

出國報告（出國類別：研究）

赴日本食品總合研究所研習奈米食品 檢測分析技術

服務機關：行政院衛生署食品藥物管理局

姓名職稱：廖家鼎 薦任技士

派赴國家：日本

出國期間：99 年 6 月 6 日至 99 年 6 月 19 日

報告日期：99 年 8 月 2 日

摘要

奈米科技是近年來熱門的新興科技，本局現正執行為期六年的奈米國家型科技計畫。日本食品總合研究所(National Food Research Institute)位於東京北方的築波市，是獨立行政法人機構，現正執行由日本農林水產省(Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)主導的食品奈米科技計畫(Food Nanotechnology Project)。此行工作為就奈米食品之檢驗研究工作進行技術交流，在 6 月 6 日至 6 月 19 日之二週期間，主要在「食品總合研究所奈米生物技術工學實驗室」學習日本在奈米食品領域之最新研究技術，如掃描探針顯微技術、微奈米化研磨技術、奈米乳化技術與奈米安全性評估技術等，所學對於本局執行奈米國家型科技計畫幫助極大，與未來幾年的研究方向具高度相關性，可立即應用於相關研究工作上。也與杉山博士(Dr. Sugiyama)等相關主管人員建立友好關係，搭起台日雙方在此領域之連絡橋樑，與國際接軌。訪日期間適逢一年一度的「東京國際食品展暨奈米食品研討會」，藉由專題演講之聆聽，並與專家學者請益討論，成功帶回諸多實用資訊，獲益匪淺。

目次

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	5
心得與建議.....	12
照片.....	13

目的

本局現正執行奈米國家型科技計畫(2009 年至 2014 年)，由於尚在起步階段，此行目的為學習日本在奈米食品領域的發展方向。由日本農林水產省(Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)主導的食品奈米科技計畫(Food Nanotechnology Project)，執行期間為 2007 年至 2011 年，約有 20 個實驗室一同參與，多在日本食品總合研究所。其中的計畫主持人杉山博士(Dr. Sugiyama)，二年前曾應本局邀約來台演講，也建立本局與該所之友好關係。此行即透過杉山博士之安排，參觀日本食品總合研究所內執行食品奈米科技計畫的多間實驗室，藉此了解日本這幾年在此領域之研究成果，從中學習到之相關技術，有助本局執行奈米國家型科技計畫之參考。二星期考察期間，也認識多位日本奈米食品研究領域之著名教授與實驗室主管，建立聯絡管道，也是此行之重要目的。此外，參加一年一度的東京國際食品展暨奈米食品研討會，蒐集許多與本局業務有關之資訊，攜回有實質助益的書面資料。

過程

本局與日本食品總合研究所(National Food Research Institute, NFRI)在過去幾年已有一些交流互動，本局曾多次派員前往學習「基因改造食品」之研究檢驗技術，並成功將所學帶回局裡，實際應用於檢測業務上，也奠定本局在國內基因改造食品檢測之領導地位。除了基因改造食品之外，奈米食品是另一重要之新興科技，有鑒於日本食品總合研究所在奈米食品領域已有許多研究成果，本局林旭陽科長在 2008 年 10 月曾邀請杉山博士(Dr. Sugiyama)至本局演講，分享其執行日本國家型食品奈米科技計畫之成功經驗，同仁皆獲益良多。本次筆者有幸獲奈米國家型計畫業務費補助，前往日本食品總合研究所短期研習二週，學習奈米食品之相關研究檢驗技術，了解該所跨實驗室之研究成果，同時延續本局與該所之友好關係，建立兩者間之溝通聯絡管道。

筆者於 6 月 6 日抵達東京成田機場之後，轉乘近 2 小時的巴士至東京北方的築波市(Tsukuba)，再搭乘杉山博士的車子進入食品總和研究所。築波市是日本的研究重鎮，舉凡工程、農學等不同領域之研究機構林立，散佈在築波研究園區內。當車子駛入研究園區內，令我驚訝的是眼前廣大的園區與美麗的風景，諸如農村工學研究所、農業生物資源研究所、食品總合研究所、動物衛生研究所、畜產草地研究所、作物研究所、森林總合研究所等各個獨立行政法人機構，井然有序地林立在道路兩旁，各研究所又自成一區，例如食品總合研究所內就有 17 棟研究大樓，如研究本館、食品物理機能實驗棟、GMO 實驗棟、微生物代謝產物實驗棟、食品技術開發實驗棟與食品安全實驗棟等，筆者此行主要待在複合領域研究棟。

