

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
Tunghai University

食品科技組碩士論文  
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：李根永 博士  
Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.

*Coniothyrium sp.* 培養液萃取物抗細胞增生之效力

**The anti-proliferative effect of cultural extract isolated from  
*Coniothyrium sp.***

研究生：林建廷 撰  
Graduate Student : Jen-Ting Lin

中華民國一百年十二月  
December, 2011

## 目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
壹、前言	1
貳、文獻回顧	2
一、盾殼黴菌活性代謝物質之探討	3
(一)抗微生物的二次代謝物	3
1. Macrospheptide A	5
2. Coniothyron	6
(二)抗癌二次代謝物	6
1. Palmarumycins	6
2. Mycosporulone	9
3. Brefeldin A	10
二、近來趨勢與未來發展	15
參、材料與方法	18
一、試驗材料	18
(一) 內生真菌	18
(二) 受試細胞	18
(三) 培養基與試藥	18
二、實驗儀器	19
三、實驗方法	20
(一)培養基製備	21
1. 真菌培養基的製備	21
(二) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 活化及接種培養	21
1. 固態培養基	21
2. 液態培養生長型態	21

(三) 液態發酵最適化培養-----	21
1. 菌酉元製備-----	21
2. 液態培養條件-----	22
3. 發酵槽試驗-----	22
4. 殘糖含量測定-----	23
5. 菌絲體乾重測定-----	23
6. 有機溶劑萃取-----	23
7. 活性物質分析-----	24
(四) 活性物質 brefeldin A 毒殺細胞存活率計算-----	24
1. MTT assay -----	24
2. 步驟-----	25
肆、結果與討論-----	27
一、菌株篩選-----	27
二、培養液抗癌活性之確認-----	29
(一) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM代謝物之細胞毒殺性-----	29
三、液態培養基碳源及氮源對活性物質產量之影響-----	34
(一) 碳源之影響-----	34
(二) 氮源之影響-----	34
(三) 攪拌式發酵槽培養試驗-----	38
四、活性物質之區分-----	40
伍、結論-----	47
陸、參考文獻-----	48
柒、附錄-----	56

## 圖 次

附圖一、Macrosphelide A 結構式-----	5
附圖二、Coniothyrione 結構式-----	6
附圖三、Diepoxin $\sigma$ 、SR7、Palmarumycin CP1、PX-916 結構式 -----	8
附圖四、Mycosporulone 結構式-----	9
附圖五、Brefeldin A、Brefeldin C、13-O-brefeldin A、 15-Demethyl-Brefeldin A等結構式-----	11
附圖六、ARF 的功能激活及對BFA 的反應-----	14
附圖七、breflate 結構式-----	16
附圖八、dehydrobrefeldin A (7-oxo-BFA) 結構式-----	17
圖一、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物 UPLC 分 析。-----	27
圖二、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM不同菌株Brefeldin A產量之比較。-----	28
圖三、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 發酵液萃取物之細胞毒性測試- ( I )24 小 時(II) 48 小時。-----	31
圖四、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM之粗萃取物加入A549肺癌細胞24及48小 時之細胞型態圖。-----	33
圖五、攪拌式發酵槽培養期間 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM pH 值、菌絲乾 重、BFA 及殘糖含量濃度比例之變化。-----	39
圖六、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。-----	41
圖七、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 1 之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。-----	42
圖八、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物	

Fraction 2(低濃度)之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。-----43

圖九、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物

Fraction 2(高濃度)之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。-----45

圖十、*Coniothyrium* sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物 Fraction 2

UPLC 分析。-----46

## 表 次

表一、不同碳源對 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、pH 及 BFA 濃度  
之影響。-----36

表二、不同氮源對 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、pH 值及 BFA 濃  
度之影響。-----37

## 摘要

盾殼黴菌(*Coniothyrium* sp.)能產生多種生物活性物質，有些已開發為農作物病害防治的商業產品。本研究探討本土盾殼黴菌 *Coniothyrium* sp. CSM 生物活性物質抗癌效果。經搖瓶培養 5 天的發酵液以乙酸乙酯萃取，以極致效能液相色層分析(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)鑑定，確認發酵液萃取物中含有 Brefeldin A (BFA)。為了提高 BFA 產量實驗進行菌株篩選，結果得到編號 A5 的菌株 BFA 產量最高，後續便以此菌株進行培養基修飾試驗。結果得悉增加培養基碳、氮源組成分，無法顯著提高 Brefeldin A 產量。培養液萃取物以 HPLC 分離純化成三個區分物，針對不含 Brefeldin A 的第二區分物，進行細胞毒性測試，得知此區分物對於抑制癌細胞亦有效果，但略遜於 Brefeldin A。第二區分物濃度 15 $\mu$ g/ml 加藥處理 24 小時，細胞存活率為 72.90 %，經過 48 小時處理後細胞存活率為 49.19%。利用 UPLC 尋找第二區分物的組成最佳分離純化條件，未來將以此條件分離純化第二區分物，並探討其有效成份。

## Abstract

It has been well known that fungal *Coniothyrium* sp. can produce a variety of bioactive substances, and some of these substances have already been developed as commercial biocontrol products against plant pathogens. Besides, some *Coniothyrium* sp. strains are capable to produce secondary metabolites with the efficacy of anti-proliferation against cancer cells. In our lab, an endemic endophytic *Coniothyrium* sp. CSM has displayed the ability to produce Brefeldin A (BFA), an anti-cancer compound. The objective of this study is to improve the yield of BFA produced by this fungal strain, and to search new bioactive compounds in its fermented cultures. The experiment results briefly describe as following: the yield of BFA of this strain reached 47 mg/L after eleven day fermenting by using stir tank; a fraction of cultural extract separated by using HPLC has showed anti-proliferative effect against A549 cancer cells. The best anti-proliferative performance of this fraction was to incubate cancer cells for two day at the concentration of 15 $\mu$ g/ml; the fraction contains several unknown compounds, according to the analysis of UPLC. These unknown compounds are worthwhile to identify in the future.



## 壹、前言

從植物體中分離出具有生物活性物質的真菌，是科學家們致力於真菌研究的目的之一。本論文研究菌株是由本土植物棕葉狗尾草 (*Setaria palmifolia Stapf*) 莖部分離得到。此菌株經本實驗室鑑定得悉為 *Coniothyrium* sp.；其培養液中之二次代謝物對人類肺癌細胞 A549 及肝癌細胞 Huh7 有毒殺的效果，其中對於 Huh7 的毒殺效果較強，對於正常心臟內皮細胞則具有較少的毒害性；根據流式細胞儀以及免疫染色法的結果發現其二次代謝物質中具有顯著的細胞毒性且會誘導癌細胞行細胞凋亡途徑。為進一步探討此二次代謝物質成份，本實驗室以回應曲面法設計改善培養基組成份，提升菌絲生長和代謝物產量。此菌株發酵液萃取物經分析鑑定，確認含有抗癌化合物 Brefeldin A，然發酵液中可能尚有毒性較弱的有效成分。本研究目的旨在於利用發酵槽製備大量的二次代謝物萃取物，並用 UPLC 分析鑑定，除 Brefeldin A 之外，尚有何種具生物活性的成份。

## 貳、文獻回顧

從眾多植物體中分離出具有生物活性物質的菌種，是科學家們致力於真菌研究的目的之一。本論文研究菌株是由本土植物棕葉狗尾草 (*Setaria palmifolia Stapf*) 莖部分離得到的菌株。得知為盾殼黴菌 (*Coniothyrium sp.*)。

盾殼黴菌隸屬於半知菌亞門 (Deuteromycotina)、腔孢綱 (Coelomyces)、球殼孢目 (Sphaeropsidales) 的真菌。(Campbell, 1947) 從核盤菌的菌核上首次分離發現並描述。

盾殼黴菌菌絲生長及分生孢子萌發的溫度範圍為 0-30°C，以 20°C 為最適宜，在高溼度下有利於盾殼黴菌分生孢子生長 (Campbell, 1947)，生長和產孢的最適 pH 範圍在 3~6 之間。生長分布廣泛，各大洲皆有分離得到盾殼黴菌的紀錄 (Muthumeenakshi *et al.*, 2001; McQuilken *et al.*, 2002)

盾殼黴菌是核盤菌的重要寄生菌，能寄生核盤菌 (*S. sclerotiorum*)、小核盤菌 (*S. minor*) (Whipps *et al.*, 1992)、三葉草核盤菌 (*S. trifoliorum*)、及白腐小核菌 (*Sclerotium cepivorum Berk*) (Turner *et al.*, 1975)，減少病原菌對植物引起的白黴、腐根及落葉等病癥 (Whipps *et al.*, 1992)。具有專一性強、作用時間長、對植物無致病性等特點 (師等, 2004)。另外，盾殼黴菌對許多細菌也有拮抗作用 (姜等, 1998)。

盾殼黴菌除了對病原性真菌有寄生作用，亦有抗細菌及抗真菌的活性。並在向日葵、萵苣及其它多種植物菌核病的生物防治方面已取得了顯著效果。歐洲市場上已經有專利為盾殼黴菌作為製劑的生物防治農藥產品 Contans WG 販售 (張，2008)。

由外觀形態上，盾殼黴菌菌絲為有色棉絮狀，菌落呈現平盤狀並規則的以圓形或橢圓形生長。而分生孢子(conidia) 是盾殼黴菌在土壤中存活的主要形式，也是傳播的重要媒介和生物防治劑中的重要成分之一。然而真菌的產孢受到營養、空氣、溫度及二次代謝物等許多因素的影響，也涉及到許多代謝途徑的調控。盾殼黴菌在土壤中通常呈休眠狀態，在遇上真菌菌核或被感染的植物病組織上才會有活性。

#### 一、盾殼黴菌活性代謝物質之探討

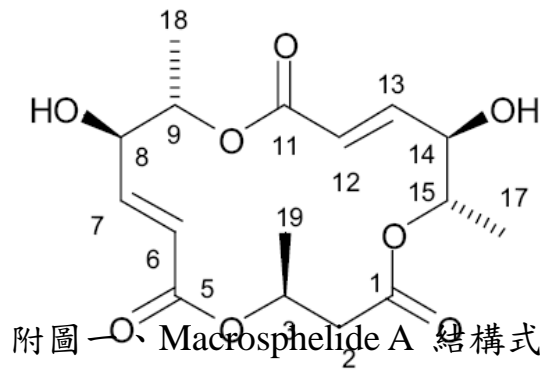
盾殼黴菌自從 1947 年被發現以後，對於病原性真菌抑制的生物防治方面之研究隨即被帶動，藉由培養盾殼黴菌於土壤中，進而寄生於核盤菌核及菌絲達到抑制核盤菌的效果。隨後研究重點轉向研究二次代謝物質。盾殼黴菌所分離純化之二次代謝物除具有抑制真菌效果外，尚有抗癌的功效。

