

出國報告（出國類別：開會）

第六屆國際最新食品分析進展研討會
The 6th International Symposium on
Recent Advances In Food Analysis

服務機關：台灣中油股份有限公司煉製研究所

姓名職稱：吳柏龍 化學工程師

派赴國家：捷克

出國期間：102年11月3日~102年11月10日

報告日期：103年1月14日

摘要

參加本次第六屆國際最新食品分析進展研討會，會議議程涵蓋國際最新食品相關重要議題與食品分析新技術、食品汙染物的可能來源介紹、食品品管方法、食品快速分析檢測、也針對食品摻假防止提出了應變方法，會議過程中也包括了海報論文發表，與各國學者討論並交換意見，本出國報告茲針對此次研討會的內容與回國後文獻的探討整理後所撰寫而成，希望能藉此建立最新且最好的生技產品品管制度，以符合中油生技宣稱的高品質管理制度。並於近年臺灣發生了一系列重大食品安全問題事件後，期能建立一套食品安全的預警機制。

目次

摘要.....	I
目的.....	1
議程內容.....	2
本文.....	4
近年來台灣食品安全問題.....	4
食品品質與食品安全控制的新研究挑戰.....	4
可能的食品汙染來源.....	5
基因改造食品.....	7
食品過敏原.....	9
最新的食品分析方法.....	11
研討會壁報論文發表.....	14
心得及建議.....	16

目的

近年來在臺灣發生了一系列重大食品安全問題事件，主要為政府食品安全主管單位主動檢驗，或接獲檢舉，發現少數不肖食品業者可能涉嫌長期使用未經核准之食品添加物或販售過期食品牟利，汙染甚至波及常見的民生必需品，致使民眾健康受損且影響全體民眾對台灣食品安全的信賴度，也引起社會高度關注，職參加此次第六屆國際最新食品分析進展研討會之目的，是希望了解世界最新的食品安全法規政策、世界食品分析、食品可能汙染來源的最新國際動態及應用於食品安全的新技術發展趨勢。同時藉由參加此研討會的心得，運用於中油生技產品的安全性與功效性品管上。

此次行程職參加了壁報論文發表，借由與食品相關學者的交談與經驗分享，期能厚實中油的研發能力與國際能見度。

議程內容

本次會議議程涵蓋國際最新食品品管指標、食品分析方法及食品分析運用等內容，活動包含邀請世界各專家的口頭演講、供應商演講還有包括海報參展發表三個部分，議程共計四天時間，於捷克的布拉格舉行，詳細的演講細節如表一，會場場地一覽圖如圖一。

RAFA 2013 – PROGRAM AT A GLANCE

Morning

Time / Date	TUESDAY November 5, 2013	WEDNESDAY November 6, 2013	THURSDAY November 7, 2013	FRIDAY November 8, 2013							
7:30-8:00		Vendor seminar Phenomenex									
8:00-8:30	Registration for the conference Lobby of the Clarion Congress Centre	Oral session 2 Bioanalytical Methods for Food Control Zenit hall	Oral session 8 Natural Toxins Analysis I Zenit hall	Oral session 13 Food Contaminants Zenit hall							
8:30-9:00					Oral session 3 Analysis of Nanoparticles in Food Nadir hall	Oral session 9 General Food Analysis I Nadir hall	Oral session 14 General Food Analysis II Nadir hall				
9:00-9:30								2nd European AMS workshop Ambient Mass Spectrometry in food and natural products Leo & Virgo halls	Oral session 15 Food Allergens Leo & Virgo hall		
9:30-10:00										Workshop for Young Scientists Opportunities to work in and with a European Scientific Institution (EC-JRC) Virgo hall	Workshop Infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and chemometrics for monitoring of food and feed products, lab-to-the-sample Leo hall
10:00-10:30											
10:30-11:00	Oral session 4 Rapid Methods Zenit hall	Oral session 10 Natural Toxins Analysis II Zenit hall	2nd European AMS workshop Leo & Virgo halls								
11:00-11:30				Oral session 5 Emerging POPs Issues Nadir hall	Webcast Food analysis issues and challenges to be addressed / solved in close future Aquarius & Taurus halls						
11:30-12:00						Exhibition / Brunch Foyer / Meridian / Tycho & Kepler halls					
12:00-12:30							SUMMARY & DISCUSSION PLATFORM Food Analysis Beyond Imagination Closing address Including Poster Awards Zenit & Nadir halls				
12:30-13:00								Lunch Conference centre restaurant Veduta			
13:00-13:30	Lunch Conference centre restaurant Veduta										

Coffee breaks will be located in Foyer / Meridian / Tycho & Kepler halls. Conference lunches will be served in the conference centre restaurant Veduta.

Afternoon

Time / Date	MONDAY November 4, 2013	TUESDAY November 5, 2013	WEDNESDAY November 6, 2013	THURSDAY November 7, 2013					
13:00-13:30		Registration for the conference Lobby of the Clarion Congress Centre	Exhibition / Poster session 1 / Vendor seminars (13:15-15:30) Agilent Technologies Bruker IonSense & KR Analytical Restek Spex CertiPrep Thermo Scientific	Exhibition / Poster session 2 / Vendor seminars (13:15-15:30) AB Sciex Agilent Technologies Bruker Leco & Restek & Gerstel Shimadzu Waters					
13:30-14:00		Opening ceremony Zenit & Nadir halls	Exhibition / Coffee break Foyer / Meridian / Tycho & Kepler halls	Exhibition / Coffee break Foyer / Meridian / Tycho & Kepler halls					
14:00-14:30		Plenary session Zenit & Nadir halls							
14:30-15:00		Oral session 1 Recent Issues and Novel Technologies Zenit & Nadir halls	Oral session 6 Food Authenticity and Fraud I Zenit hall	Oral session 7 Flavour and Food Quality Markers Nadir hall					
15:00-15:30					Inter-active seminar Step by step strategies for fast development of analytical method Leo & Virgo halls				
15:30-16:00						Oral session 12 Food Authenticity and Fraud II Zenit hall	Seminar Food safety issues beyond the EU Nadir hall		
16:00-16:30	Registration for the conference Lobby of the Clarion Congress Centre							Vendor seminars (18:30-19:30) AB Sciex Büchi R-Biopharm ToxiMet VRS	Seminar Tools for mass spectrometry-based metabolic data processing and analysis Leo & Virgo halls
16:30-17:00									
17:00-17:30		Symposium Dinner Martinky Palace, Prague Castle area							
17:30-18:00									
18:00-18:30									
18:30-19:00									
19:00-19:30									
19:30-20:00									
20:00-20:30									
20:30-21:00									
21:00-23:00									

