

出國報告（出國類別：研究）

參加由國際微生物聯合學會(IUMS)舉辦之
第 13 屆國際真菌研討會

服務機關：行政院衛生署食品藥物管理局

姓名職稱：林旭陽 科長

派赴國家：日本

出國期間：100 年 9 月 5 日至 100 年 9 月 11 日

報告日期：100 年 11 月 28 日

摘要

國際微生物聯合學會(IUMS, international union of microbiological societies)是國際上目前最具代表性之微生物科學組織，由該組織舉辦的第 13 屆國際微生物聯合學會大會之第 13 屆國際真菌研討會，於 2011 年 9 月 6 日至 9 月 10 日在日本札幌市舉行。本次研討會規模盛大，吸引計有來自世界各地 65 個國家，超過 4800 位之學者專家與會專家，發表上百場專題演講與壁報展示，可見其盛大與重要，並有微生物相關儀器廠商設攤展示。專題演講分為數個主題進行，此行主要鎖定真菌毒素檢驗技術及研發為主。藉由參加多場學術演講與壁報觀摩，吸收新知，瞭解國際間目前在真菌毒素檢驗技術之趨勢與研究方向，有利於因應未來本局可能面臨之檢驗業務與研究發展。並在會中建立本局在真菌毒素科技領域與國際溝通及聯絡之管道，並受邀參加 2012 年日本 NIHS 辦理真菌毒素實驗室共同試驗活動，對於未來檢驗業務有實質助益。此外，藉此機會收集關儀器廠商之最新檢測資訊，建立聯絡管道，供未來升級相關設備之參考。

目次

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	5
心得與建議.....	18
壁報論文.....	19
照片.....	20

目的

真菌毒素係一群結構類似之真菌二級代謝產物，其毒性強、具高穩定性及致癌性，常被發現於保存不良的食品及其原料中，少時可導致動物之肝臟及腎臟傷害，引起組織失血、厭食及生長緩慢等症狀，污染量大時也可能致癌或致死，當前人口總數遽增，甚多穀物雜糧等均需仰賴進口，國際食品貿易活絡，交易往來甚為蓬勃，各種不同作物受到真菌毒素污染的種類與狀況亦不相同，因此為保護國民之健康，達成食在安全的目標，真菌毒素檢驗技術的研發與增進，實為不可或缺重要的一環。檢驗技術隨著時代進步也日益精進與提升，其中包括檢測的處理、儀器的分析及檢測的品項等都隨之改變或增加，未來勢必有愈來愈多相關檢測技術與產品問世，由於對此領域之檢測技術與研究經驗仍須精進，希望藉由參加此次在真菌研究領域具有代表性之國際真菌研討會，能對國際間在真菌毒素之檢驗與研究有更進一步之認識。從中學習到之相關技術，應能加強本局未來相關業務之執行能力，協助本局建立更完善之真菌毒素之檢驗技術能量。此外，藉由與專家學者深入研討及溝通，增進彼此之瞭解，建立本局在真菌毒素之檢驗技術領域與國際溝通及聯絡之管道，對於未來檢驗業務有實質助益。

過程

很榮幸能參加此大規模之真菌研討會，懷抱著學習的心情，經過一段長途飛行，於 9 月 5 日到達日本新千歲機場，再轉乘 JR 火車前往目的地札幌市。會議場地位於市中心的 sapporo convention center 及 sapporo business innovation center，交通便利，會場大而新穎，動線順暢，硬體設備完善，是當地舉辦大型研討會之首選且重要場地，因次本次研討會場次多而密集，二個場地連接在一起更是方便。

國際微生物聯合學會(IUMS, international union of microbiological societies)是國際上目前具代表性之微生物科學組織，是國際科學組織(International Council of Science)的 29 個科學聯合會之一，成立於 1927 年其宗旨在於促進國際微生物學的科學的研究，並且協調國際合作的研究和其他科學活動，保證國際會議的辦理、報告與出版物的協助，並作為微生物學的科學組織在 ICSU 的代表，維持與其他國際組織的聯絡。本次第 13 屆大會於 2011 年 9 月 6 日至 9 月 10 日在日本札幌市市舉行。每 3 年舉辦之大會是全球微生物科技領域之重大盛事，本次大會同時舉辦 13 屆真菌研討會與 13 屆細菌與應用微生物研討會，而接續 9 月 11 日起為病毒研討會，是該組織與相關領域學者專家重要的集會。此行主要目的乃參加第 13 屆真菌研討會，本次研討會規模盛大計有來自全球 65 個國家，超過 4800 位學者專家與會，甚至日本天皇也出席閉幕式，可見其盛大與重要。

本研討會規模盛大，主題分為細菌與應用微生物、真菌及病毒等三個領域，發表上百場專題演講與壁報展示，並有相關儀器廠商設攤展示。筆者行程因經費所限主要參加在第一階段研討會為細菌及應用微生物與真菌，此時段 5 日的演講在分為許多小領域與子題進行，第 1 天分為 10 個演講廳，第 2~5 天則分成 12 個演講廳，每天都有不同主題的壁報展示與討論，

廣義的微生物學領域內容包羅萬象，每大主題又區分為數個次主題，在同時段於不同演講廳進行演講，因此聽眾必須先行選定適合的題目，並且將各時段區分而且弄清楚正確的演講廳避免衝突或不得其門而入，筆者有幾次就是因為跑堂，入場後甚至已經無位可坐，乾脆席地聽講，此行主題主要為黴菌毒素的檢測，但筆者又在食品生物檢驗領域服務，因此順道選擇相關講題聽講學習，第二階段專題演講係屬於病毒領域，由於經費與時間所限，故筆者無法參加，甚感遺珠之憾，然而在為期 5 天的第一階段大會中，聽取許多國際上最新研究成果與發展，受益匪淺。筆者將學習成果依專題演講內容，詳述如下：