日本食品總合研究所之前身是米穀利用研究所，成立於 1934 年，自 1972 年開始更名為食品總合研究所，自 2006 年 4 月開始在編制上隸屬於 NARO(National Agriculture and Food Research Organization)，現共分為七大研究領域，包括(1)食品機能研究領域 (2)食品安全研究領域 (3)食品分析研究領域 (4)食品素材科學研究領域 (5)食品工學研究領域 (6)微生物利用研究領域 (7)食品生物科技研究領域等。其中食品工學研究領域又細分為 8 間實驗室，分別為製造工學實驗室、反應分離工學實驗室、計測情報工學實驗室、流通工學實驗室、食品包

裝技術實驗室、食品高壓技術實驗室、先端加工技術實驗室與奈米生物技術工學實驗室等，筆者此行即待在奈米生物技術工學實驗室，在其實驗室負責人杉山博士之安排下，跟隨實驗室同仁學習奈米食品之研究檢驗技術。

由日本農林水產省(Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)主導的食品奈米科技計畫(Food Nanotechnology Project)，執行期間為 2007 年至 2011 年，約有 20 個實驗室一同參與，多在日本食品總合研究所。由於今年已是計畫執行的第 4 年，研究成果豐碩，筆者在二週期間拜會多間實驗室，除奈米生物技術工學實驗室的杉山滋博士與小堀俊郎博士之外，還見了食品工學研究領域長五十部誠一郎博士、先端加工技術實驗室的植村邦彥博士與小林功博士、製造工學實驗室的岡留博司博士、流通工學實驗室的椎名武夫博士、反應分離工學實驗室的龜原昌司博士、計測情報工學實驗室的杉山純一博士、食品機能研究領域的石川祐子博士與渡邊純博士、食品安全研究領域的中川博之博士、動物衛生研究所的山中典子博士等，聽取各實驗室主管的研究成果簡報，看了主要的研究設備，在短時間內吸收許多新知。將此行所學分類敘述如下：

一、原子力顯微鏡觀察

如何準確的量測奈米材料之粒徑大小是研究奈米科技最重要之課題。動態光散射法(dynamic light scattering, DLS)是量測奈米微粒最常使用之方式，優點為儀器價格較便宜、量測速度快、不需特別前處理、機型選擇性多等。製造廠商已將散射原理所涉及之複雜運算整合至系統內建軟體中，單一樣品之分析時間僅需數分鐘，量測能力已可達 1 nm 左右。動態光散射之原理係利用雷射光射入含有粒子的溶液中，散射之雷射光會因粒子在溶液中會有不規則的布朗運動(Brownian motion)而產生波動(fluctuation)小粒子運動及擴散速度快，造成高頻率之擾動；大粒子運動及擴散速度慢，造成低頻率之擾動。通常用相關器(correlator)分析散射光強度之擾動訊號，可得散射光強度之自身相關函數(self-correlation function)，進而得知粒徑大小。本局去年添購一台 Malvern 公司的動態光散射粒徑分析儀，使用情況良好，本次在食品總合研究所亦看到相同型號的機種。

除了動態光散射法之外，顯微鏡觀察也是常用之粒徑分析方式，因為奈米微粒極易因為凡得瓦爾力之作用而聚集(aggregation)，動態光散射法得到之平均粒徑數據可能因為微粒聚集而失真，此時即需要以電子顯微鏡觀察，才能看到較真實的全貌。常見之電子顯微鏡有掃描式電子顯微鏡、穿透式電子顯微鏡及原子力顯微鏡等，食品總合研究所內皆有上述電子顯微鏡，尤其光在奈米生物技術工學實驗室內就有數台原子力顯微鏡，此行學習了相關檢驗技術。

原子力顯微鏡(atomic force microscope, AFM)係利用一根特製的探針來觸探物體的表面形貌，因為針尖的尺寸就是奈米等級，所以得到的物體表面形貌便具有奈米等級的解析度。主要原理係藉由針尖與試片間的原子作用力，使懸臂樑產生微細位移，以測得表面結構形狀，其中最常用的距離控制方式為光束偏折技術。特點為解析度可達原子等級。奈米生物技術工學實驗室內之原子力顯微鏡是德國 JPK 公司所生產，由於量測時容易受震動與聲音干擾，因此在實驗室中另自行訂做木製隔間，將原子力顯微鏡置於隔間內，電腦連線到隔間外操作。視野下 X、Y 軸之最大軸距為 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ，Z 軸即樣品高，通常不得高於 $1\ \mu\text{m}$ 。樣品須先經特殊刀切片成非常薄之薄片，用類似接種環之工具將已漂浮在液體中之樣品撈起，沾在載玻片上觀察。AFM 操作模式可區分為接觸式(contact)、非接觸式(non-contact)及間歇接觸式(或稱輕敲式, intermittent contact or tapping)三大類，食品總合研究所是屬於間歇接觸式，探針尖端直徑僅 $20\ \text{nm}$ ，其原理係將探針與樣品距離加近，然後增大振幅，使探針在振盪至波谷時接觸樣品，由於樣品的表面高低起伏，使得振幅改變，再利用類似非接觸式的迴饋控制方式，便能取得高度影像。