表一、會議議程及時間表。

會場照片



圖一、會場照片一覽圖。上圖為主要口頭報告演講場地，下圖為海報論文場地。

本文

(一) 近年來台灣食品安全問題

近年來在臺灣發生了一系列重大食品安全問題事件，茲將資料整理於下：

- (1) 非法更改標示:過期品當即期品販售，或以過期原料製作產品。
- (2) 違法添加工業級防腐劑如:乙二胺四乙酸二鈉。
- (3) 毒澱粉事件:違法添加工業級順丁烯二酸酐。
- (4) 違法添加工業級色素:皂黃。
- (5) 慘假以工業級鹽替代食用鹽。
- (6) 大統油事件:食用油混充棉籽油和銅葉綠素。
- (7) 食品添加物超標:防腐劑苯甲酸含量超標。
- (8) 蔬菜殘留農藥，含量超標。
- (9) 非純釀造的醬油裡有致癌物單氯丙二醇，含量超標。
- (10)雞蛋裡有致癌性抗生素甲磺氯黴素與氯甲磺氯黴素，含量超標。
- (11)鮮奶中含有抗生素。

從這些問題中看出從政府、食品業者、消費者三方皆出現了很大的漏洞，政府沒有盡到的監督及食品安全把關的責任、食品業者沒有盡到品質管理及道德管理的責任、消費者沒有盡到分辨是非對錯的能力。儘管台灣目前食品產業受到非常大的打擊，但應趁此機會徹底的檢討及改革，方能創造台灣未來食品產業的機會。

(二) 食品品質與食品安全控制的新研究挑戰

食品安全部門人員對食品安全的主要挑戰為對食品的高品質、營養、安全、功能性等訴求。由於獲得安全的食品是一項基本的人權，食品不僅要求能提供在足夠的份量，同時也應兼具供應安全和有益健康的食物。全球化和國際貿易顯著地改變了食品的生產方式、加工方式、運送方式、購買方式等，這些改變需要更全面和綜合的方法來保證安全的食物鏈。特別是法律限制食物中的有害物質需要被嚴格管理與強制執

行，其他如食物過敏原或其他有害物質的食品（自然或人為）同樣需要被嚴格管理。保護消費者免受欺詐。食品造假是一種犯罪活動，以往通常不會對威脅公眾健康。然而，最近的例子並非如此，許多的造假行為已經嚴重影響到消費者與國民的生命安全。去預防檢測與食品有關的真實性和欺詐的潛在問題，這將是一個未來的大挑戰。透過聚集技術(Converging technologies)可能是一個有效的解決方案：奈米-生物-信息和通信技術（nano-biotech-ICT）透過科技的整合能有效運用於新功能食品開發，此系統方法不僅能提高產品的安全性、產品的保存期限、健康福利、使用者的方便性並降低資源投入和交易成本。如建立網站，將食品品管資料轉化成電子文件放在網站上。建立 QR code，將四維條碼印在產品外包裝上，方便消費者以智慧型手機掃描觀看品管資料。

(三) 可能的食品汙染來源

人的每一天所需的營養來源不外乎醣類、脂質、蛋白質、維生素、礦物質及水等六大營養素，補充營養的方法就是攝取均衡的食物，包括脂肪、牛奶、蔬菜、五穀雜糧、肉類及水果等等（如圖二），但這些日常生活中接觸到的食物安全嗎？



圖二、人類一日所需的食物種類繁多。

食品污染(food contamination)，指食品污染物侵染食品的現象。通常在食品生產、加工、貯存、運輸、銷售、烹飪以及進食等過程中，不經意地混入食品中的、外來的、不利於食品質量與衛生安全的物質，稱為食品污染物。食品若受污染，除可引起一些急性疾病外，還可引起一些慢性危害，如致癌、致畸、致突變及慢性中毒等。食品污染一般按污染物的性質分為生物性污染、化學性污染及放射性污染等三大類。

1.生物性污染:

非致病菌的污染，主要是假單孢菌屬及環境中的其他腐敗菌的污染，可能來自任何不潔環境、器物、人手及其他物品，是構成食品腐敗變質的主要原因。食物中毒致病菌及消化道傳染病病原體的污染，主要有沙門氏菌屬、葡萄球菌屬、變形桿菌屬等，可引起食物中毒及其他疾病。人畜共患傳染病病原體的污染，包括對人和畜禽均有致病性的，通過肉、奶、禽、蛋等食品感染於人的病原微生物，如炭疽桿菌、鼻疽桿菌、口蹄疫病毒、豬水泡病病毒、豬丹毒桿菌、結核桿菌、布氏桿菌、沙門氏菌屬等。這些病原微生物可以引起人類相應傳染病或食物中毒。寄生蟲的污染，豬肉、牛肉類食品可能有條蟲囊尾蚴，豬及各種肉食和雜食動物的肌肉內可有旋毛蟲囊包；淡水魚類體內可有肝吸蟲、肺吸蟲及其他寄生蟲；蔬菜類可能污染蛔蟲、鉤蟲、條蟲、蟯蟲等蟲卵，而使人感染相應的寄生蟲病。腸道病毒的污染，如肝炎病毒、脊髓灰質炎病毒、庫克薩基病毒等，均可經食品傳播。真菌及其代謝毒素的污染，污染食品的真菌種類繁多，但最常見的主要是曲黴菌屬、青黴菌屬和鐮刀菌屬中各種真菌。真菌污染食品的衛生意義有兩個方面：與非致病菌一樣，分解食品成分引起腐敗變質，尤以糧食及其製品為多見，導致降低或喪失其食用價值。另一為真菌中某些特定種或株，污染食品並在其中產生真菌毒素(Mycotoxin)，使食用的人或畜禽產生嚴重後果。已知的真菌毒素已有 100 餘種，主要污染食物為花生、玉米、大米等，可引起人畜禽急性中毒、慢性中毒、肝損害及致癌的黃麴毒素。

2.化學性污染:

農藥殘留，糧菜與肉魚奶蛋等所有食品都可能有農藥殘留。其來源可以是農藥直

接施用於農作物或用農藥處理畜禽體表；也可以是農作物從環境中吸收農藥或動物通過食物鏈如飼料、飲水攝入。主要是高殘留高毒農藥，如有機汞、有機氯、有機磷、除草劑等。食品中農藥殘留可引起人類的中毒，也可發生急性中毒及致畸、致癌和誘變等毒性。金屬毒物污染，汞、鎘、鉛、砷等的污染。有些還可能有鉻、鋅、鋇等金屬的污染。金屬毒物污染食品的來源主要有工業廢物，或食品加工流程中，接觸了不符合衛生標準的金屬機具、容器而污染食物，或製造中原料品質管控出問題，如加入了含金屬毒物超過標準的原料和食品添加劑等。特別是高酸性食品在品質不良的鍍鋅或其他金屬容器中存放過久，導致重金屬的釋放。金屬毒物在食品中超過一定量，雖然也可能引起人體急性中毒，但實際較為少見。主要的威脅是慢性中毒，如潛伏期可達幾年、如慢性鉛中毒、砷可能引起的皮膚癌和神經精神異常等。容具、包裝材料和塗料對食品的污染，基本上不鏽鋼是公認安全的材質；鋁一向被認為是安全的，但近來有些毒理專家質疑，尚待澄清；鍍鋅鐵器只能用於接觸冷熱水；罐頭用馬口鐵皮，最好內面被覆塗料後再用。陶瓷器皿取決於燒結品質，一般在 4%熱醋酸中無金屬溶出方可。竹、木、紙類主要防止微生物及塵垢污染。近年來普遍應用的塑料，除聚乙烯、聚丙烯是安全的，酚醛樹脂不許用於食品之外，多數是在限制單體、低聚合物、金屬等有害添加劑和甲醛等有機物的溶出量下，可以使用。

3.放射性污染

污染食品的放射性物質主要來自工農業生產和科學實驗中排放的核素廢物、核爆炸的沉降灰以及核裝置的意外事故等。污染食品的放射性核素種類很多，如 ^{90}Sr 、 ^{137}Cs 、 ^{89}Sr 、 ^{131}I 和 ^{14}C 等。這些放射性核素進入人體後，分別參加其同位素的代謝，引起白血球的減少以及致癌等症狀。日前日本大地震可能有些食品遭受污染，有期可能的風險，但目前台灣食品安全法並無此項檢驗強制規定。

(四) 基因改造食品 (Genetically Modified Food ; GMO)

基因改造食物已是我們日常生活中常接觸到的食品 (圖三)，目前基因改造食物有黃豆、玉米、稻米、小麥、馬鈴薯、蕃茄、棉花、油菜、木瓜、南瓜、甜菜、菊苣、

甜瓜、葵花及亞麻等，以人類四大主食中的黃豆、玉米為例，台灣黃豆自產率低不到5%，大部份需仰賴進口；台灣玉米每年進口量約 480 萬公噸，40%的玉米為基因改造，當中使用黃豆、玉米製造、加工、衍生食用產品等，皆與日常生活飲食息息相關；黃豆、玉米也會製成為牛、豬、雞的主要飼料，有些牛肉、牛奶、乳製品更是來自生長過程使用基因改造之賀爾蒙的牛隻，因而若透過基因改造食物鏈來看，及基改作物藉花粉的傳播過程，基因改造和非經基因改造的農作物往往會混合一起，因而難以區分該農作物類別，經過如此的計算結果，我們中的食物已占約~40%是基因改造或混雜基因改造。

環顧全球開發「基因改造食品」性狀、態勢			
基因改造品名	基因改造作物特性	衍生食品範圍	備註
黃豆	耐除草劑、耐磷塞基因改造黃豆	製造豆類飲品、醬油、豆腐、食用油豆粉、豆乾、乳化劑（如卵磷脂）等	93%屬基因改造。二號選豆在美國屬動物飼料，台灣卻進口製成豆製食品
玉米	耐除草劑、抗根蟲、耐磷塞、耐固殺草基因	食用油脂、玉米粉、麵粉、糖漿、餅乾麵包、汽水、雪餅、零食等	40%為基因改造。台灣每年進口量約480萬公噸。
油菜	耐除草劑、油菜籽種子含高量月桂酸的品種	菜籽油、食用油、菜料、有機肥料	73%基因轉殖作物
棉花	蘇力菌基因、耐除草劑	棉籽油用於製造烤焗食品、零食、食油	50%基因改造。
蕃茄	減緩軟化、甜味基因、抑制酵素PG堅實基因	番茄汁、番茄醬、佐菜料	1994年在美國出售的蕃茄FLAVR SAVRIM 是第一批在市面出售基因改造食物
馬鈴薯	加強硬度、收穫後不變色、抑制油脂吸收低熱值	餅乾、薯片、肴饌、果實食品	馬鈴薯的基因轉殖為最早研發成功
木瓜	抗病毒木瓜	果實食品、甜品、果乾	由康乃爾大學及夏威夷大學共同研發第一件抗病毒成功功
南瓜	抗蟲害及抗病毒	佐膳、南瓜湯及甜品	20%基因改造
水稻	蛋白質、碳水化合物、高量維生素A、油脂等成分	黃金米、四大糧食之一、米粉、米果餅乾及麵品	瑞士、德國科學家發明基改含維生素A黃金米。
動物	牛、豬、乳羊、基因改造糧食為主要飼料	肉製品、奶製品	複製牛、複製羊
水產	養殖草蝦、鮭魚、九孔	罐頭、食品	美國、加拿大研發