（一）真菌毒素之污染與防治研究

本次議程以真菌為主題，研討會涵蓋範圍相當廣泛，依主題區分包括 Industrial Mycology、Recent Aspect in Health Promoting Effects of Fungi、Sexual Development in Fungi、Recent Advances in Dermatomycosis、Respiratory Mycoses-Pulmonary Aspergillosis (Pathogenesis and Treatment)、Recent Advances in *Malassezia*、Recent Advances in Host Defense Mechanism against Fungi、Diagnostics for Fungal Infection、Application of Genomics of *Aspergillus oryzae* and Related Species、Recent Research Progress on Early Diverging Fungi (Evolution, Systematics and Diversity)、Phylogeography and Biogeography of Fungi 和 Mycotoxins (Chemistry, Biology and Risk Evaluation)等領域，而其中真菌毒素(Mycotoxins) 則約可包括了生物、化學及風險評估等三類重要項目，真菌毒素第一部份主要研究著重在對 *Fusarium* 頭枯萎病的化學控制，和在小麥與大麥於糧食發育成長期間，真菌毒素的污染及累積，*Fusarium* 頭枯萎病穀類病原體的分類學，系統發育和 TRICHOTHECENE 毒素潛在的可能性，以及探討在 *Fusarium* 對作物污染真菌毒素的影響與真菌毒素生合成基因的變化情形，從真菌菌種的角度來看，被研究的對象已經從 *Aspergillus* spp 轉移到 *Fusarium* spp 不論是食品中污染狀況或者是污染控制到真菌毒素之檢測筆者認為其中一個重要的因素是前者已經被研究多年大量的資料多已經累積建立所以目前後者會逐漸變成研究的重要目標小麥和大麥的 *Fusarium* head blight (FHB，*Fusarium* 頭枯萎病)病症即是由 *F. graminearum* 感染的而且此株真菌會產生 deoxynivalenol

(DON) 以及 nivalenol (NIV) 二類的真菌毒素，對人和動物致毒，目前在污染的穀物類防治上，使用殺菌劑是控制 FHB 的最實際的方法，但是這不一定是很有效。FHB 殺菌劑已經被經常使在小麥和大麥中，不管其品種如何，因為小麥在開花期上或附近時期階段非常對 *Fusarium* 敏感，此期間使用殺菌劑是較佳的時機。不過，在大麥研究裡發現 *Fusarium* 最關鍵的時間點，*F. graminearum* 感染和真菌毒素累積在培育種中不同，鑑於 chasmogamous cultivars 在開花期最易受影響，開花受精的植株在開花期表現具抵抗性。而 *F. graminearum* 和感染的時間對 mycotoxin 累積的影響調查研究結果顯示，在 anthesis 之後 20 天產生高量的 DON 和 NIV，這說明了小麥的真菌毒素污染方面的糧食系統之晚期階段的重要性，因此建議可參考建立控制策略降低小麥污染毒素的危險。FHB 是目前在世界上最破壞經濟效益的植物疾病之一。在 2000 年之前，FHB 的主要病原學被認為包括單一的 panmictic 種類如 *Fusarium graminearum*。不過，在過去十年進行的一系列研究，使用 concordance/ discordance phylogenetic 種類識別，顯示其 morphospecies 包括至少 16 phylogenetically 不同種類 (*F. graminearum* 種類複雜= FGSC)，而且大多數這些種類顯示重要的 biogeographic 架構。對比起來，形態學上的種類承認在 FGSC 內只已經解決 6 個種類和 3 種類組，反映出形態學上簡單的 multilocus 分子系統發育的結果，基於使用包括調整好脫氧核糖核酸順序數據的 16.3 kb 的 12 種結合的基因，進行最大限制和最大可能性分析，在亞洲、北美洲、南美洲、澳洲和非洲的種類分析提供許多資料，這些初步的證據結論顯示，決定種類的驗證法如 multilocus genotyping 分析和 trichothecene 毒素 chemotype，來預測在全球 FHB 調查的追溯過程中非常有用。由於世界貿易的全球化，進行中的分子和形態學上分析研究，正全方位進行 FHB 病原體探討 trichothecene 毒素潛在和傳播情形。由 *Fusarium* 產生的代謝物 fumonisins 和 trichothecenes 是全世界對最關注的食品安全的真菌毒素，真菌毒素的 biosynthetic 基因經常以基因群形式相互連結一起，fumonisin biosynthetic 基因 (FUMs) 位於 *FUM* 群的 16—基因，而且大多 trichothecene biosynthetic 基因 (*TRI*) 則座落於 *TRI* 基因的 10 到 14 的基因上。在 fumonisin 生產 fusaria，*FUM* 群相同在基因次序和定向，在不同種類中基因群在 genomic 的位置也會不同；在

fumonisin-nonproducing 中，缺乏能生產 fumonisin 功能可能是因為三種原因第一是在一個關鍵的 *FUM* 基因群內發生一個點突變；第二是 *FUM* 基因群內發生某一關鍵基因的缺失；第三是缺乏整個 *FUM* 基因群。和 *FUM* 群形成對比，*TRI* 的基因群在生產 trichothecene 的 fusaria 中顯示在基因組織方面的變化。不過，在 *TRI* 的基因順序內的變化而不是基因組織在 trichothecene 生產過程中有助於變化性。例如在基因 *TRI8* 內的變化性能確定是否 *Fusarium* 生產 3-acetyl DON 或者 15-acetyl DON。所以在真菌毒素 biosynthetic 基因變化性使 *Fusarium* 能影響架構的差異真菌毒素和真菌毒素生產對非產毒性之生產。此種基因群變化性會影響食品與作物的真菌毒素污染狀況。

(二) 真菌毒素之檢驗研究

檢測研究部分包括了從真菌的基因體探討產毒機制與影響因子及檢驗技術，在 *Fusarium graminearum* 中真菌毒素產生的生合成基因的研究方面，*F. graminearum* 會生成並累積真菌毒素在作物中例如 trichothecenes 和 zearalenone(ZEA)，從米與玉米樣品中分離與鑑定到的 *F. graminearum*，並加以測試其產生真菌毒素的能力，且確認遺傳學的組成和架構。再從每個 chemotype 選殖並且定序 *Tri13* homolog 後加以研究，來自 NIV chemotype 的 *Tri13* 攜帶著類似 *Fusarium sporotrichioides* 的 ORF，而來自 DON chemotype 菌株的 *Tri13* 則有一些突變存在，研究顯示將 NIV chemotype 的基因的 *Tri13* 刪除，導致 DON 的產生而不是 NIV，不論是單獨或組合 *Tri7* 基因結合 *Tri13* 基因的異質的表現，DON chemotype 都會有合成 NIV 的能力，這些結果顯示 *F. graminearum* 的 *Tri13* 和 *Tri7* 在 NIV 和 4-ANIV 的合成期間，需要氧的氧化和乙醯化作用。而在 ZEA biosynthesis 的研究中，也證明了 PKS13 需要 ZEA 生產。之後的分析研究顯示，具有 PKS13 的 50 kb 的 DNA 部分由 ZEA biosynthesis 是帶有另外的 ORFs 組成，其中包括另一種 PKS 基因(PKS4，作用為降低真菌的 PKS)，zearalenone biosynthesis 基因 1(*ZEB1*，與 isoamyl alcohol oxidase 基因顯示高度的相似性)，以及 *ZEB2* 基因(具保守性

