



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35卷第2期

中華民國 111 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

#### 研發成果

1

- ◎ 益生菌微膠囊包埋配方技術之開發
- ◎ 微生物的風味物質開發
- ◎ 酵母於飲品的多元開發
- ◎ 菌種優化選育策略

### 益生菌微膠囊包埋配方技術之開發

生資中心 / 副研究員 / 副研究員  
謝榮弘 / 吳安琪

#### 一、前言

近年來消費者健康意識抬頭，使得應用於促進健康的營養保健品越來越流行，其中因腸道微生物群對於人體的健康具有高度相關性，所以益生菌產品也逐漸受到消費者的關注，根據 Markets and Markets 市調公司在 2022 年指出，益生菌全球市場於 2021 年達 611 億美元，且正以年均複合成長率 (CAGR) 8.3 % 增長，預計於 2026 年時可達 911 億美元。益生菌依據效用可定義為含有足量可以改變宿主胃腸道菌叢而產生有益健康效果的活性微生物製品，其在大腸中利用小腸無法消化吸收的物質為食物，發酵產生有益腸道之物質並抑制壞菌生長。目前益生菌大多以粉末、錠劑或膠囊形式流通，而當攝食足夠量之益生菌時，將會給人體帶來許多健康益處，如整腸健胃、活化免疫系統、改善肝功能、降低血液中膽固醇、改善乳糖不耐症、抑制腫瘤細胞生長等功能，目前益生菌在作為保健食品使用時，為求促進健康效果須考慮到是否可抵抗胃酸和膽汁、菌落定殖性、菌株屬性、活菌數穩定性及食用劑量等多項標準，因此目前益生菌研究主要針對篩選耐酸鹼菌株、環境壓力提升耐受性、添加營養成分提高營養價值，以及微膠囊包埋技術

提升菌株穩定性，而生資中心在益生菌微膠囊包埋技術已有多年研究，不僅將配方設計平台化以外，同時建立在特定加工製程中搭配不同包埋配方，可使原始製程產品之水平大幅提升，因此適當的包埋配方與加工製程對於產品穩定性及應用皆有明顯之幫助。

#### 二、微膠囊包埋技術於益生菌之應用

##### (1) 微膠囊技術

微膠囊技術是利用天然或是合成的高分子材料把固體或液體包覆起來，使其形成半通透性或密封囊膜微小粒子的技術，而微膠囊化可用來改變核心物質的顏色、形狀、重量、溶解度等，使活性成分與外界環境隔離開，達到提升穩定性及延長保存期限之效果，目前微膠囊技術已廣泛應用於食品、香料、藥品、化妝品、清潔劑等產品，特別是應用在食品工業上優點相當多，不僅可改變物質的物理狀態，使其可將液態變為固態達到改變密度及產品分散狀態之效果，而挑選適當殼材還可提高抗氧化性、減少 pH 影響及降低揮發性，並達到隔絕水氣使易吸濕芯材大幅降低吸水性，同時控制機能性成分釋放之時機，而若是產品風味較為濃厚也可利用微膠

囊技術屏蔽味道及氣味，另外，微膠囊技術還可使產品型態多樣化，更可依照消費者需求進行不同產品型態之調整，而典型的微膠囊結構根據其所使用殼材及對應製程的不同，最終呈現的微膠囊型態也大不相同，而製備微膠囊的方法依據原理可以分成物理法和化學法兩種製程，物理製程主要是將目標物質與殼材的乳化液分散於流動氣體中進行目標產品型態成形製程，其製程包含噴霧乾燥、流體化床法、擠壓法等，而化學製程則是在於進行微膠囊化時，芯材以乳化或是分散於含殼材質之液體中而固化成型，其中包含了複合凝聚法、界面聚合法等方法，因為各種方法的成型機制不同，最終得到的微膠囊成品的特性亦大不相同，因此在應用上必需針對芯材、殼材挑選最為適當的組合，而目前微膠囊技術於益生菌包埋方面的應用其實相當廣泛，如乳化製程技術、擠壓製程技術、噴霧乾燥製程、冷凍乾燥製程等等，根據所使用的微膠囊技術不同，所得的乳酸菌最終產品的大小、形狀也有所差異，因此以下將針對益生菌粉末產品常用微膠囊技術進行介紹，其主要挑選噴霧乾燥、冷凍乾燥及流動床造粒。

## (2) 微膠囊製備方法

### A. 噴霧乾燥

噴霧乾燥法因其具有操作簡單、

易於實現自動化生產、成本低廉、產品分散性和復水性佳等優點，是目前最廣泛被應用於食品工業的方法，其原理主要為將目標物分散在殼材料溶液中，經過均質乳化後形成 O/W 乳液，由於目標物粒徑小，而殼材溶液具有一定的黏度和表面張力，所以霧化後液滴表面為殼材溶液，芯材則集中在霧化之液滴內部，接續將乳化溶液以穩定速度經霧化器送至艙體內部時，高溫環境會迅速蒸發掉液滴中的水分，此時殼材將形成一種既可以保護芯材又可以讓水分子從中蒸發的網狀結構，而殼材種類、乳化程度及噴霧乾燥條件等三大因素將會直接影響噴霧乾燥法製備微膠囊化產品的品質，因此採用噴霧乾燥法製備微膠囊的理想殼材應具有良好的乳化穩定性、成膜性、低黏度及無異味等特點，另外，當利用噴霧乾燥進行微膠囊化時，需特別注意熱空氣對益生菌菌體可能帶來的傷害，雖然菌體微膠囊乳液暴露於熱空氣的時間只有短短幾秒，但殼材於固化時水分迅速蒸發的溫度大於 100℃，對於具有生物活性的益生菌而言是極大的損傷，而本中心所建立的微膠囊包埋配方技術在噴霧乾燥應用已有多多年之研究，並且成功建立包埋配方搭配之噴霧乾燥參數，以 *Lactiplantibacillus plantarum* 為例，將食品所建立之微膠囊包埋配

方技術比較市售產品常用之包埋配方，經由表一可以看出利用市售產品配方所生產之菌粉，其粉末回收率為 72.3 %、存活率為 19.32 %、活菌數為 3.48E+9，而利用本中心所建立之微膠囊配方技術，其粉末回收率為 79.6 %、存活率為 65.63 %、活菌數為 1.18E+10，由此可知本中心建立之微膠囊包埋配方在菌體保護方面較佳。

### B. 冷凍乾燥

冷凍乾燥是一種廣泛使用且操作方便的低溫乾燥方法，在食品工業上，一般高價值、高品質的乾燥產品通常會以冷凍乾燥的型式進行加工，因此常被應用於微生物、醫療用藥及抗體等方面，其主要原理為利用冰昇華作用去除樣品中的水分達到乾燥之效果，因此經凍乾製程之產品除了結構較不易塌陷所以溶解度佳以外，同時也具有較完整之機能性成分，然而即便冷凍乾燥有許多優點但該製程還是有缺點，例如因冰晶破壞細胞膜、表面蛋白和細胞壁，從而降低菌株乾燥後的存活率，因此選擇合適的殼材與芯材進行充分乳化後再進行冷凍乾燥，可有效降低菌體損傷並提升菌株存活率，而本中心對於冷凍乾燥製程已累積許多經驗，其中以 *Lactobacillus paracasei* 為例，如表二所示，將 *Lactobacillus paracasei* 直接進行冷凍乾燥時，其菌株存活率僅剩 4.7 %，菌數為 9.33E+10 cfu/g，而當本中心所之微膠囊包埋配方技術導入後，利用生資中心微膠囊包埋配方充分與 *Lactobacillus paracasei* 混合均勻，再將乳液進行冷凍乾燥，經檢測後存活率提升至 46.5 %，菌數提升至 1.17E+11，可明顯看出微膠囊包埋配方保護菌體之效果。