圖三、基因改造食物的種類與基因改良的目的地。參考來源為 <http://www.taifer.com.tw>。

近年來人類生物科技研發神速，但在發展生物科技的同時，它所造成背後問題與後遺症頻頻引起許多爭議與隱憂，環保與有識人士相關質疑不斷，1996年基因改造食品在美國上市以來，雖有世界衛生組織表明：『目前在國際市場上出售的基因改造食物都已通過風險評估，因此不大可能對人類健康帶來風險』，到目前為止，也未有直接證據證明基因改造食物確對人體安全有危害，不過，民眾對基因改造食品的安全性卻普遍存有疑慮，有些科學家與環保團體仍強烈質疑那是時間問題，即使目前無明確實證，但二、三十年後的長期性影響目前並不可預期。所以歐盟有些會員國目前禁止進口基改玉米 Mir 604，歐盟等訂定「防衛條款」來封鎖基改，在人民反對聲浪下，有58%的基改作物輸入歐盟面臨困難。目前基因改造主要爭論、疑慮、質疑有下列幾個方面：可能危害人體健康、違反自然法則及破壞生態平衡、引發自然界害蟲的抗藥性、安全檢測管制規範標準及對素食者重大的影響，基因改造工程把無限物種的基因重組技術導入，用動物或植物、微生物取出的基因來個乾坤大挪移，使得人類及動物、植物基因混亂交換，假設產生「比目魚草莓、北極魚番茄（抗寒）、蠍子玉米（抗蟲害）」，所產生基因食品讓素食者是避無可避、無從選擇。

(五) 食品過敏原

食物過敏是由於人體免疫系統對食物中某些特定蛋白質產生過度免疫反應所致，具再現性，且往往與劑量沒有正相關反應。食物是由蛋白質、碳水化合物及脂肪所組成，其中蛋白質是最主要的食物過敏原。食物中所含「會引起人體異常免疫反應的特定成分」稱為食物過敏原 (food allergen)。具過敏原性質的蛋白質分子量約為 10-67 kDa，具有水溶性、良好的熱穩定性並且耐酸、耐蛋白質水解酵素的分解等特徵，如小麥與穀類中最常見的麩質 (gluten) 等蛋白質，所以歐美國家食品加工常把麩質去除，而標榜 gluten-free 食品。酒類中的溶菌 (lysozyme) 或白蛋白質 (ovalbumin) 也是過敏原，常見的食物過敏原還包括蛋類、乳類、小麥、花生、蕎麥，海鮮類如蝦、蟹、鮭魚、鯖魚、鮭魚卵、鮑魚、烏賊等，肉類如牛肉、雞肉、豬肉、其他如胡桃、黃豆、柳橙、奇異果、松茸、桃子、山藥、蘋果、明膠及香蕉等也都有引發過敏的案例。

。種類非常多，日常生活中很難不去接觸到。估計現今約有近百種的食品會導致過敏反應，進而對人體產生危害。食物過敏的盛行率逐年增加，包括可能致死的猝發性過敏反應，不可輕忽。目前無根本治療方法，唯有避免接觸引發過敏食物。

美國食品藥物管理局從 2006 年起制定「食物過敏原與消費者保護法案」，要求廠商所有的食品，都必須標示主要過敏原，同時歐盟、中國大陸、加拿大、日本及紐澳等各國對食品過敏原標示皆已實施相關法規。但目前台灣市售食品包裝上並未清楚標示過敏原要求，許多學者也大聲疾呼政府應即早正視過敏原問題，衛生署於近期嗎已經開始展開食品過敏原調查計劃，研議擬定食品過敏原標示的政策。

目前市面上有許多快速檢測試劑的產品(如圖四)，使用此類產品具有下列等優勢，短時間(15 分鐘)即完成檢測，可提供“即時”的檢測結果確認，可同時檢測多個不同過敏原標的樣本，用肉眼即可判讀結果，低成本、高效率的檢測方式，同時實驗結果具有高專一性，高敏感度等優點。



圖四、市售快速檢測試劑產品。睿嘉生物科技股份有限公司所代理的 Agitest，可以快速針對容易產生過敏原的食物做過敏原檢測，如花生、小麥、蛋、大豆牛奶蕎麥、杏仁等。

