



財團法人 食品工業發展研究所

第 94 期

生物資源保存及研究簡訊 第26卷第2期

中華民國 102 年 6 月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎ 本所邀請美國菌種中心國際事務顧問鍾順昌博士蒞臨指導

研發成果 2

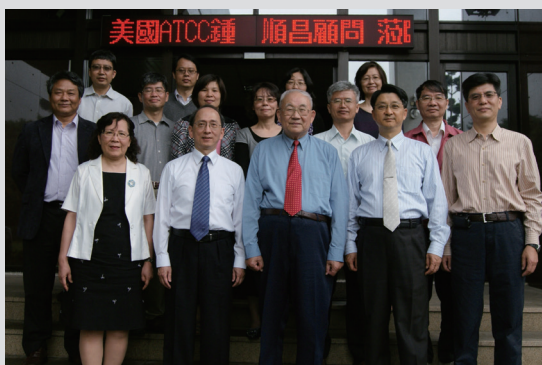
- ◎ 101 年度新資源之收集簡介
- ◎ 因應 PIC/S GMP 國際標準之實施 --BCRC 建立環境監測微生物鑑別服務模式
- ◎ 具潛力食藥用真菌之鑑定與分類現況 --BCRC 之研發能量與經驗分享

科技新知 8

- ◎ 多重抗藥性病原菌之檢測與分子鑑定

重要新聞摘要 12

- ◎ 食品衛生管理法修正

本所邀請美國菌種中心國際事務顧問
鍾順昌博士蒞臨指導

◀ 上圖：本所邀請鍾順昌博士（前排中）於 102 年 4 月 22 至 26 日蒞臨本所指導，與本所陳樹功所長（前排左二）、廖啟成副所長（前排右二）及相關同仁合影。

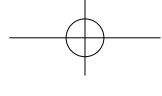


◀ 下圖：由本所陳樹功所長（左）敦聘鍾順昌博士（右）為本所創新前瞻計畫指導委員會委員，並頒發聘書。

（圖：生資中心陳思齊副研究員提供）

美國 ATCC 菌種中心 (American Type Culture Collection) 國際事務顧問鍾順昌博士應邀於 4 月 22-26 日期間來訪，為生資中心之營運策略提供指導與建議。鍾博士是一位資深的生物資源經理人，任職於 ATCC 超過 36 年，對於 ATCC 的發展功不可沒，也是生資中心成立與成長的重要推手，目前亦為本所創新前瞻計畫指導委員會委員。

鍾博士來訪期間以全球未來展望與 ATCC 價值創造與價值分配的願景與策略為題進行演講。千禧年全球發展展望研究計畫之未來展望報告是由來自四十多個國家之組織及專家共同參與所產出，對全球現況、問題、解決方案、及未來展望進行研究並做出報告。鍾博士在演講就該報告進行重點說明，並建議生資中心參考該報告進行營運策略規劃。他指出 ATCC 是一個關注全球脈動並據以調整營運策略的典範，由單純以收集保存菌株為任務的傳統菌種中心，成功轉型成為具有多重功能的生物資源中心，並朝向虛擬全球生物資源中心努力。他以例子說明 ATCC 的願景與策略。ATCC 期許可以預見科學及技術成長所需的服務，並為



2 研發成果

生物資源保存及研究簡訊
102年第26卷第2期

滿足客戶的需求預先做好準備。例如，ATCC 投入資源以提升微生物樣品等產品的品質，以滿足客戶對法規或標準符合之須求；而為了落實這項願景，ATCC 策略性地投入資源並積極參與標準之研究與建立。藉由本次來訪的難得機會，除了演講外，另外安排鍾博士參加座談與參訪。其中重要座談之一，是有關生資中心持續進行營運規劃中的幾個具體規畫案構想，座談中由生資中心同仁進行簡報，並與鍾博士進行討論及交換意見。其他座談議題包括，國際上生物資源中心的發展趨勢、生物材料產品與技術服務之價值提升、生物材料安全等議題；以及生資中心正在推動試行，名為 BCRC Partner TM 以開放式創新模式推動之生物材料商業應用方案。參訪安排則包括，赴嘉義參觀食品所負責營運的經濟部嘉義產業創新研發中心，參訪重點為生資中心在當地於 101 年底完成建構的生物資源遠端備援保存系統。這個系統完成後，生資中心的生物資源增加在嘉義的備份保存管理，並運用雲端虛擬化技術，建構系統資源整合之異地備援，減少天災意外發生時生物資源的損失。整體而言，鍾博士對生資中心提出的營運規劃案表示樂觀其成，並相當看好其中幾項包含備援保存系統在內的具體規劃案。他肯定生資中心過往的表現，認為相較世界上大部分菌種中心，生資中心處於相對領先之地位。他勉勵生資中心應積極管理智慧資產及運用商業模式，為所收集的生物資源創造並獲取價值，並提供滿足產官學研各界客戶需求的服務，作為我國生技產業發展的後盾。

(文：生資中心陳玉芬管理師)

新資源

101 年度新資源之收集簡介

生資中心

黃麗娜研究員 / 劉桂郁研究員 / 謝松源研究員 / 陳漢根技師

本中心為活絡生物資源之應用開發，已建立完善的多樣化生物資源之保存與提供服務體系，達到優質化生物資源銀行品質管理。在去年 (101 年) 度共新增 230 株細菌資源，其中包括由學研界公開寄存台灣本土分離新種或功能菌株 110 株，自德國 DSM、法國 CIP、日本 NBRC、比利時 LMG、瑞典 CCUG、英國 NCTC 等國外菌種中心引進取得之標準菌株 (type strain) 及參考用菌株共計 120 株。

引進之多樣化標準菌株，如分離自深海之 *Idiomarina abyssalis* BCRC 80290，*Oceanibaculum indicum* BCRC 80385 及 *Bacillus oceanisediminis* BCRC 80336。分離自海綿之 *Aquimarina spongiae* BCRC 80286；分離自溫泉之高溫菌 *Tepidimonas thermarum* BCRC 80387；分離自河川底泥之 *Sphingobium amiense* BCRC 80341，*S. vulgare* BCRC 80417；分離自活性污泥之 *Flavobacterium defluvii* BCRC 80288，*F. haorarii* BCRC 80420，*Pseudorhodoferrax caeni* BCRC 80293；分離自日本海藻處理廠汙泥之