食品總合研究所利用 AFM 進行許多奈米生醫方面之研究檢驗，例如量測 DNA 與 chromosome 之尺寸，獲得一些三維影像資訊；觀察澱粉顆粒內部之奈米微細結構，發現新的構造，推測與支鏈澱粉分子有關；利用 AFM 檢測食品過敏原，量測 antibody-fixed cantilever(懸臂)與 allergen (sample) fixed substract 之間的交互作用力，若樣品含有過敏原，會與懸臂上之抗體結合，產生交互作用力(單位：nN)，藉此可在數分鐘內檢測食品中過敏原。筆者也實際練習用 AFM 進行 DNA 與 chromosome 之尺寸量測，確實觀察到高解析度之細微影像。

食品總合研究所在掃描探針顯微技術(又稱走查型探針顯微技術，Scanning Probe Microscopy, SPM)上確實下了很多工夫，除了 SPM 中的代表儀器 AFM 之外，該單位也自行

組裝了一台走査型近接場工學原子力顯微鏡(SNOM/AFM, scanning near field optical/atomic force microscopy)，也是一種兼具「掃描機制與動作」與「微細探針機制」的顯微技術，解析度遠優於傳統光學顯微鏡，應用在奈米生醫相關研究上。

二、奈米研磨技術

製造工學實驗室的岡留博司博士負責執行奈米食品計畫中的「微奈米化穀類製程開發」。由於日本的主食是白米，該實驗室選用米粉(rice flour)做為研磨材料，研磨方式則比較落地型 hammer mill 與 jet mill。研究發現 jet mill 之研磨效果優於 hammer mill，jet mill 可得到平均粒徑 3 μm 之 rice flour，hammer mill 則只能研磨到 50 μm 。以動態光散射粒徑分析儀分析研磨後樣品之粒徑分佈，jet mill 之粒徑分佈較集中，表示其研磨均勻度佳。此研磨方式外接冷卻槽，防止研磨過程中產生之高溫影響產品品質。研磨原理並非靠研磨介質作用，而是粒子間之碰撞與粉碎。樣品自機器上方入料，側邊有高速壓縮氣體將樣品帶進碰撞室(crushing zone)，內設有陶板。以物性測定儀分析之結果，3 μm 之 rice flour 的流動性等物性已大大改變，期能改變其風味、口感。該實驗室並將 3 μm 之 rice flour 送至奈米生物技術工學實驗室作 AFM 觀察，另送至食品化學實驗室進行黴菌毒素之檢測，也送至動物衛生研究所進行安全性評估，顯示此群體計畫是跨各領域實驗室共同完成的。

有別於食品總合研究所的「乾磨法」，本局今年以「濕磨法」進行相關研究，兩者同樣屬於由上而下(Top-down structuring)之製備方式。濕式研磨分散設備是利用機械力帶動研磨介質，使研磨介質產生高能量密度的撞擊及剪切力將微粒微細化及分散。濕式研磨法之優點為簡單、快速、操作過程較安全，但有研磨濃度限制、產品應用較窄等缺點。在各種研磨介質中，具有高硬度及抗耗損性之鈮鋯珠 (Yttria-stabilized zirconia grinding media)，是最被廣泛使用者。研磨介質之尺寸已進展到 0.3 mm 以下。本局已能成功製備出平均粒徑 200 nm 以下之奈米鈣與奈米珍珠粉水懸浮液，此行學習到食品總合研究所的乾式研磨技術，未來有機會可在本局測試。

三、奈米乳化技術

食品總合研究所先端加工技術實驗室的小林功博士自行開發出一套微奈米乳化油滴生產裝置。奈米乳化液滴廣泛應用於奈米生醫產品、化妝品與食品等，是研究奈米技術之重要課題。傳統多用機械式乳化裝置(如高速均質機)，優點為可大量生產，缺點為乳化油滴(droplet)尺寸分佈不易控制、耗費能量大。食品總合研究所發展出「微通道乳化裝置(microchannel emulsification)」，優點為耗費能量小、乳化油滴尺寸大小容易控制、可生產monodispersed emulsion。從早期的grooved MC array進展到最新的straight-through MC array，乳化油滴產量大幅提升。裝置上主要有一塊 40×40 的MC emulsification device，上有 4 個straight-through MC array與 2.2×10^5 個channel，溝槽通道之寬度極窄(微米等級)，黃豆油滴自裝置下方的through-hole冒出，經由水層往上至油層穿出，過程中藉由許多小的方形檔板作用，使其能產生大小均一之乳化油滴，平均粒徑 $30\mu\text{m}$ ，變異百分比(CV%)小於 4%，產量 50 g/hr。乳化油滴在continuous phase可藉由gentle crossflow之作用被收集出來。顯微鏡下可發現此裝置確實可生產大小均一、呈正圓形之乳化油滴，效果較均質法(homogenization)好很多。小林功博士指出此裝置已成功應用在業界生產上。