(六) 最新的食品分析方法

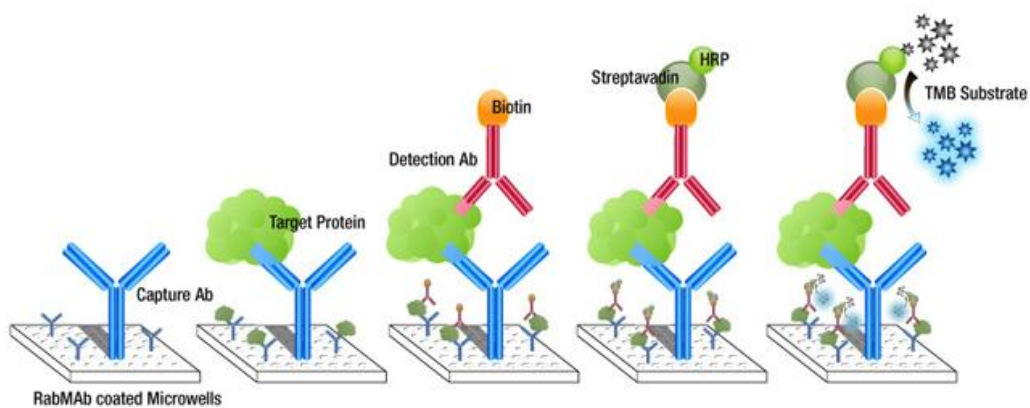
針對近年來的食品問題，快速及準確的檢驗方法顯得非常重要，目前最準確的食品檢驗方法，不外乎是利用液相層析 (Liquid chromatography) 或氣相層析 (Gas chromatography) 配合質譜儀 (mass spectrometry) 來針對『已知; Known;』的可能污染來源做檢驗，此方法稱之 Targeted methods。例如、針對特定種類的塑化劑及農業用藥，以已知標準品進行比對。但隨著科技日新月異，化工技術的進步，未來面臨到的將會是許多可能『未知;Unknown』的可能污染來源，這些未知的污染來源，政府目前沒有標準訂定法規，更別說訂定檢驗標準，那我們如何去面對這些可能『未知』可能污染來源？

由此次的會議中學習到針對『已知』可能污染物，我們可以 LC-MS/MS 或 GC-MS/MS 來檢測，而針對『未知』的污染來源，只能預防性的建立原料履歷與建立一套健全的標準操作程序(SOP)來防範，例如、根據不同同位素的分布情形，就可以知道原料的來源國家，另一個積極性的防範未知污染物的作法，就是每批樣品以 LC-MS/MS、UPLC-MS/MS、GC-MS/MS 或紅外線光譜(IR spectrum)來建立基本的指紋輪廓(fingerprinting profile)，即便我們不知道每個波峰(peak)是什麼物質，只需長期建立指紋輪廓檔案並利用統計學的方法，進行輪廓的比對，如果出現新的污染源時，指紋輪廓勢必會不同，如此一來就可以簡單又快速的避免可能『未知』的污染源，之後再針對這些多出的波峰進行結構分析(如 X-光繞射或 NMR 核磁共振)，就可以清楚地將『未知』轉變成『已知』並建立一套早期預警系統(Early warning system)來防止造假及防偽事件，此種方法稱之為 non-targeted fingerprinting methods。

此次會議中也學習到許多不同的技術運用於不同食品的檢驗上，如 Axion DSA-TOP (Direct sampling analysis coupled with TOP)：是不需要任何樣品的前處理步驟就可以區分天然與人工香草添加的食品。

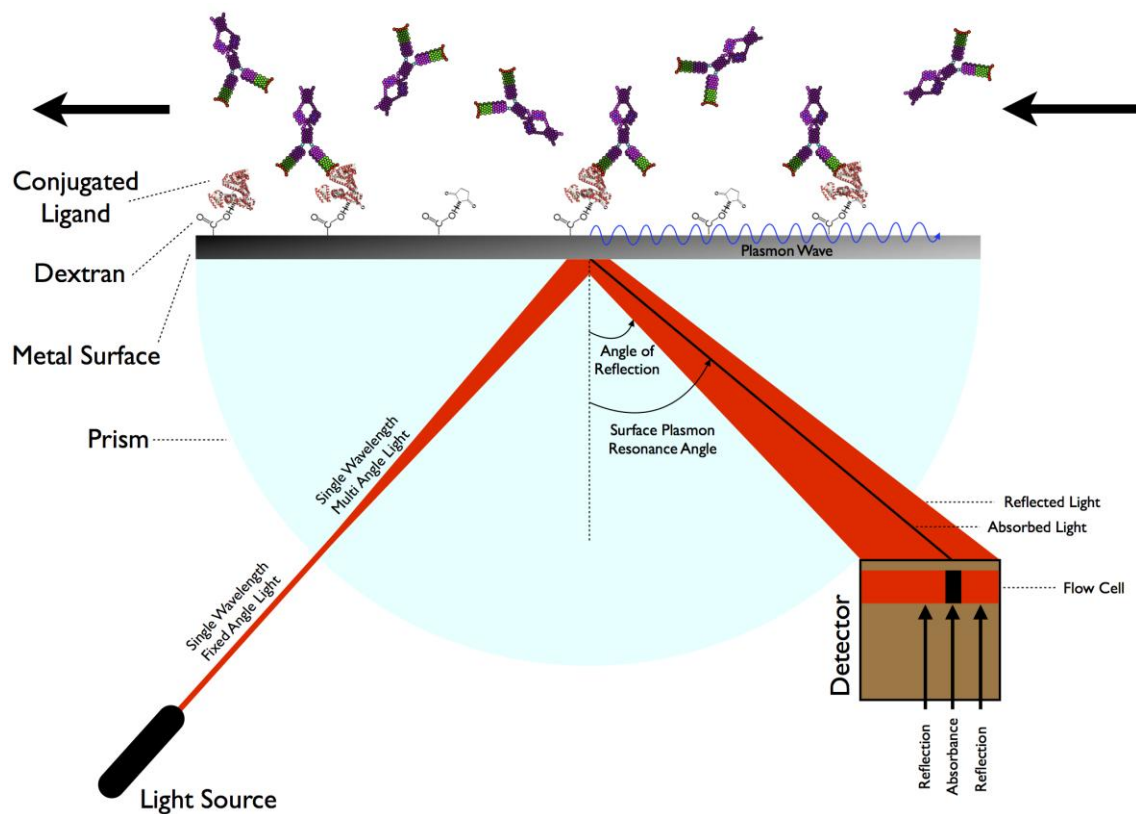
另外利用表面電漿共振 (Surface plasmon resonance ; SPR) 或酵素交聯免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 方法來偵測藏匿於酒類中可能導