### C. 流動床造粒

流動床造粒屬噴霧包埋的一種，將益生菌菌體顆粒置於流動床

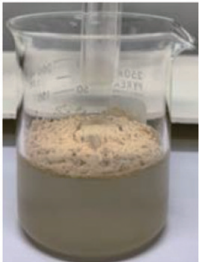
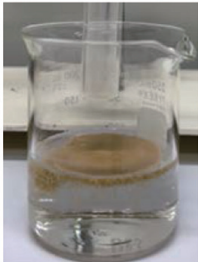
表一、不同微膠囊包埋配方於噴霧乾燥之比較

| 添加賦形劑配方     | 噴乾粉末 (cfu/g)                                                                                    | 粉末回收率 (%) | 存活率 (%) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------|
| 市售產品配方      | 3.48E+9<br>  | 72.3      | 19.32   |
| 生資中心微膠囊包埋配方 | 1.18E+10<br> | 79.6      | 65.63   |

表二、不同微膠囊包埋配方於冷凍乾燥之比較

| 添加賦形劑配方 |         | 未添加                                                                                           | 生資中心微膠囊包埋配方                                                                                    |
|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 凍乾粉末    | (cfu/g) | 9.33E+10<br> | 1.17E+11<br> |
|         | 存活率 (%) | 4.7                                                                                           | 46.5                                                                                           |

表三、不同微膠囊包埋配方於流動床造粒之比較

|         | 市售產品配方                                                                                            | 生資中心微膠囊包埋配方                                                                                       |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 潤濕性 (s) | > 60<br>        | 3<br>           |
|         | 11.58±0.49<br> | 90.73±1.13<br> |

生菌粉為例，在相同造粒條件下以市售產品之配方與本所開發之配方進行粉體特性比較，在以往經驗利用流動床造粒即可提升潤濕性及分散性，但經由表三顯示，微膠囊包埋配方設計在流動床造粒上有明顯之特性差異，以流動床造粒市售產品常用之配方進行造粒後，其粉粒潤濕性還是遠大於 60 秒，且分散性僅有約 11.58 %，而利用食品所建立之微膠囊包埋配方，最佳組別為編號 4，其潤濕性僅 3 秒且分散性達 90.73 %，因此可以明顯看出本中心所開發之微膠囊包埋配方效果優異。

三、結語

目前市面上益生菌產品種類繁多，其中許多產品並未達到較佳保護菌體能力且粉體特性較差，主要原因是一般市售產品大多未針對不同粉體搭配最適配方，而這類型產品因菌數在初始或是長期保存下未達標準，以及因粉體特性較差導致食用時體驗不佳等各種不良狀況，皆會使消費者在食用時無法感受到正面回饋而降低消費者回購意願，而本中心對於微膠囊包埋配方技術已有許多開發經驗，此技術不僅可應用於保護菌體產品不受加工製程影響，且在粉體特性方面也有明顯正面幫助，藉此可大幅提升產品品質及公司之競爭力。

中，並以吸引空氣之方式將艙體內形成穩定氣流，使菌體顆粒隨著氣流做循環運動，同時將殼材溶液透過霧化器均勻噴灑在懸浮上升的益生菌菌體顆粒，經過反覆多次循環使殼材溶液沉積於菌體顆粒表面，最終益生菌菌體顆粒表面即可包埋上厚度適中且均勻的殼材，藉以達到保護益生菌菌體的目的，同時此包埋方式還可改變菌體顆粒流動性、潤濕性及分散性等，使增加產品品質並可滿足消費者食用上之體驗，而本中心針對流動床造粒之參數條件搭配不同配方設計進行研究，以益

微生物的風味物質開發

生資中心 / 研究員  
黃學聰

一、前言

食物常以色香味俱全來形容美食，因此風味是影響食品品質的關鍵因子之一，由於天然來源的風味物質往往取得相對成本較高，通常

由植物產生，然而，這些來源含量少且主要以結合形式存在的風味化合物，使得它們的分離困難且昂貴。隨著科技的進步，愈來愈多的風味物質可以被合成生產，合成香料也成為主要的食品風味添加劑來源。



然而，隨著對石化來源對環境危害的疑慮，消費市場逐漸趨向以天然來源的風味物質為主要訴求，標榜著 Clean Label 的食品趨勢逐漸在歐美形成主流。微生物長久以來即被用於食品的加工處理，除了改善食品的質地（豆腐乳、麵包等）、產生特定目標成分（酒），更可以用來改善或產生食品風味（醋、可可、咖啡、葡萄酒等），因此我們可以利用微生物可產生或利用基質轉化生產風味物質，可做為石化來源的食品風味添加劑替代，更有機會成為主要的天然風味添加劑來源。

## 二、天然微生物生成香氣物質途徑

對於化學合成或從植物中分離芳香化合物的傳統途徑仍然是目前主要風味物質來源，但由於對通過生物技術方式生產的天然香料化合物的需求不斷增加，生物技術的產生變得越來越有吸引力。生物香料的市場價格實際上是 100-500 美元 / 公斤。超過 100 種風味化合物（單一成分和複雜的風味混合物）已經逐漸商業化。利用生物香料合成的其中一種途徑是基於微生物生物合成或生物轉化。這些基於微生物（細菌、真菌、酵母菌）及其酶的生物過程是綠色生物製程。該技術的原理包括在生物系統中使用可再生資源、清潔生產、減少污染和減少能源密集型過程，例如用作試劑或催化劑的全細胞或酶來進行轉化生產。近年來，已有幾種微生物來通過生物技術工藝開發風味劑。我們初步可以生物技術方法可分為兩類：微生物學方法與酶轉化方法用於合成天然分子，其中香料的微生物方法可以分為從頭合成和生物轉化。*De novo synthesis* 是透過微生物利用發酵（從頭）構成了一種可行的風味物質合成替代途徑。從頭合成通過以微生物的代謝系統產生幾種芳香化合物的混合物，包括：Benzaldehyde 與 Citronellol 等，可微生物可以在發酵過程中合成香料作

為次生代謝物，主要以基礎碳水化合物、脂肪和蛋白質代謝利用，並進一步將分解產物為風味成分 (Akacha and Gargouri, 2015)。

另外，微生物轉化生產風味物質則是利用基質所提供風味前驅物轉化生成風味成分，如圖 1 右側。通常使用的方法可以有液態的深層發酵與固態發酵。深層發酵中以丁香酚等來源的前驅物，利用 *Pseudomonas sp.* 與 *Aspergillus niger* 等菌株可轉化生成 Vanillin 香草醛類風味物質；同樣的情況可於 lignin 與 L-phenylalanine 為前驅物，以 *Pleurotus cornucopia*、*Ischnoderma benzoinum* 與 *Kluyveromyces marxianus* 等菌株，轉化生成 Anisaldehyde 與 2-phenylethanol。在固態發酵方面，最著名均為傳統的發酵工藝食品所衍生而來，例如：以樹薯渣或咖啡皮 (Melo Pereira, G.V. *et al.*, 2019) 進行特定為微生物發酵 (*Ceratocystis fimbriata* 與 *Kluyveromyces marxianus* 等菌株)，可生產 Ethyl acetate 風味物質；以大豆亦可以 *Bacillus natto* 進行發酵生產 Pyrazine 等風味物質；以預糊化米澱粉亦可以 *Neurospora sp.* 發酵生產 Ethyl caproate 等。

## 三、微生物生產香氣物質種類

微生物目前約有超過 8,000 種以上的揮發性成分被鑑定出來，主要包含：Carvone、Carveol、 $\alpha$ -Terpineol、Rose oxide、Isoamyl acetate、 $\beta$ -Ionone、2-Phenylethanol 及 Nootkatone 等。然還有許多含量很低但在非常低的濃度即有風味影響性的揮發性物質，無法被鑑定出來。微生物於發酵過程中產生這些揮發性物質的途徑主要有合成及基質轉化兩種，因此若要強化特定的揮發性物質生成，則可由其生成途徑加以調控，或由基因改造方式，增強微生物生成的能力 (Paulino *et al.*, 2021; Li, Z. *et al.* 2018; Sales *et al.*, 2018)。