## (一)抗微生物的二次代謝物

自從化學合成抗菌物質出現後，人們在農業上對其依賴性日漸增加，但長久使用下來，這些施以化學藥物之病原真菌或病原菌也開始自我突變產生抗藥性，對於臨床或是傳染疾病上，都對人體產生嚴重的威脅。這也使得科學家將研究轉向利用微生物的二次代謝物來尋找新的活性物質。盾殼黴菌可產生下列抗菌二次代謝物：

### 1、Macrosphelide A

核盤菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)是全球性腐生型的植物病原菌，可引起 408 種植物的菌核病(Boland *et al.*, 1994)。由內生真菌 *C. minitans* 二次代謝物中萃取，分離得到 Macrosphelide A 具有抑制真菌生長能力，可抑制菌絲體的生長。對於病原真菌 *Sclerotium sclerotiorum* 抑制效果  $IG_{50}$  (抑制 50 % 真菌生長所使用的代謝物濃度) 為 46.6  $\mu\text{g/ml}$  對於 *Sclerotium cepivorum* 抑制效果則為 2.9  $\mu\text{g/ml}$  明顯優於 *Sclerotium sclerotiorum*；而當 Macrosphelide A 濃度增加到 175  $\mu\text{g/ml}$  時，則完全抑制 *Sclerotium cepivorum* 的生長。(McQuilken *et al.*, 2003)。附圖一為其結構式。

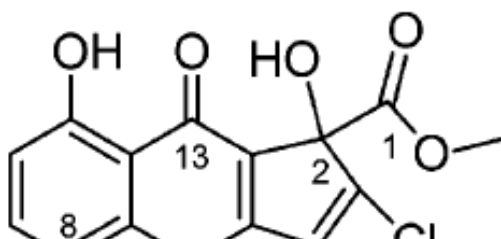


## 2、Coniothyryone

內生真菌 *C. cerealis* MF7209 分離出二次代謝物 Coniothyryone 作為新的抗生素，主要的作用機制為抑制病原細菌體內蛋白質合成。

Coniothyryone 是由內生真菌 *C. cerealis* MF7209 中分離得到之二次代謝物質，做為一種新興的抗病原細菌物質；其抗病原細菌生長主要機制為抑制菌體內核糖體蛋白合成。Coniothyryone 的作用在於將核糖體 30S 次單元中之 r-protein S4 構型改變而進行抑制，另可藉由抑制 DNA 合成的機制中止菌體生長。使 r-protein 的構型改變或抑制 r-protein 的生合成來有效的使蛋白質合成受到中斷。

對於 *Bacillus subtilis* 和 *Haemophilus influenzae* 最小抑制濃度為 16  $\mu\text{g/ml}$ ，對 *Streptococcus pneumoniae* 及 *Enterococcus faecalis* 最小抑制濃度為 32  $\mu\text{g/ml}$ 。而對於病原細菌 *Staphylococcus aureus* 最小抑制濃度為 32  $\mu\text{g/ml}$ ，且測得抑制蛋白質合成  $\text{IC}_{50}$  值為 5  $\mu\text{g/ml}$ ，另外得知對抑制 DNA 合成  $\text{IC}_{50}$  值為 3  $\mu\text{g/ml}$ 。附圖二為其結構式，(Ondeyka *et al.*, 2006)。



## 附圖二、Coniothyrione 結構式

### (二)抗癌二次代謝物

1993年從短葉紅豆杉的韌皮部分離到*Taxomyces andreanae*，此內生真菌可以產生抗癌藥物Taxol，此發現使得內生真菌一躍成為產生對抗人類疾病藥物的新天然研究來源 (Stierle *et al.*, 1993)。也使得利用真菌代謝活性物質抑制腫瘤及癌細胞成為新趨勢。盾殼黴菌產生可抑制癌細胞的代謝物如下：

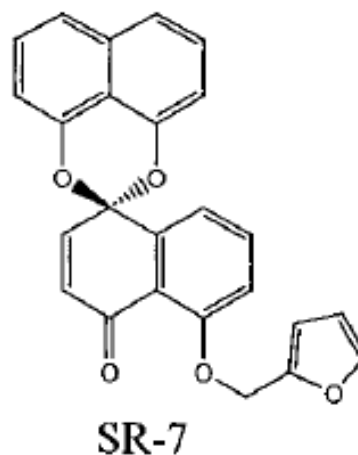
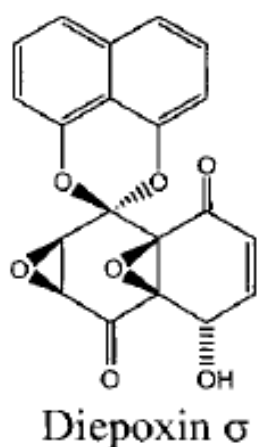
#### 1、Palmarumycins

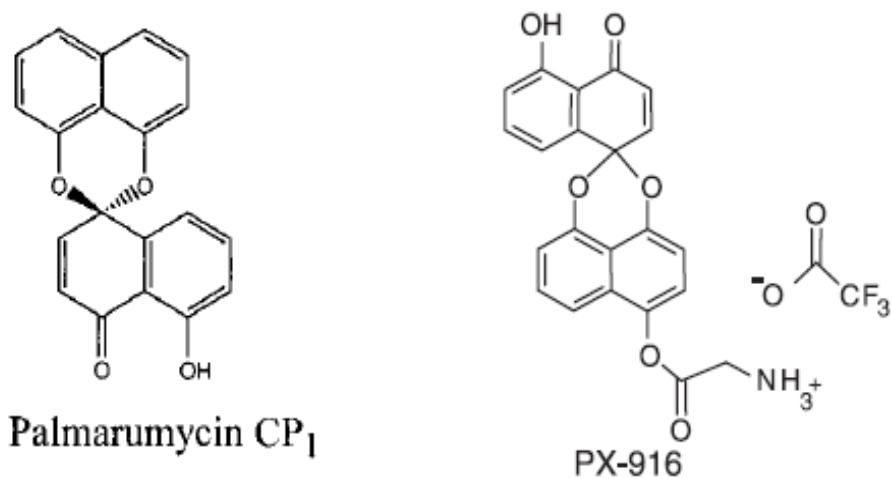
由 *C. palmarum* 和某些 *Coniothyrium* sp.之代謝物中分離得到一種新的活性物質 Palmarumycins CP1，經由改變官能基或構型上轉化獲得許多的衍生物質，皆具有和 Palmarumycins CP1 相似的生物活性，能抑制病原細菌、真菌的生長及抑制腫瘤細胞的生成 (Krohn *et al.*, 2007)。

文獻指出 Palmarumycin CP1 及其衍生物 Diepoxin  $\sigma$  和 SR7 可以對於細胞在進入細胞週期的 G<sub>2</sub>/M 期進行調控，進一步的控制細胞分裂抑制癌細胞的增生。對於人類乳腺癌細胞 MCF-7 抑制能力 IC<sub>50</sub> 分

別為 0.96、1.64 和 1.13  $\mu\text{M}$ ; 而對人類乳腺癌細胞 MDA-MB-231 之  $\text{IC}_{50}$  個別為 2.61、2.01 和 2.44  $\mu\text{M}$ 。其附圖三為其結構式 (Lazo *et al.*, 2001)。

Thioredoxin-1 (Trx) 主要與細胞增生和細胞凋亡之間的調控有著關聯性，而許多腫瘤細胞增生是由於 Trx 的過度表現。Palmarumycin CP1 雖可以有效抑制 Trx 的過度表現，但其水溶性不佳不易在體內溶解，導致無法在醫藥上受到重用。而其人工合成的前驅藥物 PX-916 具有較佳的溶解性，進入細胞後會進行分解成 Palmarumycin CP1 達到抑制 Trx 和 TrxR-1 過量表現的效果。Palmarumycin CP1 及 PX-916 對於抑制乳腺癌細胞 MCF-7 之  $\text{IC}_{50}$  分別為 1.0  $\mu\text{M}$  和 3.1  $\mu\text{M}$ ，附圖三為其結構式 (Powis *et al.*, 2006)。





附圖三、Palmarumycin CP<sub>1</sub>、PX-916 結構式、  
Diepoxin  $\sigma$ 、SR7 結構式

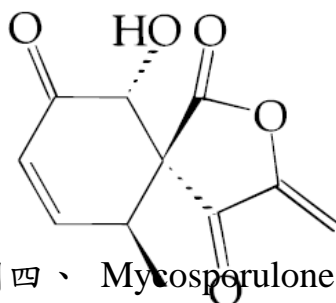
## 2、Mycosporulone

從 *C. sporulosum* 的發酵液中萃取分離得到具有多種抑制活性的代謝物質 coniothyriol 和 Mycosporulone。其中 Mycosporulone 具有抑制病原細菌及病原真菌的活性。對於病原細菌 *Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Staphylococcus aureus* 具有最小抑制濃度



為 14  $\mu\text{g/ml}$ 。對於病原真菌 *Candida albicans*、*Candida tropicalis* 及 *Cryptococcus neoformans* 皆有最小抑制濃度為 14  $\mu\text{g/ml}$ 。除了可以減少食品上的污染菌，另外在臨床上也可以抑制抵抗常見抗生素的病菌。在醫藥及食品工業上具有良好的發展性。附圖四為其結構式 (Guiraud *et al.*,1999)。

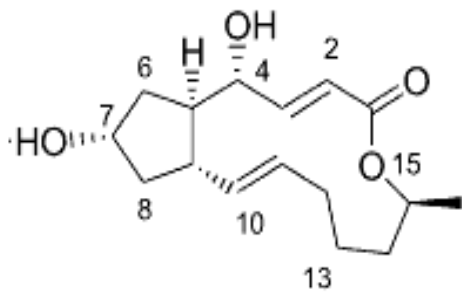
另外在抑制癌細胞方面，Mycosporulone 對於人類乳腺癌細胞 (MDA-MB 231)、前列腺癌細胞 (PC3) 和大鼠白血病細胞 (L-1210) 的抑制效果  $\text{IC}_{50}$  分別為 7.7  $\mu\text{g/ml}$ 、2.6  $\mu\text{g/ml}$  及 0.3  $\mu\text{g/ml}$ 。對人類正常肺組織細胞 ( $\text{MRC}_5$ ) 濃度提升至 100 $\mu\text{g/ml}$  依然不具毒殺性，但由於對正常細胞毒殺性較小，因此近來受到較多的試驗及發展。



