



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 111 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

研發成果 1

- ◎果糖乳酸桿菌之研究與發展
- ◎台灣山羌糞便分離之新穎菌種 *Weissella muntiaci*
- ◎水產養殖光合細菌資源及應用
- ◎Biobanks 國際標準及認證現況

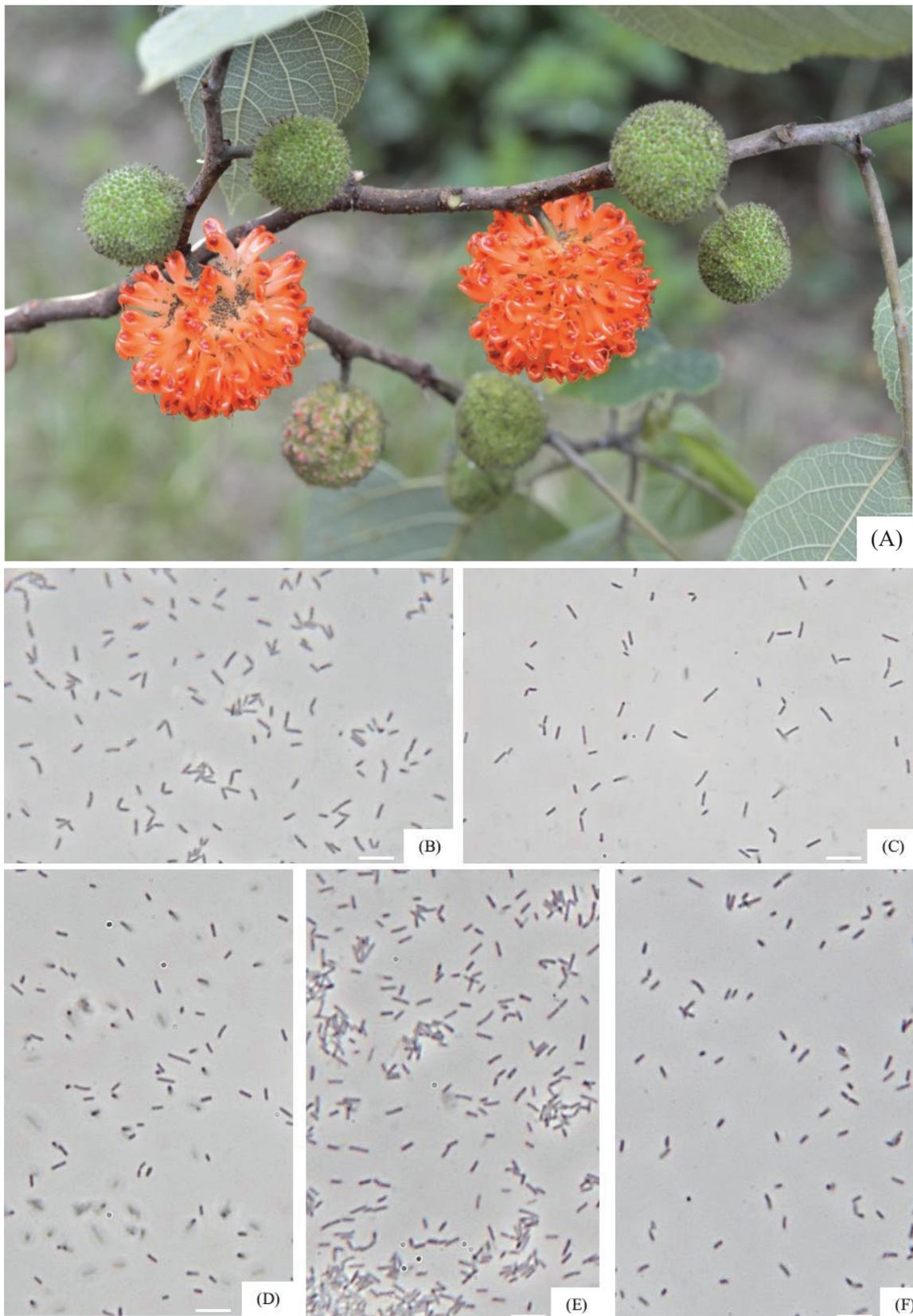
果糖乳酸桿菌之研究與發展

生資中心 / 研究員
古家榮

果糖乳酸桿菌被定義為一群偏愛果糖的產乳酸桿菌 (fructophilic lactic acid bacteria, 簡稱 FLAB)。最早於 1956 年, 日籍研究學者 Kodama 發表此類細菌, 當時被歸類在嗜酸乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*, 縮寫成 *Lb.*), 命名為 *Lb. fructosus*。2002 年, Antunes 等人利用 16S rDNA 序列之分子數據將 *Lb. fructosus* 變更至明串珠菌屬 (*Leuconostoc*, 縮寫成 *Ln.*), 同時從無花果果實分離並發表新種, *Ln. ficulneum*。2005 年, Leisner 等人從 tempoyak 醬 (一種利用榴槿果實發酵而成的醬料, 於東南亞國家普遍使用) 分離並發表新種, *Ln. durionis*。2006 年, Chambel 等人再次從無花果果實分離並發表新種, *Ln. pseudoficulneum*。總計從無花果果實中, 發現到 *Ln. ficulneum* 和 *Ln. pseudoficulneum* 這兩個新種。直到 2008 年, 日籍研究人員利用 16S rDNA 序列之分子數據將上述 4 個 *Leuconostoc* 屬的菌種 (*Ln. fructosus*、*Ln. ficulneum*、*Ln. pseudoficulneum* 及 *Ln. durionis*) 提升至新屬的位階, 命名為果糖乳酸桿菌屬 (*Fructobacillus*,

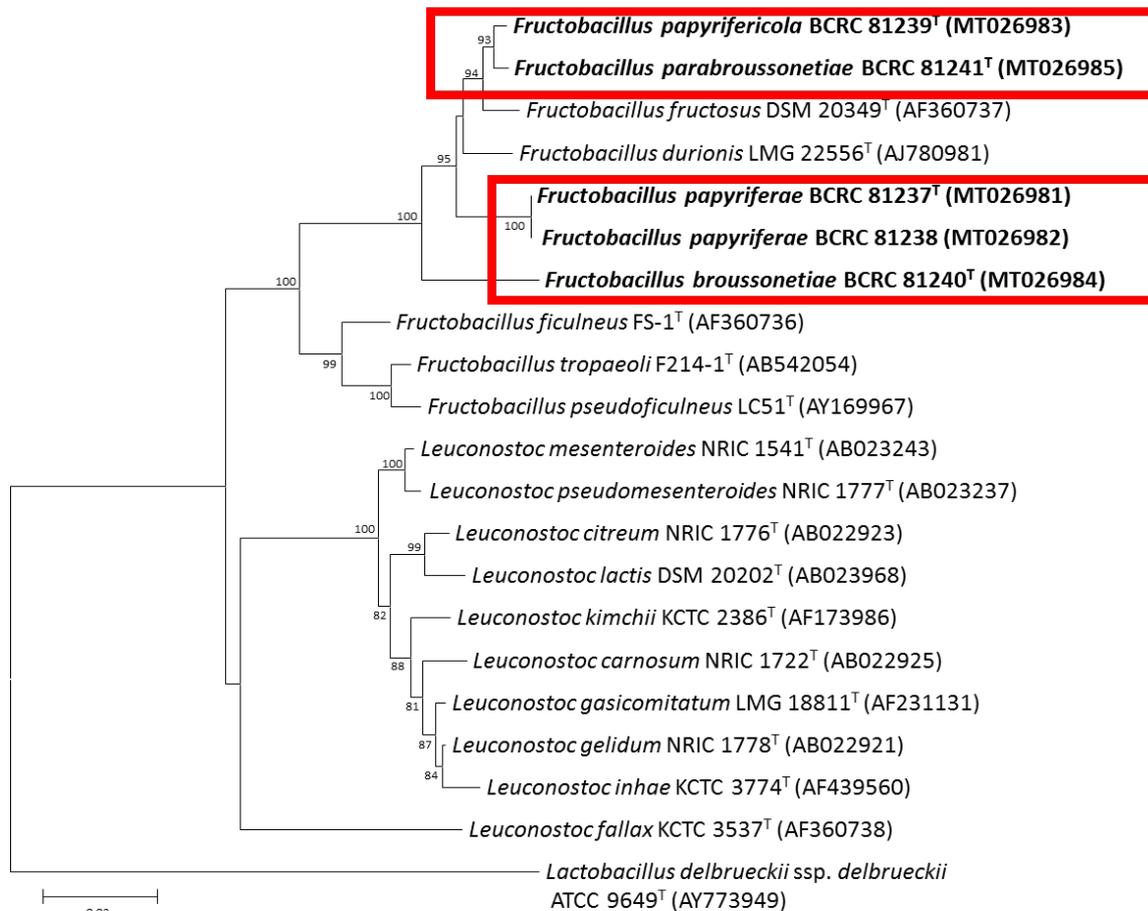
縮寫成 *Fb.*) (Endo *et al.*, 2008)。2011 年, Endo 等人從金蓮花 (*Tropaeolum majus*) 花朵分離並發表新種, *Fb. tropaeoli*。