Novosphingobium tardaugens BCRC 80304；分離自牛瘤胃之 *Actinobacillus succinogenes* BCRC 80310 等。新收可公開的絲狀真菌包括炭角菌科 (Xylariaceae)、地衣真菌、及弓黴屬 (*Absidia*) 等，以模式菌株、台灣本土分離株、產學研及業界需求之菌株為主。新收菇菌，包括 *Antrodia cinnamomea* (牛樟芝) 新增分離菌株一株 BCRC37941 及 *Agaricus campestris* (蘑菇)、*Auricularia polytricha* (毛木耳)、*Hericius erinaceus* (猴頭菇)、*Pleurotus eryngii* (杏鮑菇)、靈芝屬 *Ganoderma fornicatum* (拱狀靈芝)、*Ganoderma gibbosum* (有柄樹舌)、*Ganoderma tropicum* (熱帶靈芝) 等食藥用菇菌及其他擔子菌菌種超過一百株。

新收酵母菌包括 *Lachancea kluyveri*、*Saccharomycodes sinensis*、*Rhodotorula fujisanensis*、*Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*)、*Lipomyces starkeyi* 等。

相關新收菌株資訊可參考生資中心網頁新資源 (http://www.bcrc.firdi.org.tw/g_newthing_main.do) 或生物資源線上目錄 (http://catalog.bcrc.firdi.org.tw/BSAS_cart)

具潛力食藥用真菌之鑑定與分類現況 -- BCRC 之研發能量與經驗分享

生資中心 / 研究員
謝松源

生資中心 BCRC 在菌種鑑定的服務業務，自 1983 年開始接受委託，至今已完成 3,000 株以上之菌種鑑定服務。鑑定技術包括顯微觀察、菌落型態、生理生化試驗、脂肪酸分析與核酸序列分析等試驗結果綜合研判，範圍涵蓋一般微生物、病原微生物、環境微生物、產業用微生物及新屬新種微生物之鑑別。服務對象涵蓋藥廠、新興生技公司、食品廠、各大學及研究單位為國內產官學研界倚重之菌種專業鑑定單位。菌種鑑定服務種類包括細菌、真菌、酵母菌、放線菌等各類微生物，可提供菌名鑑定、DNA 分析檢測、快速鑑別等不同服務方式。

本中心 101 年度真菌鑑定案件達 130 件以上，且真菌的鑑定需求逐年增加。真菌鑑定為一項專門技術，目前並無檢測套組、亦無法利用化學方法或儀器判讀，快速獲得結果。以往鑑定時須依靠顯微鏡觀察各項顯微形態特徵，比對文獻及相關菌株或標本以區別細微差異，方可鑑定出菌名，但有時標本或菌株取得困難，真菌分類文獻資料又相當分散龐雜，因此真菌鑑定是一項相當困難耗時的工作。近年來以基因序列作為鑑定依據的方法已有大幅進展，資料庫累積的資料數量亦相當多，對於真菌之鑑定工作有很大的幫助。目前在真菌物種的鑑別所使用的基因序列主要為 ribosome DNA ITS1-5.8-ITS2

片段，但此片段序列對於某些屬的種間分辨能力不足，因此亦發展出利用其他基因片段包括蛋白質編碼基因 (protein coding region) 如 elongation factor 1-alpha (EF-1 α)、calmodulin (Cmd)、 β -tubulin (tub) 等作為種之鑑別的輔助序列，並參考 NCBI GenBank 及其他真菌 DNA 資料庫 (表一)，提高這些屬種以 DNA 鑑定之可信度。

GenBank 雖然資料豐富，但序列資料由各界多方所提供上傳，其中許多序列提供者未必是分類專家，使用的菌種是否正確是一個問題。另外，某些少見種或無法培養的種尚無資料或資料不足，有時比對結果數據多樣或互相矛盾，此時需要加以判斷，

不可據以認定其菌名。本文針對幾種重要的食藥用真菌目前的分類、鑑定及所遭遇到的問題進行介紹。

1. 冬蟲夏草及相關菌種

Cordyceps 蟲草屬已知有超過 400 個種，多數寄生於昆蟲、蜘蛛等節肢動物。最近 Sung 等人利用分析 162 種蟲草相關菌種的五至七段基因序列 (nrSSU、nrLSU、TEF1、rpb1、rpb2、tub、atp6) 結果，認為蟲草屬並非單一親緣性，而將原先蟲草屬重新分類為三個科 (Clavicipitaceae s.s.、Cordycipitaceae、Ophiocordycipitaceae)。其中北蟲草 (*Cordyceps militaris*) 及許多具有明亮色澤。肉質子座的種類主要屬於 Cordycipitaceae，仍被保留於 *Cordyceps* 屬；Clavicipitaceae s.s 則包括與禾草類共生的麥角菌類及一些 *Metarhizium* 類的昆蟲寄生菌。而冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*) 及其他具有暗色，質地緊密的子座的種類則被置於另一個新成立

表一：一些重要真菌屬被推薦之鑑別基因及序列資料庫

菌群	Recommended locus	Databases
<i>Aspergillus</i> and teleomorphs	Calmodulin	Genbank ¹ CBS website ²
<i>Penicillium</i> and teleomorphs	β -tubulin	Genbank ¹ CBS website ²
<i>Fusarium</i>	EF-1 α	Fusarium-ID database ³
<i>Trichoderma</i>	ITS	TrichOKEY ⁴
	EF-1 α	TrichoBLAST ⁴
Zygomycetes	ITS	Genbank ¹
<i>Mucor</i>	ITS	BCRC website ⁵
<i>Absidia</i>	LSU	BCRC website ⁵
Mushroom	ITS	Genbank ¹ BCRC website ⁵

¹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

² <http://www.cbs.knaw.nl/>

³ <http://isolate.fusariumdb.org/>

⁴ <http://www.isth.info/>

⁵ <http://funcode.bcrc.firdi.org.tw/>

的科 *Ophiocordycipitaceae*，而冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* 之屬名亦被變更，目前其學名為 *Ophiocordyceps sinensis*。