四、微奈米氣泡

氣泡在日本食品工業上之應用在提升產品之外觀、組織、口感、消化性等，有研究指出粒徑愈小之氣泡，能提供之特性愈佳。微奈米氣泡是一項非常新穎之研究。食品總合研究所流通工學實驗室的椎名武夫博士發展微奈米氣泡之製作方法，主要有機械攪拌(mechanical agitation)與超音波(sonication)兩種方式。機械攪拌是在 4000 rpm下作用 10 分鐘，超音波法則是利用 0.5 英吋的ultrasound probe於 300W下作用 3 分鐘。氣泡尺寸量測方式有雷射粒徑分析儀與電子顯微鏡觀察，其中雷射粒徑分析儀之量測範圍介於 0.03 至 $1000\mu\text{m}$ ，有單一光源(680 nm)與單一光學系統，可得到每一秒中即時(real-time)的粒徑分佈資訊，樣品槽中的樣品靠著幫浦與攪拌器之作用，循環、分散於槽中以利量測。電子顯微鏡觀察時，使用特殊capsule將氣泡包起來，使氣泡保有原形狀進行觀察量測。結果發現超音波法優於機械攪拌法，其氣體滯留量(gas hold-up)較大、氣泡尺寸較小、界面面積較大。單位氣泡數之比較，超音波法之產

量為 $90 \times 10^5/\text{mL}$ ，機械攪拌法之產量為 $20 \times 10^5/\text{mL}$ ，超音波法之效率較高。試驗中也發現添加界面活性劑—soybean oil-based polymeric biosurfactants與電解質有助提高微奈米氣泡之穩定性與表面活性。商業化應用仍在起步階段，目前氣泡尺寸大約可做到 $100\mu\text{m}$ 左右。

五、安全性評估

安全性評估部分是由食品總合研究所委託給動物衛生研究所(National Institute of Animal Health) 進行，此行也透過食品總合研究所的杉山博士聯繫，得以前往動物衛生研究所拜訪實驗室負責人山中典子博士，聽取其簡報並參觀其動物實驗室。目前動物衛生研究所針對奈米化 β -胡蘿蔔素(β -carotene)已完成安全性評估試驗，結果是安全無毒。奈米化 β -胡蘿蔔素分別以下列不同方式製備：(1)高壓均質法：平均粒徑約 200 nm ；(2)乳化蒸發法：平均粒徑 67 nm 。以 6 週齡大的 SD 大鼠進行安全性評估，結果發現餵食奈米化 β -胡蘿蔔素之大鼠在血液生化分析與病理切片觀察之結果與控制組相比並無差異，不同製備方法與平均粒徑之組別亦無差異，表示奈米化 β -胡蘿蔔素並無毒性。食品總合研究所亦進行奈米化 β -胡蘿蔔素之功效性評估，先以腹腔注射 *D*-galactosamine (800 mg/kg bw)之方式誘導大鼠肝損傷，24 小時後以胃管餵食方式給予奈米化 β -胡蘿蔔素(1 mg/kg bw)，於 1、3、6 小時後分別犧牲大鼠，採集血漿與器官，分析肝臟中抗氧化酵素活性，如 glutathione peroxidase、superoxide dismutase 與 glutathione S-transferase，並分析 lipid peroxide 含量。結果發現平均粒徑 67 nm 之奈米化 β -胡蘿蔔素之組別的肝臟中抗氧化酵素活性較高、lipid peroxide 含量較低，表示抗氧化活性較佳，可能是吸收較佳所致，因為奈米化組別的血漿中 β -胡蘿蔔素與 retinol 含量較高。本局目前亦進行奈米鈣的安全性評估，正進行體外 Ames test 與細胞基因毒性分析，未來也會參考食品總合研究所的作法，進行大鼠餵食試驗已完成更完整之安全性評估。