從 2011 年截止以來, 果糖乳酸桿菌屬在國際原核生物分類系統委員會認可的菌名列表中, 一直只有收錄 5 個標準菌種: *Fb. fructosus*、*Fb. ficulneum*、*Fb. pseudoficulneum*、*Fb. durionis* 及 *Fb. tropaeoli*。直到 2022 年, 生資中心 (BCRC) 為了探勘和收存台灣本土乳酸菌資源, 從台灣各地採集多樣化的樣品進行乳酸菌之分離保存和系統分類研究。筆者和 Lin 等人從台灣構樹果實上分離到 28 株果糖乳酸桿菌屬的分離株, 並發表 4 個新種 (圖一及圖二), 分別命名為 *Fb. brossonetiae*、*Fb. papyriferae*、*Fb. papyrifericola* 及 *Fb. parabrossonetiae* (Lin *et al.*, 2022)。從分離菌株的新穎性, 足見台灣擁有獨特的地理氣候, 蘊藏豐富的物種, 非常值得持續探勘和收存台灣特有微生物資源。果糖乳酸桿菌屬目前總計有 9 個標準菌種 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022)。依據物種所屬棲地進行統



圖一、台灣構樹果實及果糖乳酸桿菌屬新種的顯微照片。

(A) 台灣構樹果實 (圖片引用至 <https://www.facebook.com/台北植物園-Taipei-Botanical-Garden-321991691227057/photos/pcb.4148316761927845/4148311898594998>); (B), (C) *Fructobacillus papyriferae* BCRC 81237^T, BCRC 81238^T; (D) *Fb. papyrifericola* BCRC 81239^T; (E) *Fb. broussonetiae* BCRC 81240^T; (F) *Fb. parabroussonetiae* BCRC 81241^T; 油鏡 100 倍, 比例尺: 5 μm。



圖二、台灣構樹果實分離的果糖乳酸桿菌屬菌株與相近菌種之 16S rDNA 序列親緣關係樹狀圖。

計，果糖乳酸桿菌屬的菌株主要存在於花、果實及昆蟲腸道，其中以存在於果實的種類被報導的最多。

非歸類於果糖乳酸桿菌屬，但具有 FLAB 特性的菌種也有被發現。1998 年，Edwards 等人從腐敗的葡萄酒中分離並發表新種，*Lb. kunkeei*。2010 年，Endo 等人在雛菊 (*Osteospermum moniliferum*) 花朵上發現新種，*Lb. florum*。2014 年，Olofsson 等人在蜜蜂 (*Apis mellifera*) 胃部分離並發表七個 *Lactobacillus* 新種，其中 *Lb. apinorum* 被歸到 FLAB。2018 年，McFrederick 等人分別從野生蜜蜂及花朵上，發表 3 個 *Lactobacillus* 新種，分別為 *Lb. micheneri*、*Lb. timberlakei*

及 *Lb. quenuiae*，這 3 種菌種皆具有 FLAB 的特性。

具有 FLAB 特性的這類細菌，其生長特性可分為兩類，一為絕對嗜果糖性，另一則為兼性嗜果糖性。處在氧氣充沛的環境下，葡萄糖並不是優先選擇的碳水化合物來源，惟有添加丙酮酸 (pyruvate) 後，才能提升對葡萄糖的利用性，這類 FLAB 被歸在絕對嗜果糖性乳酸桿菌 (obligate FLAB)，所有果糖乳酸桿菌屬的菌株皆屬於此類 FLAB。反之，則稱為兼性嗜果糖性乳酸桿菌 (facultative FLAB)，這類 FLAB 不需添加丙酮酸，於生長 48 小時後，可自行轉而提升對葡萄糖的利用性 (Holzapfel *et al.*, 2014)。研究人員探究其生化機轉後，

結論出氧氣、果糖或丙酮酸為 FLAB 所必需的電子接受者，能促進 FLAB 生長。另外，同質發酵型和異質發酵型乳酸菌的差異，在於乙醇去氫酶 (alcohol dehydrogenase; ADH) 及乙醛去氫酶 (acetaldehyde dehydrogenase; ALDH) 的有無。這兩種酵素產生與否，取決於是否具有 *adhE* 基因。Endo 等人的研究成果證實一般性乳酸菌具有此基因 (Endo *et al.*, 2018)，而果糖乳酸桿菌屬的菌株不具有此基因。儘管具有 FLAB 特性的乳酸桿菌屬菌株，雖然具有此基因，但有些菌株會缺乏部份片段，這應該是此類乳酸桿菌屬菌株與一般性乳酸桿菌屬菌株最大的差異。Endo 等人進一步對這類菌株進行全基因體解

表一、生資中心收存之果糖乳酸桿菌屬菌種資源

菌種學名	BCRC 菌號	分離源	分離地
<i>Fructobacillus fructosus</i>	12191 ^T	花朵	未知
<i>Fructobacillus fructosus</i>	14019 ^T	花朵	未知
<i>Fructobacillus ficulneus</i>	81231 ^T	成熟的無花果	葡萄牙
<i>Fructobacillus tropaeoli</i>	81232 ^T	花朵 (金蓮花)	南非, 西開普
<i>Fructobacillus durionis</i>	81233 ^T	Tempoyak	馬來西亞
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i>	81234 ^T	成熟的無花果	葡萄牙, Alentejo region
<i>Fructobacillus papyriferae</i>	81237 ^T	構樹果實	臺灣, 新竹市
<i>Fructobacillus papyriferae</i>	81238 ^T	構樹果實	臺灣, 新竹市
<i>Fructobacillus papyrifericola</i>	81239 ^T	構樹果實	臺灣, 新竹市
<i>Fructobacillus broussonetiae</i>	81240 ^T	構樹果實	臺灣, 新竹市
<i>Fructobacillus parabroussonetiae</i>	81241 ^T	構樹果實	臺灣, 新竹市

序，發現這類菌株的基因體序列皆小於 1.6 Mbp，比一般乳酸桿菌屬菌株的基因體略小，可表現基因數目 (number of cds) 也較少，低於 1500 個。筆者和 Lin 等人也針對發表的 4 個果糖乳酸桿菌屬新種和分離株進行全基因體解序，亦得到相同印證，大小皆小於 1.3 Mbp (Lin *et al.*, 2022)。