蟲草屬中目前可作為藥用的蟲草包括冬蟲夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*)、北蟲草 (*Cordyceps sinensis*)、蟬花 (*Cordyceps sobolifera*) 等幾種。其中又以冬蟲夏草最為人所熟知。冬蟲夏草是中國傳統名貴中藥，產於中國、尼泊爾、不丹及印度，以中國產量最大，以青海及西藏為主要產區，估計每年產量約有 100-200 噸。最近因過度採擷，產量稀少，幾乎價比黃金，據稱上等品每公斤價格可達 70 萬人民幣。由於不易於人工環境下培育出子實體，因此由蟲草分離菌種進行各種研究及發酵生產變成較為可行的方式。然而，多位中國大陸學者由冬蟲夏草子實體中分離到許多不同的真菌，包括 *Cephalosporium sinensis* (蟲草頭孢)、*Chrysosporium sinensis* (中國金孢霉)、*Hirsutella sinensis* (中國被毛孢)、*Isaria farinosa*、*Mortierella hepioid* (蝙蝠蛾被孢霉)、*Paecilomyces*



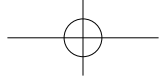
Hirsutella sinensis 中國被毛孢

hepioid (蝙蝠蛾擬青霉)、*Paecilomyces sinensis* (中國擬青霉)、*Pseudogymnoascus roseus*、*Scytalidium hepioid* (蝙蝠蛾柱霉)、*Stachybotrys* sp.、*Synnematium sinense*、*Tolypocladium sinense* (中國彎頸霉)。其中有幾種菌早期皆被認為是冬蟲夏草的無性世代，並在中國已被開發成蟲草相關產品販售。包括由中國被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 製成百令膠囊、由蝙蝠蛾擬青霉 (*Paecilomyces hepioid*) 所製成金水寶膠囊、由蝙蝠蛾被孢霉 (*Mortierella hepioid*) 製成至靈膠囊、蟲草頭孢 (*Cephalosporium sinensis*) 製成寧心寶膠囊及由中國彎頸霉 (*Tolypocladium sinense*) 製成蟲草口服液等。

近年來學者經微循環產孢觀察及 nrDNA 序列分析結果，目前已公認冬蟲夏草的無性型是中國被毛孢 *Hirsutella sinensis*，並且不同地理來源的冬蟲夏草之 ITS 序列具有高相似性，不同分離株之 ITS 序列差異最大約 3-4.3%，目前認定是同一物種。與其他相近物種之 ITS 序列相似度低於 91% (如與 *Ophiocordyceps robertsii* 之相似度為 91%；與 *Cordyceps militaris* 之相似度僅 75%)，目前有學者認為一些 ITS 序列相似的新種如 *C. multiaxialis* 多軸蟲草 (ITS 序列相似度 99%)、*C. nepalensis* 尼泊爾蟲草 (ITS 序列相似度 99%) 等認為是 *Cordyceps sinensis* 冬蟲夏草之同物異名。因此在 GenBank 上已有多筆 *Ophiocordyceps sinensis* 或 *Hirsutella sinensis* 的序列資料可供參考，故由菌絲、原料或產品中若可順利抽出 DNA、擴增及定序 ITS 片段序列即可判斷是否為冬蟲夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*)

菌株或產品。

台灣亦有不少冬蟲夏草相關的保健產品，其菌株或樣品之鑑定結果主要有三種分別為 *Tolypocladium inflatum*、*Hirsutella sinensis* 及 *Paecilomyces hepioid*。其中 *Hirsutella sinensis* 即為冬蟲夏草的無性型，已被公認接受。另外 *Paecilomyces hepioid* 蝙蝠蛾擬青霉菌株亦曾被送驗。在中國相當知名的蟲草產品金水寶膠囊所使用的菌株 CS-4 經鑑定亦為蝙蝠蛾擬青霉 *Paecilomyces hepioid*，在 NCBI GenBank 上具有 CS-4 菌株之 ITS 序列可比對，不過菌名僅登錄為 *Paecilomyces* sp.，其餘 *Paecilomyces hepioid* 菌株登錄在 NCBI GenBank 上之 ITS 序列筆數很少，僅有四筆。然而當以 *Paecilomyces hepioid* 之 ITS 序列進行比對結果經常會出現許多菌名為 *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) 之序列，且相似度達 99%。顯示兩者為緊密相關或同種。查閱 *Paecilomyces hepioid* 新種發表之原始文獻，文中描述 *Paecilomyces hepioid* 其形態及與 *Isaria farinosa* 有相當差異，但 *Paecilomyces hepioid* 的模式菌株之序列並未見於 NCBI 之 GenBank 上，因此兩者是否同種需要更進一步研究，包括取得模式菌株或形態符合原始描述的菌種，再進行 ITS 或其他片段之序列研究比對。在目前 ITS 序列差異很小的情況下，根據原始描述 *Paecilomyces hepioid* 及 *Isaria farinosa* 兩者形態差異頗大，可以由形態進行區分。*Paecilomyces hepioid* 的產孢結構較簡單，分生孢子柄短梗，由氣生菌絲直接長出，末端具 1-2 個瓶梗產孢細胞。有時瓶梗產孢細胞直接由氣生菌絲長出，單生、互生或對



6 研發成果

生物資源保存及研究簡訊
102年第26卷第2期

生，瓶梗由基部向頂端漸變細。分生孢子單細胞，表面光滑透明無色，球形或矩圓形，大小為 $2.2-2.6 \times 1.5-1.7 \mu\text{m}$ ，串生可達 30 個之多。*Isaria farinosa* 的產孢結構較複雜、緊密、多層次，分生孢子柄 (conidiophores) 多由埋生菌絲產生，有時聚生成孢梗束 (synnemata)，通常長，具輪生分支，每一分支頂端著生 2-4 個瓶梗產孢細胞 (phialides)，瓶梗產孢細胞基部膨大具細長頸部，分生孢子單細胞，橢圓至紡錘形或檸檬形，大小為 $2-3 \times 1.0-1.8 \mu\text{m}$ ，表面光滑，透明無色 (Sung 2007; 張 2012; 戴 2008; Samson 1974)。