的 leucine zipper domain)。ZEB1 負責 β -zearealenonol 合成 ZEA，而 ZEB2 主要調控轉譯。

在食物鏈中真菌毒素的風險評估也逐漸受到重視，由於食品與飼料受到真菌毒素污染事件在全球陸續的發生，因此危害分析必須處理整個食物鏈從食品的主要生產者到最後的消費者。第一步是食品供給鏈弱點的評估，不論收穫前及收穫後受到黴菌侵襲和真菌毒素產生的可能性，並且導入 HACCP 策略。應將農產品的化學分析概念，包括植物和來自動物性質的食品或商品也都包括在內。把這些分析的結論轉入食品消耗資料庫中提供暴露的程度。Biomarkers 的暴露（真菌毒素和/或它的代謝物的內部的劑量）以及 biomarkers 影響的（例如為黃麴毒素和 ochratoxins 的 DNA adducts）有助於專業風險評價暴露的精緻與描述。對各種各樣的真菌毒素（例如黃麴毒素，ochratoxins 和一些 *Fusarium* 毒素）來說，國際上也已經發表出版了基於健康訴求的指導綱要。以前的這些毒物風險評估的特性多是集中於致突變和真菌毒素的鑑定潛在致癌。傳統的風險估根據範例的暴露量計算將真菌毒素予以排序。目前，其他毒物的 endpoints（例如在致癌性、neurotoxicity、免疫學的效應（trichothecenes）、內分泌影響（resorcylic acid lactones）等得更多的注意與研究。另一個新興的工作是混合型毒素（對各種的毒素的共同暴露）的評估以及有食品成分和其他污染物與真菌毒素的潛在的相互作用。

在以減少於作物與食品中產毒性真菌及真菌毒素含量為目的，與多重真菌毒素的生物多樣性之研究等多方面，由於各種植物、動物和人的疾病中主要引起真菌毒性，主要是由 *Fusarium*、*Aspergillus* 和 *Alternaria* 屬的 3 種真菌，這 3 屬包括能生產許多有毒次要代謝物之真菌毒素的病原，它們混雜了多種不同的機制並在不同的條件與環境之下產生多種混合的真菌毒素，因此在各種不同的 agro-eco 系統裡所存在不同的環境狀況，因為不同的條件能影響與這些作物相關的真菌的種類，具有特別的生物多樣性的植物種植與培育，真菌與植物的相互作用和產生的二級代謝物包括真菌毒素的生物作用，也引起許多研究的興趣。例如小麥和玉米就是會在不同的環境狀況下，產生不同複雜而且種類不同的真菌毒素，並且引起的疾病的有毒真菌的二個重要的作物，所以在了解產毒真菌的相互作用和進行彼此既適合風險估

計又適合控制與歸約策略至關重要，因此在歐洲進行極其重要的工作計畫 FP7(www.mycored.eu) MYCORED，是一項相當大的合作的計畫，其主要目標與任務即是促進整個科學團隊合作與相互連結的一個網路，為了優化並且努力適合研究產毒真菌，同時發展適合降低真菌毒素在主要作物上的污染，提出合理策略與解決辦法。

而目前在真菌毒素之檢測方面已經由單一液相層析方法轉向多重液相層析法，並且都朝著質譜分析方式提升整個檢驗策略與檢驗層次，配合前端有效的前處理加上後端多重液相層析質譜分析是目前的整個趨勢與走向，但是目前在前處理方面，雖然在樣品處理上有數種不同方式例如 TTE、SPE、IFC 等多樣方法，但是以免疫吸附法進行前處理，是目前最有效去除基質干擾效應，達到去除雜質與純化檢測目標物質的方式，其缺點就是成本高，而後端的儀器分析目前則以液相層析質譜分析是最有效與精確，以滯留時間將目標物予以區隔外，並以精確分子量、母離子及破碎子離子精確確認化合物分子。因此前端的以免疫吸附法也隨著整個研究與分析潮流，研發推出多重以免疫吸附法之管柱，雖然目前所費成本偏高，但是卻可以大大提升檢測目標物種類及樣品前處理之淨化程度與專一性。

（三）重要之食因性疾病

彎曲桿菌屬細菌 *Campylobacter jejuni* enteritis 在開發國家的急性的腸胃炎的主要原因之一，Guillain- Barre syndrome (GBS)是在 *C. jejuni* enteritis 感染腸炎之後有時發生急性的神經肌肉的麻痺之最常發現的現象之一，以分子模擬分析人體與病菌之間之關係與互相作用機制，結果顯示神經節是神經組織主要表現細胞表面醣脂類之處，是革蘭氏陰性菌 *C. jejuni* 細胞外膜 lipo-oligosaccharides 的主要組成部分，透過有 GM1 和 *C. jejuni* 的兔子的致敏化分子模擬，建立 *C. jejuni* lipo-oligosaccharide 的疾病模型，將有助更進一步理解分子 pathogenesis 和 GBS 新治療的發展。*Campylobacter* spp 經常存在於為煮熟的食物上，例如生的禽畜肉，此種情形因為飲食習慣與文化的不同，我國由 *Campylobacter* spp 引起之食品中毒事件較歐美國家來得少。