FLAB 的應用目前仍有相當大的空間可供探索，主要是因為發現的物種少，與應用相關的研究議題相對不多。因為菌株特性的關係，研究方向都著重於蜜蜂、蜂巢及養蜂生態。台灣之外的其他國家，對養蜂產業相對較為盛行。近年來，由於蜂群大量減少，導致影響農業生態系的改變已受到大眾的關注。管理蜂群的生物性病害，最快的方法不外乎使用抗生素。不過採取這類快速治標方法的背後也使蜂群及周遭環境付出慘痛的代價。撇開管理蜂群慣用的抗生素施行法，Kluser 等人提出蜂群七大生物性病原，分別為蟻、甲蟲、病毒、黃蜂、真菌、蜂蠅、細菌。目前最嚴重的病害為美洲幼蟲臭腐病 (American

foulbrood disease，簡稱 AFB; 病原為 *Paenibacillus larvae*，是由細菌性微生物引起的病害) (Kluser *et al.*, 2010)。Zeid 等人利用益生菌拮抗性代謝物的概念，從蜜蜂腸道篩選出的益生性菌種 *Fb. fructosus* HI-1，也是屬於 FLAB。此菌株產生的五種代謝物，與控制 AFB 的抗生素 oxytetracycline (OTC) 具有相似的抗菌效果，不失為另一種友善環境的方向及選用方法 (Zeid *et al.*, 2021)。對於高價添加物及原料的開發，也有研究人員利用果糖乳酸桿菌屬菌株進行生產，例如甘露醇、赤藻醣醇、乳酸及醋酸等，雖然應用此類細菌生產相對天然、安全，但在成本考量下，還需進一步的改良。

作為生物材料資源中心收存微生物的角色，生資中心收存 11 株果糖乳酸桿菌屬菌株 (表一)。6 株由國外菌種中心引進，寄存編號分別為 *Fb. fructosus* (BCRC 12191、14019)，*Fb. ficulneus* (BCRC 81231)，*Fb. tropaeoli* (BCRC 81232)，*Fb. durionis* (BCRC 81233)，*Fb.*

pseudoficulneus (BCRC 81234)，5 株是從台灣分離的本土菌株，編號為 BCRC 81237 ~ 81241。若對此類菌株有興趣進行探索者，可至生資中心生物資源線上目錄進行選購和詢問 (網址 <https://catalog.bcrc.firdi.org.tw/>)。

參考文獻

1. Endo A, *et al.* 2008. IJSEM 58: 2195–2205.
2. Lin ST, *et al.* 2022. IJSEM 72: 5235.
3. Meier-Kolthoff JP, *et al.* 2022. Nucleic Acids Res. 50, D801-D807.
4. Holzapfel WH, *et al.* 2014. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.
5. Endo A, *et al.* 2018. Appl. Environ. Microbiol. 84(19): 1290.
6. Kluser S, *et al.* 2010. UNEP EMERGING ISSUES.
7. Zeid A, *et al.* 2021. Probiotics and Antimicro. Prot. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09812-5>.

台灣山羌糞便分離之新穎菌種 *Weissella muntiacy*

生資中心 / 副研究員
林詩婷

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，具有維持正常的腸道細菌相、免疫調節作用、改善代謝作用等。而在食品加工業中，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 (陳慶源 *et al.*, 2007)。台灣保健食品市場規模約 1,200 億元，其中乳酸菌類益生菌產品佔 40%，足見乳酸菌產業的應用開發潛力與市場商業價值。由於特定的功效是由特定菌株持有，現階段產業常使用的乳酸菌大多以進口為主，使用本土菌株之比例相當稀少，因此，探勘台灣本土乳酸菌的微生物資源和開發應用潛力菌株是國內產業迫切需求。為拓展本土乳酸菌資源的收存，生資中心長久以來採集台灣各地區之多樣化樣品進行乳酸菌之分離純化和系統性分類研究，冀望能發掘到可應用於產業使用之乳酸菌。

位於宜蘭員山和新北烏來交界的福山植物園，海拔高度介於 400 ~ 1,400 公尺之間，自然資源豐富具有各種台灣原生的植物、昆蟲、鳥類及動物，園區著重於動植物之保育研究與蒐集展示，是一處探勘微生物資源的寶庫。2017 年於福山植物園園區內進行樣品採集，總共採集 20 個野生動物排遺、8 個植物及 3 個環境樣品。樣品經過系列稀釋後，接

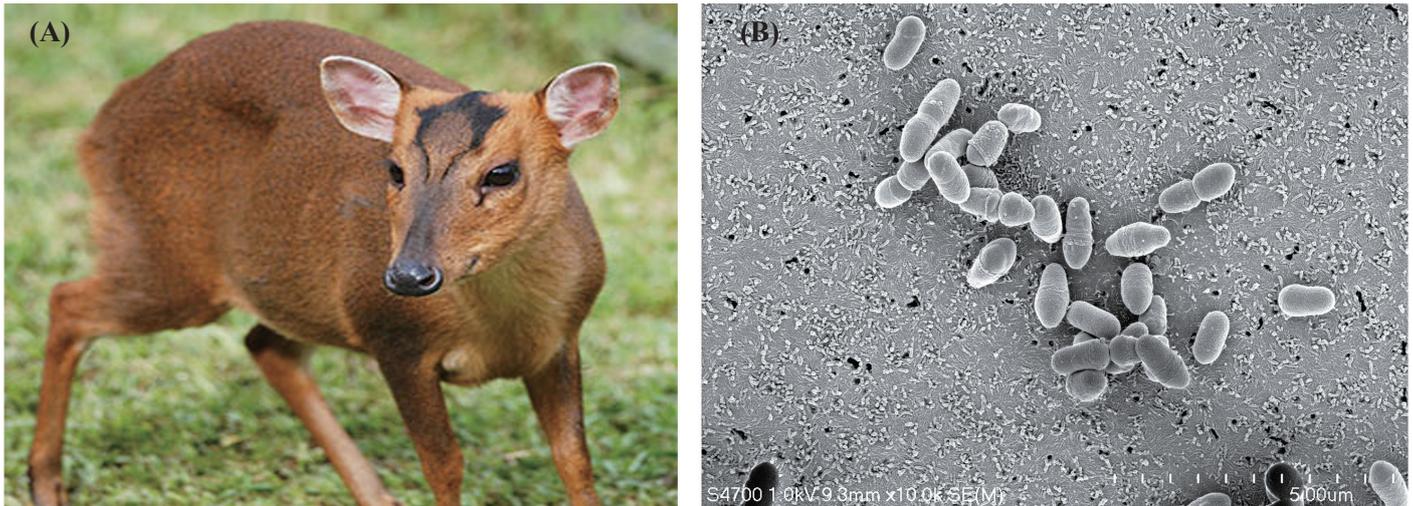
種在含有 0.001% sodium azide 和 cycloheximide 的 MRS 培養基，置於 30°C 與厭氧環境下進行乳酸菌的培養和篩選。利用 MALDI-TOF MS 菌種鑑別和 16S rRNA 基因序列分析，初步鑑定所分離到的 52 株乳酸菌分離株，其中 51 株乳酸菌隸屬於 7 個屬共 8 個種，包括 *Lactiplantibacillus plantarum* (同種異名 *Lactobacillus plantarum*)、*Limosilactobacillus reuteri* (同種異名 *Lactobacillus reuteri*)、*Ligilactobacillus ruminis* (同種異名 *Lactobacillus ruminis*)、*Lactococcus lactis*、*Lactococcus garvieae*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Weissella paramesenteroides* 與 *Vagococcus fluvialis*。另外有 1 株分離株 8H-2，根據 16S rRNA 基因序列分析結果，無法歸類到乳酸菌的已知種，推測可能是乳酸菌的新穎菌種。