2. 桑黃的鑑定

桑黃是一種著名的藥用真菌、在中國、韓、日等國的研究顯示認為具有抗癌潛力。最初的學名被認為是 *Phellinus linteus* (= *Inonotus linteus*)，但後來的研究顯示 *Phellinus linteus* 僅分布在中南美洲，而亞洲所普遍使用的桑黃並非同一種。我國仿間認為的桑黃又較為廣義包括好幾個形態近似種 - 桑樹桑黃、楊樹桑黃、暴麻子、淡黃木層孔菌等，並認為皆有功效。桑黃相關物種的 ITS 序列在目前在 NCBI 之 GenBank 相當混亂，有許多

鑑定錯誤的情形發生，因此要利用 ITS 序列在 GenBank 上比對出正確菌名相當不容易。吳等人 (Wu 2012) 最近對桑黃的分類研究中利用子實體形態、寄主及序列分析等進行多相研究，對於桑黃混亂的菌名獲得相當釐清，並提出一個桑黃新種 (*Inonotus sanghuang*)。目前在 NCBI 之 GenBank 上亦僅有一筆序列資料菌名登錄為 *Inonotus sanghuang*，因此桑黃相關菌種在多數情況下，比對的結果並不正確。例如以楊黃 *Inonotus vaninii* 序列進行比對時出現最接近的結果卻是 *Inonotus baumii*、*Fuscoporia gilva* 及 *Inonotus linteus*。因此對於比對結果須小心選用及驗證 (Wu 2012; Tian 2013)。

3. 牛樟芝的鑑定

牛樟芝是台灣特有藥用菇菌，許多研究顯示具有多方面功效，是我國近年來最熱門的藥用菇菌，其子實體生長緩慢、價格昂貴，其中以野生牛樟子實體價格最貴，段木栽培子實體次之、非牛樟段木栽培子實體再次之，三者不易區別，市場上亦曾發現有假品混充。有些多年生野生子實體可以長到相當大型，最初平伏貼生，隨者生長時間加長可反

卷至部分三角形，長形，半圓形，或形成多層狀堆疊成蹄形至不規則形，邊緣不孕，可變厚甚至向內捲起或呈波浪狀，木栓質至木質，苦味強，具樟樹香氣味。菌體表面初呈橘紅色，橘褐色，血紅色至淡肉色，隨著生長時間拉長變成褐色或黑色，平滑，有時具同心環痕，菌孔圓形至角形，每毫米 4-6 個，菌孔表面新鮮時橘紅色、橘褐色、鮮紅色至淡肉桂色，老化時變赭褐色。人工栽培牛樟芝子實體通常需培育一年至一年半以上方可形成子實體，至少需有明顯及均勻分布的菌孔形成才可算是子實體，子實體一般平伏，緊貼於木材表面，無柄，多呈薄片狀，約 0.5-1 公分高，圓形，橢圓形，長型，或不規則形，大小約 5-10 公分，有時會壟起成半球形、鐘形或塔形等。新鮮菇體多呈橘紅，紅色、橘色、橘黃，有些變異種為黃色、白色、黃白色，灰白色。菇體上表面布滿圓形或三角形或斜管狀菌孔。乾燥子實體顏色稍加深。具樟樹香氣味。

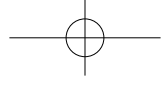
牛樟芝以子實體進行鑑定時形態具特殊性、相當容易區別由菌株鑑別則觀察菌落形態，顏色氣味等。另外以 DNA 序列分析進行鑑定亦是一個主要的方法。



桑黃 *Inonotus sanghuang*



牛樟芝 *Antrodia cinnamomea*



目前的牛樟芝 DNA 序列分析方法採用的序列片段是利用核醣體 rDNA 的 ITS1/5.8S/ITS2 片段序列。序列長度約 600-700 bp，再與 GenBank 資料庫中可信菌株序列，如 BCRC 35396 等進行比對，相似度高於 98% 以上，即可判定為牛樟芝菌種或產品。不同來源牛樟芝菌株之 ITS 序列彼此間具高度相似性，高於 99%。與親緣最相近的種香杉芝 *Antrodia salmonea* 的 ITS 序列相似度僅有 83%；與 *Antrodia* 與其他種的相似度僅有 65-70%。另外白色牛樟芝菌株之 rDNA ITS 序列與其他牛樟芝之 ITS 序列之相似度高於 99%。因此白色牛樟芝鑑定為牛樟芝。不過牛樟芝目前有幾個種名被使用包括 *Antrodia cinnamomea*、*Taiwanofungus camphoratus*、*Antrodia camphorate* 等，皆是同物異名。

4. 烏靈參

烏靈參據記載是一種從白蟻巢長出的黑柄炭角菌 (*Xylaria nigripes*) 的菌核，可作為中藥使用，又稱為雷震子，具有安神、止血、降血壓、治療失眠等功能。在中國由烏靈參中分離所獲得的菌種再經發酵技術制成的中藥制劑稱為烏靈膠囊，據稱對於鎮靜安眠有良好效果。朱列出 25 種與白蟻巢相關的炭角菌，據了解，仍有不少新種等待描述。文章中對於 *Xylaria nigripes* 的子實體形態及培養菌落形態特徵進行描述，並提供相關的檢索表可供比對，此外亦寄存一株菌株編號為 BCRC34219，其 ITS 序列資料於 NCBI 之 GenBank 上編號為 EU179868。然而查詢 NCBI 資料庫，另有一群 *Xylaria nigripes* 菌株之 ITS 序

列資料 (JQ967448、JQ979095、JQ927570、HM050414 等) 存在，兩者之序列相似度僅有 86%，顯然為不同菌株。另外中國販售的烏靈膠囊所使用的烏靈參菌種目前並沒有序列資料可供查詢，是否為 *Xylaria nigripes* 尚需進一步了解。因此由白蟻巢中分離出的炭角菌，未必就是 *Xylaria nigripes* (Rogers 2005; Ju 2007)。