另外在日本未確認原因的食因性疾病增加，再加上從 2003 年起連續爆發由於生食魚和

馬肉的食品中毒事件，也一直找不到致使食品中毒的原因，這種食因性疾病在進餐食用包括生的魚和肉類之後 2-20 個小時內發生，並沒有任何食品中毒之媒介物或原因物質如細菌、病毒及細菌的毒素或者有毒的化學物質在食品裡被檢出，經由流行病學調查研究分析與比對，結果顯示可能是由 *Paralichthys olivaceus* (橄欖比目魚) 與馬肉引起食品中毒，因此被推定認為此二個食品是原因食物。將 *P. olivaceus* 樣品進行 metagenomic DNA 的序列分析，顯示檢體中有 *Kudoa sepioides* 的存在，是 *P. olivaceus* 新發現的寄生蟲在哺乳動物試驗如小鼠會引嚴重的腹瀉水便現象 而在馬肉檢體中，以顯微鏡檢查發現有非常微小寄生蟲，也經由 DNA 檢驗證實係為 *Sarcocystis fayeri* 在兔子腸道的測試中引起帶血的腹瀉呈現陽性食品中毒現象。這些結果顯示此等寄生動物是屬於新發現證實於食品中引起疾病之原因物質。因為結冰和熱處理時這些寄生動物引起 de-toxication，生的魚和動物肉體的安全管理上是對寄生蟲列入對象是有相當必要的。所謂他山之石可以攻錯，雖然在台灣因為飲食文化多偏重於熟食料理，大部分經由高熱烹煮食品中，其條件不適合寄生蟲的生存，因此在估計台灣由食物傳送寄生蟲至人體而引起食品中毒之機會應該很低，但是，在食品安全衛生的管理上，由於異國文化的傳入，恐有不同飲食習慣的影響，仍然是一個值得參考與注意的重點。

Norovirus(NoV)，係屬於 Caliciviridae 的成員之一，是引起急性的腸胃炎的重要得因子之一，近年來在美歐與日本的食物中毒中逐漸受到重視。 NoV 可被分成 5 個 genogroups (G1~GV)，其中 GI、GII 和 GIV 等 3 型是主要感染人類的型別。 目前已經使用 capsid 基因區域(稱 capsid N/S 區) 的 5' 終點的核酸序列，建立一個 NoV 分類系統，此分類系統能容易把 NoV 清楚分成數個基因群，由於這些基因群具有抗原性(使用由基因重組之抗原和抗體 ELISAs 確定的病毒顆粒)非常符合，這個分類系統已經使 NoV 的全球流行病學監視變得容易，提供關於遺傳學和抗原的趨勢以及 NoV 演化的有用的訊息。不過，NoV 在 polymerase 的 ORF1 區域通常會經基因體的重新結合以及 capsid ORF2 交叉重組，專家估計 NoV 重新結合的頻率幾乎相同於的分裂的 RNA 病毒的程度，以流感病毒為例，最近報告 NoV 非架構的蛋白質 p22 會破壞細胞的蛋白質運輸系統，並且產生一種強大的 cytopathic effect(CPE)，透過

測量和比較不同的 CPE 可以使我們能更仔細檢查與了解 NoV 致病機制。

（四）微生物代謝物生物活性的研究

在多位專家演講中多會敘述研發一些具有關鍵性的篩選系統，尋找探討化合物的獨特的特徵，以及發現已經在生物醫學和科學的各種各樣的領域有的完全不同的影響。以非常著名的 Satoshi Omura 教授（日本 Kitasato 大學的 Kitasato 生命科學研究所）為例，Omura 教授對微生物的代謝物的研究在 1965 年於 Kitasato 研究所開始，在發現 mitomycin 的 Toju Hata 教授指導下開始進行，在他的研究中利用想出新方法隔離微生物並且發展新的而具有專一性的篩選的系統，在過去 45 年來已經針對 1500 個菌株研究，發展出 25 種化合物，已經被我們廣泛地使用在人和動物健康中的藥品和作為生物學的試劑。其中包括了 staurosporine (蛋白質 kinase 抑制劑)、avermectin (anthelmintic endectocide)、nanaomycin (antifungal 抗黴菌)、lactacystin (proteasome 抑制劑)、atpenin A5 (mitochondrial 複合體 II 抑制劑)以及 pyripyropene (Acyl-CoA 膽固醇 acetyltransferase 抑制劑)等。由於微生物生產的數量受到化合物和結構上的差異與及多樣化限制，因此為了更深入理解並且利用微生物生產代謝物的能力，對產生 avermectin 的 *Streptomyces avermectinius* (avermitilis) 進行基因組的完全解析，因此找到 37 個二次代謝物的生合成基因群，例如 polyketides、縮氨酸和 terpenoids 等，目前各界仍持續以新的遺傳學方法，進行非自然代謝物但卻有效的化合物生合成進行研究探討。

（五）疫苗的重要性

在 20 世紀期間，疫苗已經消除及控制了大多數疾病，但是如 meningococcus 和呼吸 syncytial 病毒(RSV)引起的疾病尚未能解決，因此談到 21 世紀的疫苗、醫學和公共衛生時，專家認為在 21 世紀接種疫苗的角色主要第一個目標將是為 meningococcal 腦膜炎發展疫苗，是或許最後一種疾病，在幾數小時能攻擊並且殺死健康的孩子和年輕人，以及會嚴重影響在初生的最初幾個月幼童的 RSV。幸好由於在過去 30 年期間開發的幾項革命性的技術，包括

接合作用，遺傳學和新佐劑的研究，目前在最後的階段征服 meningococcal 腦膜炎和並以新方法對 RSV 進行測試。疫苗接種的第 2 目標非常重要的，在 21 世紀將是注意這個世紀的全球健康問題，這些包括照顧人口老齡化，由於新疫苗針對典型老年人的疾病，在老化免疫的系統運作，另外為了控制新興抗菌抵抗，同時必須注意大流行的流感對新興的疾病影響，因此疫苗在 21 世紀仍將有增加的健康和安全，並且在健康將被視為一項重要的保險與保證。