表一、*Weissella muntiacy* 8H-2T 與 *Weissella* 屬相近菌種之 ANI 及 dDDH 值

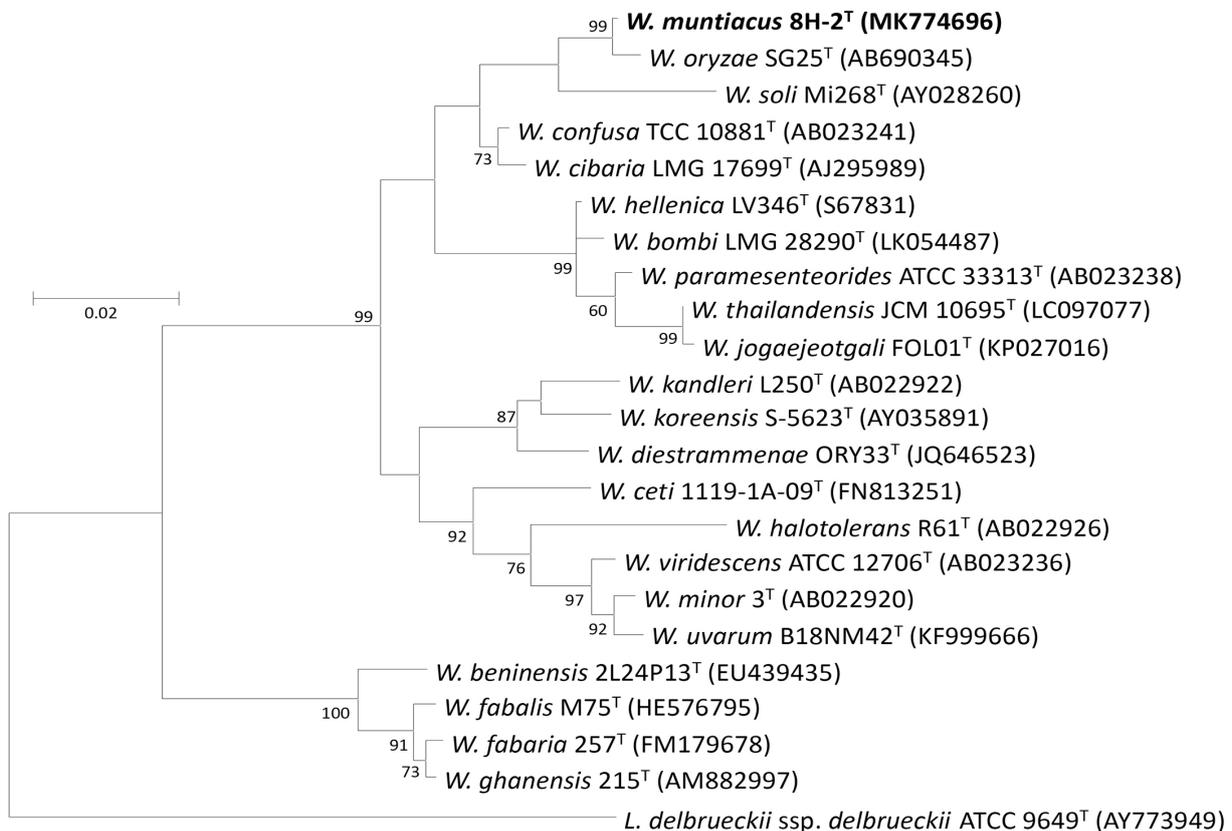
Strain	Accession No.	1	2	3	4	5
1	SDGZ00000000	100	30.1*	27.3	27.5	25.1
2	BAWR00000000	75.4†	100	20.6	21.3	23.7
3	JQAY00000000	71.7	71.4	100	23.2	21.8
4	BJEF00000000	71.7	71.0	79.2	100	22.9
5	QRAS00000000	70.2	70.1	71.5	71.1	100

Strains: 1. *Weissella muntiacy* 8H-2T; 2. *Weissella oryzae* SG25T; 3. *Weissella confuse* DSM 20196T; 4. *Weissella cibaria* JCM 12495T; 5. *Weissella soli* CECT 7031T。* 右上方為 dDDH 值 (%), † 左下方為 ANI 值 (%)。

分離株 8H-2 (BCRC 81133) 是從山羌糞便樣品分離到的球菌 (圖一)，利用多相分類學技術，如表型特徵、全基因體序列分析、16S rRNA 基因序列分析、持家基因 (pheS 和 dnaA) 串聯序列分析、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，投稿至國際分類期刊 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，命名為 *Weissella muntiacy*，並被接受核可為有效學名 (Lin *et al.*, 2020)。*W. muntiacy* 8H-2^T 透過 16S rRNA 基因序列 (圖二)、持家基因串聯序列、全基因體序列的 ANI (average nucleotide identity) 及 dDDH (digital DNA-DNA hybridization) 等方法 (表一)，確認 *W. muntiacy* 8H-2^T 為 *Weissella* 屬中的新種。在生理生化特性上，*W. muntiacy* 8H-2^T 可於 10-37°C、pH 4-12 及 1-3% NaCl 生長，會利用 *L-arabinose*、*D-ribose*、*D-xylose*、*D-glucose*、*N-acetylglucosamine* 及 *gluconate* 等醣類發酵產酸，不會利用 *D-galactose*、*D-fructose*、*D-mannose*、*L-sorbose*、*L-rhamnose*、*D-mannitol*、*lactose*、*sucrose*、



圖一、從台灣山羌糞便分離之 *Weissella muntiaci* 8H-2^T (BCRC 81133^T)。
(A) 台灣山羌 (圖片引用至 <https://fushan.tfri.gov.tw/>); (B) 分離株 8H-2^T 之電子顯微照片。



圖二、*Weissella muntiaci* 8H-2^T 與 *Weissella* 屬菌種之 16S rRNA 基因類緣演化樹。

starch 及 glycogen 等醣類。以葡萄糖為基質時，*W. muntiaci* 8H-2^T 代謝後之產物以乳酸為主，伴隨一些醋酸、檸檬酸及琥珀酸。

Weissella 屬為乳酸菌的一員，相較於運用廣泛、耳熟能詳的 *Lactobacillus* 屬或 *Lactococcus* 屬菌株，大家對 *Weissella* 屬相對

陌生，至今對於 *Weissella* 屬的研究仍然偏少。依照目前的文獻顯示 *Weissella* 屬菌株具有幾項可供食品領域應用之特性，未來是否能應用於食品工業作為發酵劑或輔助培養用，則待更多的實驗研究探討，以下針對 *Weissella* 屬及這些特性進行介紹。*Weissella* 屬

為革蘭氏陽性菌，形態為球狀或短桿菌，於兼性厭氧環境下可生長。在分類學上，*Weissella* 屬原本歸在 *Leuconostoc* 屬之中，隨著分子生物學研究的進步，在 1993 年 Collins 藉由 16S rRNA 基因序列分析，將 *Weissella* 屬獨立出來，截至 2022 年 3 月，*Weissella*

屬共有 24 個種。從目前已發表之菌種的分離源可看出 *Weissella* 屬的棲息地分佈廣泛，包括動物皮膚、牛奶、人類唾液、母乳、植物和蔬菜、土壤、擠奶機、甘蔗、糞便、發酵食品如發酵蔬菜和發酵牛奶製成的奶酪等。有些 *Weissella* 屬菌株與各地區的傳統產品有關，例如 *Weissella thailandensis* 是從泰國的發酵魚中分離到、*Weissella koreensis* 是從韓國泡菜中發現、*Weissella kandleri* 是從蒙古的馬奶酒中找到，而 *Weissella ghanensis* 則是在發酵的加納可可豆堆中分離到，這些產品倘若在沒有 *Weissella* 屬菌株存在的情況下製造，不知它們的特性與風味是否會有所差異 (Kavitake *et al.*, 2020)。