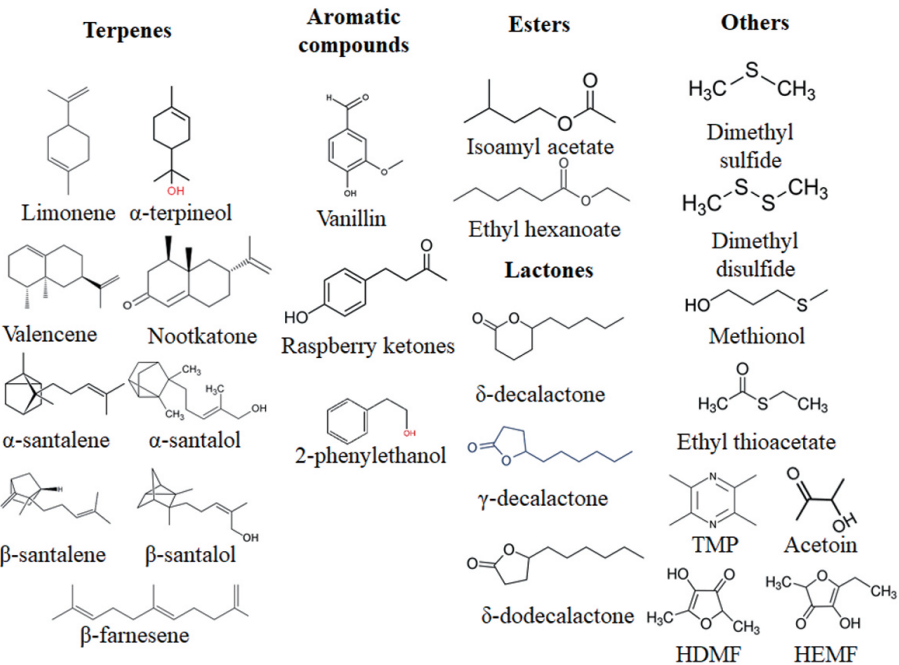
目前研究類別以微生物生產

具有潛力的香氣物質為主：1. 單萜類，如 Limonene。2. 倍半萜類，如 Valencene、Nootkatone 與  $\alpha$ -santalene 等。3. 酯類，最典型的是 Isoamyl acetate。4. 內酯類，如  $\delta$ -decalactone。5. 芳香烴類，如 Vanillin 與 2-phenylethanol 等。6. 其他，如 Acetoin、2,3,5,6- Tetramethylpyrazine (TMP) 與 4-hydroxy-2-ethyl -5-methyl -3(2h)- furanone (HEMF) 等，如下圖一。微生物本身可產生多元的風味，酵母菌產生眾多種香味物質中 2-苯乙醇是一種具有玫瑰香氣的芳香醇，天然存在於多種植物葉、花及提取的精油中，在麵包、果酒及乾酪等發酵食品中含量豐富，其衍生酯類如乙酸苯乙酯也是重要芳香產品。在酵母細胞中，2-苯乙醇可以通過合成芳香族胺基酸的莽草酸途徑合成，或通過艾氏途徑 (Ehrlich pathway) 合成，L-苯丙氨酸分解的另一條途徑是通過轉氨基作用生成苯丙酮酸，再脫羧形成苯乙醛，經氧化脫氫酶作用生成苯乙醇。

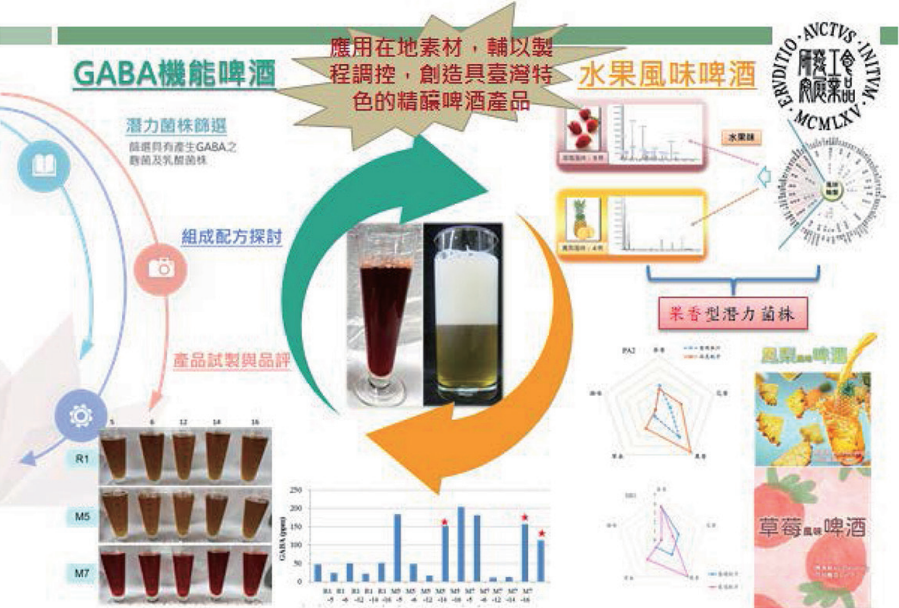
多種酵母具有合成 2-苯乙醇的能力，如球擬酵母、馬克斯克魯維酵母、發酵畢赤酵母、乳酸克魯維酵母、釀酒酵母及異常漢遜酵母等。長孢洛德酵母菌發酵產生羰基化合物主體物質是由  $\alpha$ -酮酸經脫碳酸而生成的醛類，其中己醛具有葡萄風味香氣，乙醛為乳香味來源。己醛是植物體內脂氧合酶代謝途徑中形成的次生產物，天然存在於蘋果、草莓、柑橘等果蔬的香氣成分之中，也是酵母具有生產潛力的特色風味物質。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 因具有食用安全、2-苯乙醇產率高等優勢而成為國內外持續研究開發的重點對象 (Paulino *et al.*, 2021)。

## 四、食品所之微生物生產風味物質技術

食品所生物資源中心整合多年累積之酵母菌種分離保存、鑑定技術、培養條件建立，結合基因及代謝



圖一、微生物可能生產的香氣物質（整理自 Paulino *et al.*, 2021）



圖二、特殊風味及機能性酵母菌之啤酒開發技術示意圖

工程、發酵製程、配方及劑型等技術能量，系統開發我國特色酵母菌資源，建立我國特色酵母菌株及其特性酵母菌配庫，並發展酵母菌配製備之相關技術標。

特色酵母菌可利用特定前趨物代謝成一系列風味物質，包括醇類、酯類、羰基類等，這些轉化形成的物質與許多與水果熟成產生芳香化合

物相似。利用具有產生特殊風味之酵母菌與台灣特色農產品開發特色果香風味之精釀啤酒。生資中心長年來於不同來源分離並鑑定與保存大量酵母菌資源，經由一系列的培養條件、發酵製程、配方等技術能量開發，建構完整酵母菌商用菌配庫技術平台，應用於精釀啤酒及烘焙產業需求，目前以台灣在地特色水果 - 鳳梨

及草莓，結合產生各自特色香氣之酵母菌，將麥汁與水果汁混合進行共同釀造呈現出鳳梨風味及草莓風味啤酒。此外，利用台灣多元花草農產素材，與特色酵母菌進行共同釀造產生紅心芭樂風味精釀啤酒。此結果除了應用台灣特色農產品外，亦改善目前市面上果香風味啤酒之果汁用量，降低生產成本或水果香料添加。此外，一般於果香風味啤酒開發過程中，經果汁麥汁共同釀造後造成香氣風味不佳，後續需進行果汁勾對，造成果香風味啤酒之添加量及熱量提高，進一步為了呈現果香氣，亦會額外添加水果香料；然而本技術以較低比例水果與麥汁混合，經篩選出之特定酵母菌，以一定發酵程序共同釀造後，不但可維持一定果香風味，發酵後不需額外後製果汁勾對及水果香料添加（如圖二）。

此外，藉由發酵調控、下游精製分離與活性評估技術，挑選精釀啤酒及烘焙產業等的需求，開發特色酵母菌株（如耐糖、發酵力佳、風味特殊、低酒精、低嘌呤等），配合不同酵母設計菌配配方，以補足國內烘焙、精釀啤酒等產業鏈的技術缺口，並開發多層次的食品產業生產技術。本技術平台技術移轉與輔導超過多家以上國內不同食品產業，包含酒類、烘焙、可可、茶渣資源利用等，導入不同的風味酵母菌株，以協助改善與建立完整發酵及產品生產製程，開發具有特色與標的性之風味衍生產品，提升本土原料使用率，使風味酵母於烘焙、酒類、可可等多元產業技術提昇，解決進口酵母選擇少，並發展特色且多元的差異化產品，加速商品化時程。

## 五、參考文獻

1. Akacha, N. B. and Gargouri, M. 2015. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocesses*



- Processing*, 94: 675-706.
- Paulino, B. N. *et al.* 2021. Recent advances in the microbial and enzymatic production of aroma compounds. *Current Opinion in Food Science*, 37: 98-106.
  - Wyk, N. *et al.*, 2018. The Smell of Synthetic Biology: Engineering strategies for aroma compound production in Yeast. *Fermentation*, 54(4): 1-18.
  - Sales, A. *et al.* 2018. Biogenesis of aroma compounds. *Current Opinion in Food Science*, 19, 77-84.
  - Melo Pereira, G.V. *et al.* 2019. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. *Food Chemistry*, 272: 441-452.
  - Li, Z. *et al.* 2018. Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis. *Food Microbiology*, 76, 405-415.