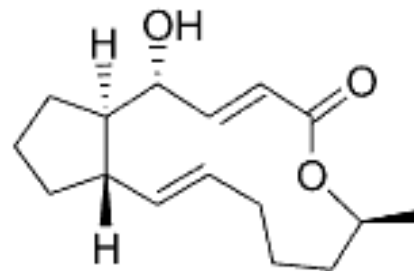
附圖四、Mycosporulone 結構式

### 3、Brefeldin A (BFA)

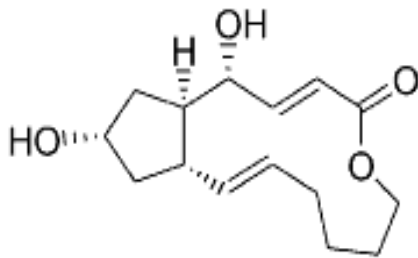
BFA是一個具有十三元環內酯結構的天然抗生素，最早發現於1958年(Singleton *et al.*, 1958)，從青黴屬的斜臥青黴(*Penicillium decumbens*) 分離得到並被命名為Ducumbin。隨後也被其他相關研究人員從許多其他微生物來源(包括 *Penicillium cyaneum*、*P. brefeldianum*、*P. simplicissimum*、*Ascochyta imperfecta*、*Nectria radicola*、*Curvularia launata*、*C. subulata*、*Phoma herbarum* 及 *Phyllosticta medicaginis*等(Betina *et al.*,1962)分離得到。此外近期也在*Paecilomyces* sp. 及 *A. clavatus*.等菌中發現(Jianfeng *et al.*, 2002)。早在1960到1970年代人們就發現BFA具有多種顯著生物活性，包括抗真菌、抗病毒、抗腫瘤等(Betina *et al.*,1964; Hayashi *et al.*, 1974)。2002年之後經研究證實BFA對於MCF-7乳癌細胞株的抑制率比Taxol強(IC<sub>50</sub>=2:5)，且在多種不同的內生真菌之代謝物質中皆可發現其存在(Wang *et al.*, 2002)。從*Phoma medicaginis* 產生的BFA可以保有其真菌的生長環境，避免被其他真菌二次感染(Weber *et al.*, 2004)。由於BFA具有多種生物活性，經濟價值極高，依其純化程度而有所增減。因此研究學者們也開始著手進行人工合成BFA。常見BFA的人工合成類似物見附圖五。



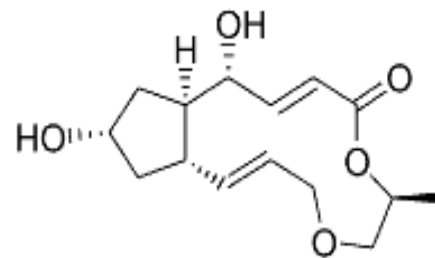
Brefeldin A



Brefeldin C



13-O-brefeldin A



15-Demethyl- Brefeldin A

附圖五、 Brefeldin A 、Brefeldin C、13-O-brefeldin A、  
15-Demethyl-Brefeldin A 等結構式

在哺乳動物中，BFA會抑制ARF 1進行招募coat proteins到細胞內膜形成轉運小泡(transport vesicles)的過程。BFA也常被用於抑制細胞因子等蛋白質的分泌，並用於增強分泌蛋白的免疫染色檢測。BFA可激活神經鞘磷脂循環(sphingomyelin cycle)，還可誘導一些腫瘤細胞發生凋亡。對於大鼠動脈血管舒張也有影響。對植物體懸浮培養細胞有抑制蛋白糖基化或抑制分泌以及改變其胞外蛋白型態。

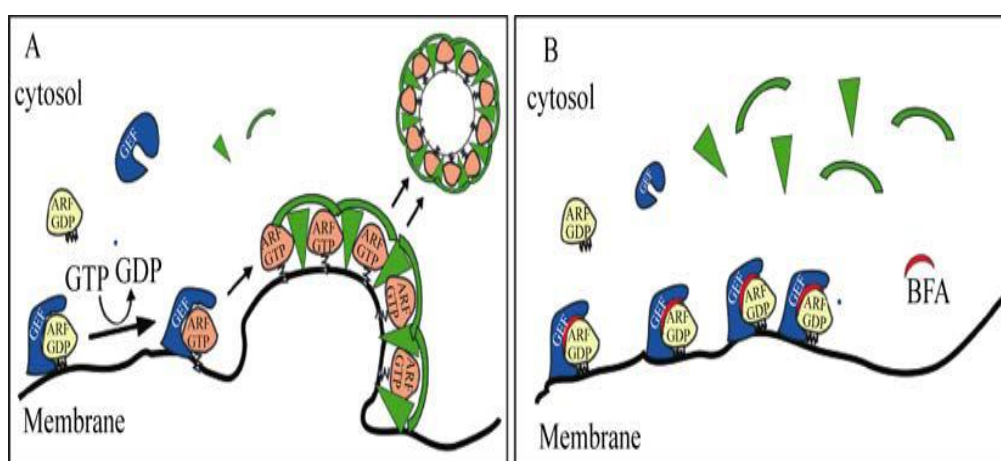
BFA對於真核細胞具有中斷囊泡運輸系統和阻斷糖蛋白分泌之效果 ( Klausner *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1999; Nebenfuhr *et al.*, 2002; Pelham, 1991; Sata *et al.*, 1999 )。Susana等研究發現以10 $\mu$ g/ml BFA作用於燕麥胚芽鞘片段可以抑制細胞膜上多糖體約60%。

研究指出BFA具有抗病毒活性，可以阻礙封套病毒(enveloped viruses)製造胞內或細胞膜上糖蛋白及感染顆粒。(Dasgupta *et al.*, 2001; Irurzun *et al.*, 1993; Mirazimi *et al.*, 1996; Suikkanen *et al.*, 2003).此外Harry等證實以 1 $\mu$ g/ml Brefeldin A作用於GH3細胞中可抑制其大約33%蛋白質生合成 (Harry *et al.*, 1994)

BFA是一種常用的蛋白轉運抑制劑，會抑制ARF-GEF (ADP-Ribosylation Factor-Guanine nucleotide Exchange Factor) 兩者的結合，ARF是個GTPase，參與高爾基體上分泌囊泡形成，如果被抑制住的話，則會將新生成的蛋白質抑制在內質網中，使其無法經過高爾

基體後分泌到胞外，導致細胞所需的分泌蛋白質減少而使細胞死亡 (Nebenfuhr *et al.*, 2002)。附圖六為生物體內ARF的功能激活及加入 BFA對正常細胞的反應(Anders *et al.*, 2008)。

BFA作用目標為鳥苷酸交換因子Sec7-type GTP-exchange factors (GEFs)中的次單元，能以非競爭性結合到複合物上並使其保持穩定。此交換因子主要功能為活化一種G蛋白稱為ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)(Jackson *et al.* , 2000)。活化態的ARF1與細胞膜之間有一段長脂肪煙鏈將兩者緊密連結。主要與細胞骨架的裝配和蛋白質運輸小泡的調控有重要的作用(Gillingham *et al.* , 2007；Mossessova *et al.* , 2003)。GEFs (Guanine-nucleotide exchange factors)藉由使ARF與GTP(活化態)和GDP(失活態)之間個別結合來精確調控其活性，當ARF發揮功能後將GTP水解成GDP成為失活態，ARF-GDP在GEF的催化下解離GDP改變構型並進一步與GTP結合成為活化態(Mouratou *et al.* , 2005；Gillingham *et al.* , 2007)



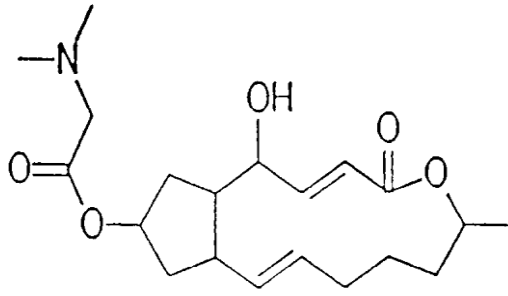
## 附圖六、ARF 的功能激活及對BFA 的反應

(A:正常條件下GEF 對ARF 的催化和小泡的裝配; B: BFA 條件下小泡不能正常裝配。)

## 二、近來趨勢與未來發展

BFA目前被作為一種重要的分子工具而廣泛應用於哺乳動物信號傳導途徑的研究。國際腫瘤協會在抗腫瘤體外篩選中發現BFA作為化學療法試劑有廣大的前景(Sausville *et al.* ,1996)。有鑑於BFA的可溶性不佳，導致在臨床實驗上無法直接做為服用藥物。BFA結構上具有兩個二級結構的氫氧基，可以此進行官能基構造上的修飾，增加其親水性。Phillips等從化合物中選出7-*N,N*-dimethylglycinate ester of BFA並稱其為breflate 結構式見附圖七。Breflate 除了比BFA更安定以及可溶性增加等特性外，也更適用於靜脈注射的臨床實驗上。(Phillips *et al.* ,1998)

近來BFA也常做為內質網壓力誘導物(ER stress inducers)。而摺疊不完全或不正確的蛋白質則停留在內質網內，直到摺疊成正確的型態或被降解掉。當這個蛋白質合成過程無法被正確地執行時，則會引起內質網壓力(ER stress)產生。而內質網壓力會啟動多種的訊息傳遞路徑，藉由BFA適當誘發內質網壓力，進而幫助我們能更深入研究及了解這些訊息傳遞路徑的機制。



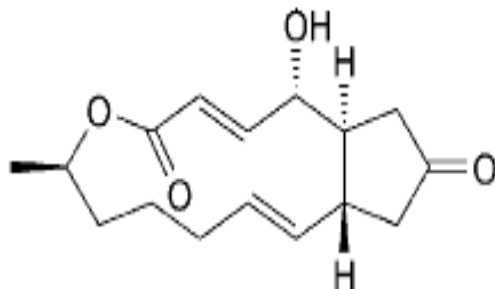
附圖七、brefflate 結構式

鑑於BFA具有多種生物活性及潛在的藥用價值，故開發和研究BFA的工作已受到人們的廣泛重視，是目前國際上抗癌藥物研究的一個熱點。而在抑制病原真菌方面也有研究指出dehydrobrefeldin A (7-oxo-BFA)附圖八。對於抑制植物體高爾基氏體的效果更優於BFA。國外在BFA的生物活性方面做了大量工作，但是國內對該化合物的研究甚少，特別在微生物發酵生產BFA等研究方面並不多見。至於生產BFA菌株方面，主要以青黴屬真菌所得產量較高。劉等(劉，2005)以經過正交化試驗調整得到最適培養組成(馬鈴薯200g(煮汁)、葡萄糖20g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0g，CaCO<sub>3</sub> 5.0)液態發酵青黴屬真菌SHZK-1生產BFA，可得最高產量151.6 mg/L。加上胞內也有發現少量BFA，估計此菌產量可達160 mg/L以上。鄭等(鄭，2009)布雷正青黴變種ZJB082702及其發酵製備BFA產量可高達943.8 mg/L。此外，劉也以液態培養基為基礎設計固態發酵培養基質(馬鈴薯300g(煮汁)、葡萄糖25g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、



MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g，NaCl 0.5g、瓊脂 2.0g)。首次利用固態發酵青黴菌株，以每毫升固體培養基接種0.5X10<sup>6</sup>個孢子。BFA經固態發酵產量高達392.16 mg/L，是液態發酵產量的2.6倍。

因此本研究希望利用發酵槽探討發酵BFA操作條件，同時也對液態培養基做各種不同碳源及氮源之比較，以提升BFA產量之液態培養基組成。另外也針對液態培養萃取出以HPLC進行分析，找尋除BFA以外是否包含其他具有抑制癌細胞毒殺活性的衍生物質或類似物。



附圖八、dehydrobrefeldin A (7-oxo-BFA) 結構式

## 參、材料與方法

### 一、試驗材料

#### (一) 內生真菌

由中研院生物多樣性中心趙淑妙博士提供內生真菌盾殼黴菌  
(*Coniothyrium* sp. CSM)。

#### (二) 受試細胞

人類肺腺癌細胞 A549 (BCRC 60074)，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

#### (三) 培養基與試藥

### 1. 真菌培養基

(1) Modified mycological medium (M broth)，pH 7.0±0.2。

Benzoic acid	0.05 (g/L)
D-glucose	40
Sodium acetate trihydrate	1
Tryptic soy broth	10

(2) Potato dextrose agar (PDA)，pH 5.1±0.2。

Bacto agar	15 (g/L)
Potato dextrose broth (PDB)	24

### 2. 細胞培養基

RPMI-1640 cell culture medium , pH7.0±0.2 。

RPMI-1640 basal medium

Fetal bovine serum	5%
L-glutamine	2mM
Non-essential amino acid	1%
Penicillin and Streptomycin	10U/ml and 10 µg/ml
Sodium pyruvate	1µM

## 二、實驗儀器

1、單門式高壓滅菌釜 (YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD.

Model : YMT) 。

2、pH meter (EUTECH instruments, Cyberscan 510, Singapore) 。

3、恆溫培養箱 (1) 低溫恆溫培養箱(KS, R.O.C.) 。

(2) 恆溫培養箱(Sanyo, Janpen) 。

4、冷凍乾燥旋轉濃縮機 (VV2000, Heidolph, Germany) 。

5、減壓濃縮裝置 (RE111, Buchi, Switzerland) 。

6、烘箱 (Risen, Taiwan)

7、離心機 (1) 低溫離心機 (Hettich, Janpen) 。

(2) 高速冷凍離心機 (Hettich, Germany) 。

(3) 桌上型微中量高速離心機 (Hettich, Germany) 。

8、HPLC (High performance liquid chromatography)

(1) L-6200A Intelligent pump (Hitachi, Janpan) 。

(2) L-4200 UV-Vis Detector (Hitachi, Janpan) 。

(3) D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi, Japan)。

(4)分析型管柱 Hypersil HS C18 5 $\mu$ m 250 $\times$ 4.6 m (Thermo, U.S.A.)。

(5)半製備型管柱 Hypersil HS C18 5 $\mu$ m 250 $\times$ 10mm (Thermo, U.S.A.)。

#### 9、極致效能液相層析系統

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)

##### 1. Quaternary Solvent Manager – QSM

MODEL CODE : QSM (Waters,USA.)

##### 2. Sample Manager – FTN

MODEL CODE : SDI (Waters,USA.)

##### 3. PDA e $\lambda$ Detector –極體陣列檢測器

MODEL CODE : UPL (Waters,USA.)

##### 4. FLR Detector – 螢光偵測器

MODEL CODE : UPF (Waters,USA.)

##### 5. 分析型管柱

Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters, Ireland)

#### 10、攪拌式發酵槽

7.5L 桌上型全自動微生物培養裝置, MG750V。(微聚科技, Taiwan)

### 四、實驗方法

#### (一) 培養基製備

##### 1、真菌培養基的製備

將 PDA 配製完後以 121 $^{\circ}$ C、15 分鐘滅菌，將滅菌後 PDA 倒入培

養皿混勻待凝固後使用。

## (二) *Coniothyrium* sp. CSM 活化及接種培養

### 1、固態培養基

將 *Coniothyrium* sp. CSM 以取樣刀分別切取三塊菌絲塊培養至 PDA 上，培養 7 天後觀察生長形態。

### 2、液態培養生長形態

*Coniothyrium* sp. CSM 在 Modified mycological medium (M broth 培養 5 天後，以濾紙分離菌絲體及培養液，觀察其生長形態並將菌絲體烘乾後秤重。

## (三) 液態發酵最適化培養

### 1. 菌菌元製備

將培養在 PDA 上 7 至 9 天的真菌，以直徑 0.84 cm 的打孔器挖取 10 顆圓形菌絲塊，培養於 100 ml M broth 液態培養基中，以 150 rpm，25°C 震盪培養 5 天，以此作為菌菌元。

### 2. 液態培養條件

*Coniothyrium* sp.CSM 培養 7 至 9 天，以打孔器取 10 顆直徑 0.84cm 菌塊加入 100 ml M broth 中，以 150 rpm，25°C 培養 5 天。另外改變培養之條件，以不同的碳源及氮源添加物進行培養，並測量其菌絲體乾重、pH 值變化及活性物質含量。

### 3. 發酵槽試驗

利用 7.5L 攪拌式發酵槽 (agitated fermentor) 進行培養，觀察並測量其菌絲體乾重、pH 值變化、殘糖含量及活性物質萃取。

培養條件如下：

- 培養溫度： 25°C
- 攪拌葉片： 六片標準式渦輪葉
- 攪拌速度： 150 rpm
- 接菌量： 5% 菌元培養液
- 通氣量： 1 vvm
- 培養體積： 2 L

### 4. 殘糖含量測定

取經抽氣過濾後之發酵液於 4°C 下，經冷凍離心 (11000rpm, 30 分鐘) 後，取上清液經 0.2 $\mu$ m 濾膜過濾，以分析管柱 Lichrospher 100 NH<sub>2</sub> (5 $\mu$ m)，250mm × 4mm (Thermo, Germany)，在移動相 85% 乙腈 (Acetonitrile)，流速為 1.0ml/min，取 10 $\mu$ l 濾液進行 HPLC 分析，再與標準品之標準曲線進行定量。

### 5. 菌絲體乾重測定

將發酵液以烘乾並先行稱重之濾紙進行抽氣過濾，再將濾紙上菌絲體以蒸餾水沖洗數次後，將帶有菌絲體的濾紙於 60°C 之烘箱乾燥至恆重，所得重量扣除濾紙乾重即為菌絲體乾重。單位以 g dry wt./L 培養液表示。

## 6. 有機溶劑萃取

*Coniothyrium* sp.CSM 液態培養 5 天後，分離菌絲體及培養液，發酵槽大量培養液先利用冷凍濃縮將培養液濃縮 10 倍 (500 ml 濃縮至 50 ml)，搖瓶試驗則直接取 5ml 發酵液加入等體積乙酸乙酯激烈震盪數分鐘後靜置一天。將有機上層取出揮發後復溶於 1ml 甲醇中，以 UPLC 作活性物質分析。另一方面將有機上層取出揮發後復溶於 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 中，將粗萃取物濃度調整為不同濃度後進行細胞毒性測試。

## 7. 活性物質分析

以 UPLC 分析型管柱 (ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 2.1x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) 移動相為 50% 乙腈 (Acetonitrile)，流速 0.5ml/min，注入樣品 2  $\mu$ l/次，偵測時間是 2 分鐘，偵測波長為 210 nm。分析圖譜再與標準品進行比對。

以半製備型管柱 Hyperpre Hs C18 8 $\mu$  250x10 mm (Thermo, Germany)，移動相為 70% 乙腈 (Acetonitrile)，流速 1.0 ml/min，注入樣品 50  $\mu$ l/次，偵測時間是 30 分鐘，偵測波長為 210 nm，感度 10。分成二個 HPLC 收集區，將收集到的濾液經冷凍濃縮去除有機

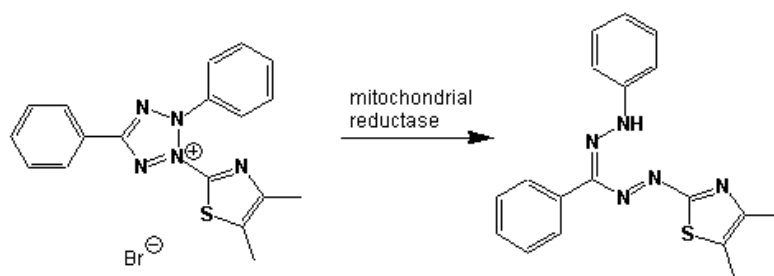
層，再將其冷凍乾燥後秤重，復溶於 100 % DMSO 中，將其濃度調整為，做細胞毒性測試。

#### (四) 活性物質 brefeldin A 毒殺細胞存活率計算--MTT assay

##### 1、 MTT assay

##### 原理

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 為易溶於水之黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞線粒體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原）。可利用測 O.D.值得知細胞還原 MTT 的能力(formazan 形成量)，此 O.D.值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。



附圖一、細胞代謝產生 formazan 之反應圖

##### 實驗方法

##### 材料：

##### (1) Chemicals



DMSO (Scharlau)

MTT (Sigma)

(2) Reagents

0.5 mg/ml stock solution

MTT 5 mg

PBS 10 ml

以0.2 $\mu$  filter 過濾，避光貯存於4 $^{\circ}$ C

2、步驟：

(1) MTT試劑配製(避光處理)

以RPMI medium將MTT stock solution 稀釋成0.5mg/ml MTT working reagent。

(2) 加藥處理

先將受測細胞培養於 96 孔盤中，每孔中以100 $\mu$ l 培養液，接種  $2 \times 10^5$  個細胞，培養於5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱中，待細胞貼附於孔盤後進行加藥處理。之後去除 96孔盤中之 medium進行MTT 分析

(3) 呈色分析

1. 欲檢測之96-well plate ，加入100  $\mu$ l /well之MTT溶液。
2. 放入37 $^{\circ}$ C，5%  $\text{CO}_2$ 的細胞培養箱中培養4小時，時間長短可視 MTT代謝後產生深藍色結晶物的量而增減。
3. 取出96-well plate，小心抽乾黃色的MTT溶液，且盡可能不抽