六、吸收率評估

奈米化食品之吸收率評估也是重要的研究項目，因為尺寸效應、表面積效應、奈米乳化作效或是藉由奈米載體之攜帶，皆有可能使奈米食品在體內之吸收率提高。目前許多商業化

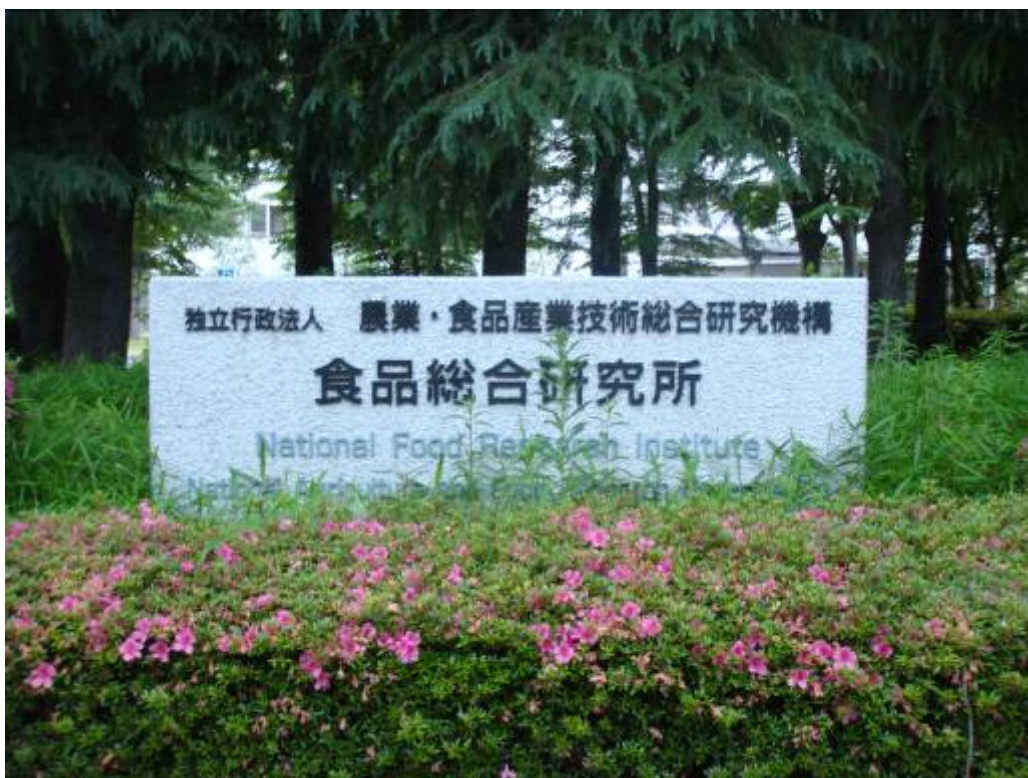
產品，如牛乳中的奈米鈣及奈米鐵，主要訴求點也是吸收較佳。近年來除了動物模式之外，以 Caco-2 細胞單層膜模式評估化合物之生物可利用率亦為廣泛被使用之方法。Caco-2 cell line 是一株由人類結腸腺癌（Human colon adenocarcinoma）所分離出之細胞株，其是以表面吸附之方式生長，經適當培養可表現出體外型態學上及功能上之分化。在培養過程中，隨培養天數之增加，細胞逐漸分裂增生，直到細胞長至滿盤後，細胞與細胞之間會分泌蛋白質，形成緊密的連結(tight junction)，漸呈現單層膜(monolayer)之型態。此時細胞上下層被區分開，物質的通透必須穿越細胞膜進入細胞到另一端，無法經由 tight junction 穿越細胞。Caco-2 具有分化之特質，當 tight junction 形成，細胞自發性分化，表現出成熟腸道之特性，如細胞極化(polarization)、具微絨毛刷狀緣(brush board)、分泌消化水解酵素(microvillous hydrolase)等。由於其容易取得且培養方便，目前已廣泛被當作探討藥物通透性與生物可利用率之體外模式。

食品機能研究領域的石川祐子博士與渡邊純博士利用 Caco-2 細胞單層膜模式評估化合物之吸收率，本局目前亦著手規劃此方面之試驗，因此剛好藉由此難得之機會與對方請教以 Caco-2 細胞單層膜模式評估吸收率之方法，雙方相談甚歡。食品總合研究所的作法是先製備包含機能性化合物類黃酮 flavonoids 之奈米等級 vesicles，平均粒徑可小至 50 nm，為 lipid bilayer。接著將此奈米類黃酮(hesperetin)添加到已事先培養 21 天形成之 Caco-2 細胞單層膜上，模擬在人體小腸中之吸收情形，30 分鐘後分析通透過 Caco-2 細胞單層膜之 hesperetin 濃度，計算通透率(permeability)。研究結果發現奈米類黃酮之吸收情形確實較佳。