致過敏的牛奶蛋白，這些蛋白質的污染來源可能來自於酒類澄清步驟所加入的澄清劑所導致，動物來源的澄清劑是紅酒和白酒釀酒過程經常使用的，特別是從牛奶中的酪蛋白酸鹽 (caseinates)，魚類及其他動物來源的雞蛋蛋白(egg protein)和明膠(gelatin)。酵素交聯免疫吸附分析今天被認為是「黃金標準」來直接檢測食品中的過敏原和牛奶中蛋白的定量。但是此方法有一些缺點常常造成誤判，特別是針對某些食物進行特殊的處理後，如熱或酸鹼處理而導致抗原的變性或去活化，而無法以酵素交聯免疫吸附分析方法來準確偵測(圖五)。



圖五、酵素交聯免疫吸附分析(ELISA)方法圖示。藍色 Y 字型為抗體、綠色為標的物或過敏原、紅色為二次抗體、橘色為生物素、HRP 為呈色酵素、TMB 為呈色受質。當樣品中有過敏原時，二次抗體可以結合，TMB 加入後可以有顏色產生，如果沒有過敏原時，二次抗體不可以結合，TMB 加入後可以沒有顏色產生。

另一種 Biacore 技術，是基於表面電漿共振的做法，是一個利用將特定抗體固定在微傳感器上(microsensor)，當流過檢體如果檢體中具有與此抗體交互作用的過敏原時，微傳感器下方的感應器偵測到質量變化，此方法可以應用於蛋白質檢測 (圖六)。比酵素交聯免疫吸附分析方法方便，不需要呈色反應，且微傳感器可以重覆使用等優點。



圖六、表面電漿共振 (Surface plasmon resonance ; SPR)方法圖示。利用化學方法將抗體(如圖中表示為 conjugated ligand) 與晶片上的 dextran 交聯後，當樣品流過此晶片，如果檢體中具有與此抗體交互作用的過敏原或待測物時，微傳感器下方的感應器偵測到質量變化，借此來反應抗體與抗原的結合，並求得結合的動力參數。

研討會壁報論文發表

B-20

DNA-BASED ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY AND TRACEABILITY FOR IVORY SHELL (*BABYLONIA AREOLATA*)

Tsai-Hsin Chiu^{1*}, Ching-Wen Guo², Hui-Chiu Lin³, Ting-Shih Huang⁴, Po-Long Wu⁵

^{1 2} *Department of Food Science, National PengHu University of Science and Technology, Taiwan*

^{3 4} *Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute, COA, EY, Taiwan*

⁵ *Environment and Biotechnology Department, Refining and Manufacturing Research Institute, CPC Corporation, Chiayi, Taiwan*

**Corresponding author – E-mail: thchiu@npu.edu.tw, Phone: +886910512622*

For promoter the production traceability of seafood products in Taiwan, we need to control quality effectively in identify the seafood species. Propose of this study is to analyze the gene diversity and identification of high values seafood, Ivory shell (*Babylonia areolata*), in Penghu Island by molecular marker technology and built the database. Total of 36 Ivory shell and other *Babylonia* samples from cultivation and wild were confirmed to the species and analyzed for inter simple sequence repeat (ISSR) method, mitochondrial DNAs, and SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. The results were shown ISSR3, ISSR7, and ISSR13 primers of ISSR method and mitochondrial DNAs have good discriminate powders for inter-species and intra-species. Conclusion, ISSR, COI genes with SSCP method could detect different species and source seafood sample in time and get highly financial benefits.

Keywords: *Babylonia areolata, ISSR, mitochondrial DNAs, SSCP*

表二、研討會壁報論文發表摘要。此篇論文發表於壁報論文的「可性度、追朔性及欺騙行為」分類項目。



DNA-based analysis of genetic diversity and traceability for Ivory shell (*Babylonia areolata*)

Tsai-Hsin Chiu¹, Ching-Wen Kuo¹, Hui-Chiu Lin², Ting-Shih Huang², Po-Long Wu³

¹Department of Food Science, PengHu University, Penghu county, Taiwan, ROC

²Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute, COA, EY, Taiwan

³Environment and Biotechnology Department, Refining and Manufacturing Research Institute, CPC Corporation, Chiayi, Taiwan



Overview

For promoter the production traceability of seafood products in Taiwan, we need to control quality effectively in identify the seafood species. Purpose of this study is to analyze the gene diversity and identification of high value seafood, Ivory shell (*Babylonia areolata*), in Penghu Island by molecular marker technology and built the database. Total of 38 Ivory shell and other *Babylonia* samples from cultivation and wild were confirmed to the species and analyzed for inter simple sequence repeat (ISSR) method, mitochondrial DNAs, and SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. The results were shown ISSR3, ISSR7, and ISSR13 primers of ISSR method and mitochondrial DNAs have good discriminate powers for later species and intra-species. Conclusion, ISSR, COI genes with SSCP method could detect different species and source seafood sample in time and get highly financial benefits.

Introduction

The globalization of the seafood industry allows many countries to import or export certain local species to countries around the world. After seafood is imported, it often makes many more steps before reaching the consumer, making it difficult to track. Many fishery products are processed before being delivered to the buyers, which makes it difficult to identify the species in some circumstances (Mafru, Ferreira & Oliveira, 2008).