走細胞及MTT結晶。

4. 加入100  $\mu$ l /well的DMSO，放入培養箱中約20分鐘，使MTT結晶完全溶解擴散均勻即可，時間不可過久，MTT結晶完全溶解於DMSO中呈紫色。
5. 以ELISA reader測定波長OD<sub>595</sub>之讀值。推算細胞存活率。

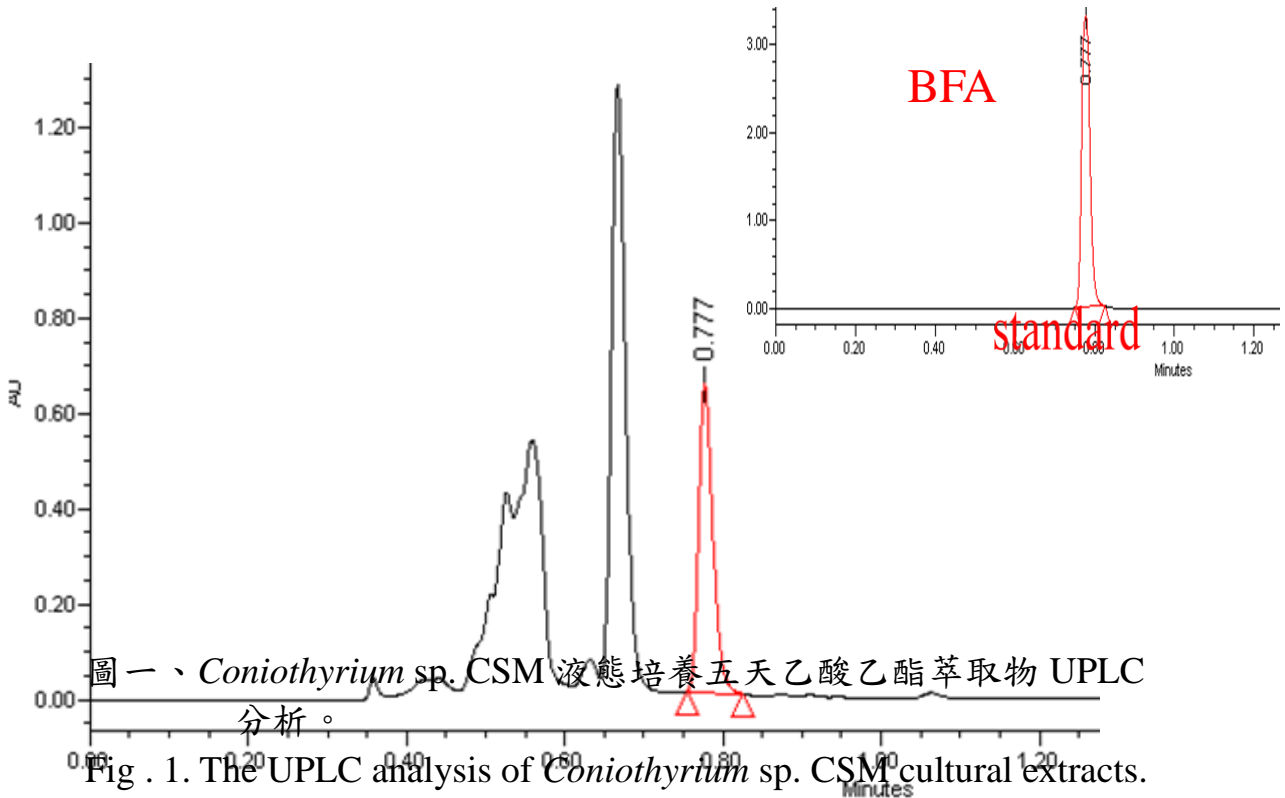
MTT assay 分析細胞公式如下：

$$\text{細胞存活率}(\text{cell viability } \%) = (\text{O.D}_{\text{sample}} / \text{對照組}_{\text{control}}) \times 100\%$$

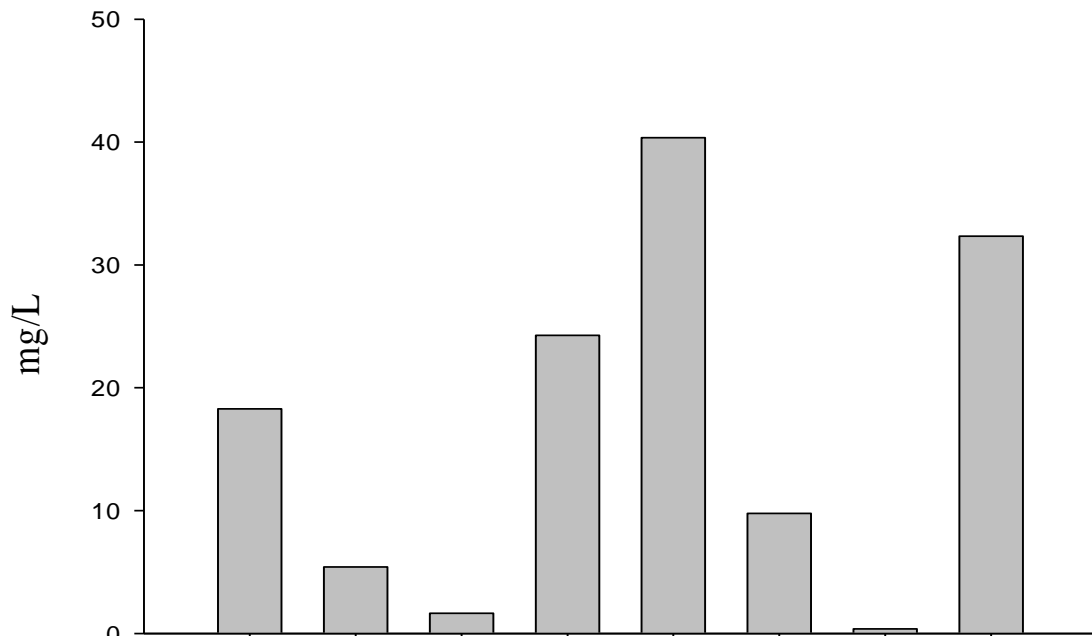
## 肆、結果討論

### 一、菌株篩選

為尋求能穩定產生有效生物活性物質的 *Coniothyrium* sp.CSM 菌株，從培養皿中挑選不同菌落進行培養，篩選分離具有 BFA 較高產量之菌株進行後續實驗。菌株培養液乙酸乙酯萃取物經 UPLC 分析結果如圖一。圖中滯留時間 0.777min 即為 BFA。



隨機選用 8 個菌落，編號 A1~A8，菌落經液態培養後，再用乙酸乙酯萃後，以 UPLC 分析定量 BFA 產量，結果如圖二。BFA 產量以 A5 最高，後續實驗即以 A5 為實驗菌株。



圖二、*Coniothyrium sp.* CSM 不同菌落 Brefeldin A 產量之比較。

Screening strains

Fig. 2. The comparison of Brefeldin A productivities of *Coniothyrium sp.* CSM strains.

## 二、培養液抗癌活性之確認

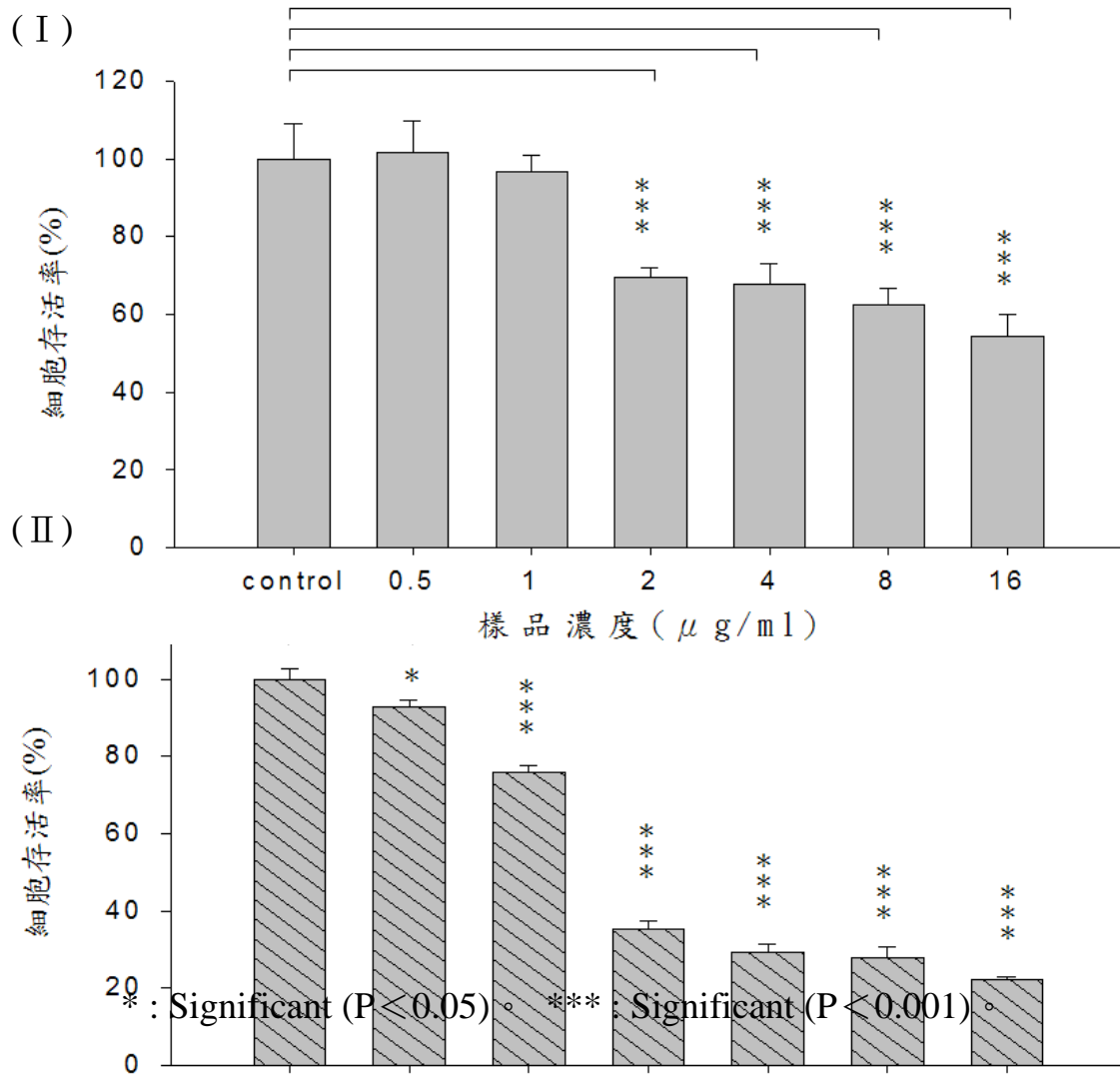
為確認此一生物活性物質，菌體經長期培養，活性是否有所改變，或者因外在培養條件改變而導致活性物質消失，本研究將進行下列試驗。