5. 靈芝

靈芝 (*Ganoderma*) 是亞洲最著名，歷史最悠久的藥用真菌，經常被用於提升免疫力及抗癌，並已有許多商品上市。靈芝屬的種類相當多，已有超過 250 個種被記錄，其中被作為中藥材的種類主要是赤芝 (*G.lucidum*) 及紫芝 (*G.sinense*)。最近以 ITS 序列分析研究顯示原本認為廣泛分布世界各地，長久以來皆稱為 *G. lucidum* 的物種，並非單一個物種，由序列分析至少可分成四群。在中國大陸及台灣主要栽培的赤芝與歐洲的 (*G.lucidum*) 並非同種，並認為是一個新種，被發表為 *G.lingzhi*。而台灣業界栽培的松杉靈芝 (*G.tsugae*) 及鹿角靈芝經序列分析後也是同一種。台灣野生採集到的則多是另一個種稱重傘靈芝 (*G.multipileum*) 及熱帶靈芝 (*G.tropicum*)。靈芝的種類繁多且形態多變，有時無法以形態特徵準確進行鑑定，例如鹿角靈芝即是赤芝經控制環境因子培育出的。因此，以正確菌株建立其序列資料庫 (如 ITS) 將有助於靈芝相關菌種之鑑定工作。本中心現已完成靈芝屬菌種 2 百餘株的序列資料，對於靈芝菌種之鑑定與親源分析研究工作建立良好基礎 (Cao 2012; Wang 2009)。

結語

許多重要的藥用真菌具有產業應用潛力，是一群具高經濟價值的真菌，因此吸引生技廠商及研究人員的注意及投入。其中菌種的鑑定在產業化過程是重要的第一步。不論未來商品化需要有菌種證明，在品管過程、終端產品證明或其在研究其功能性未來能夠連結追溯引用，皆需要確保菌種正確。然真菌的鑑定是一項困難的工作，近期利用 DNA 序列的技術雖可大幅降低技術門檻，然而最經常使用的序列資料庫 NCBI 之 GenBank 卻並不總是正確，資料的使用需要小心評估。另外，真菌鑑定並非一定可以獲得理想的菌名，由於目前已知真菌種尚不到所有真菌總數的十分之一，亦即有許多新種尚待發現描述，故鑑定後仍無法確定其種名者，亦所在多有。

參考資料

1. Sung, GH et al. 2007. Studies in Mycology 57 : 5-59.
2. 張永杰 2012 冬蟲夏草的生物學研究 科學出版社 北京
3. 戴如琴等。2008。Mycosystema 27: 641-644
4. Samson, RA 1974. Studies in Mycology No. 6
5. Wu, SH et al. 2012. Botanical Studies 53 : 135-149
6. Tian, XM et al. 2013. Fungal Diversity 58 : 159-169
7. Rogers, JD. 2005. Mycologia 97 : 914-923
8. Ju, YM. & Hsieh, HM. 2007. Mycologia 99 : 936-957.
9. Cao, Y. et al. 2012. Fungal Diversity 56:49-62
10. WANG, DM et al. 2009. Botanical Studies 50: 451-458

多重抗藥性病原菌之檢測與分子鑑定

生資中心 / 研究員
黃麗娜

I. 前言

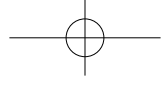
自從 20 世紀初弗萊明先生發明 Penicillin (青黴素) 後，抗生素的廣泛使用大大降低了人類因細菌感染所造成的傷亡，也造就了抗生素製藥產業的蓬勃發展，開啟了「抗生素時代」。抗生素依照其作用機轉可分成四大類，第一類為抑制細胞壁合成，如 Bacitracin (桿菌肽素)、Cephalosporine (頭孢菌素)、Penicillin (青黴素)、 β -lactamase inhibitor (β -內醯胺酶抑制劑) 與 Vancomycin (萬古黴素) 等。第二類為抑制細胞膜功能，如 polymyxins (多黏桿菌素)、imidazoles (咪唑) 及 Colistine (粘桿菌素) 等。第三類為抑制蛋白質合成，如 Chloramphenicol (氯黴素)、Erythromycin (紅黴素)、Tetracycline (四環黴素) 與 Aminoglycoside (胺基糖苷) 等。第四類則是抑制核苷酸合成，如 Quinolone (奎諾酮)、Rifampin 與 Sulfonamides (磺胺類) 等。自從抗生素被廣泛運用以來，抗藥性細菌就不斷地增加，而台灣的細菌抗藥性問題也十分嚴重，甚至產生出具多重抗藥性的超級細菌，例如：耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)，抗萬古黴素

腸球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和包氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 等。無論是在臨床診斷或是疾病醫療處置上，正確且快速的鑑別致病微生物的種類是十分迫切與重要的。而具有正確鑑定學名的病原微生物標準菌株 (type strain) 或是具有代表性的臨床分離株 (clinical isolate)，對於病原菌診斷技術之提昇，或是對感染症之新型藥物標的之開發，是極為重要的生物材料。食品所生資中心於 100 年度起執行生技醫藥國家型科技計畫 (NRPB) 中「台灣醫用細胞和微生物資源庫」計畫，針對國內重要臨床病原微生物及抗藥性菌株進行系統性收集與保存，可提供給學研界或生技產業進行新藥篩選和新型檢測試劑開發之基礎。目前我們已自行政院衛生署疾病管制局移轉重要細菌感染症病原菌一批共計 196 株，菌株分離年代為 2001~2011 年間，共計涵蓋 11 個不同的菌種別。另外也自成大醫學檢驗技術研究中心引進 1,000 株抗藥性細菌，包括廣效性乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactamases; ESBL) 菌株、oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) 及 vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) 等。本文就