PCR-based methods are extremely sensitive, often faster than other technologies, and are widely used in fishery products (Rasmussen and Morrissey, 2008). Numerous DNA-based detection methods have been used for seafood species identification, including PCR sequencing, discontinuous molecular markers such as RAPDs, AFLPs, as well as their variants (i.e. ISSR, SSAP, SAMPL) and single-stranded conformational polymorphism (SSCP) have been successfully used in the characterization of different kinds of raw material (Hellberg & Morrissey, 2011; Teitelbaum, 2009; Galimberti, et al., 2013). In addition, ISSR and SSCP do not require prior knowledge of DNA sequence information.

The objective of this study was to develop molecular markers methods, including ISSR, cytochrome oxidase subunit I (COI) gene sequences, PCR-SSCP and PCR-DGGE for assessing and identifying the nature and the extent of genetic variation among interspecies and intraspecies of Ivory shell.

Methods

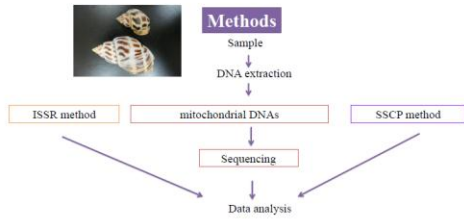


Table 1. Specimens of *Babylonia areolata* and other *Babylonia* samples were used in species identification study and localities where they were collected.

species	method	size	sample No.	species	method	size	sample No.
<i>Babylonia areolata</i>	ISSR	800	WF1001	<i>Babylonia areolata</i>	COI	500	WF1001
			WF1002				WF1002
			WF1003				WF1003
			WF1004				WF1004
			WF1005				WF1005
			WF1006				WF1006
	mito	16S	WF1007	mito	16S	500	WF1007
			WF1008				WF1008
			WF1009				WF1009
			WF1010				WF1010
			WF1011				WF1011
			WF1012				WF1012
<i>Babylonia areolata</i>	ISSR	800	WF1013	<i>Babylonia areolata</i>	COI	500	WF1013
			WF1014				WF1014
			WF1015				WF1015
			WF1016				WF1016
			WF1017				WF1017
			WF1018				WF1018
	mito	16S	WF1019	mito	16S	500	WF1019
			WF1020				WF1020
			WF1021				WF1021
			WF1022				WF1022
			WF1023				WF1023
			WF1024				WF1024
<i>Babylonia areolata</i>	ISSR	800	WF1025	<i>Babylonia areolata</i>	COI	500	WF1025
			WF1026				WF1026
			WF1027				WF1027
			WF1028				WF1028
			WF1029				WF1029
			WF1030				WF1030
	mito	16S	WF1031	mito	16S	500	WF1031
			WF1032				WF1032
			WF1033				WF1033
			WF1034				WF1034
			WF1035				WF1035
			WF1036				WF1036
<i>Babylonia areolata</i>	ISSR	800	WF1037	<i>Babylonia areolata</i>	COI	500	WF1037
			WF1038				WF1038
			WF1039				WF1039
			WF1040				WF1040
			WF1041				WF1041
			WF1042				WF1042
	mito	16S	WF1043	mito	16S	500	WF1043
			WF1044				WF1044
			WF1045				WF1045
			WF1046				WF1046
			WF1047				WF1047
			WF1048				WF1048
<i>Babylonia areolata</i>	ISSR	800	WF1049	<i>Babylonia areolata</i>	COI	500	WF1049
			WF1050				WF1050
			WF1051				WF1051
			WF1052				WF1052
			WF1053				WF1053
			WF1054				WF1054
	mito	16S	WF1055	mito	16S	500	WF1055
			WF1056				WF1056
			WF1057				WF1057
			WF1058				WF1058
			WF1059				WF1059
			WF1060				WF1060

Result

For ISSR analysis, 59 primers were selected in this study. A total of three primers, ISSR3, ISSR7, and ISSR13, had polymorphic bands and well distinguish ability (Results were shown in Fig 1, Fig 2, Fig 3). All the primers used have revealed unambiguously scorable polymorphic bands.

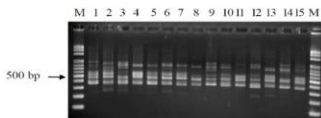


Figure 1. ISSR profiles of the 38 *Babylonia areolata* samples obtained using the primer ISSR 3. Lane M: Bio-100bp DNA Ladder, Lanes 1-33: *Babylonia areolata* (WF1B01, WF1B02, WF1B03, WF1B04, WF1B05, WF1B06, WF1B07, WF1B08, WF1B09, WF1B10, WF1B11, WF1B12, WF1B13, WF1B14, WF1B15, WF1S01, WF1S02).

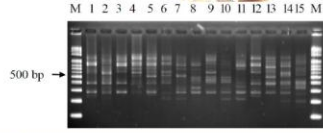


Figure 2. ISSR profiles of the 38 *Babylonia areolata* samples obtained using the primer ISSR 7. Lane M: Bio-100bp DNA Ladder, Lanes 1-33: *Babylonia areolata* (WF1B01, WF1B02, WF1B03, WF1B04, WF1B05, WF1B06, WF1B07, WF1B08, WF1B09, WF1B10, WF1B11, WF1B12, WF1B13, WF1B14, WF1B15, WF1S01, WF1S02).

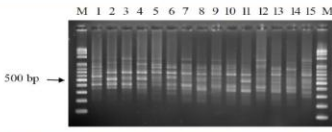


Figure 3. ISSR profiles of the 38 *Babylonia areolata* samples obtained using the primer ISSR 13. Lane M: Bio-100bp DNA Ladder, Lanes 1-33: *Babylonia areolata* (WF1B01, WF1B02, WF1B03, WF1B04, WF1B05, WF1B06, WF1B07, WF1B08, WF1B09, WF1B10, WF1B11, WF1B12, WF1B13, WF1B14, WF1B15, WF1S01, WF1S02).