根據文獻研究顯示 *Weissella* 屬菌株具有產生胞外多醣 (exopolysaccharides, EPS)、細菌素或過氧化氫之能力，這些特性讓 *Weissella* 屬菌株在食品工業中具有應用的潛力。胞外多醣是自然界中一些特定微生物在生長過程中分泌到胞外的水溶性多醣體，通常附著在細胞表面或者是分泌到培養基中，是由碳水化合物組成的高分子量結構，添加到食品中主要是作為增稠劑和乳化劑，使得產品的粘度增加、質地改善和脫水收縮減少，它們可應用在製造布丁時替代玉米澱粉 (Kavitake *et al.*, 2019)。*Weissella* 屬大多數的菌株都具有生產胞外多醣的能力，產生的胞外多醣大都是同質多醣體 (HoPS)，是僅由一種類型的單醣所組成的巨分子物質同多醣，例如由 dextran、fructan、galactan、levan 或 inulin 等基質構成。*Weissella* 屬菌株主要藉由發酵碳水化合物產生乳酸，它們可以使用如麥芽糖，果

糖、核糖、木糖、蔗糖和葡萄糖酸鹽作為碳源，同時具有 β -半乳糖苷酶可將乳製品中之乳糖發酵。胞外多醣及乳酸作用後可以提供粘度，這項特性有利於生產酸奶等需要黏稠性之產品。此外，由於 *Weissella* 屬菌株能夠發酵多種醣類，它們可以作為起始培養物，應用於製造具有不同感官特性的產品 (Fusco *et al.*, 2015)。

回顧過去文獻研究可知 *Weissella cibaria* TM 128 可以產生有機酸和過氧化氫，可抑制真菌和細菌在蔬菜水果中的生長，而 *W. cibaria* D30 若添加於乾酪製造時可以預防單核細胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的生長 (Kariyawasam *et al.*, 2019)。*Weissella confusa* PL9001 可以抑制 90% 的幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 與人類胃細胞株 MKN-45 之結合，推測 *Weissella* 屬菌株可作為益生菌添加到發酵乳以達到對抗幽門螺旋桿菌之功效。除此之外，*W. confusa* DD-A7 能夠引發氧化攻擊並限制病原體的生長，具有拮抗多重抗藥性大腸桿菌之功效 (Dey *et al.*, 2019)。泰國發酵魚製品 plaa-som 分離到的 *W. cibaria* 110 中發現第一個 *Weissella* 屬菌株產生的細菌素 Weissellicin 110，這種細菌素對於某些革蘭氏陽性細菌具有抗菌活性，並且對高溫和過氧化氫酶具有抗性，但是暴露於蛋白酶 K 和胰蛋白酶時則會失去活性 (Sriannual *et al.*, 2007)。而後也在 *Weissella hellenica* D1501 發現細菌素 Weissellicin D，這種細菌素具有致病菌如金黃色葡萄球菌、單核細胞增生李斯特菌和大腸桿菌等的抗菌活性 (Chen *et al.*, 2014)。除了 Weissellicin D 之外，科學家陸續從 *W. hellenica* 中發現

Weissellicin L、Weissellicin M 和 Weissellicin Y 等細菌素，這些細菌素對單核細胞增生李斯特菌和凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*) 具有拮抗活性 (Masoud *et al.*, 2012)。細菌素是天然的抗微生物化合物，食品工業對它們的用途很感興趣，可做為天然防腐劑和化學防腐劑的替代品。但目前在食品工業中使用 *Weissella* 屬菌株作為發酵劑仍有一些阻礙，如對 *Weissella* 的致病性缺乏全盤了解。近年來有些報導顯示 *Weissella* 屬菌株與菌血症、膿腫、人工關節感染和感染性心內膜炎有關，因此在其技術應用之前，對於菌株安全性需要很嚴謹的評估和測試。另一方面，由於 *Weissella* 屬菌株會產生細菌素，因此對其他工業用的微生物會造成怎樣的影響仍需評估，這些問題需要更多的研究來證明 *Weissella* 屬菌株可以安全的應用在食品工業上 (Fusco *et al.*, 2015)。

參考文獻

1. 陳慶源，黃崇真，邱雪惠，廖啟成。2007。農業生技產業季刊。頁 60-68。
2. Lin *et al.* 2020. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1578-1584.
3. Kavitake *et al.* 2020. *Int J Biol Macromol.* 2964-2973.
4. Kavitake *et al.* 2019. *J. Food Sci. Technol.* 1-9.
5. Fusco *et al.* 2015. *Front Microbiol.* 155.
6. Kariyawasam *et al.* 2019. *J. Dairy Res.* 1-7.
7. Dey *et al.* 2019 *Microb. Pathog.* 119-130.
8. Sriannual *et al.* 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 2247-2250.
9. Chen *et al.* 2014. *Food Control.* 203-209.
10. Masoud *et al.* 2012. *Int. J. Food Microbiol.* 192-202.

水產養殖光合細菌資源及應用

生資中心 / 研究員
郭楊正

一、光合細菌

光合細菌是一群能利用光能驅動細胞新陳代謝的原核生物，廣泛存在潮濕的自然環境中。光合細菌具有多樣化的代謝型態，包含光能自營 (photoautotrophy)、光能異營 (photoheterotrophy)、化能自營 (chemoautotrophy) 及化能異營 (chemoheterotrophy)。自營光合細菌可利用無機碳 (例如 CO_2) 作為碳源，具有固碳的能力；異營光合細菌則利用有機碳 (例如糖、有機酸) 作為碳源，其生長速率通常優於自營生長；部分光合細菌含有固氮酶 (nitrogenase)，可以將空氣中的氮氣 (N_2) 轉換成氨 ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$)。因此光合細菌對於自然界中碳、氮循環扮演重要角色。

早期將光合細菌分為產氧及不產氧兩大類。產氧光合細菌代表物種為藍綠菌 (cyanobacteria)，可利用水分子 (H_2O) 做為電子供體，並伴隨氧氣的釋放；不產氧光合細菌則是利用無機物 (例如 H_2S) 做為電子供體，因此不會產生氧氣。不產氧光合細菌族群較廣泛，依其生理特性可區分 Red-FAP (filamentous anoxygenic phototrophic)、Green-FAP、Heliobacteria、Acidobacteria、Gemmatimonadetes、green sulfur bacteria (GSB)、purple sulfur bacteria (PSB) 及 purple non-sulfur bacteria (PNSB)，其中 GSB 及

PSB 對於 H_2S 有較高的耐受性，可在體內聚集成硫顆粒。

從細菌學名分類的角度來看，各種光合細菌彼此間親緣性並不高，以 PNSB 這類群為例，它們分布在 α 及 β 變形菌綱，至少包含 6 個目、13 科及 21 屬 (Sakarika *et al.* 2019.)。隨著分子生物學及鑑定技術的演進，有更多的菌株被分離及鑑定，部分菌株在重新鑑定之後，生物學家會再思考給予更精確的學名。舉例來說，球形紅桿菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 在 2020 年便被重新歸類在蠟桿菌屬 (*Cereibacter*)，因此學名更改為球型蠟桿菌 (*Cereibacter sphaeroides*) (Hördt *et al.*, 2020)。