### (一) *Coniothyrium* sp. CSM 代謝物之細胞毒殺性

將 *Coniothyrium* sp. CSM 於 M broth 搖瓶中進行震盪培養 5 天，發酵液以乙酸乙酯萃取，500ml 的發酵液約可萃取出 16 mg 萃取物。16 mg 的粗萃物溶於 1 ml 的 DMSO 做為加藥樣品，樣品稀釋成不同濃度後對肺癌細胞 A549 進行細胞毒性測試。結果如圖三。

萃取物對於 A549 具有明顯的抑制效果，經加藥 24 小時之後，於低濃度 2  $\mu\text{g/ml}$  即有明顯的抑制效果，細胞存活率約為 69.4%，樣品濃度 4  $\mu\text{g/ml}$  則有相似抑制效果，細胞存活率為 67.8 %。添加高濃度 8  $\mu\text{g/ml}$  樣品時抑制效果比起其他濃度則更明顯，細胞存活率為 62.3 %。最高添加濃度 16  $\mu\text{g/ml}$  樣品則有最顯著的抑制效果，與其它濃度相比有趨於五成的抑制率，細胞存活率僅剩 54.2 %。而 A549 在經由加藥 48 小時之後各組樣品抑制效果更為顯著，與對照組相比在低濃度 0.5  $\mu\text{g/ml}$  即有明顯的抑制效果，細胞存活率約為 92.7 %。濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  細胞存活率則為 75.9 %。除了前述兩組樣品，其於濃度對於 A549 皆具有相當好的抑制效果，細胞存活率均低於 50%。在最高濃

度 16  $\mu\text{g/ml}$ ，細胞存活率僅剩 22.1 %。結果顯示在低濃度處理下 24 小時無法對於癌細胞有明顯抑制效果。但經 48 小時處理後中、高濃度樣品皆有顯著的抑制效果。

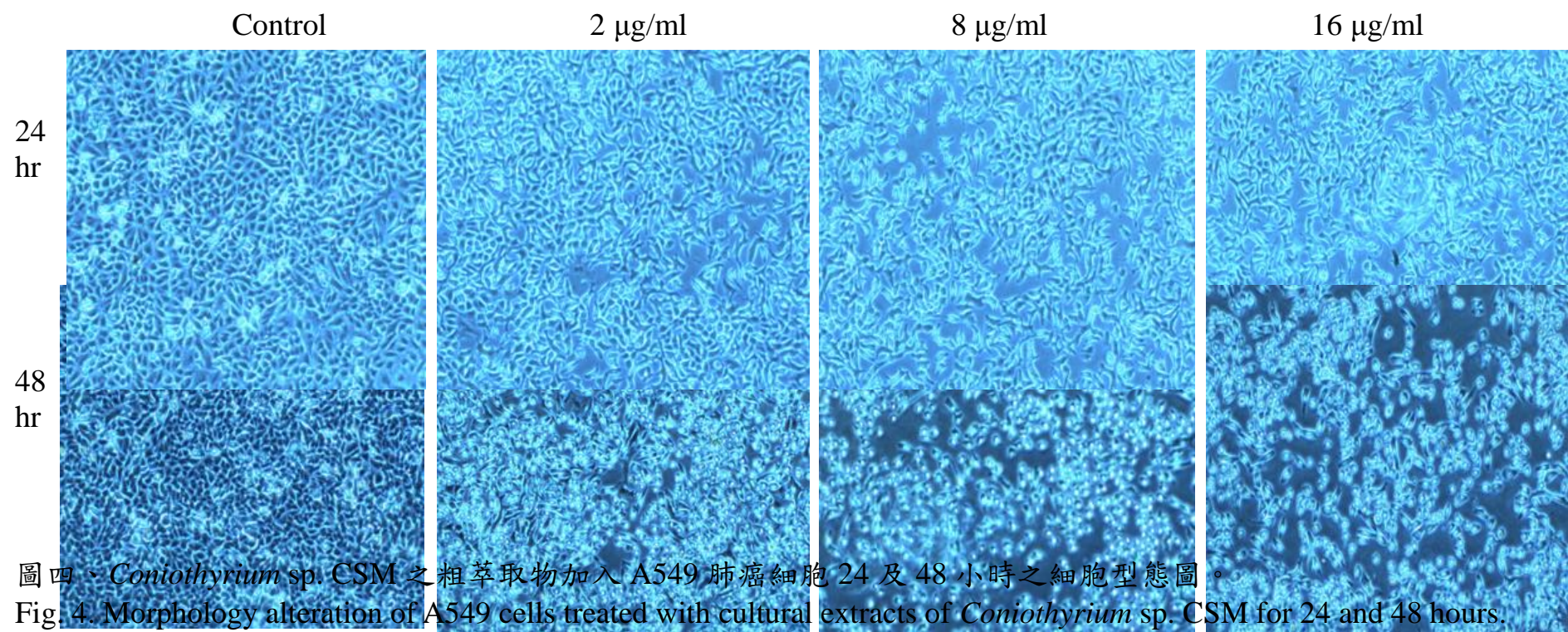


圖三、*Coniothyrium* sp. CSM 發酵液萃取出之細胞毒性測試16  
 - ( I )24 小時( II )48 小時

Fig. 3. The survival ratios of A549 cell treated with ethyl acetate extracts of *Coniothyrium* sp. CSM culture. - ( I )24hr ( II )48hr.

添加萃取物對 A549 細胞型態的改變，如圖四所示。由於濃度 1、2 $\mu\text{g/ml}$  與 4、8 $\mu\text{g/ml}$  兩組細胞型態上類似，皆以高濃度處理做為代表。24 小時試驗組在 2  $\mu\text{g/ml}$  與控制組對照之下，細胞數有減少的趨勢細胞之間也有孔隙產生，濃度提高至 8  $\mu\text{g/ml}$  時細胞間孔隙明顯增加，細胞外型變成較為細長狀，最高濃度 16  $\mu\text{g/ml}$  時細胞數驟減。經加藥 48 小時後可以發現在 2  $\mu\text{g/ml}$  時細胞型態即有顯著變化，細胞明顯驟縮，呈現圓形。8  $\mu\text{g/ml}$  處理組細胞型態除了驟縮呈現圓形外，多數細胞皆無法貼附在培養皿而漂浮於培養皿之中，16  $\mu\text{g/ml}$  處理下幾乎無細胞貼附於培養皿中，培養皿中細胞皆趨於死亡。





### 三、液態培養基碳源及氮源對活性物質產量之影響

*Coniothyrium* sp.CSM 二次代謝物中，BFA 是已確定的有效成份，因此不同碳、氮源對活性物質產量的影響，即以 BFA 產量為指標。

#### (1) 碳源之影響

基礎培養基中含有 4% 葡萄糖，其餘試驗組以果糖、麥芽糖、蔗糖、乳糖做為替代碳源。試驗結果如表一。顯示以基礎培養基之葡萄糖以及蔗糖和果糖所含活性物質濃度較高，乳糖代謝活性物質產量則為最低。菌絲體乾重方面，以麥芽糖試驗組菌絲體乾重最重，葡萄糖次之，乳糖組則為最低。乳糖無論在菌絲體乾重或是活性物質產量皆明顯低於其他試驗組別，各項數據顯示乳糖並不適合做為菌體生長之碳源，而在最終培養液 pH 值以乳糖試驗組為最高，且略偏鹼性；可能菌體無法利用乳糖，菌絲體養分不足而發生自體分解導致 pH 值上升。

#### (2) 氮源之影響

本實驗所用之 M broth 已含有 Casin 及 Soybean meal，因此僅添加 1.0% 氮源於基礎培養基中；試驗除基礎培養基外，以四種不同氮源添加進行探討。試驗結果如表二。

實驗結果與碳源試驗組相似，以基礎培養基所產的活性物質含量最高，培養基中添加蛋白腴似乎不利於 BFA 的生產，而麥芽萃取物雖然能提供較好之菌絲體生長，但在對於產生活性代謝物質卻低於基礎培

養基。氮源試驗組在 pH 值方面，添加四種不同氮源的是培養基均普遍高於基礎培養基，原因是菌體在生長過程中利用培養基中的氮源代謝分解成鹼性物質，造成 pH 值增加。

藉由不同碳源影響菌絲體乾重以及活性物質產量可以得知，推測與其糖類組成有著相關性。對照基礎培養基之糖類，麥芽糖在組成上為兩個葡萄糖結合而成，蔗糖則為葡萄糖與果糖組成；而在發酵過程中，菌絲體為主要的初級代謝物質直接以葡萄糖進行轉換得到養分，活性物質 BFA 則屬於次級代謝物質，當培養環境不利於菌體生長，菌體轉而進行產生次級代謝物質，抵抗外界不利環境。因此以葡萄糖為主要碳源的麥芽糖試驗組，菌絲體乾重相對其他組別為最高，而蔗糖試驗組在發酵後期葡萄糖消耗殆盡，培養基中僅存果糖促使 *Coniothyrium* sp.CSM 產生二級代謝產物質 BFA。

氮源試驗結果也有相同趨勢，除了基礎培養基組別外，麥芽萃取物試驗組在活性物質也有不錯的表現量，與其他試驗組比較之下，麥芽萃取物所含糖類組成較多，一方面幫助增加菌絲體乾重，進而增加誘導活性物質產生。

表一、不同碳源對 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、pH 及 BFA 濃度之影響。

Table 1. The effect of various carbon sources on cell mass, pH value and BFA concentration of *Coniothyrium* sp. CSM cultures

Carbon sources (4.0 %)	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	BFA (mg/L) <sup>1</sup>
Fructose	6.04±0.06 <sup>C</sup>	5.32±0.15 <sup>D</sup>	28.96±0.73 <sup>B</sup>
Maltose	8.61±0.01 <sup>A</sup>	6.87±0.10 <sup>B</sup>	16.30±0.62 <sup>C</sup>
Sucrose	5.44±0.04 <sup>C</sup>	5.45±0.09 <sup>D</sup>	35.48±0.19 <sup>B</sup>
Lactose	3.36±0.02 <sup>D</sup>	7.74±0.15 <sup>A</sup>	8.99±0.40 <sup>C</sup>
Control	7.72±0.03 <sup>B</sup>	5.66±0.05 <sup>C</sup>	40.02±0.03 <sup>A</sup>

註：培養時間為 5 天。

註：Control 為添加 4 % 葡萄糖為碳源。

註：1：Means of triplicates ± standard deviation.