（六）真菌污染與控制

在比較容易遭受污染的熱帶食品裡的真菌和其毒素的研究調查中，*Aspergillus* 是在熱帶和亞熱帶的最普通最常見的真菌菌屬，而其產生的 ochratoxin A 和黃麴毒素常存在於熱帶產品內，例如已經被世界各國報導的部分如咖啡、可可粉和巴西堅果。顯示出能生產這些毒素的真菌，在產品生產的某一些階段受到污染。多年來有許多在咖啡、可可粉、水果乾和巴西堅果等產品的研究，從各種不同的產品中分離到的菌株以 *Aspergillus section Nigri*, *Circumdati* 和 *Flavi* 的幾個種類為主，超過 2,500 株以上具有產毒性質的 *Aspergillus* 被分離出來，在可可粉以 *A. flavus* 是最普通的種類其次是 *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* 和 *A. nomius*，從咖啡樣品則是分離出超過 800 株真菌包括 *A. ochraceus*, *A. carbonarius* 和 *A. niger*，從巴西堅果中分離菌株以 *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* 為主，其中還包括了會產生黃麴毒素 B、G 的 *A. flavus* 和 *A. parasiticus*。以分子研究正進行比較這些不同起源菌株，從與可可粉分離的 *Aspergillus Nigri* 部分中，咖啡和水果乾，經鑑定 88.4% 為 *Aspergillus Nigri*、11.6% 為 *Aspergillus carbonarius* 的，儘管 *Aspergillus Nigri* 高的檢出率，但是只有 4.1% 會產生 ochratoxin A，而 91% 的 *Aspergillus carbonarius* 都會產生 ochratoxin A，而有關 fumonisin 產生的部分，僅有少數可可粉樣品被檢出，其初步的結果顯示 87.5% 產生 fumonisin B2，25% 會產生 fumonisin B2 與 ochratoxin A 但是 12.5% 不會產生 fumonisin 或者 ochratoxin A。

也有相關把玉米儲存在農場進行相關利用酵母菌等生物控制法研究儲存污染情形，在

2~5 個月中的實驗顯示產毒性 *Aspergillus* spp. 均未被檢出，其他一般的酵母菌如 *Candida* spp. (e.g. *C. quercitrusa*、*C. intermedia*、*C. leandrae*)、*Meyerozyma* spp. (*M. caribbica*、*M. guilliermondii*) 與 LAB (*Lactobacillus plantarum*、*Leuconostoc citreum*) 被檢出，顯示生物控制法競爭生存，亦屬於降低真菌污染可行方法。另外也有新的研究，利用 LAB 添加於飼料中，餵食家畜與家禽，藉以改善飼養家畜與家禽健康的增進，同時也減少飼料中抗生素的使用，有益於動物用藥的殘留改善與環境的保護。

針對有關飲料的變化的原因和正確的方法學也有一些研究與探討，和如何去降低污染的探討。防止變化的最好的方法是控制污染，監控進來的成分(例如液體增甜劑、果汁、水果濃縮汁等等)對於 HRM (heat-resistant fungi) 來說是必要的處置。但也必須使用正確的方法，例如就算是空的包裝瓶子必須加以監控，研究顯示空瓶子有時高達 2.5% 的比率會含有囊孢子，空氣和環境也應該被經常監控，必須執行適當和有效的衛生計畫，同時搭配正確的使用殺菌消毒。

另亦有針對真菌在重要的食品上增長的溫度，pH 值和水活性的影響進行調查 28 種不同的菌株。成長率透過測量經過一段時間後的菌落直徑。生長曲線被使用岡珀茨方程式計算轉換，每種真菌的最小，最佳和最大的 A_w 、pH 值和溫度的加以評估，希望藉由這些結果與參數，有助於做為改進食品的儲存期限和安全，提出與發展更好的策略。

真菌可以導致食品發生幾種變化，包括產生不同味道、產生真菌毒素，失去果色和腐爛等， A_w 、pH 值、溫度等因素將會導致決定真菌產生有不同類型的變化與發展。另亦有針對真菌在重要的食品上增長的溫度、pH 值和水活性的影響，進行調查 28 種不同的菌株，成長率透過測量經過一段時間後的菌落直徑。生長曲線被使用岡珀茨方程式計算轉換，每種真菌的最小、最佳和最大的 A_w 、pH 值和溫度的加以評估，希望藉由這些結果與參數，有助於做為改進食品的儲存期限和安全，提出與發展更好的策略。

以往人們認為乾燥性的食物可以保存較久，也較為安全，部分研究發現，在許多食物中毒事件中可以分離培養出病原菌，其中又以沙門氏桿菌屬之病原菌為最多，一般乾燥食物之 A_w 小於 0.85，不同病原菌對低含水量的耐受度不同，*Staphylococcus aureus* 最不耐沒

有水分， $A_w < 0.58$ 就無法生存，大部分微生物包括真菌與酵母菌等，都約需 $A_w > 0.5$ 以上，在乾物中的沙門氏桿菌屬造成的中毒，其中毒劑量較低，但依然值得憂慮與注意，以往案例仍然發生許多食品中毒事件，民眾值得注意與防範。

（七）食品微生物

乳酸細菌(LAB)或者 *Lactobacillales* 屬於 *Firmicutes* 門，為格蘭氏陽性菌，其中 DNA 內 G+C 含量較低(一般指少於 55 mol %)，目前 LAB 分布於 38 屬中，即使在同屬和同種內，各都有完全不同 phylogenetically，例如同一屬方面 *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Enterococcus*、鏈球菌、*Leuconostoc*、*Weissella*、*Oenococcus*、*Pediococcus*、*Tetragenococcus* 和 *Carnobacterium* 等都與食品及環境有關，並且這些 LAB 的一些種類在不同的食品之發酵作用中扮演重要作用。並且特別的是 *Lactobacillus* 屬、*Enterococcus* 屬和 *Streptococcus* 位於小腸的部位，形成一主要組合體，雖然在總菌相裡的相對算起來只有一小的部分。與人體有關腸胃道健康的研究方面，因為在人道技術限制下，想要解開 LAB 的角色和在人體內外之差異，仍然被限制進行研究。LAB 有主要有利的功能(例如消化，營養物的吸收)，刺激免疫的系統，對病原體，免疫的回應，以及腸的 angiogenesis 的刺激生成的防衛。因此筆者認為食品微生物的領域目前約可分成二群，一群是研究有益菌，另一群則針對有害之病原微生物研究，面對越來越頻繁的人與人接觸，更忙碌的工作，均需要一些營養補充物質，或對體質進行調解，引此乳酸菌與其他益生菌的研究分別又加深也加廣。