二、光合細菌在水產養殖的應用

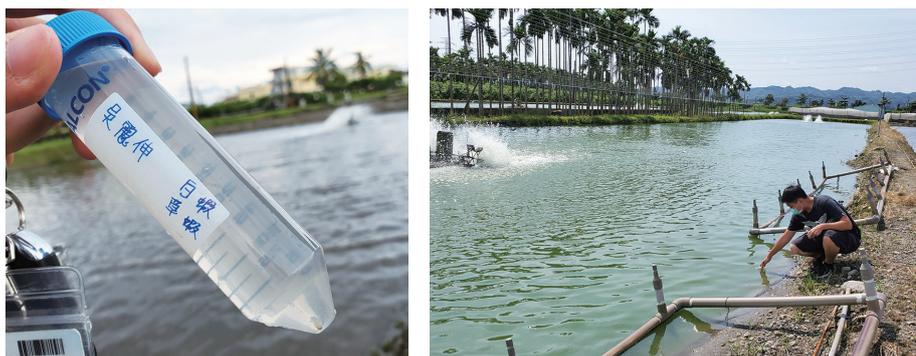
過去臺灣曾有養殖王國的美稱，但在長期高密度飼養及管理失衡下，衍生出病害、生態環境

及社會問題。水產養殖常見的問題為水中氨氮、硫化氫及有機物過高，造成養殖生物緊迫、中毒或感染等現象。魚蝦飼料中含有高濃度蛋白 (20~45%)，這些飼料中的氮大部分會被釋放到水中，以氨氮 ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) 的形式存在，氨將造成水中生物生存的壓力，因此在養殖過程中需要盡可能降低水中氨濃度。有機物主要來源為投餵產生的殘料、魚蝦的糞便及死亡的藻類等，當有機物濃度過高，可能讓有害細菌大量繁殖，造成水中生物感染、死亡；當有機物不斷累積，在池子底部形成沉積層，在此環境中缺乏氧氣，厭氧微生物得以繁殖並釋放出還原性的代謝物，如硫化物及氨。其中硫化氫 (H_2S) 對於水中生物具有高毒性，且會影響亞硝酸鹽 (nitrite) 的氧化，造成亞硝酸鹽的濃度升高。

在管理層面上，有許多可以減少水中污染物的方法，包含適當飼養密度、精準飼料投餵、水質監測及微生物製劑的使用。在水產養殖上，光合細菌已是常用的管理資材之一。一般而言，光合細菌在生長過程中，可代謝氨氮、硫化氫及有機物，可降低上述物質在水中的濃度，因此適當



圖一、光合細菌廣泛應用在水產養殖



圖二、生資中心自國內養殖池中採集樣本，分離光合細菌

使用光合細菌等微生物在水池管理上，可達到控制水質的目的。Chumpol 等人 (2017) 混合多株 *Rhodobacter sphaeroides* 及 *Aiffella marina* 在白蝦的養殖管理上，可有效降低水中氨氮及促進蝦的生長 (重量及體長)；亦可有效控制 *Vibrio parahaemolyticus* SR2 誘發的急性肝胰腺壞死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)。Zhang 等人 (2014) 應用 *Rhodospseudomonas palustris* 在草魚池的管理，發現氨氮、亞硝酸氮及總氮皆明顯比對照組低，可有效控制水質。

另外，光合細菌富含蛋白質及維生素，亦可生產 Co-Q10 及類胡蘿蔔素，因此也常被作為餌料或飼料添加劑，促進魚蝦幼苗的發育及生長。Alloul 等人 (2021)

將 *Rhodospseudomonas palustris* 及 *Rhodobacter capsulatus* 作為白蝦飼料添加劑，可提升飼料轉化率，增加蝦子的收成重量。

三、生資中心在光合細菌資源的收集與開發

生資中心近年從國內各地的養殖池中採集樣本，並利用 NS 培養基 (BCRC 522) 增殖培養，放大光合細菌之菌量，再從中分離、純化及鑑定光合細菌。109~110 年共收集 56 處養殖池樣本，共新增 115 株光合細菌分離株 (表一)，主要為紫色非硫細菌，其中數量較多的菌株為 *Rhodovulum sulfidophilum*、*Rhodospseudomonas palustris* 及 *Rhodospseudomonas faecalis*，分別有 35、25 及 18 株，占有所有分離菌株的 67.8%。

Allochrochromatium 及 *Marichrochromatium* 為紫色硫細菌，共有 6 株；從淡水養殖池中分離的菌株主要為 *Rhodospseudomonas palustris*、*Rhodospseudomonas faecalis* 及 *Rhodoplanes serenus*，經耐鹽性測試，多數僅能在 1% 以下鹽度之環境生長；從海水養殖池中分離的菌株主要為 *Rhodovulum sulfidophilum*、*Phaeovulum vinaykumarii* 及 *Cereibacter sphaeroides*，多數可耐受 3.5~4.5% 鹽度。透過收集、純化、鑑定及保存光合細菌，建立國內水產養殖之光合細菌菌種庫，未來可針對個別菌種之特性，進一步開發成水產養殖之微生物製劑。

參考文獻

1. Sakarika, M. *et al.* 2019. Purple non sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1336-1365.
2. Hördt, A. *et al.* 2020. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in microbiology*, 11, 468.
3. Chumpol, S. *et al.* 2017. The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. *Aquaculture*, 473, 327-336.
4. Zhang, X. *et al.* 2014. Effect of photosynthetic bacteria on water quality and microbiota in grass carp culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2523-2531.
5. Alloul, A. *et al.* 2021. Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance, and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress. *Aquaculture*, 530, 735788.

表一、自國內水產養殖池分離之光合細菌

菌種學名	數量
<i>Allochrochromatium vinosum</i>	1
<i>Cereibacter sphaeroides</i> (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	6
<i>Marichrochromatium bheemicum</i>	4
<i>Marichrochromatium gracile</i>	1
<i>Phaeovulum vinaykumarii</i> (<i>Rhodobacter vinaykumarii</i>)	12
<i>Rhodobacter</i> sp.	1
<i>Rhodoplanes serenus</i> (<i>R. piscinae</i>)	8
<i>Rhodospseudomonas</i> sp.	1
<i>Rhodospseudomonas faecalis</i>	18
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	25
<i>Rhodospseudomonas pentothentatexigens</i>	1
<i>Rhodovulum algae</i>	2
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	35
總計	115

Biobanks 國際標準及認證現況

生物資源庫 Biobank 保存微生物、真核細胞、組織、血液、植物或種子等生物材料，這些生物資源及大量的相關數據是基礎研究轉化至臨床或產業應用的重要基礎，加速科技研究與生物醫學的發展。這些生物資源的收集、分析、保存和儲存，以及流程中的相關數據，是生物資源庫的關鍵活動，必須確保樣本和數據的適當品質、符合道德法律規範，以及保持管理活動的開放與效率。這些品質要求在現今面臨巨量資料分析與整合研究計畫中尤其重要，若生物資源庫彼此間標準不同，生物資源及數據的品質將造成診斷或研究的重要瓶頸。

全球生物資源中心為了提高組織效能及優化使用者滿意體驗，導入國際品質標準融合至營運管理系統，計畫性管理巨量生物資源、資料、流程運作與持續改善，這些國際品質標準包括 ISO 9001 品質系統、ISO 17025 驗證系統或 ISO 15189 醫學領域驗證系統等，並持續參與國際生物技術領域標準化推動工作。目前國際標準化組織技術委員會 (ISO Technical Committees) 已陸續發布 ISO 20387:2018、ISO 22758:2020 及 ISO 21710:2020 等生物資源庫相關標準，全球認證組織預期未來更多生物資源庫獲得品質認證，將可促進全球大規模研究合作之可行性。