心得及建議

- (一) 奈米科技是重要之新興科技，奈米食品在全球之研究發展尚屬起步階段，但可預期未來勢必是非常熱門之領域。此行有幸承蒙本局出國經費之補助，拜訪全世界少數研究奈米食品且具規模之機構—日本食品總合研究所，在 2 週期間內參觀多間實驗室，聽取各項研究成果並學習相關技術。日本食品總合研究所執行日本國家型奈米科技計畫之成功經驗對於同樣正在執行國家型奈米科技計畫的本局而言，幫助極大。尤其在奈米材料之製備、粒徑量測技術、原子力顯微鏡觀察技術、安全性評估、吸收率評估等方面受益良多，可實際應用在未來執行國家型奈米科技計畫之工作上。
- (二) 本局可持續充實奈米食品與奈米生醫研究檢驗方面之實驗室設備，購買原子力顯微鏡等相關儀器，以增強研究能量。
- (三) 此行與杉山博士(Dr. Sugiyama)等食品總合研究所相關主管人員建立友好關係，搭起台日雙方在奈米食品研究領域之連絡橋樑，與國際接軌。日後可邀請對方來台演講，分享最新研究成果，也可持續讓本局同仁至食品總合研究所學習相關技術。

照片



食品總和研究所門口



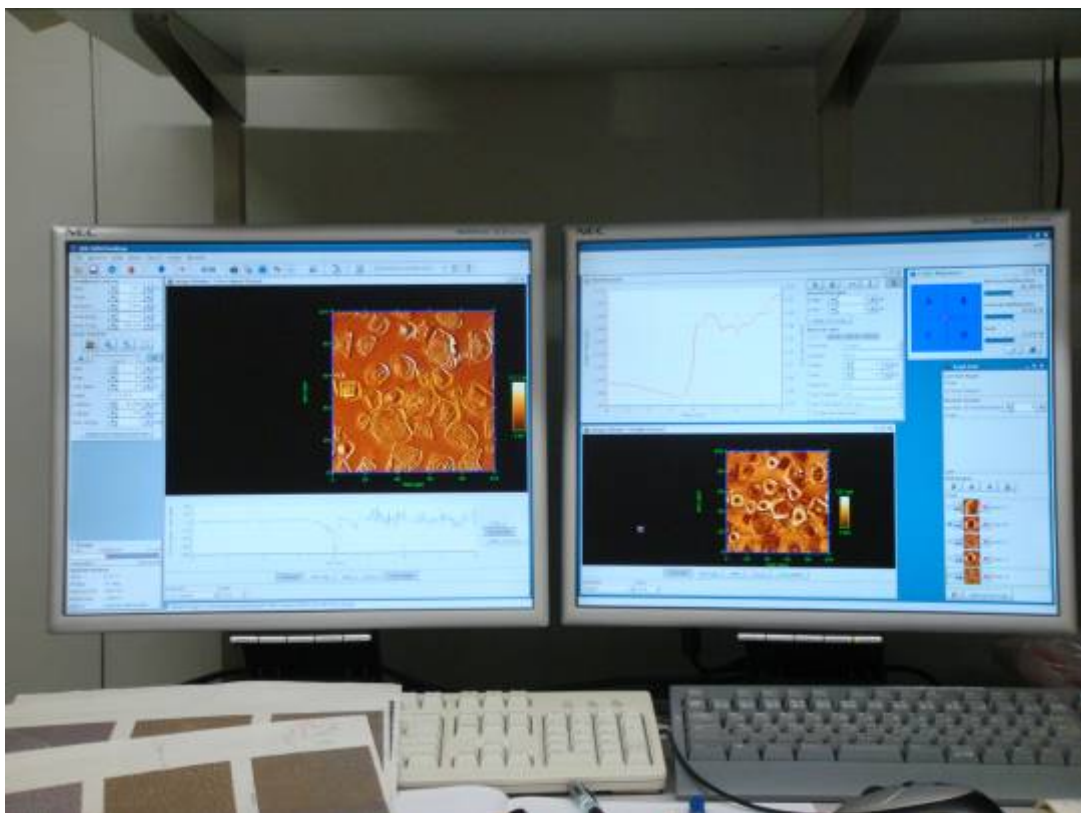
與實驗室同仁合影



jet mill 研磨機外觀



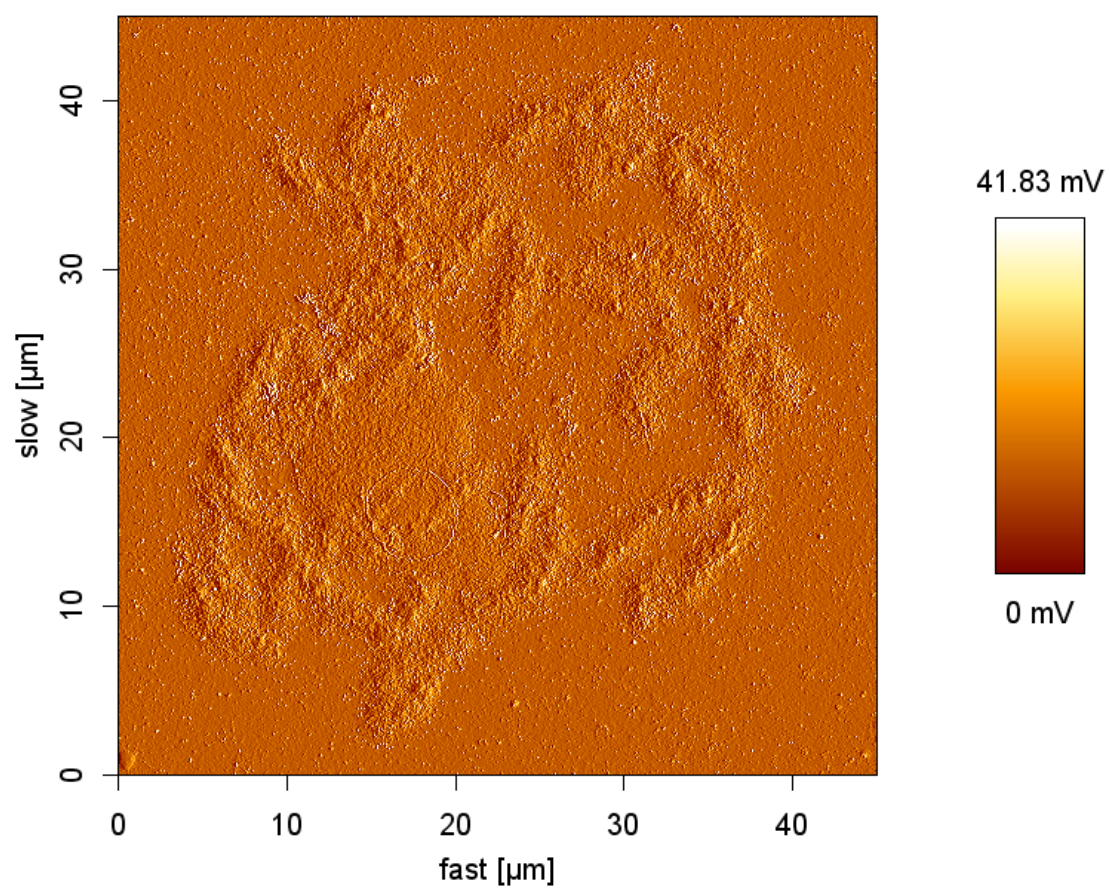
擺放原子力顯微鏡之木箱



原子力顯微鏡

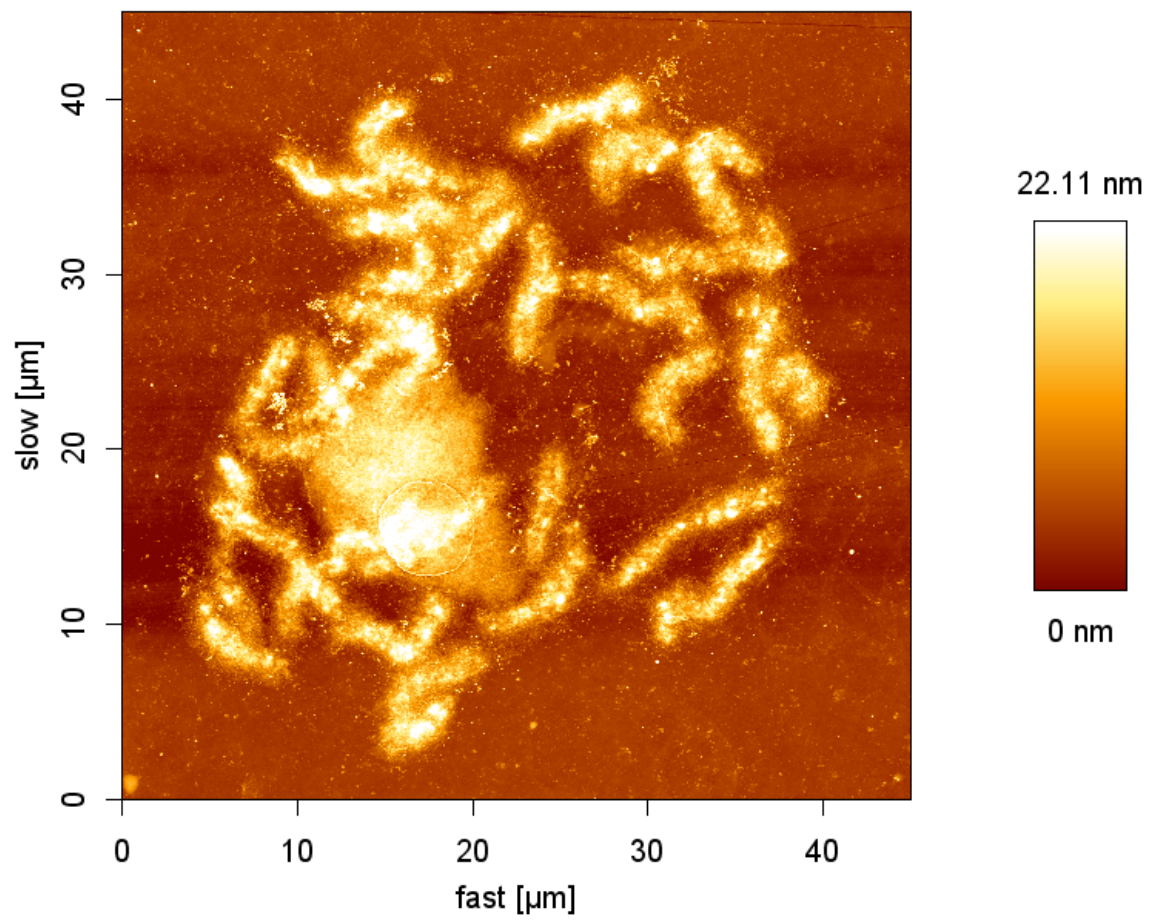