The cytochrome c oxidase subunit I gene had been used extensively for species identification and was highly effective at resolving phylogenetic structure within and among the species groups considerations (Kyle & Wilson, 2007; Chiu et al., 2012). In this study, COI1490 and COI2198 primers were used to analyze the phylogenetic relationships of *COI* gene sequence of 33 Ivory shell and other *Babylonia* samples. All the *Babylonia* samples had *COI* gene positive reaction and was obtained 710 bp amplicon. Results were shown in Fig 4.

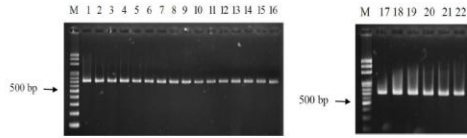


Figure 4. *COI* gene of *Babylonia* samples obtained using the primer COI1490 and COI2198 by PCR method. Lane M: Bio-100bp DNA Ladder, Lanes 1-16: *Babylonia areolata* (WF1B01, WF1B02, WF1B03, WF1B04, WF1B05, WF1B06, WF1B07, WF1B08, WF1B09, WF1B10, WF1B11, WF1B12, WF1B13, WF1B14, WF1B15, WF1S01, WF1S02, WF1S03, WF1S04), Lanes 17-22: *Babylonia feicheni* (BF1), *Babylonia spirata spirata* (BS), *Babylonia perforata* (Bp), *Babylonia formosae formosae* (BF), *Babylonia feicheni* (BF), *Babylonia formosae formosae* (BF) samples.

In SSCP analysis six of the examined species *Babylonia areolata*, *Babylonia feicheni*, *Babylonia spirata spirata*, *Babylonia perforata*, and *Babylonia formosae formosae* showed distinctive patterns of single stranded DNA. The results have shown in Fig. 5. The SSCP patterns for portion of the 35 *Babylonia areolata* samples illustrated similar migration positions (Lanes 1 to 10). Thus, differentiation between the 35 *Babylonia areolata* samples based on the SSCP patterns was not possible. Double-stranded DNA patterns for two *Babylonia areolata* were similar. Migration shifts in the dsDNA bands differed noticeably between the different *Babylonia* species. The migration positions of the dsDNA bands of the *Babylonia areolata* differed slightly from those of other *Babylonia* samples (Lanes 11 to 15).

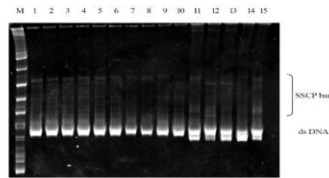


Figure 5. A portion of *Babylonia* samples obtained using the *COI* gene by PCR-SSCP method. Lane M: Bio-100 bp DNA Ladder, Lanes 1-10: *Babylonia areolata* (WF1B01, WF1B02, WF1B03, WF1B04, WF1B05, WF1B06, WF1B07, WF1B08, WF1B09, WF1B10), Lanes 11-15: *Babylonia feicheni* (BF), *Babylonia spirata spirata* (BS), *Babylonia perforata* (Bp), *Babylonia formosae formosae* (BF) samples.

Conclusions

In this study, ISSR and COI genes with SSCP method could detect different species and source seafood samples. Furthermore, we try to find other method to detect the inter-species of *Babylonia areolata*.



圖七、研討會壁報論文發表內容。

心得及建議

針對近年來的台灣食品問題，快速及準確的檢驗方法非常重要，目前最準確的食品檢驗方法，不外乎是利用液相層析或氣相層析配合質譜儀來針對『已知』的可能污染來源做檢驗。例如、特定種類的塑化劑及農業用藥。但隨著科技日新月異，化工技術的進步，未來面臨到的將會是許多可能『未知』的可能污染來源，這些未知的污染來源，我們如何去面對這些可能『未知』可能污染來源？由此次的會議中學習到可能的食品污染原種類，及針對『已知』可能污染物，我們可以 LC-MS/MS 或 GC-MS/MS 來檢測，而針對『未知』的污染來源，只能預防性的建立原料履歷與建立一套健全的標準操作程序來防範。例如、根據不同同位素的分布情形，就可以知道原料的來源國家，另一個積極性的防範未知污染物的作法，就是一批樣品以 LC-MS/MS 或紅外線光譜(IR spectrum)來建立基本的指紋輪廓，即便我們不知道每個波峰是什麼物質，只需長期建立指紋輪廓檔案並面對進行輪廓的比對，如果出現新的污染源時，指紋輪廓勢必會不同，如此一來就可以簡單又快速的避免可能『未知』的污染源，之後再針對這些多出的波峰進行結構分析，就可以清楚地將『未知』轉變成『已知』。

目前中油生技的產品檢驗有一部分是委託技輔組檢驗：如塑化劑、兒茶素等等，其他絕大部分是委託外界認證機構如 SGS 進行檢驗。煉研所環生組目前並沒有 LC-MS/MS 等設備，加上本公司生技產品種類繁多，要技輔組幫忙執行指紋輪廓建立與分析於人力與時間上考量有實質的困難，建議日後環生組可以自行購置一台 LC-MS/MS 或 GC-MS/MS 並指派專門人員負責操作，以符合中油生技宣稱的高品質管理制度。

對於『已知』污染源部分，雖然目前沒有 LC-MS/MS 或 GC-MS/MS 設備，但許多食品檢驗測試公司推出了針對特定污染源的親合性管柱 (Affinity column)，所以本組可以先購買此類的產品，於實驗室以親合性管柱先以初步簡單的純化特定標的污染物，濃縮之後以現有的紅外線光譜來進行純物質的光譜分析，是目前短期可以進行的『已知』污染物快速檢測方法。