## 酵母於飲品的多元開發

生資中心 / 技師 / 研究員  
郭曉萍 / 黃學聰

### 一、前言

世界上最古老的生物技術 - 啤酒、葡萄酒及麵包生產，而所用酵母菌亦是最古老的馴化微生物，隨著時間推進，因重複使用及多重突變造成不同食品具有各自酵母菌群，亦造就了啤酒與葡萄酒的專業釀酒師及品牌區分。約百年前開始純酵母發酵技術，以純菌株進行發酵飲料達到全球生產一致化，隨著人類經濟發展至今已從商品經濟階段邁向服務經濟及體驗經濟，大大改變消費者的消費能力，消費者對於啤酒、葡萄酒或奶酪的獨特偏好，說明了食品發酵風味的力量，且許多消費者已從追求限量食品轉向選擇個人喜好的特殊風味食品，並願為此付出更多代價。酵母菌對發酵飲料風味影響之唯一微生物組成，不同酵母菌具有不同代謝產物產生不同風味，且混合培養的複雜性及酵母菌多樣性對風味表現影響顯著，目前已有些釀酒師或啤酒釀造者著重於此，亦提供食品工業創新之新

契機，而在傳統發酵飲料中，以葡萄酒、啤酒及米酒為主，而酵母對風味影響巨大。

### 二、酵母與葡萄酒

葡萄、酵母及發酵技術彼此交互作用造就了葡萄酒的獨特性，每種葡萄酒酵母菌具有特定的代謝活性，決定了最終葡萄酒中風味化合物的濃度 (Romano *et al.*, 2003)。一般葡萄酒自然發酵初期由酒精耐受能力較弱但具有較高產香能力的非釀酒酵母完成，但隨著酒精濃度的不斷升高逐漸被酒精耐受能力較強的釀酒酵母代替 (翟明昌等人, 2011)。發酵初期主要的酵母菌群為 *Hanseniaspora* 及 *Candida* 屬，當酒精濃度至 5 ~ 6% 時則抑制其生長，隨後由耐酒精、高糖濃度的酵母進行發酵，主要是 *S. cerevisiae* 及相關酵母，包括 *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* 及 *Saccharomyces* 等屬酵母，這些酵

母在葡萄酒發酵及熟成過程中，彼此競爭營養及代謝，其產生次級代謝產物對最終葡萄酒質量具有顯著影響，經多年研究指出在酒精飲料中，風味物質已鑑定出超過 1000 種揮發性化合物，其中酵母菌產生的超過 400 種 (Romano *et al.*, 2003)，且不同物種酵母產生不同化合物及濃度，這些代謝產物主要為有機酸、高級醇、酯及乙醛等化合物。

不同酵母菌發酵葡萄酒其最終代謝產物種類差異不大，但各種化合物的相對量不同，造就了葡萄酒的品質，Romano 等人研究 5 種常見葡萄酒酵母菌之代謝產物，結果顯示早期發酵菌株 *H. uvarum* 及 *C. stellate* 表現出代謝產物非常相似，其 acetoin 及乙酸乙酯產量高且高級醇產量低；而 *S. cerevisiae* 具有高產異戊醇及 2,3- 丁二醇且低產 acetoin；*Z. fermentati* 在分析的 7 種化合物只有 2,3- 丁二醇產量較高；*S. ludwigii* 一種眾所周知的葡萄酒腐敗酵母，在 acetoin、乙酸乙酯、異戊醇和異丁醇產量特高。

Romano 團隊長期研究酵母菌在葡萄酒中扮演的角色，分析天然發酵葡萄酒早期酵母 *H. uvarum* 及主發酵酵母 *S. cerevisiae*，發現 *S. cerevisiae* 菌株具有很強的多型性且產生不同含量的二級代謝產物來賦予葡萄酒風味及香味，分析 52 株 *S. cerevisiae* 結果顯示，菌株主要的變異性為異丁醇和異戊醇；而 *Hanseniaspora* 活性顯著影響葡萄酒的化學成分，主要是因為產生及分泌酵素 (酯酶、 $\beta$ - 葡萄糖苷酶、蛋白酶等) 與葡萄香味化合物前趨物作用產生芳香活性化合物，菌株之間最大的變異為乙酸，為 0.6 ~ 3.4 g/L，而此菌株長期被認為是腐敗酵母；但有些研究指出 *H. uvarum* 與 *S. cerevisiae* 之間為正向交互作用，適用於混合發酵的 starter (Romano *et al.*, 2003)。

在葡萄酒釀造過程中，酵母菌不同物種之間交互作用於各個階段發生，其對葡萄酒風味影響可分 3

部分：1. 發酵前葡萄品質：在葡萄園中常見受損葡萄，而受損葡萄增加了微生物生長的營養物質，並促進更多的酵母菌種群，酵母菌濃度從 $10^4$ - $10^6$  CFU/g增加至 $>10^6$  CFU/g，增加的酵母菌群為 *Hanseniaspora* (*Kloeckera*)，*Candida*、*Metschnikowia*、*Saccharomyces* 和 *Zygosaccharomyces* 的種類；而主要發酵酵母 *S. cerevisiae* 含量少或不存在，可能與酵母間相互作用有關，例如葡萄上常見的 *M. pulcherrima* 對其他酵母具有抑制效果，亦包含 *S. cerevisiae*，因此受損葡萄的相對比例對葡萄酒風味具有一定的影響程度。2. 酒精發酵：此為酵母菌對葡萄酒風味的主要影響，酵母利用葡萄汁糖類生產乙醇及其他溶劑，有助於從葡萄固體中提取風味成分。再者酵母菌產生酵素將葡萄香味化合物前趨物轉化為風味活性化合物。另外酵母菌產生數百種風味活性的次級代謝產物（如酸、醇、酯、多元醇、醛、酮、揮發性硫化化合物），這些反應隨酵母種類及菌株不同而有所差異。酒精濃度決定了發酵過程中 non-*Saccharomyces* 種類生長，然而低溫及耐酒精的 non-*Saccharomyces* 種類逐漸被發現，且與 *S. cerevisiae* 共培養可產生不同葡萄酒風味特徵，例如 *C. stellate* 與 *S. cerevisiae* 共培養可增加甘油含量來改變葡萄酒風味。在酒精發酵過程中酵母菌種類的消長受到許多因子影響進而影響葡萄酒風味，包括短鏈至中鏈脂肪酸、營養源可用性、限制、氧氣利用率、氨基酸和維生素利用、蛋白質水解能力、多醣利用性及殺傷毒性感受性等，例如酵母菌自溶產生細胞多醣與單寧和花青素結合影響葡萄酒的澀味和顏色。3. 酵母腐敗：酵母可以在生產過程中的幾個階段破壞葡萄酒，從酒精發酵過程中不適當的酵母物種或菌株生長，則可能產生不可接受的風味；或者包裝前因未完全填充於罐或桶而暴露於空氣，酵母迅速