針對最近在 ESBL 病原菌之檢測與其分子鑑定相關研究做一整理，以作為收存醫用病原細菌培養及複核之參考。

II. ESBL 病原菌的嚴重性

乙內醯胺 (β -lactam) 類抗生素因可抑制細菌細胞壁合成中許多重要的酵素作用，使得敏感性細菌無法完成正常之細胞複製而失活。目前在細菌感染症中最常被使用的處方藥，如 penicillins, cephalosporins, cephamycins, carbapenems, monobactams 等，在化學結構上都具有一 β -lactam ring，泛稱為乙內醯胺型抗生素。但由於此類抗生素之廣泛使用，尤其是廣效性的第三代頭孢菌素 (3rd generation cephalosporins)，短短幾年之間就導致細菌演化產生抗藥性，藉由產生廣效性乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactamases; ESBL)，將上述抗生素之環狀結構破壞，而使其喪失殺菌活性。一開始 ESBL 細菌只在少數地區出現，但隨著抗生素之濫用，目前不管是在院內型感染或是社區型感染，ESBL 菌株已成為一個全球性關切的問題。以往 ESBL 主要存在於常見之腸內菌如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及克雷伯氏菌 (*Klebsiella spp.*) 等菌屬；但目前已知沙門氏菌屬 (*Salmonella spp.*)、變形桿菌屬 (*Proteus spp.*)、檸檬酸桿菌屬 (*Citrobacter spp.*)、摩根氏桿菌 (*Morganella morganii*)、黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、赤痢志賀氏桿菌 (*Shigella dysenteriae*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及包氏不動桿菌 (*Acinetobacter*



baumannii) 等病原細菌中也發現有 ESBL 菌株之存在，是造成尿道感染或菌血症之主要元凶，可見其對人類健康之威脅日趨嚴重，不容忽視。

III. ESBL 病原菌的分類與命名

目前已知乙內醯胺酶 (β -lactamase) 依照其可產生分解作用的抗生素種類之不同，可區分為四大家族，包括 penicillinases, extended-spectrum β -lactamases (ESBL), carbapenemases, 及 AmpC-type cephalosporinases 等，其中 ESBL 因可分解廣效性的 cephalosporin 類抗生素 (如 cefotaxime, ceftazidime 等)，是造成病原菌具有多重抗藥性的主因，也成為細菌性感染症中最为廣泛的病原 (Bush, 2010)。

ESBL 是由位於質體 (plasmid) 上之 bla 基因所生合成，在宿主細菌複製過程中，質體核酸容易產生基因突變，造成轉譯出的酵素蛋白結構產生一或多個氨基酸的改變，因而能水解更多 cephalosporin 類抗生素、penicillins 及 aztreonam 等。但 ESBL 也會被乙內醯胺酶抑制劑 (β -lactamase inhibitor)，如 clavulanic acid 所抑制，這是一般實驗室鑑別 ESBL 菌株的重要參考。

目前 ESBL 被分為 9 類，分別以其分離來源或是作用特性加以命名，包括 TEM (源自最初分離來源患者的名字 Temoniera)，SHV (sulphydryl variable)，OXA (oxacillinase)，CTX-M (對 cefotaximes 水解能力很強)，PER (在 *P. aeruginosa* 發現)，VEB (源自人名

Vietnam，又名 CEF)，GES，TLA，BES 等。初期大部分的 ESBL 皆為 TEM 或 SHV 突變而得的衍生物，ESBL 的發現最早始於 1983 年由 Knothe 等人提出，他們發現這種能水解 cefotaxime 的酵素，它的胺基酸序列有別於早期發表的 SHV-1 乙內醯胺酶，故命名為 SHV-2。稍後 1985 年，法國發現另一種可水解 cefotaxime 的酵素的新型乙內醯胺酶，為 TEM-1 的衍生物，並命名為 TEM-3。往後研究人員又陸續發現其他類型 ESBLs，如 1986 年發現 TEM-4、SHV3，1987 年發現 TEM-6、TEM-9、SHV4、SHV5... 等。近年來由於廣效性抗生素的研發及在醫療系統中抗生素被濫用的情況日益嚴重，病原菌也演化產生許多的變異，例如原本存在 *Kluyvera* spp. 之抗藥性基因，可經由接合性質體 (conjugative plasmid) 在腸內菌科不同病原菌之間產生基因平行移轉 (horizontal transfer)，使得更多的病原菌獲得抗藥性，目前已知 ESBL 菌株類型已超過 150 種以上，且逐年仍在增加之中。其中又以 CTX-M 型的 ESBL 佔最多數，傳播速度最快，已有超過 50 多種 allotypes，已知 131 個不同酵素又可再細分為 CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 及 CTX-M-45 等六個小群組 (sub-lineages)。而有關乙內醯胺酶之分類與其胺基酸序列之差異性，可以查閱 Lahey Clinic 資料庫 www.lahey.org/studies/。

IV. ESBL 病原菌之檢測與分子鑑定

由於 ESBLs 的基因是由質體所攜帶的，容易經由接合作用，在不同種細菌之間傳播。因此 ESBL 的菌株所引起的院內感染已有日益增加的趨勢，在臨床病患所分離樣品的致病細菌檢測上，判斷是否為 ESBL 菌株對投藥控制就成為很重要的參考。一般而言，當受試細菌對相關抗生素的感受性降低，尤其是對第三代 cephalosporin 藥物，如 cefotaxime、ceftriaxone、ceftazidime 或 aztreoname 的感受性下降，就很有可能是 ESBLs。不過要確定還需透過合併乙內醯胺酶抑制劑一起觀察。目前對 ESBLs 的檢測有多種不同方法 (Gazin et al., 2012)，其中依據菌株特性 (表現型) 較常用的有雙紙錠協同測試法 (double disc synergy test; DDST)、最小抑菌濃度 (MIC) 測試和蛋白質等電點聚焦 (isoelectric focusing; IEF) 等，也有廠商開發出選擇性呈色培養基以及自動化鑑定系統。另外，依據菌株遺傳物質特性，如偵測特定 ESBL 基因之存在與 DNA 定序分析、多基因座定序分群 (multilocus sequence typing, MLST)、微陣列 (microarray) 基因晶片分析、甚至是全基因體定序分析等，則屬於分子鑑定方法，簡述如下。

1. 雙紙錠協同測試法

此方法主要是依據 ESBL 菌株對 cefotaxime、ceftazidime 等第三代 cephalosporin 藥物具抗藥性，但會受到乙內醯胺酶抑制劑 clavulanic acid 之抑制來做判斷。把含有抗生素 cefotaxime、ceftazidime、cefotaxime 加 clavulanic acid 以

及 ceftazidime 加 clavulanic acid 等四片紙錠放在塗有待測菌的選擇性培養基 (如 MacConkey agar 或 Drigalski agar) 上, 觀察待測菌株生長狀況。當有添加 clavulanic acid 的紙錠比沒加 clavulanic acid 的抑制環增加 5 mm 以上, 即判斷為 ESBL 菌株。

2. 最小抑菌濃度測試 (以瓊脂稀釋法為例)