日本有兩個食因性疾病監視系統，一是食因性疾病的數據收集，另一個是為傳染病管制。食因性疾病的報告首先由當地保健中心醫生通知，再由當地保健中心的食品檢查員進行調查發生疾病的原因食品，調查結果會送到地方政府的主要辦公室，向上級報告，最後資料與數據被送至給衛生勞動福利部。

食因性疾病是因為食品和飲料引起的疾病，引起食因性的主要原因有微生物類，例如病菌與病毒，有部分是化學製品，例如蘑菇、魚和有毒物質，大部分食因性疾病都是由微生物所引起，微生物引起食因性疾病大多數是 *norovirus*，日本在近十年 *norovirus* 食物中毒的病例達到最高峰，由每年有 250 到 500 位病患，病患的數量增加到每年 8000 到 27000 位

病患。另外一種食因性疾病就是第 2 高的 *C. jejuni* (彎曲桿菌屬細菌) 排名為。這兩種病原菌的媒介食品非常難被控制，例如 *norovirus*，病原會被從人的手部轉傳到另一人，很少的數量即能引起 *norovirus* 疾病。但是彎曲桿菌屬細菌的食品中毒，大多是由於雞肉肉品為媒介引起之食媒性疾病，在一些農場超過 80% 的雞感染上彎曲桿菌屬細菌，並且雞肉在雞肉加工廠裡亦被彎曲桿菌污染。沙門氏菌以及 *Vibrio parahaemolyticus* 的病例，在日本在是引起食因性疾病的主要微生物，引起沙門氏菌中毒則是主要發生在蛋裡的 *S. Enteritidis*，日本政府規定出售蛋必須貼日期標籤的才賣給消費者，而以弧菌屬為例 (*Vibrio*)，消費食用的生海鮮 *Vibrio* spp 期限量不得超過 100 cfu/g，都是日本政府為防治食品中毒的措施。

(八) 新的微生物檢測技術

多位學者介紹其工作領域上一些新發展的分析技術，基本上都是走分子生物路線，筆者認為分成 Genomics 與 proteomics 兩個領域在前進，但是並非一定是兩條線性發展，同一個實驗室或單位，也有可兼備二種技術，目前在 genomics 最先進技術莫屬於 next generation sequencing (NGS)，而全球現在也有重要要的四或五家知名廠牌，但是各家有相似處也有因為專利權或營業秘密，各自有其讀到之處，例如 AX 公司就是以小片段 (約 100 bp 左右) 執行定序，再將進行小片段連接排序與比對等工作，另外 SX 公司則是以大片段 (3000 bp 左右) 進行定序，減少連接排序與辨認的工作，但是就會有進行長片段的不準問題，以另外 polymerase 去解決等，也有號稱具 one cell sequencing 能力的技術與儀器，其特點就是 non-amplification，不再利用放大功能，放大會有出錯的機會發生等等，因此各實驗室必須去評估各自的需求，技術能力和未來發展，此外應用 MODLI-TOF 技術，加上微流進樣技術與特殊 detector，進行 proteomics 研究微生物的 phenotype 和 metabolic-regulation 等研究探討，但是也可利用 proteomics profile，成為鑑別之有效技術。同時也又另一種技術結合 PCR-MASS 功能，其工作速率不錯但是其 database 現在仍偏屬少的，也有學者利用 2 部以上 NGS 進行分析，遇到 DNA loop 或強鍵結無法打開，則以不同水解或 adapters 進行分析。多種技術分析與相比較，研究人員除了要有利器外，仍要有深遠的思維，才能發揮這些儀器與技術。

（九）國際合作

本次研討會中在演講方面主要論述利用 LC 與 LC/MS/MS 去檢驗真菌毒素，並沒有實際探討或實驗的流程、架構、標準品、SOP、管柱、溶劑...等等實驗室裡的種種的工作情形，大會另安排的壁報論文時間，倒是給實驗室工作者有實際接觸討論的機會，此次真菌毒素壁報論文區共計有 17 篇，其中有 9 篇是與真菌毒素檢驗分析相關的，其他則是探討真菌毒素病理方面的研究，筆者工作團隊亦提出壁報論文乙篇，題目為「Simultaneous determination of multi-mycotoxin in cereals Using LC-MS/MS」(壁報論文編號是 MY04-10)，本論文總共可以同時檢測 11 種真菌毒素，是本次可以同步檢測真菌毒素品項最多的論文，一直都有許多專家詢問並交換意見，也有很多來照相拍攝本局的壁報論文，希望帶回去當參考資料，所以目前在真菌毒素檢測這一方面的方法開發，本局目前還算趕得上世界潮流，應該繼續維持迎頭趕上，有助於維護國民健康，保障民眾食的安全，其間並與各國專家交換意見，獲益良多。

會中並且認識來自日本 NIHS 的專家，除了就檢驗技術與檢驗品項等交換資訊與經驗，同時了解未來真菌毒素檢測會漸漸擴大檢驗品項以及相關之衍生物，同時日方亦對本局本次發表之壁報論文相當注意，一在詢問相關之淨化與質譜參數等實驗重要細節，並且邀請筆者參加由 NIHS 辦理之真菌毒素 DONs 檢驗方法實驗室比對研究(co-laboratory study)，筆者欣然表示願意參加方法研發之共同實驗，以提升本局在檢驗方法研發之能力與範圍，來自義大利的是全球真菌學會組織的副會長，義大利真菌學會會長，他表示之前有收到筆者之電郵，非常樂意接受我方派員赴義大利研習真菌毒素檢驗技術，目前不論在歐盟或全球，義大利之食品真菌毒素檢驗，無論在檢驗的淨化處理或是儀器分析乃居龍頭領先之地位，應持續與其保持聯絡多多請益，解決技術疑難，以提升我們的檢驗技術。