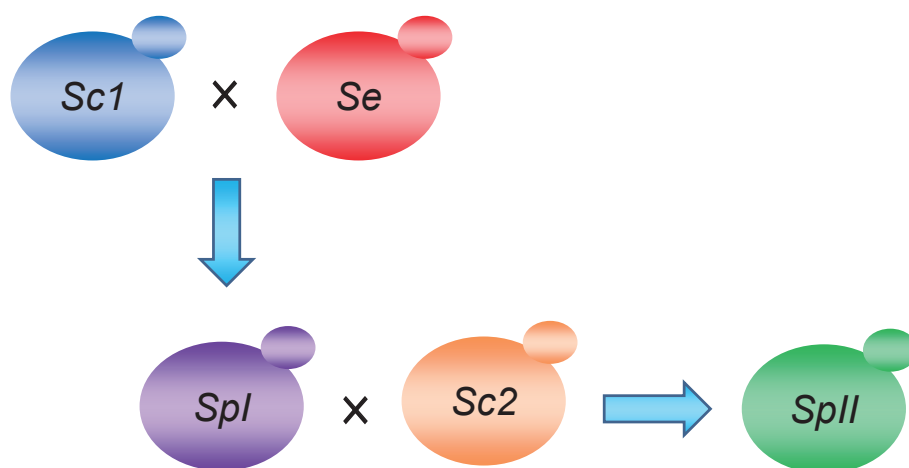
形成弱發酵或氧化產生氧化乙醇、甘油和酸，使葡萄酒的乙醛、酯和乙酸含量高得令人無法接受；甚至到裝瓶時因不當操作均會因酵母造成的葡萄汁腐敗，例如裝瓶後被 *Dekkera/Brettanomyces* 污染產生四氫吡啶和揮發性酚類物質而令人感受不愉快 (Fleet, 2003)。

### 三、酵母與啤酒

酵母的活性決定啤酒品質，不僅因酵母發酵產率高，其中間代謝產物及酵母代謝的副產物大多為芳香族化合物，影響了啤酒香味及風味。啤酒的風味特徵主要是因酵母細胞將麥芽糖轉化為乙醇及揮發性化合物，例如高級醇及酯，這些揮發性化合物為麥芽及啤酒花的芳香化合物不同，對啤酒香味及口味具有重要影響。乙醇及二氧化碳為發酵過程中主要副產，其他酵母衍生風味活性化合物包括羰基（醛/酮）、高級/雜醇、酯、鄰位二酮（二乙酰和戊二酮）、脂肪酸、有機酸及硫化化合物等 (Capece *et al.*, 2018)。

傳統啤酒以 *Saccharomyces* 屬的啤酒酵母為主，可產生高酒精及耐受多種環境逆境的能力，傳統上根據生長及發酵溫度區分為艾爾 (*ale*

或稱頂部發酵) 及拉格 (*lager* 或稱底部發酵) 等兩群酵母菌，艾爾酵母菌生長及發酵溫度為 14~25℃ 之間，而拉格酵母菌則為 4~12℃ 之間進行。利用完整基因組序列分析顯示艾爾啤酒酵母與其他工業相關用的 *S. cerevisiae* 不同類緣，且不同國家的艾爾啤酒酵母分在同一類群裡，包括德國、英國、比利時和美國。另外在葡萄酒、麵包及清酒酵母分枝中亦存在啤酒酵母，表示啤酒酵母較葡萄酒酵母菌株更多樣化，且發現自然界中許多艾爾酵母菌為雜交種，例如在比利時特拉普斯啤酒中有 25% 艾爾菌株為 *S. cerevisiae* 及 *S. kudriavzevii* 雜交種。拉格啤酒生產菌株為 *S. pastorianus*，其菌株雜交的情況較艾爾菌株複雜許多，研究指出拉格酵母很久以前即被分為二群：(I) Saaz 及 (II) Froberg，Saaz 為 *S. cerevisiae* (*ale*) 及 *S. eubayanus* 雜交種，而 Froberg 為 Saaz 菌株進一步與其他 *S. cerevisiae* 雜交而得 (圖一)，且用於發酵 stout 產品，一般來說 Saaz 菌株無法發酵麥芽三糖，其生長及發酵活性均較 Froberg 菌株慢。艾爾菌株較拉格菌株具有更高的多樣性，可能是因為艾爾菌株可於許多地點分離得到；而拉格菌株來自非常有限的地區 (Capece



圖一、拉格酵母 *Saccharomyces pastorianus* group I (*SpI*) 和 II (*SpII*) 起源。*SpI* 為 *S. cerevisiae* (*Sc1*) 與 *S. eubayanus* (*Se*) 雜交而得，*SpII* 為 *SpI* 與其他 *S. cerevisiae* (*Sc2*) 進一步雜交。(Capece *et al.*, 2018)



et al., 2018)。

研究指出非傳統酵母在酒精飲料生產中具有產生多樣風味特徵的能力，以滿足現代消費者的期望。Holt等人篩選出17種非傳統酵母菌，以連續式發酵進行啤酒發酵，第一階段先接種非傳統酵母進行風味酯類及酚類生產，後續接種傳統釀酒酵母進行酒精發酵，結果顯示接種 *Pichia kluyveri* 可增加乙酸異戊酯（水果、香蕉味）、接種 *Brettanomyces* 菌種可提高乙基酚類化合物（辛辣味）及接種 *Torulaspora delbrueckii* 可增強4-乙基愈創木酚（丁香類香氣），而 *Wickerhamomyces anomalus* 為丙酸乙酯、苯乙醇、2-苯乙酯及乙酸乙酯的良好生產菌株。

*Dekkera/Brettanomyces* 菌種是生產酸啤酒 (sour beer) 的非傳統酵母，尤其是比利時啤酒 (Lambic beer)，研究指出 *Dekkera/Brettanomyces* 產生酚類異味 (phenolic off-flavors, POF)，賦予飲料獨特感官特徵；亦發現商用 *Dekkera/Brettanomyces* 菌株產生大量的乙酯，進而提高了整體的水果或花香特徵。例如利用 *B. bruxellensis* 進行啤酒釀造，可產生多種酯類（乙酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯及辛酸乙酯），這些化合物若以中等水平存在有助於增加啤酒風味複雜度；若高含量則對產生似溶劑般的黃油和藥用香味的不良氣味。此群菌株對啤酒風味影響有另一說法，因此群菌株具有高  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性，發酵基質中的糖苷經酶水解釋放糖分子及糖苷配質，而糖苷配基可表達出芳香活性而改變啤酒芳香性，此說法比較不適當，因為啤酒中的關鍵芳香物質如單萜烯的芳樟醇（柑橘、花香和八角香精）及水楊酸甲酯（冬青、薄荷和香料香味）是從啤酒花而來 (Capece et al., 2018)。

*Saccharomycodes ludwigii* 為一非 *Saccharomyces* 商用啤酒釀造酵母，此菌種在分解麥汁中的麥芽糖及麥芽三糖能力很低，通常發酵葡

萄糖、果糖及蔗糖產生具豐富風味的低濃度酒精。另外 *P. kluyveri* 因發酵葡萄糖能力有限，但同時可改變啤酒花化合物成為正向風味化合物。*Z. rouxii* 完全或部分不發酵麥芽糖，研究偏向於酒精生產、風味及異味產生等，此種的某些菌株可產生大量的酯、二乙酰及2,3-戊二酮。這些菌株在生產低酒精 (0.5-1.2% v/v)/無酒精 (<0.5% v/v) 啤酒上具有相當潛力。*S. cerevisiae* var. *diastaticus* 具有葡萄糖澱粉酶，可催化糊精來降低啤酒中殘糖量，此種菌株亦會產生強烈的酚類異味。*B. bruxellensis* 可分泌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶來降解糊精，產生高度發酵 (highly attenuated) 飲料。*Dekkera/Brettanomyces* 酵母菌分泌  $\beta$ -葡萄糖苷酶降解啤酒中複雜分子量的殘糖形成單糖，使其易被同化而形成超級發酵啤酒 (super-attenuated beer)。

由此可知，在啤酒生產上酵母菌對其香氣及風味影響甚大，為賦予產品新風味可經由 (a) 單一酵母純菌培養；(b) 連續或共同接種不同酵母菌；(c) 使用轉基因生物；(d) 外添加其他微生物分泌的酶。其中以非傳統酵母選用具有最佳可行性；然非傳統酵母酒精生產特性較低，一般與傳統酵母 (*S. cerevisiae*) 進行共同發酵或連續發酵，另外對這些酵母代謝特徵了解較少，在啤酒生產上是否安全 (GRAS/QPS)，則需進一步進行檢測。