將菌株接種在含有不同濃度抗生素的瓊脂培養基上, 經隔夜培養後, 判斷可抑制細菌生長的最小抗生素濃度。當觀察到菌株在沒有添加乙內醯胺酶抑制劑 clavulanic acid 的瓊脂培養基上比有添加 clavulanic acid 瓊脂培養基的最小抑菌濃度大於 3 個 2 倍連續稀釋倍數 ($>3 \log_2$) 時, 即判斷為 ESBL 菌株。

目前也有市售呈色培養基 (chromogenic medium) 配合適當的抗生素添加, 可用於檢測 ESBL 菌株。如 chromID ESBL (bio-Merieux), Brilliance ESBL (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) 及 CHROMagar ESBL (CHROMagar, Paris, France) 等。

3. 酵素活性測定及蛋白質等電點聚焦電泳

市售呈色藥品 nitrocefin 可用來偵測細菌是否具有乙內醯胺酶存在。因為乙內醯胺酶可將 nitrocefin 水解, 由其最大吸光值之改變而產生顏色變化, 反應液由黃色轉為紅色。以陽性反應之細菌均質液進行蛋白質等電點聚焦電泳, 電泳結束後再利用 nitrocefin 為受質來呈色, 可以偵測該菌株之乙內醯胺酶分布,

並量測其等電點 (pI 值) 之相對泳動距離, 再根據一些已知乙內醯胺酶等電點為標準值, 畫出迴歸曲線, 可計算出該細菌所含乙內醯胺酶之 pI 值, 經查詢比對公開資料庫 www.lahey.org/studies/ 所列之各個乙內醯胺酶 pI 值, 判斷可能的乙內醯胺酶種類。因為酵素蛋白在電泳時可能受到雜質干擾, 移動的位置或迴歸曲線計算結果會有些許誤差, 因此以等電點值區分乙內醯胺酶種類只能提供參考。

4. 自動化微生物鑑定系統

針對人類疾病常見的病原微生物, 由於臨床檢測需求量大, 目前也有廠商開發出自動化微生物鑑定系統, 如法國 bioMérieux 公司的 Vitek-2 Compact 系統, 及美國 Becton Dickinson (BD) Diagnostics 公司的 Phoenix 系統等, 均可用於已純化的單一菌落之 ESBL 特性檢測。Gherardi 等人 (2012) 曾比較此兩種系統在對血液樣品中細菌之抗生素耐受性分析能力, 其結果顯示以 Vitek-2 Compact 系統之成效普遍優於 Phoenix 系統, 尤其是針對革藍氏陰性桿菌而言, 正確率幾乎達百分百 (Gherardi et al., 2012)。

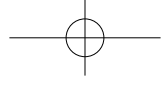
5. ESBL 相關基因之分子鑑定

除了上述以菌株表現型 (生理或生化特性) 作為 ESBL 之判別之外, 若要進行流行病學相關之探討, 則還需搭配根據遺傳特性之分子檢測分析。由已發表之 ESBL 基因序列, 如 blaTEM, blaSHV, bla CTX-M 等, 設計通用引子, 抽取細菌之質體 DNA 作為模板, 並利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 進行擴增, 以偵測

是否有相關 ESBL 基因之存在。所得 PCR 反應產物再進行 DNA 定序反應, 可以解析其遺傳變異性, 再與基因資料庫中已知抗藥性基因做比對, 以進行類緣關係之分析, 也可以提供菌株演化或散播之佐證。

6. ESBL 菌株品系鑑別分群

目前針對細菌菌株品系之鑑別, 最常採用多基因座定序分群 (MLST)。主要是針對 5-7 個持家基因 housekeeping genes (如 aspA, glnA, gltA, glyA, pgm, tkt, uncA) 進行內部一小片段 (約 450-500 bp 長) 的複製及雙向定序, 將所得的 allelic sequences 上傳到 MLST 資料庫進行比對 (<http://www.mlst.net>), 分析各個 allelic sequences 之種類, 定義為不同的 sequence type (ST), 以 eBURST 軟體比對 STs 之間的差異, 相近的 STs 再被歸群為 clonal complexes (CC), 可作為族群結構之依據。目前在 MLST 資料庫網站上已有超過 85 個細菌菌種之 MLST schemes 可供比對參考, 也涵蓋多種重要的臨床微生物的資料, 如 *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* 等常見的臨床病原細菌, 以及 *Candida albicans*, *Batrachochytrium dendrobatidis* 等真菌。目前 MLST 已被視為可信度極高的分子鑑定技術, 這類以 DNA 定序為基礎的方法,



容易進行不同實驗室之間的資料交換及資料庫建構與比對，具有共同性與擴充性，已成為臨床微生物鑑別的主流方法。

7. 以 DNA 微陣列 (基因晶片) 快速鑑別 ESBL 菌株品系

由於生醫研究人員對病原菌抗藥機轉的研究日益詳盡，目前已有廠商結合特殊抗藥性基因組合，設計 DNA 微陣列 (microarray) 而開發出特別為偵測抗藥性菌株之基因晶片，即所謂的 Check-Points assays (Check Points Health BV, Wageningen, the Netherlands)。以 ESBL 菌株為例，其所納入的基因片段組合，涵蓋了 Lahey database 中主要的抗藥基因，包括 95% 的 blaTEM、77% 的 blaSHV，以及 100% 的 bla CTX-M 等，最佳可達到 95% 的靈敏度及 100% 的專一性。如 Check-MDR CT102 晶片可同時偵測非常多種類的 ESBL 菌株品系，包括 TEM、SHV、CTX-M 類的 ESBL，以及 KPC、OXA-48、VIM、IMP 及 NDM-1 型的 carbapenemases 等 (Naas et al., 2011)。

8. 病原菌全基因體定序分析

全基因體定序 (whole-genome sequencing) 無疑是能提供生物體最完整遺傳訊息的研究方法，自從 1995 年 *Haemophilus influenzae* 全基因體序列被發表，開啟細菌基因體學研究之先例，當時以 ddNTP 作為 chain-terminating inhibitors 之 Sanger sequencing 技術費時 13 個月才完成解析。時至 2013 年 3 月底在 Microbial