心得及建議

1. 筆者非常幸運承蒙本局出國經費之補助，參加此大型之國際研討會，增廣見聞，受益良多。深覺新科技與高解析度之儀器，在檢驗與研究未來將扮演愈來愈重要之角色，不論在食品生物技術或是食品化學等領域皆然，也可預期將有愈來愈多真菌毒素檢驗方法及相關之淨化商品與技術問世。此行並與日本 NIHS 建立交流管道與參加 2012 年由其主辦之真菌毒素 DONs 實驗室共同研究。
2. 藉由多場專題演講及壁報展示，瞭解國際間在真菌毒素檢驗研究之最新研究發展趨勢，而本局亦有發表壁報論文報告，可實際應用於本局真菌毒素之檢驗與研究業務上。
3. 與多位真菌毒素檢驗研究之專家實際之討論，並瞭解各種檢測儀器之操作原理及方法，並建立聯絡管道以便日後切磋檢驗技巧及取得最新資訊。本次國際研討會筆者主要參加真菌研討會，惟該研討會尚包括細菌與病毒等不同領域，筆者建議本局可考慮將來可以派遣不同領域微生物工作(包括細菌、乳酸菌、真菌及病毒等)的同仁與會，加強國際合作與聯繫提升檢驗能量。
4. 整體看來，高解析度之質譜儀 LC/MS/MS 是國際間各實驗室普遍使用之真菌毒素檢測最重要工具，未來本局應首重此類儀器之操作技術訓練，另外許多種檢體之前處理技術等均有其優點，但是目前仍以免疫吸附層析管柱為最佳之選擇。
5. 本局也可考慮邀請國際間知名專家學者來訪，藉由專題演講讓更多局內同仁可吸取新知，並能建立聯絡管道。
6. 我國位處亞熱帶，農作物為我國重要之食品，真菌毒素檢驗技術相關研究與精進，實攸關國民健康之把關工作，此研討會是極佳的技術學習與交流平台，此次大會圓滿成功，不論在硬體設備或演講內容方面皆相當充實理想，未來由 IUMS 舉辦之國際真菌研討會，非常值得派員參加學習。



Simultaneous determination of multi-mycotoxin in cereals Using LC-MS/MS

Hsu-Yang Lin, Si-Chuan Wang, Chia-Ding Liao, Ying-Chun Chen, Lih-Ching Chiueh, Daniel Yang-Chih Shih

Food and Drug Administration, Department of Health, Taiwan

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that are capable of causing disease and death in humans and other animals. A multi-mycotoxin method was developed for the simultaneous determination of Aflatoxin B₁ (AFB₁), Aflatoxin B₂ (AFB₂), Aflatoxin G₁ (AFG₁), Aflatoxin G₂ (AFG₂), Fumonisin B₁ (FB₁), Fumonisin B₂ (FB₂), Deoxynivalenol (DON), Zearalenone (ZON), Ochratoxin A (OTA), T-2 and HT-2 toxin in cereals. Rice and maize were extracted with PBS and 70% of methanol, cleaned up using immunoaffinity columns and analyzed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with an electrospray (ESI) ionization interface. Using the positive ion mode, the parent ion and product ions of each mycotoxin were selected. The LC separation was performed using ACQUITY UPLC BEH C18 column with the mobile phase consisting of gradient program of water and methanol with 0.1% formic acid. Besides FB₁ and FB₂, the limit of quantification (LOQ) for most mycotoxins can be achieved below 5 ppb. Good recoveries were found among various mycotoxins, ranging from 74 to 116%. The coefficient variance (CV) was below 20%, indicating this method is reliable. This rapid and easy method was successfully developed as eleven mycotoxins could be analyzed in a single 9-min run. The method could be applied to routine cereal analysis.

Material and Method

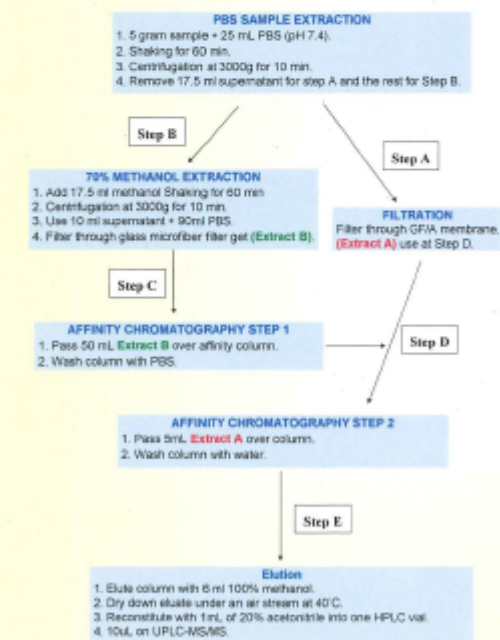


Table 1. Gradient programmer of the UPLC system

Step	Time (min)	Flow (mL/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Curve
1	0	0.3	95	5	6
2	5.5	0.3	15	85	6
3	5.8	0.3	0	100	6
4	6.9	0.3	0	100	6
5	7	0.3	95	5	6
6	9	0.3	95	5	6

Column : ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
Mobile phase A : 0.1% formic acid in water
Mobile phase B : 0.1% formic acid in MeOH
Flow rate : 0.3 mL/min

Table 2. MS/MS parameters for the determination of 11 mycotoxins in ESI+ mode

Analyte	Parent ion (m/z)	Cone voltage (V)	Daughter ion (m/z)	Collision energy (eV)	Ionization mode
AFB ₁	313	48	241	36	ESI ⁺
AFB ₂	315	46	259	28	ESI ⁺
AFG ₁	329	46	200	42	ESI ⁺
AFG ₂	331	48	189	42	ESI ⁺
FB ₁	722	58	334	44	ESI ⁺
FB ₂	706	44	336	36	ESI ⁺
DON	297	22	249	12	ESI ⁺
ZON	319	20	187	19	ESI ⁺
OTA	404	32	239	26	ESI ⁺
T-2	489	42	245	26	ESI ⁺
HT-2	447	48	345	20	ESI ⁺

Result

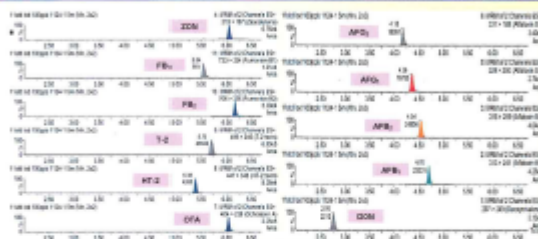


Fig. 1. MRM chromatograms of 11 mycotoxins.