#### 四、食品所酵母多樣性篩選

在食品生物技術中發展酵母菌篩選方法，其“風味表現型 flavor phenotype”為一極其重要的特性 (Carrau et al., 2015)，酵母菌與發酵培養基進行動態交互作用，不同酵母產生風味炯異，當從天然環境中針對特定性狀如耐酒精度、低乙酸、低溫下良好發酵速率或影響發酵食品香味化合物的產生能力等，篩選得到特定天然酵母菌株，後續經由

培養基組成、接種量、發酵容器、溫度調控，使每批次發酵結果相似，建立出特定酵母之生產標準流程；然而天然來源發酵原料組成上具有些微差異，可能造成發酵飲品風味差異；因此後續篩選策略從酵母菌基因下手，針對特殊性狀，以基因調控方式進行菌株優化。生資中心整合多年累積之酵母菌種分離保存、鑑定技術、培養條件建立，結合基因及代謝工程、發酵製程、配方及劑型等技術能量，系統開發我國特色酵母菌資源，建立我國特色酵母菌株及其特性酵母菌配庫，並發展酵母菌配製備之相關技術。

#### 五、參考文獻

1. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. and Romano, P. 2018. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation* 4:38
2. Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. j. and Thevelein, J. M. 2018. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentation. *Food Microbiology* 72:55-66.
3. 翟明昌、朴永哲、王祥余、夏先鋒、沈海萍、趙爽、趙長新。2011。混菌發酵中不同分子量代謝產物對非釀酒酵母胞內蛋白及酒體有機酸的影響。微生物學通報 38:1443-1448。
4. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. *International journal of Food Microbiology* 86:169-180.
5. Feet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavor. *International journal of Food Microbiology* 86:11-22.
6. Carrau, F., Gaggero, C. and Aguilar, P. S. 2015. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotype. *Trends in Biotechnology* 33, No.3



## 菌種優化選育策略

生資中心 / 研究員  
林奐好

### 一、前言

微生物菌種優化在發酵產業中具有十分重要的地位，有好品質的菌種，才能有效的提高產量及產值。菌種選育是在微生物遺傳學、生物化學等理論基礎下，優化微生物提高產量，並開發出新品種之優良菌種，以促進產業發展。早期，菌種優化選育常採用自然突變選育和誘變育種等方法，帶有一定的未知性，然而，隨著微生物學、生化遺傳學的發展，科學家開發出原生質體融合、基因體重組、代謝調控和基因工程等較為定向的育種方法。無論是哪一種菌種優化選育的策略，都是先提高微生物的遺傳變異，再從眾多的遺傳變異菌株中挑選出優良菌種。本篇將介紹數種菌種優化選育技術及策略，包括自然突變育種、誘導突變育種、雜交育種、代謝控制、遺傳工程及基因編輯等策略，各種策略並非單獨進行，而是相互交叉使用，針對特定生產目的為導向，以加速菌種優化，提升微生物應用在食品、農業、工業、醫學等產業利用率。

### 二、自然突變選育

在自然突變中，DNA 突變是最重要的遺傳變異，也是自然突變選育中之基石。每一個基因發生突變的機率是十萬分之一，對生物而言，自發性的突變可能是無害的也可能是有害的，但從演化的角度來看，生物的基因突變有時卻能幫助生物體適應環境氣候的變遷，也因此突變成了物種進化的因素之一。早期在釀酒工業使用酵母菌，常有酒精發酵不穩定的現象，因此，透過持續篩選，選拔出單一純系品種的酵

母菌，提高酵母菌發酵產能，解決了酒精發酵不穩定的現象，是最早應用自然突變選育的例子之一。無泡清酒酵母菌和耐酒精酵母菌，也都是成功利用自然突變選育篩選之菌株。在特定的培養條件下，建立明確且簡單的篩選標幟，是自然突變選育成功篩選的關鍵。然而，利用自然突變進行微生物選育，由於突變機率極低，選育耗時長且效率低，因此發展出誘導突變選育技術，大大提升選育的效率。

### 三、誘導突變選育

在自然條件下，基因突變進化是非常緩慢的，而利用物理或化學等因素誘導 DNA 發生改變，加速微生物遺傳變異，可在短時間內獲得大量不同遺傳變異之突變株，再從中選拔株具有利用價值之菌株。不論是使用物理或化學誘變劑，劑量的控制是最重要的，當劑量太高，基因體中累積突變數目過多，細胞可能無法修復而造成死亡。

物理突變劑包含紫外線、電磁輻射(如 $\gamma$ 及X射線)、高能粒子輻射(如 $\alpha$ 及 $\beta$ 粒子)等，其中最簡便也最常使用的就是紫外線。紫外線波長介於280-315 nm之UVB具有較強的基因毒性，可造成DNA損傷，使DNA在複製過程中鹼基錯誤結合，可能導致鹼基脫氨現象，造成一種鹼基轉化成另一種鹼基，如胞嘧啶(cytosine, C)經脫氨作用後產生尿嘧啶(uracil, C)，而腺嘌呤(adenine, A)變成次黃嘌呤(hypoxanthine)。此外DNA受到紫外光照射後，鹼基可能發生脫嘌呤或脫嘧啶現象，導致DNA主鏈斷裂，當DNA雙股發生斷裂，對於細胞來說是很嚴重的傷害，若DNA無法修復

已造成細胞死亡。

化學誘變劑可誘導DNA發生突變，N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG)是最有效也是使用最廣泛的化學誘變劑之一，主要使鹼基GC轉換成AT，也可能發生鹼基切除或GC鹼基對的缺失。菌株長在時間使用誘變劑後，突變的效果會變差，可能還會引起菌種生長變慢或代謝減慢等現象，因此在誘導突變的選育過程中，可能是重複使用同一種誘變劑，或單獨輪流使用或同時使用兩種或多種誘變劑，一般認為複合誘變具有協同效應，能更容易篩選出優良菌株。

誘變育種已廣泛應用於微生物菌株改良，在提高酵素活性、抗生素產量，或在生產胺基酸、抗生素、化合物等菌種選育中使用。本所研發團隊開發高丁四醇(erythritol)生產株，就是經過NTG及紫外線之複合誘變選育，將葡萄糖轉換率從30%提高至55%。此外，本所研發團隊也利用複合誘變選育，開選出轉穀氨醯胺酵素(transglutaminase)高產量菌株。本所利用複合誘變選育之菌種改良技術，協助廠商開發出多樣性微生物產品，於食品生技產業之應用。

### 四、菌種雜交育種

菌種雜交育種或原生質體融合是將不同種類、不同基因型之微生物的優良性狀集中於同一個菌株中。將兩種不同的菌種進行雜交，產生之後代透過不斷的與母株反覆回交，以獲得良好性狀且安定性高的生產用菌種。在釀酒過程中，發酵後的酵母菌懸浮於發酵液中，對於酒精回收來說卻是一大煩惱，酵母菌透過菌種雜交，選拔出凝集性高的酵母菌，使釀酒過程中酵母菌易凝集而沉降，以加速固液分離，這種高凝集性之酵母菌，大幅解決酒精回收，去除發酵後菌體之問題。

原生質體融合技術可在種內或種間甚至屬間進行，較不受到親緣關

係的影響，是菌種改良的重要技術之一。此技術最早是應用於動物細胞，後來逐漸擴展應用於植物細胞及微生物細胞。原生質體融合技術利用酵素去除細胞壁後，在一定的物理或化學條件下，如添加融合劑聚乙二醇 (PEG) 或給予電場誘導，提高細胞之通透性，使兩株不同遺傳性狀之菌株發生融合，經過部分或全部 DNA 重組，進而獲得新的重組子，產生出新的遺傳性狀菌株。在 1980 年代中後期，食用菇菌常利用原生質體融合技術進行品種選育，選育株有突出優良性狀的食用菇菌，例如香菇、草菇、平菇、冬蟲夏草、桑黃等，多是透過原生質體融合技術建立出優良之新興品種。