A-D：Means followed by the same letters in the same column are not significantly different (P < 0.05).

表二、不同氮源對 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、pH 值及 BFA 濃度之影響

Table 2. The effect of various carbon sources on cell mass, pH value and

BFA concentration of *Coniothyrium* sp. CSM cultures

Nitrogen sources (1.0 %)	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	BFA (mg/L) <sup>1</sup>
Yeast extract	5.58±0.20 <sup>B</sup>	7.62±0.08 <sup>A</sup>	12.93±0.43 <sup>C</sup>
Malt extract	7.57±0.43 <sup>A</sup>	7.04±0.06 <sup>A</sup>	37.74±0.18 <sup>B</sup>
Tryptone	4.91±0.13 <sup>B</sup>	7.83±0.01 <sup>A</sup>	2.08±0.00 <sup>D</sup>
Peptone	4.98±0.77 <sup>B</sup>	7.71±0.04 <sup>A</sup>	1.64±0.00 <sup>D</sup>
Control	7.72±0.27 <sup>A</sup>	5.29±0.01 <sup>B</sup>	40.02±0.03 <sup>A</sup>

註：培養時間為 5 天。

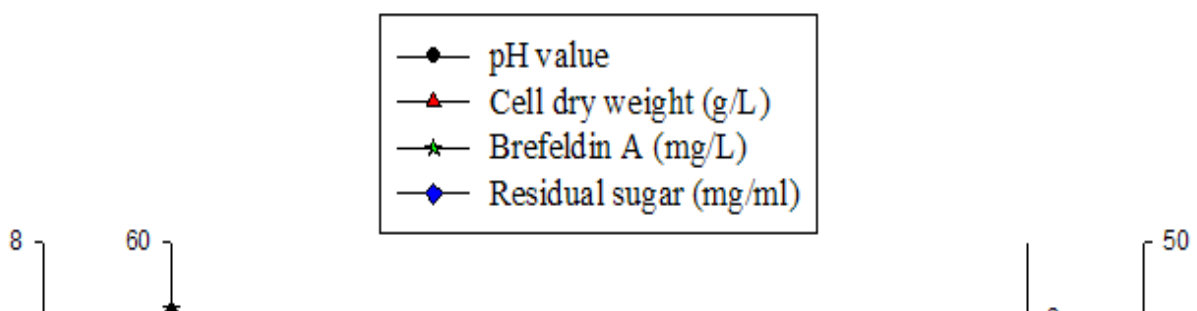
註：Control 為未添加氮源之基礎培養基。

註：1：Means of triplicates ± standard deviation.

A-D：Means followed by the same letters in the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

### (3) 攪拌式發酵槽培養試驗

經由搖瓶試驗中探討不同碳、氮源的發酵條件，對於 *Coniothyrium* sp. CSM 的菌絲體乾重以及 BFA 濃度的影響，得知經修飾培養基中之碳源及氮源，並無法得到顯著提升活性物質產量及菌絲體的成份。故以攪拌式發酵槽探討發酵過程中代謝物質之變化，採用基礎培養基。結果如圖五所示，發酵液之 pH 值隨發酵時間增加逐漸下降，可能為分解培養液中醣類而產生酸性物質，發酵末期有些微上升趨勢，推測菌體生長至後期因培養液中養分消耗光，菌體自行分解以獲得養分，而產生鹼性物質導致 pH 值回升，發酵末期 pH 值趨近於 4。*Coniothyrium* sp. CSM 於培養第二天起便進入對數生長期，菌絲體乾重快速增加，生長至第六天後趨於平緩，菌絲體乾重約達 8 g/L 左右。活性物質 BFA 於第二天開始明顯增加，與菌絲體生長類似，濃度在第 7 天後便不在持續增加，發酵後期 BFA 不再隨菌絲體生長有所提高。而發酵液中殘糖隨著菌絲體生長而對應減少，發酵至第 10 天時幾乎被菌體利用殆盡。



圖五、攪拌式發酵槽培養期間 *Coniothyrium* sp. CSM pH 值、  
菌絲乾重、BFA 及殘糖含量濃度比例之變化。

Fig. 5. Variations of pH value, cell mass, residual sugar and BFA concentration of *Coniothyrium* sp. CSM culture during the time period of fermentation.

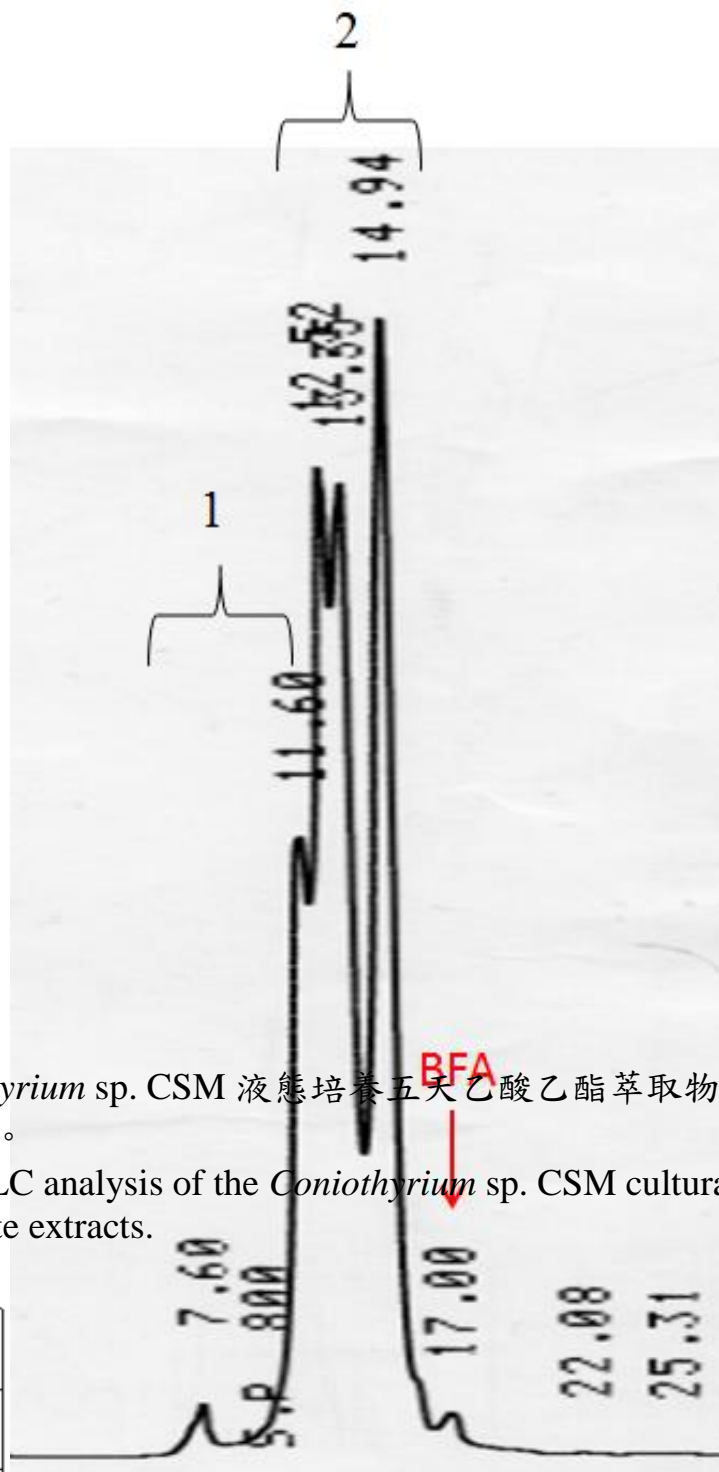
#### 四、活性物質之區分

為了解萃取物中除了 BFA 之外，是否含有其他生物活性物質。萃取物 HPLC 分析圖(圖六)中除 BFA 之外，尚有的二個區域 Fraction 1 (7-8 min)、Fraction 2 (10-16 min)，個別收集此二區域沖提液，凍乾後復溶於 DMSO 中進行細胞毒性測試，觀察哪一區域具有抑制癌細胞之有效成份存在。。

將二區域(F-1、F-2) 製備之樣品溶於 DMSO 中進行細胞毒性測試。F-1 結果如圖七，0.5  $\mu\text{g/ml}$  的 F-1 對於 A549 無論在 24 或 48 小時均無顯著毒殺性；加藥 24 小時細胞存活率為 95.4 %，濃度 2  $\mu\text{g/ml}$  細胞存活率為 92.1 %。經過 48 小時加藥結果與 24 小時類似，在濃度 2  $\mu\text{g/ml}$  比 24 小時更不顯著，可能是缺乏有效抑制癌細胞能力，導致細胞持續生長降低顯著性。由結果顯示 F-1 對於 A549 沒有進一步的毒殺效果。在 F-2 試驗中(如圖八)，加藥 24 小時雖與 F-1 結果類似，僅最高濃度有顯著細胞毒殺性，但經過 48 小時 F-2 之加藥處理下，濃度 0.6 $\mu\text{g/ml}$  及 1.2 $\mu\text{g/ml}$  顯著性均高於 F-1 試驗組。細胞存活率分別為 92.3 %、90.7 %。

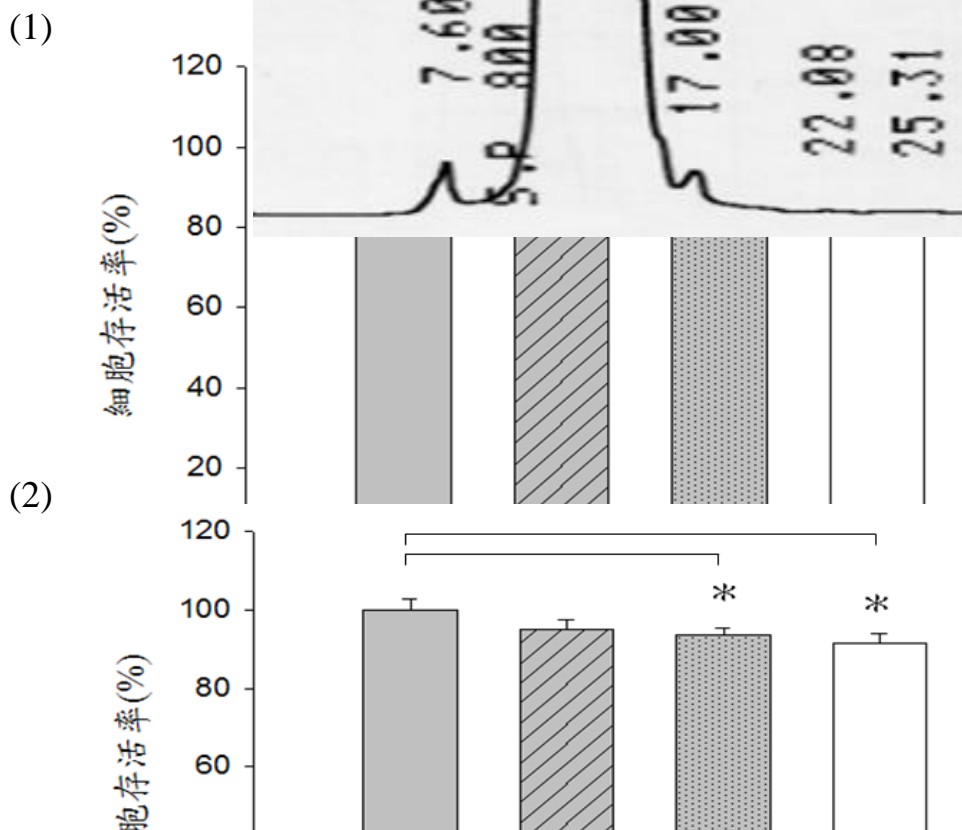
實驗結果與先前試驗結果類似(紀，2009)。F-1 對於 A549 不具毒殺性，F-2 雖有效果但不如 BFA，而先前試驗指出 F-2 低濃度下無法有效抑制細胞生長，實驗將進一步提高 F-2 濃度確定其抑制效果。