生物資源庫—科學與生物醫學的平台

生物材料的收集保存最早可追溯到 17 世紀，與科學研究發展密切相關，更是許多學門研究中不可或缺組成。各類標準文件中常常可看相似用詞，例如 biological storage, biological repository, biological collection，隨著現代各項研究需要大量樣品的分析、儲存與管理，生物資源庫的品質更顯重要。生物資源庫通常是指為了特定研究目的而收集儲存的大量樣品之集合，經濟合作與發展組織 (the Organization for Economic

Co-operation and Development, 簡稱 OECD)、國際生物與環境庫 (the International Community for Biological and Environmental Repositories, 簡稱 ISBER)、歐盟委員會 (the European Commission, 簡稱 EC) 等具影響力的國際組織均有為其賦予合適的定義以鏈結對應角色功能 (圖一)。生物資源庫鮮明的共通特徵就是為特定目的收集儲存，但實質上彼此之間往往具有高度差異性，例如樣本類型不同、來源物種不同、計畫目的不同、特定標的、單一或複雜型，甚至營運本體也有公共非營利性組織與私人營利公司機構的不同 (圖二)，其中涉及人類樣品相關的保存庫自然是最受關注。以人類微生物組生物資源庫為例，這些生活在人類身體的微生物群落的研究解析加速了精準醫療的進程，微生物組菌相組成與密度的變化與多種疾病之發生密切相關，例如反覆性梭狀難治桿菌感染症、代謝性疾病、各類癌症等。然而在樣本收集過程中，易因實驗方法不同及設備差異產生菌相與數量的差異消長，為了解決此問題，建立人類微生物組技術國際標準規範是當務之急。而在全球新冠疫情方興未艾時，病原體生物資源庫更顯現其重要性。依據世界衛生組織估計，未來新興傳染病中可能有 75% 來自人類與動物共通的病原體，收集分析並保存這些高危險性的樣品，將是開發診斷方法、藥物或疫苗的重要關鍵。負責這些來自病患、動物或環境採集的高傳染性樣本的病原體生物資源庫需要再加入生物安全與生物保全的強化管理，包括 WHO 公告的實驗室生物安全指引，或是 ISO 35001 實驗室生物風險系統管理標準，以及應達成國家傳染病管理相關法規之管制與合規要求。

整合各類生物資源庫之共通性要求，可類歸成人員能力、品質及資料管理、法令規範之符合及高效透明等管理架構，及生物資源及相關數據的技術要求。無論是內部使用或外部

合作，都必須確保樣本得到妥善處理、一致、可追溯且適合預期用途，故而生物樣本庫是建立在科學管理、高科學技術含量與永續責任等面向上的新角色，包括多邊利益相關者的利益討論、加速科學知識轉化為技術應用，甚至改變了樣品科學性與相關技術的相互倚賴關係。此外，樣本收集存儲的異質性、獲取樣本的倫理法律問題、隱私權、知情同意數據管理等仍是深具挑戰。雖然有幾個標準以某種方式涵蓋生物樣本庫的各個方面，例如 ISO 15189 醫學實驗室之質量和能力要求、ISO/IEC 17025 測試和校準實驗室能力的一般要求和 ISO 17034 參考物質生產機構能力的一般要求，直到 2018 年發布 ISO 20387-生物資源庫的一般能力要求後，許多關鍵問題才獲得解決。

ISO 20387:2018 生物資源庫的一般能力要求

為提供生物醫學領域研究者的需求，本所生物資源保存及研究中心 (簡稱 BCRC) 已於 2000 年導入品質管理系統並獲得 ISO 9001 認證，近 20 年內已成為全球國際生物資源中心的一致標準。為提升生物產業標準化水平，生命科學研究面臨生物資源及相關數據大量高質管理的發展趨勢，國際標準化組織於 2013 年 2 月設立了 TC 276 生物技術委員會，其工作範圍涵蓋生物術語和定義、生物資源庫、生物材料、生物分析方法、生物技術程序及數據整合處理等方面的應用課題，以 29 個參與成員 (Participating member) 及 15 個觀察成員 (Observing member) 之技術專家群，分為五個工作小組 (WG) 執行相關標準化工作，以建立國際通用的生物技術標準為共同目標，預計涵蓋所需要的管理與技術要求。ISO 20387:2018 是首次專為生物資源庫管理所發布的 ISO 技術標準，而 ISO TR 22758:2020 則為生物資源庫如何實施 ISO 20387 品質管理和技術要求提供補充說明。

ISO 20387 技術標準規定了生物資源庫的能力、公正性和一致性操作的一般要求，包括品質控制要求

- An infrastructure for collecting human biological samples and related data, such as medical, family, social, and genetic . (Public Population Project in Genomics)
- A collection of biological materials, related data and related information stored in an organized system for the needs of an entire population or part of it. (OECD)
- An organization that receives, stores, processes and/or distributes biological samples in an appropriate manner. (ISBER)
- An organized collection consisting of biological samples and related data that are of particular importance for fundamental science and the needs of personalized medicine. (The European Commission)
- **Legal entity or part of a legal entity that performs biobanking (ISO 20387:2018)**

圖一、生物資源庫定義說明

以確保妥善收存生物材料和品質數據，以及管理系統與運營技術要求。整體而言，生物資源庫核心流程包括生物材料及相關數據從收集、分析、保存、儲存到分讓的所有關鍵活動，其餘圍繞著核心流程的品質管理活動，則分屬支援流程與管理流程，例如品質控制、不合格管制、運送管理及對外文件發行管理等。因此依據每個生物資源庫預設的目標及適用性，也可因應特殊法規的管理需求，增減調整程序內容與管理要件（圖三）。這份技術標準涵蓋生物資源庫全生命週期內的程序管理，包括樣品製備、長期保存以及長期可追溯性的要求，並為永續營運提供風險策略與指導，適用於所有正在執行研究和開發工作中的生物保存庫組織（包括人、動物、真菌、植物和微生物等材料），也可作為確認生物資源庫的品質能力之佐證、同行評鑑標準、第三方認證及監管標準。ISO20387 標準中涉及大量數據之管理與分享，可參考 TC 276 生物技術委員會發布之 ISO 21710:2020 微生物資源中心數據管理與發佈規範。標準中規定數據管理和內部數據質量控制的要求，以提高 MRC 以文件形式記錄的數據和信息的整體準確性和可靠性，唯一標識和統一數據形式可提高微生物資源中心間的數據交換和品質管理，提供高效的數據共享和大數據分析基礎，有助於促進利益共享。

認驗證市場現況

生物資源庫共同遵循標準發布後，歐美認驗證市場呈現蓬勃

發展。國際實驗室認證聯盟 (International Laboratory Accreditation Cooperation ; ILAC) 配合 ISO20387 新標準發展，於 2018 年 10 月新加坡第 22 屆 ILAC 大會中決議 ISO 20387 為 biobanks 認證之獨立適用標準，美國 A2LA 及 ANAB、英國 UKAS、澳洲 NATA、及歐盟 BBMRI-ERIC 等國際認驗證組織均推出 ISO20387 驗證服務。2017 年成立於波蘭的弗羅茨瓦夫醫科大學生物資源庫 (Wroclaw Medical University Biobank, 簡稱 WMU Biobank) 是歐洲首位獲得 BBMRI-ERIC 驗證通過的人類生物資源庫，將 ISO9001 和 ISO20387 的 QMS 要求整合至工作流程中，並通過審查員之紀錄查核。WMU Biobank 的研究與轉譯醫學及臨床流行病學相關，通過 ISO20387 證明 WMU 生物資源庫將合規保存與管理捐贈者樣品，符合捐贈者支持生物醫學研究的期望，是勝任生物醫學合作研究的關鍵夥伴。