基因體重組 (genome shuffling) 技術，最早是在 2002 年在鏈黴菌 *Streptomyces fradiae* 生產 tylosin 抗生素及增強乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. 之耐受性而發展出來的。這個技術是結合誘變育種及原生質體融合技術，開發出一種新型微生物育種的改良技術，在不了解基因組序列及相關遺傳背景下，利用基因組重組技術可快速增加細菌遺傳變異，不僅容易操作且效率高。在提高微生物代謝產物之產量、增強菌株耐受性等，已廣泛利用基因體重組技術進行菌種改良。基因體重組技術，先利用傳統誘變育種獲得許多的突變菌種，再透過數次的基因體融合，最終改良出多個正突變遺傳性狀之菌株，可顯著提高獲得高性能菌株的機會。基因體重組技術多用於革蘭氏陽性的細菌，僅少數用於革蘭氏陰性的細菌，主因是兩者細胞壁的構造不同，以革蘭氏陰性細菌進行原生質體融合的效率較低，也因此以基因體重組技術進行菌種優化多見於革蘭氏陽性菌之開發。

不論是自然突變選育、誘導突變選育、菌種雜交育種、原生質體融合或基因體重組，都是在不了解基因組序列及相關遺傳背景下進行微生物菌種優化，因此這些突變的發生位

置或頻率都是不確定的，皆需要有明確且簡單的篩選標幟，從而選拔出優良菌株。從政府管理的角度來看，以這些技術改良的菌株，不論是突變篩選後的菌株或是原始菌株，都具有相似的遺傳背景，且這些菌種改良技術已有長久使用歷史，因此，這些菌株不認為是基因改造菌株，不需要特別加以監管。

## 五、遺傳工程

遺傳工程或稱基因工程，緣起於 1970 年代，胰島素是第一個利用遺傳工程 DNA 重組技術，以細菌生產並商業化之產品。遺傳工程使用生物技術直接操縱生物的基因體，用於改變細胞遺傳物質，透過分子選殖技術分離和複製特定的遺傳物質 DNA，或設計合成的核酸序列，再將此外源 DNA 的新遺傳物質插入宿主基因體中，並可在同一物種或跨物種進行基因轉移，以改良出新菌株。遺傳工程技術建立在分子生物學、分子遺傳學、基因分子生物學等知識進展上，基因可透過遺傳工程技術將基因刪除、剔除或過度表現來研究基因的功能。目前胺基酸、維生素、抗生素、有機酸、多糖、酵素等物質，多是利用遺傳工程 DNA 重組微生物生產。

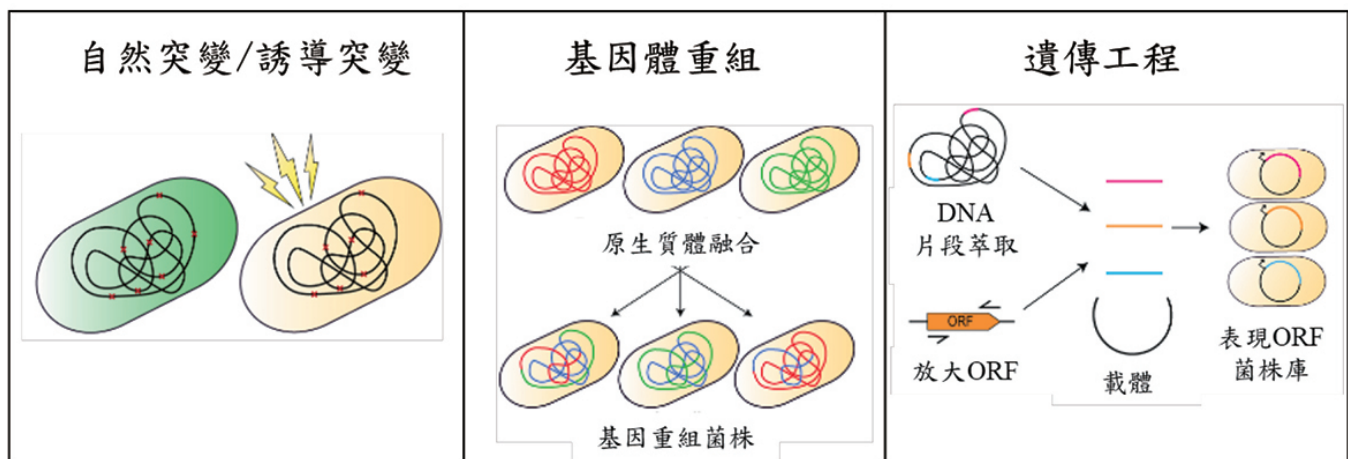
大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 已是廣泛利用做為工業生產的菌株，主因是大腸桿菌在遺傳、生理及生化學研究已有良好的基礎，且可在便宜的培養基中高密度的生長，加上大腸桿菌是環境安全的菌株，因此可用來進行大規模工業發酵。芽胞桿菌 *Bacillus* sp. 也是一個很好的宿主，可用以生產外來蛋白，也具備一套蛋白質分泌系統，可大幅降低蛋白質純化的生產成本。生產特定產物之表現系統，需考量許多因素，包含啟動子與終止子之特性、核糖體結合區與核糖體之能力、表現質體的拷貝數、表現系統是以質體形式或嵌入至染色體中、生產外來蛋白質在細胞中之位置、分泌至胞外或在細胞內、mRNA 的轉譯效率、影響蛋白質在宿主中

穩定表現的內在及外在因素。

像大腸桿菌或芽胞桿菌等都屬於原核細胞，原核細胞缺乏轉譯後修飾系統，無法生產需糖化作用或蛋白水解作用的外來蛋白質，許多真核蛋白需要經過修飾作用才能摺疊出具有功能的結構。因此，要生產特定具有功能結構的蛋白質，酵母菌作為細胞生產工廠就是一個很好的選擇。酵母菌在基因操作上有著與大腸桿菌相同的優點，不僅生長快速，且基因操作容易，又具有真核細胞的蛋白質表達能力，例如具有糖化作用及分泌能力。啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在食品發酵上已有數千年的使用歷史，1996 年整個基因體序列也已解碼，以啤酒酵母作為生產蛋白的表達系統更打破了原核生物的限制。B 型肝炎的商業化重組疫苗，就是以啤酒酵母作為宿主表現出 B 型肝炎表面抗原 HBsAg，這不僅是酵母菌作為表現系統的一大突破，更是疫苗發展的巨大突破。酵母菌除了啤酒酵母外，也開發出畢赤酵母 (*Pichia pastoris*)、多形漢遜酵母 (*Hansenula polymorpha*)、博伊丁假絲酵母 (*Candida boidinii*) 等基因工程菌株，利用真核生物作為蛋白表現系統有了更多種的選擇。

近年來，許多基因改造微生物生產之食品原料陸續通過衛生福利部非傳統性食品原料之食用安全許可。2020 年 12 月公告之以基因改造大腸桿菌 BL21 (DE3) #1540 菌株發酵生產之食品原料 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose)，經衛生福利部核准為非傳統供食用原料。2'-岩藻糖基乳糖是利用基因改造大腸桿菌 BL21 (DE3) #1540 菌株發酵生產，並經過過濾、層析、濃縮及電透析等一系列的純化步驟製得，且最終成品不含基改微生物與其轉殖基因片段。2'-岩藻糖基乳糖可使用於嬰兒配方食品、較大嬰兒配方輔助食品及專供 7 歲以下兒童之乳粉或類似產品，使用限量以即食或依產品標籤指示調配後的供食狀態作為計算基準，最高





圖一、自然突變與誘導突變、基因體重組、遺傳工程技術

資料來源：Fernandez-Cabezon *et al.*, 2019.