Channel: Error signal; trace

Filename: save-2010.06.15-05.16.17.jpk



Channel: Height; trace

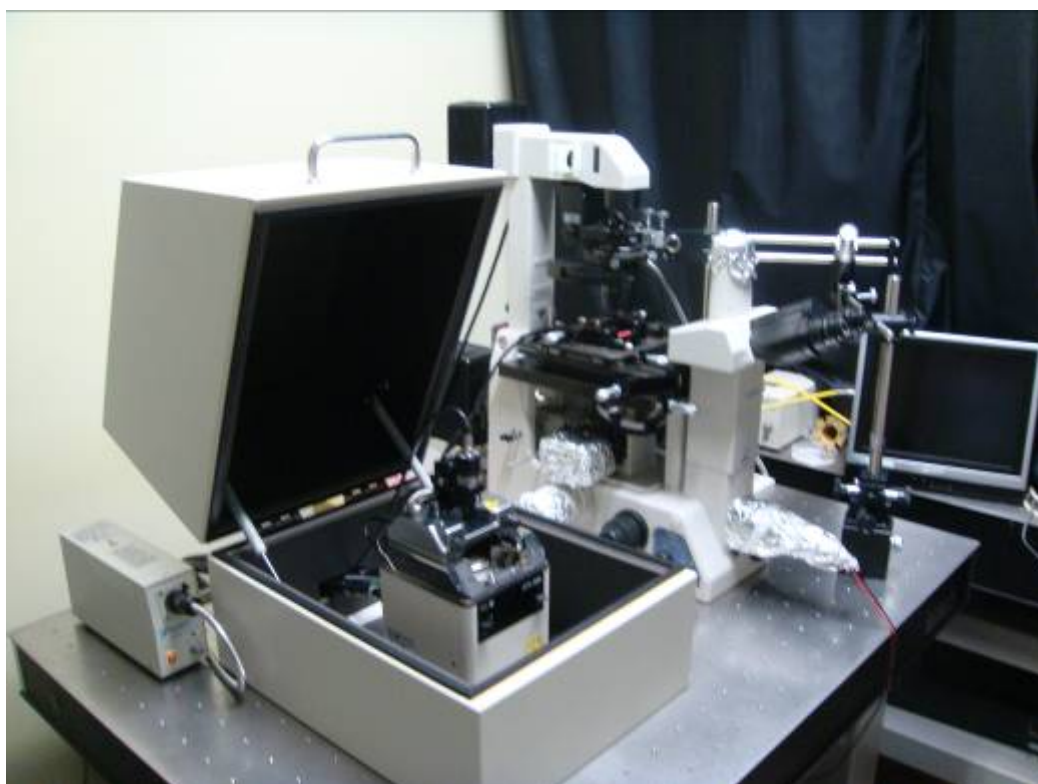
Filename: save-2010.06.15-05.16.17.jpk



以原子力顯微鏡觀察染色體與 DNA



電子顯微鏡



走査型近接場工學原子力顯微鏡

(SNOM/AFM, scanning near field optical/atomic force microscopy)



粒徑分析儀