美國康乃爾獸醫生物資源庫 (Cornell Veterinary Biobank, 簡稱 CVB) 係收集康奈爾大學臨床獸醫師和相關合作單位的動物樣品，提供高品質的生物材料與相關臨床數據，服務全球之非營利性生物資源庫。從動物醫學研究中瞭解約有 3 千多種動物疾病與遺傳相關，其中近 1/2 是人類疾病的潛在模型。康奈爾獸醫生物資源庫的目標是促進這些疾病的研究從而改善動物和人類健康。CVB 的專家團隊也參與 TC 276 技術委員會第 2 工作小組，協助 ISO 標準制定。在 ISO 20387:2018 發布後展開認驗證規劃直至獲證合計約 8 個月。這些

生物資源庫 Biobanks 之多樣性特徵

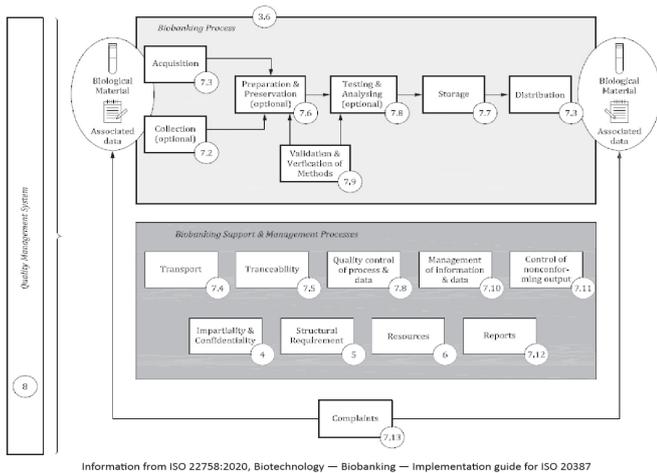
計畫目的	樣本類型	來源	特定標的	營運本體
<ul style="list-style-type: none"> • 人類生物醫學研究和醫療保健 • 獸醫研究 • 農業技術 • 生物技術 	<ul style="list-style-type: none"> • 原核細胞 (微生物) 或真核細胞 • 由細胞衍生的生物物質 (例如 DNA) • 血液或其他體液 • 器官組織 • 標本或種子 	<ul style="list-style-type: none"> • 人類 • 動物 • 植物 • 微生物 	<ul style="list-style-type: none"> • 人類微生物組 • 特定疾病及傳染病原體 • 新興傳染病及其病原體 	<ul style="list-style-type: none"> • 公共非營利性組織 • 私人營利公司機構

1. 任何 biobank 都需要對於生物材料進行儲存管理。
2. 生物材料的來源可能有人、植物、動物或微生物。也有一些 biobank 來自不同生物物種的集合。然而人類生物材料相關的 biobank 最為熱門。

圖二、生物資源庫之多樣性特徵

工作包括：先建立校內跨領域的聯合作小組，遵循 ISO 標準制定品質相關手冊，分析從生物資源收集到保存分讓範圍內所有過程涉及的程序和所需文件，包括標準操作程序 (SOP)、流程圖整理、表單、手冊與外部參考文件。評鑑審查分為品質系統和技術審查兩部份，品質系統審查旨在評估 ISO 20387 標準中每項條款的合規證明，而技術審查的部份著重於評估可追溯性、技術能力、設備的適當使用以及對認證範圍所列過程的準確描述。獲得 ISO 20387 認證的生物資源庫證明其品質與运营管理已被認可，隨著認驗證活動推展，標準化流程在生物樣本庫中的應用效益將更顯重要。

2020 年亞太認證合作組織 (Asia Pacific Accreditation Cooperation Incorporated, 簡稱 APAC) 也將生物資源庫 Biobanking (ISO 20387:2018) 列為國際相互承認協議 (Mutual Recognition Arrangement, 簡稱 MRA) 發展項目之一，規劃於 2021 年發展生物資料庫 Biobanking (ISO 20387:2018) 認證項目之相關指引文件。2021 年 ILAC 發布「ISO 20387: Accreditation for Biobanking Facilities」推廣文宣積極推動此項符合性標準的發展 (https://ilac.org/latest_ilac_news/accreditation-for-biobanking-facilities-brochure/)。生物資源庫導入 ISO 20387:2018 之預期效益將包括 (1) 提高合格樣本和數據 (BMaD) 的利用率；(2) 確保品質；(3) 生物資源庫之間政策程序具有一致性；(4) 支援生物材料與數據之交



Information from ISO 22758:2020, Biotechnology — Biobanking — Implementation guide for ISO 20387

BCRC Quality Management



圖三、ISO 20387 之生物資源及相關數據之生命週期管理全貌

圖四、生物資源保存及研究中心 (BCRC) 之品質管理系統

換；(5) 促進公私部門間的合作參與；(6) 提升利益相關者信心和保證；(7) 不同規模生物樣本庫均適用；(8) 促進研發提升生物材料與相關數據的價值；(9) 降低預期成本和研究浪費。相關國際認證組織的動態訊息，可持續關注全國認證基金會之認證報導 (<https://www.taftw.org.tw>)。

結語

生物資源庫實施質量管理系統有助於提高科學與生物醫學的研究品質，標準化程序且遵守生物資源庫標準，生物材料從收集到最終分讓研究之全生命週期均可提供高質量控制和保證、可靠數據分析及減少發生研究無再現性之問題。再配合認證機制推動，使用者或監管機構就可以分辨優劣合規。食品所生物資源保存及研究中心已建立我國最重要的生物資源庫 (BCRC)，以產業應用為導向提供全面性的生物資源相關科學服務，包括生物材料寄存與分讓、生物材料鑑定與檢測，專業人員訓

練與生物資源探勘之合作與應用研究，合計超過 160 項的多元化服務。本中心於 2000 年導入品質管理系統並通過 ISO9001 認證，2007 年依循 ISO17025 標準通過 TAF 測試實驗室驗證，2012 年依循 ISO17034 標準通過參考物質生產機構驗證。2021 年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，提供 OECD TG442E 與 TG460 分別建立體外皮膚敏感性與眼部嚴重刺激性試驗服務，提升收存生物資源之品質管理與強化服務品質與國際 ISO20387 之認證趨勢一致相符 (圖四)。高品質的生物資源與相關數據可應用於新穎性生物研究、開發和驗證工作，加快精準醫療產業從基礎研究到產品化的時程。由於現今基礎和臨床研究的需求與複雜性明顯增加，以本所生資中心推動 ISO 的認證經驗觀察，預期將對各類生物資源庫的品質活動產生積極影響，通過 ISO 20387:2018 驗證的生物資源庫必將更具有優勢競爭力。

參考文獻

- Blasio, PD. *et al.* 2021. New Challenges for Biobanks: Accreditation to the New ISO 20387:2018 Standard Specific for Biobanks. *BioTech* <https://doi.org/10.3390/biotech10030013>
- Müller, H. *et al.* 2020. Biobanks for life sciences and personalized medicine: importance of standardization, biosafety, biosecurity, and data management. *Current Opinion in Biotechnology*, 65:45-51.
- Malsagova, K. *et al.* 2020. Biobanks-A Platform for Scientific and Biomedical Research. *Diagnostics*, 10, 485; [doi:10.3390/diagnostics10070485](https://doi.org/10.3390/diagnostics10070485)
- ISO 20387:2018, Biotechnology -Biobanking-General requirements for biobanking
- ISO 21710:2020, Biotechnology -Specification on data management and publication in microbial resource centers
- 石兆平。2021。認證報導 TAF Newsletter 第 35、39 及 41 期。

生物資源保存及研究簡訊 第129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