為 1.2 公克 / 公升。

2021 年 3 月公告之以基因改造大腸桿菌 Ast12 菌株發酵生產的蝦紅素 (astaxanthin)，經衛生福利部核准為非傳統供食用原料。此可供食品原料使用之蝦紅素，是利用基因改造大腸桿菌 Ast12 菌株發酵生產，並經過滅菌、萃取及結晶等一系列的純化步驟製得，且最終成品不含基改微生物與其轉殖基因片段，每日食用限量以蝦紅素計為 2 毫克，另有使用限制及標示相關規定。

2021 年 6 月公告之以基因改造大腸桿菌 K-12 DH1 MDO MAP1001d 菌株發酵生產之食品原料 2'-岩藻糖基乳糖，2'-岩藻糖基乳糖是利用基因改造大腸桿菌 K-12 DH1 MDO MAP1001d 菌株發酵生產，並經過一系列的純化步驟製得，最終成品不含基改微生物與其轉殖基因片段。2'-岩藻糖基乳糖可使用於嬰兒配方食品、較大嬰兒配方輔助食品及專供 7 歲以下兒童之乳粉或類似產品，使用限量以即食或依產品標籤指示調配後的供食狀態作為計算基準，最高為 1.2 公克 / 公升。

2022 年 2 月公告以基因改造畢赤酵母菌 Ey72 菌株發酵生產之食品原料小孢子靈芝類球蛋白濃縮液，經衛生福利部核准為非傳統供食用原料。小孢子靈芝類球蛋白濃縮液是利用基因改造畢赤酵母菌 Ey72 菌株發酵

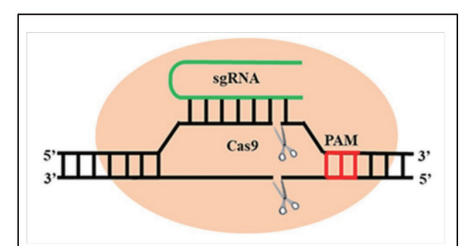
生產，再經濾膜移除菌體、濃縮、調配混合製得，最終成品不含基改微生物與其轉殖基因片段。小孢子靈芝類球蛋白濃縮液可供食品原料使用，小孢子靈芝類球蛋白每日食用限量為 6 毫克。

## 六、基因編輯

隨著生物技術的進步，科學家不斷嘗試修改細胞基因序列以提升應用價值。近年來，科學家在化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 發現病毒攻擊的自我防禦系統 - 常間群聚短迴文重複序列核酸酶 CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9) 系統，此系統最早發現在 1987 年，在大腸桿菌的基因體中發現一段長度為 29 bp 重複 5 次的序列，且每段重複序列被長度為 32 bp 的序列隔開。2000 年發現這種序列在不同類的微生物中廣泛存在。2002 年此段重複序列才以 CRISPR 縮寫表示，並推測 CRISPR 序列可能與微生物對噬菌體免疫有關聯繫。2008 年深入對 CRISPR-Cas 系統研究才了解 CRISPR 經轉錄加工後得到 CRISPR RNA (crRNA)，crRNA 對 DNA 具有靶向作用，也推測 CRISPR 系統具有作為基因編輯的工具潛力。2011 年法國科學家伊曼紐夏彭提耶 (Emmanuelle Charpentier) 發現

RNase III 參與 CRISPR 序列修飾成 crRNA 的過程。2012 年夏彭提耶與美國珍妮佛道納 (Jennifer A. Doudna) 共同合作完成 single chimeric RNA 的研究，透過 CRISPR RNA 分子作為嚮導，再加上內切核酸酶 Cas9 之活性，可精準定位至生物基因體中對應之序列。2013 年美國張鋒團隊將 CRISPR-Cas9 系統首次在哺乳動物細胞中進行多基因編輯的應用，也開啟了基因編輯之熱潮。

CRISPR-Cas 基因編輯系統由兩種要素組成，第一種是 CRISPR RNA，另一種為核酸內切酶 Cas9。經過 CRISPR-Cas9 作用，細胞內之標的基因發生雙股 DNA 斷裂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，以獲得經編輯標的基因之細胞。基因編輯技術 CRISPR-Cas9 系統已經普遍使用於基因體改良中，在微生物、植物或



圖二、基因編輯技術

資料來源：Liu *et al.*, 2020.

動物都能進行編輯，不僅操作簡化且經費相對便宜，更重要的是能精準且有效的編輯目標基因，現已成為受歡迎且用途最廣的基因編輯技術。

微生物以基因工程技術進行基因修飾，多需提供篩選標記並經多重篩選才可成功獲得選植株，因此多運用於少數幾種模式菌株及工業菌株中。隨著基因編輯的發展，研究人員可開發嶄新的微生物基因修飾工具，藉由基因編輯技術引入 DNA 斷裂以修改或操縱微生物基因體，或藉由基因編輯技術建構人工轉錄因子進行基因表現之調控。CRISPR 基因編輯系統另一個優勢在於可同時編輯多個目標基因，具有全面改變微生物基因體的潛力。自 2013 年以來，有越來越多的工業微生物成功的利用 CRISPR-Cas9 技術剔除基因及插入基因，用以生產酵素、胺基酸、酒精及各種一次或二次代謝產物。

雙孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 俗稱蘑菇、洋菇，是常見的食用菇。蘑菇中含有多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO)，造成蘑菇很容易因碰撞及儲存產生褐變。美國賓州州立大學的植物病理學家楊亦農教授，在 2016 年以 CRISPR-Cas9 技術應用在雙孢蘑菇上，將 6 個 *ppo* 基因的其中 1 個基因刪除部分序列，成功將蘑菇的 PPO 多酚氧化酶活性降低約 30%，減緩蘑菇的褐變速度，以達到抗褐化的目的。由於此基因編輯蘑菇不含抗植物病蟲害的外源基因，因此不受美國農業部 (USDA) 的監管，這也是 USDA 核准的第一個基因編輯

物種。但由於考量目前基因編輯蘑菇的市場商機尚未成熟，且現行栽培有機蘑菇的利潤較高，因此基因編輯蘑菇仍未商業種植及上市販售。

基因編輯 CRISPR-Cas9 技術在藥用菇類上之研究已應用於靈芝、蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*) 等菇類，以提高藥用菇類特定代謝物之產量。靈芝中的乳清酸磷酸核糖轉移酶 URA3 會抑制靈芝酸 (ganoderic acid) 的合成，透過持續改良靈芝 CRISPR-Cas9 技術剔除 *ura3* 基因，來增加靈芝酸的產量，產生更多具有抗腫瘤活性和抗轉移活性的靈芝酸。蛹蟲草又名北蟲草，是一種寄生於昆蟲的真菌，通常寄生於鱗翅目幼蟲體內，在宿主化成蛹時長出子實體，也是一種大型藥用真菌，主要的活性成分為蟲草素 (cordycepin)，具有抗腫瘤、調節免疫細胞、抗菌、抗氧化、促進雄性荷爾蒙合成等活性。透過優化 CRISPR-Cas9 技術，提高基因編輯在蛹蟲草中的效率，未來將持續研究調控蟲草素生物合成相關基因進行基因改造，以提高蟲草素的含量。

本所研發團隊於麩胺酸棒狀桿菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 建構基因編輯平台，利用 CRISPR-Cpf1 技術針對標的基因精準剔除或標的基因部分 DNA 刪除，已成功篩選出基因編輯轉植株，以提高胺基酸產量。此外，本所研發團隊於啤酒酵母菌建構基因編輯平台 CRISPR-Cpf1，針對標的基因 *ade2* 透過基因編輯技術精準剔除，以視覺辨識紅色菌落加以區分，證明 CRISPR-Cpf1 系統在

啤酒酵母菌進行基因編輯之可行性，提升了啤酒酵母菌 CRISPR-Cpf1 基因編輯工具之應用性。此外，本所研發團隊透過基因編輯技術 CRISPR-Cpf1，剔除啤酒酵母菌中兩個與抗凍相關的基因，包含海藻糖酶基因 *nth1* 及熱休克蛋白 *hsp12* 基因，已成功篩選出高抗凍能力之啤酒酵母菌，且提高冷凍麵團於長時間低溫保存後之發酵能力。

## 七、結語

隨著分子生物學、代謝體學、基因編輯技術等現代生物學研究之蓬勃發展，未來將發展出更多元的菌種優化技術，無論是用傳統突變、菌種雜交或基因編輯技術進行菌株改良，選拔出高產量、品質優良、生產新品種或具有特殊培養耐受性之菌株，以提高微生物在食品、農業、工業、環保、醫療等產業之應用價值。

## 八、參考文獻

1. Fernandez-Cabezón, L., Cros, A., & Nikel, P. I. (2019). Evolutionary approaches for engineering industrially relevant phenotypes in bacterial cell factories. *Biotech. J.* 14(9), [e1800439]. <https://doi.org/10.1002/biot.201800439>
2. Liu, Z., Dong, H., Cui, Y. et al. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb. Cell Fact.* 19, 172. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>

## 生物資源保存及研究簡訊 第130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