Table 3. Recoveries, intra-day and inter-day repeatability data for the determination of 11 mycotoxins in rice and maize

(a) Rice					(b) Maize				
Concentration (ppb)	Recovery (%)	Intra-day precision (n=5) CV (%)	Inter-day precision (n=5) CV (%)		Concentration (ppb)	Recovery (%)	Intra-day precision (n=5) CV (%)	Inter-day precision (n=5) CV (%)	
Aflatoxin B ₁					Aflatoxin B ₁				
0.5	81.0 ± 4.2	6.2	-		0.5	77.0 ± 3.6	4.7	-	
1	82.0 ± 3.2	11.2	-		1	84.6 ± 16.3	12.3	-	
10	86.0 ± 10.2	10.3	8.1		10	84.0 ± 2.0	3.8	3.9	
Aflatoxin B ₂					Aflatoxin B ₂				
0.5	82.4 ± 11.9	16.0	-		0.5	82.0 ± 5.5	6.4	-	
1	84.0 ± 6.2	7.2	-		1	84.0 ± 6.6	7.8	-	
10	92.7 ± 14.3	14.0	4.9		10	81.7 ± 1.4	1.8	5.8	
Aflatoxin G ₁					Aflatoxin G ₁				
0.5	74.0 ± 3.7	5.0	-		0.5	76.1 ± 4.1	5.3	-	
1	75.1 ± 4.7	6.8	-		1	76.0 ± 2.3	3.8	-	
10	87.9 ± 6.0	6.9	8.1		10	81.7 ± 6.3	7.7	11.6	
Aflatoxin G ₂					Aflatoxin G ₂				
0.5	73.2 ± 3.8	4.8	-		0.5	74.2 ± 2.7	3.8	-	
1	75.5 ± 2.1	2.8	-		1	76.4 ± 4.1	5.2	-	
10	80.0 ± 4.4	5.8	16.8		10	79.3 ± 6.9	8.8	8.1	
Fumonisin B ₁					Fumonisin B ₁				
0.5	84.0 ± 2.7	4.4	-		0.5	77.4 ± 5.8	7.8	-	
1	71.7 ± 3.8	5.2	-		1	80.0 ± 4.3	5.1	-	
100	91.6 ± 11.0	12.0	8.9		100	76.0 ± 8.1	10.8	7.7	
Fumonisin B ₂					Fumonisin B ₂				
0.5	95.0 ± 5.9	6.0	-		0.5	71.4 ± 11.6	16.7	-	
1	98.8 ± 14.9	16.1	-		1	81.1 ± 8.3	10.2	-	
100	105.9 ± 11.1	10.7	7.9		100	81.2 ± 3.8	4.3	1.8	
Deoxynivalenol					Deoxynivalenol				
0	79.2 ± 4.8	6.1	-		0	76.9 ± 6.0	8.8	-	
20	73.0 ± 3.4	4.8	-		20	76.0 ± 2.8	3.8	-	
100	73.9 ± 4.0	6.1	10.1		100	77.3 ± 1.2	1.6	7.3	
Zearalenone					Zearalenone				
0	103.4 ± 7.3	7.1	-		0	88.1 ± 9.2	10.4	-	
20	86.7 ± 8.1	16.5	-		20	91.7 ± 7.9	8.8	-	
100	83.1 ± 3.0	4.2	8.1		100	116.1 ± 2.4	2.3	10.0	
Ochratoxin A					Ochratoxin A				
0.5	89.7 ± 13.3	14.0	-		0.5	76.4 ± 2.2	2.1	-	
1	75.5 ± 6.6	8.8	-		1	76.6 ± 10.9	14.4	-	
20	84.2 ± 6.0	7.1	8.3		20	83.1 ± 6.6	8.3	8.3	
T-2					T-2				
0	111.4 ± 3.2	2.7	-		0	46.2 ± 9.3	19.9	-	
1	116.7 ± 7.0	6.0	-		1	81.5 ± 6.4	7.9	-	
50	111.1 ± 11.0	9.8	8.2		50	88.2 ± 8.5	9.2	7.8	
HT-2					HT-2				
0	84.4 ± 5.3	6.8	-		0	141.2 ± 3.7	2.8	-	
1	84.1 ± 6.1	7.3	-		1	103.3 ± 1.8	0.8	-	
50	86.5 ± 7.8	9.0	8.6		50	116.2 ± 4.9	4.2	4.3	

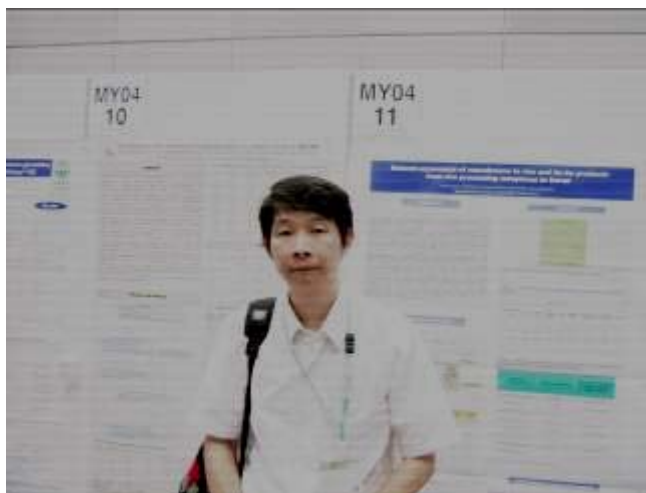
Conclusion

This multi-mycotoxin analysis method was developed for the simultaneous determination of 11 mycotoxins in rice and maize. With PBS and 70% of methanol for samples extracted, cleaned up using immunoaffinity columns and analyzed by UPLC-MS/MS for qualification and quantification. Besides FB₁ and FB₂, the limit of quantification for most mycotoxins can be achieved below 5 ppb. Good recoveries were found among various mycotoxins. The CV was below 20%, indicating this method is reliable. This method has a simple and user friendly protocol, require short analysis time, the approach is very sensitive and reliable, can simultaneously identify 11 most popular toxins in the cereals within 9 minutes. The method could be applied to routine cereal analysis.

照片



筆者在會議中心門口



筆者在海報區域，壁報論文編號是 MY04-10



會議中心演講廳專題演講