9. doi: 10.1007/s10453-020-09689-x.
8. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. 2007. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
9. Perrone G, Stea G, Kulathunga CN, Wijedasa H, Arseculeratne SN. 2013. *Aspergillus fijiensis* sp. isolated from bronchial washings in a human case of bronchiectasis with invasive aspergillosis: The first report. *Microbiology Discovery* 1: 9.

生物資源保存及研究簡訊 第128期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啓成所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、許璦文、黃學聰、梁克明

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