Genome database 中已有 2139 株細菌、145 株古生菌及 42 株真核微生物基因體序列被發表 (<http://mbgd.genome.ad.jp/>)，而基於 DNA 定序技術的精進與相關儀器與試劑花費的逐漸下降，快速而大量的定序，已經不是難事。目前已廣泛被使用的第二代定序法 (Next Generation Sequencing, NGS) 有別於傳統的 Sanger sequencing，其共通的特點是不需將模板 DNA 先選殖到細菌載體上，可大大節省許多人力、時間及物力的花費。一般定序的長度較短 (<400 bp)，但一個批次反應常可產生大量的序列資訊 (最高可達 600 Gb)，因此可以在一週之內即可完成近百株病原細菌的全基因體定序。由於 NGS 對於短長度範圍的定序既快且準，很適合作為序列再確認 (re-sequencing) 之用，通常 NGS 所獲得的定序結果會透過與一個已知的基因體序列作比較來作為定位排序的參考。目前最常用的有三種 NGS 技術平台，包括 Illumina/Solexa、Roche/454 及 Applied Biosystems/SoLiD 等。由於 NGS 技術是直接對 DNA 作定序，過程中不需進行 DNA 擴增或選殖，在病原菌之分子鑑定上是十分適合的工具。目前 NGS 已經有桌上型設備可使用，如 Illumina 公司的 MiSeq platform，Life Technology 公司的 Ion Torrent platform 等，可以大大減少定序之花費及縮短定序時程。如 Ion Torrent PGMTM 定序儀就被成功使用於解析德國 2011 年間嚴重出

血性大腸桿菌之病原株 *E. coli* O104:H4 血清型，在 62 小時之內即能完成 4 株病原分離株及 2 株參考菌株之定序分析。另外，Oxford Nanopore 公司還開發出 GridION 與可攜式 MinION 儀器，以電子學分析技術解析 DNA、RNA 甚至是小分子蛋白質等。最新 Pacific Bioscience 公司更開發出第三代定序技術 PacBio RS system，為單分子即時定序法 (single-molecule real-time, SMRT)，強調可擴增個別讀長至 3 kb~10 kb，單一個 SMRT cell 在一天之內即可獲得 100 mb 之序列資訊，且同時可得到 DNA methylation pattern 之結果，在技術上又有長足的進展。此技術已成功應用在解析德國 2011 年嚴重出血性大腸桿菌病原株 *E. coli* O104:H4 outbreak strain C227-11 與其他血清型 *E. coli* 菌株間 DNA methylation 程度之差異性 (Fang et al., 2012)。微生物全基因體定序可作為分子鑑定之用，在釐清國際間重要致病感染原菌株之傳播與流行追蹤，可作為一個有效的分析工具。不過快速且大量的定序資料產出，在數據處理與整合上，仍需要合適的生物資訊工具來輔助。而不同研究人員所產出的資訊，需要能進一步整合與分析，才能提供更為完整的病原菌基因體族群演化資訊，有利於分子鑑定與流行病學追蹤。

V. 結論與展望

針對多重抗藥性菌株，如 ESBL 病原菌之檢測與鑑定，不

論是以表現型 (phenotypic) 或是基因型 (genotypic) 方法為基礎，對於所獲得數據的品質除了要確認其正確性之外，還希望能在越短的時間內完成相關病原菌之鑑別，才能提供即時又正確的臨床治療處置建議。尤其在流行病學研究上，為了達到不同實驗室之資訊可以交流，在健康照護領域相關醫療資訊之存取及分析，以至於提出決策支援等，已朝向分析資料宜具有可攜性 (portability) 之趨勢，因此在重要病原菌之檢測方面，數位化及微小化之分子鑑定技術需求將會日漸提升，而對於生物資源保存中心而言，提供各類正確的參考菌株，將可作為相關檢測技術開發之基礎，期待能對各類由微生物所致感染症之控制與治療，提供新型藥物開發之參考。

VI. 參考文獻

1. Bush K. 2010. Curr. Opin. Microbiol. 13: 558-564.
 2. Fang G, Munera D, Friedman DI, Mandlik A, Chao MC, Banerjee O, Feng Z, Losic B, Mahajan MC, Jabado OJ, Deikus G, Clark TA, Luong K, Murray IA, Davis BM, Keren-Paz A, Chess A, Roberts RJ, Korlach J, Turner SW, Kumar V, Waldor MK, Schadt EE. 2012. Nat. Biotechnol. 30:1232-1239.
 3. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2012. J. Clin. Microbiol. 50:1140-1146.
 4. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, Avola A, Fico L, Palazzo C, Sapia GF, Visaggio D, Dicuonzo G. 2012. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72:20-31.
 5. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. 2011. J. Clin. Microbiol. 49:1608-1613.
- 公布日期為中華民國一百零二年六月十九日總統華總一義字第 10200115241 號。
- 總統令修正公布全文共計六十條；於第十章附則第六十條說明，本法除第三十條申報制度與第三十三條保證金收取規定及第二十二條第一項第五款、第二十六條、第二十七條，自公布後一年施行外，自公布日施行。
- 食品衛生管理法共計十個章節，摘錄如下
- 第一章 總則
第二章 食品安全風險管理
第三章 食品業者衛生管理
第四章 食品衛生管理
第五章 食品標示及廣告管理
第六章 食品輸入管理
第七章 食品檢驗
第八章 食品查核及管制
第九章 罰則
- 第十章 附則
- 全法之內容可於下列幾個網站下載：
1. 總統府公報，網址 <http://www.president.gov.tw/Default.aspx?tabid=164>
 2. 行政院衛生署食品藥物管理局法規資訊，網址 <http://www.fda.gov.tw/TC/law.aspx?cid=62&cchk=98582909-2745-4c4e-9469-cc93da057d65>
- 衛生署食品藥物管理局提出十大行動方案，包括建立強制登錄制度；大幅加重罰則；追繳不當利得；源頭控管化學原料；建置食品追蹤及追溯系統；明確規範全成分標示；鼓勵檢舉及提高獎金；強化食品安全監測與建立預警監控；研議食品安全基金；增加專家及民間團體參與，邁向食品安全新紀元。

生物資源保存及研究簡訊 第94期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所
發行人：陳樹功所長
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