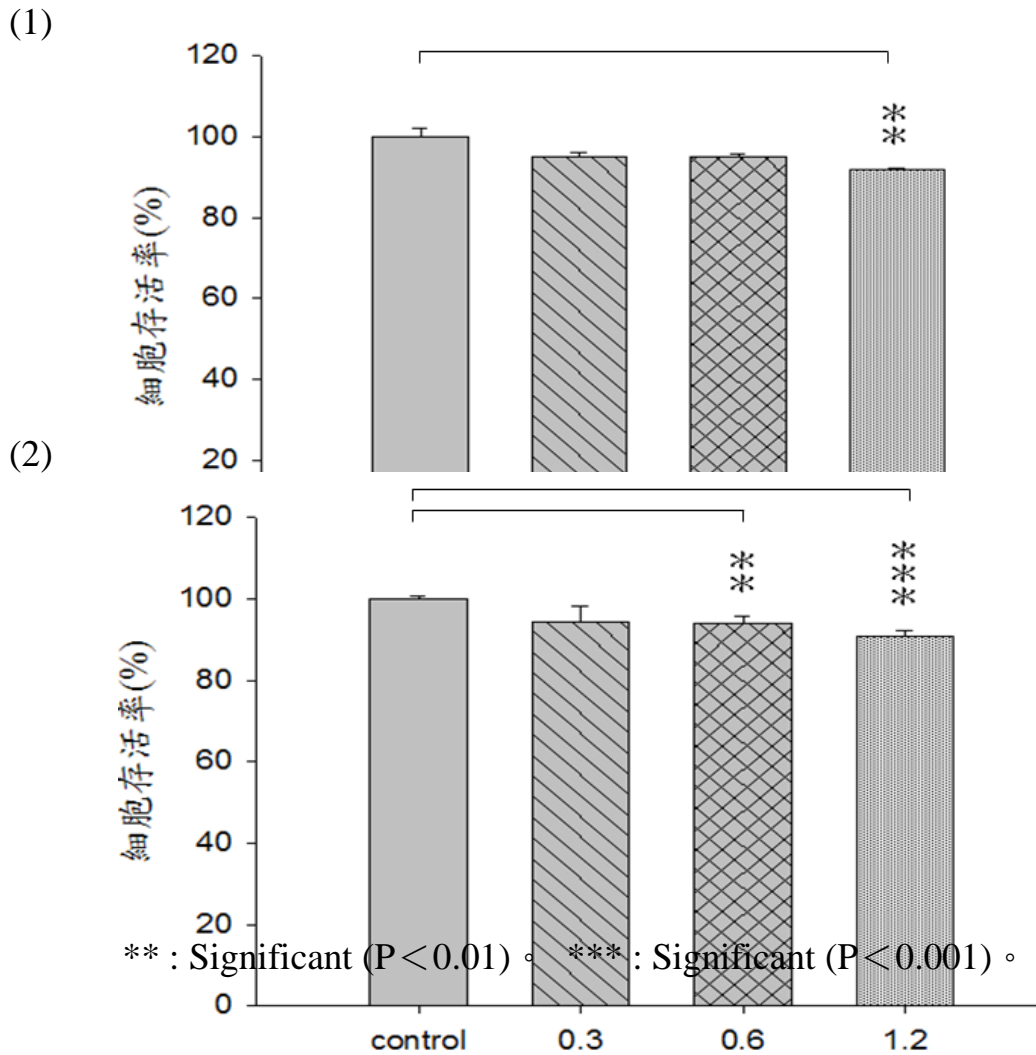
圖六、*Coniothyrium* sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。

Fig. 6. The HPLC analysis of the *Coniothyrium* sp. CSM cultural ethyl acetate extracts.



\*\* : Significant ( $P < 0.01$ ) 。 \*\*\* : Significant ( $P < 0.001$ ) 。

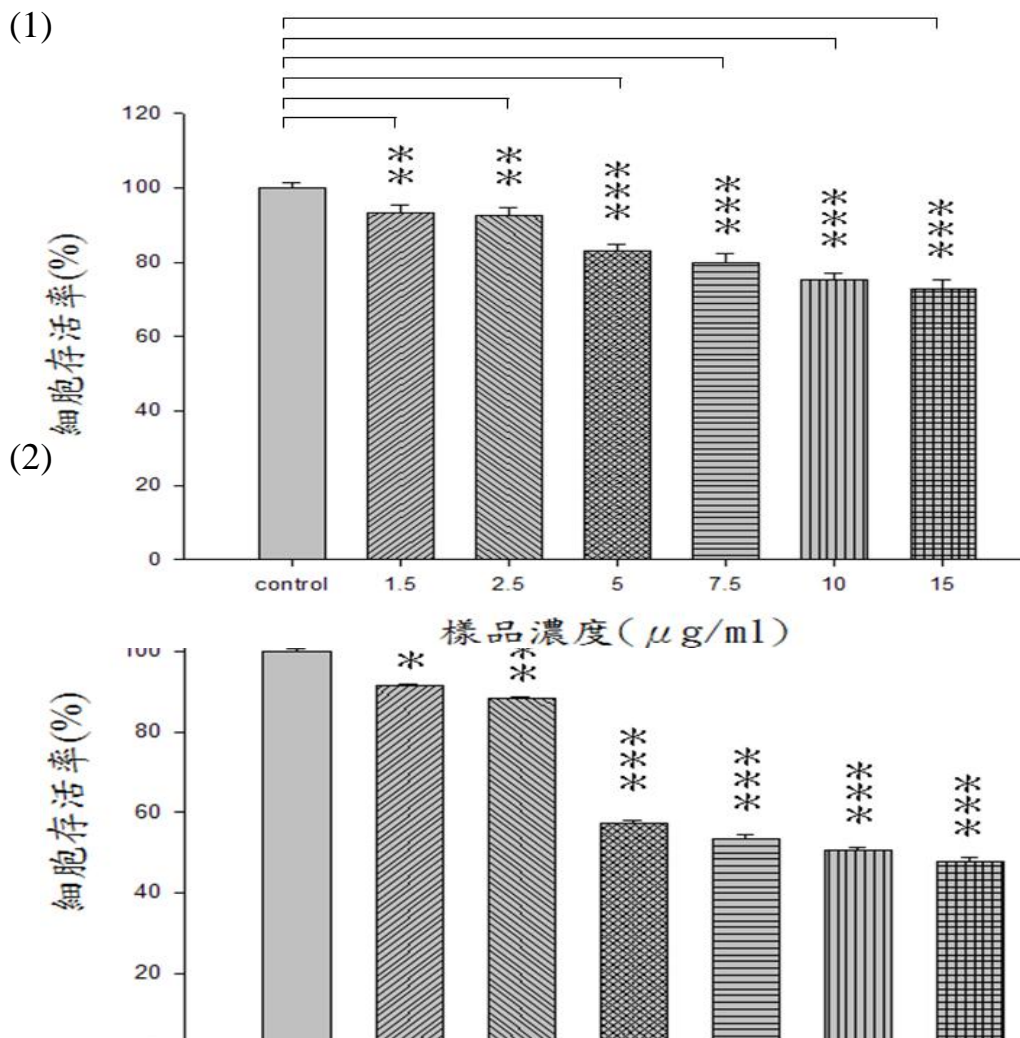
圖七、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產  
物 Fraction 1 之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。  
Fig. 7. The cytotoxic assay of the Fraction 1 collected from the HPLC  
eluent. (1)24 小時；(2)48 小時。



圖八、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 2(低濃度)之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。  
 Fig. 8. The cytotoxic assay of the Fraction 2 collected from the HPLC eluent. (1)24 小時 ;(2)48 小時。

藉由二個區域之沖提液結果，得知 Fraction 2 對於癌細胞有較為顯著的抑制效果，實驗將進行提高 F-2 濃度並測試細胞毒殺性。結果顯示如圖九；F-2 最高濃度提高至 15µg/ml，經加藥處理 24 小時，細胞存活率隨著樣品濃度增加而減少，最高濃度細胞存活率為 72.9 %。而經過 48 小時處理後，在濃度 5µg/ml 以上細胞存活率有明顯下降的趨勢，但細胞存活率降低趨勢變化不大。在 15µg/ml 細胞存活率為 49.2%。

藉由提高 Fraction 2 濃度結果得知對於抑制 A549 具有不錯的效果。雖然不如 BFA (紀, 2009)。, 但從 Fraction 2 之 UPLC 分析(圖十)滯留時間來看, Fraction 2 內之物質極性較大故水溶性也較佳, 由於 BFA 本身具多圓環結構可溶性不佳, 導致臨床上不利於開發成為口服藥物 (Phillips *et al.* , 1998), 因此分析探討 Fraction 2 內之物質是否具有不同活性的物質, 或含有其他有效成分將是另一重點。不過經 UPLC 分析圖譜得知, 區分物中仍含有許多物質存在, 需再由 UPLC 或其他分析儀器進一步分離純化。



\*\* : Significant ( $P < 0.01$ ) 。 \*\*\* : Significant ( $P < 0.001$ ) 。

圖九、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 2(高濃度)之細胞毒性測試 (1)24 小時 (2)48 小時。  
Fig. 9. The cytotoxic assay for HPLC product of Fraction 2 of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts. (1)24 小時 (2)48 小時。

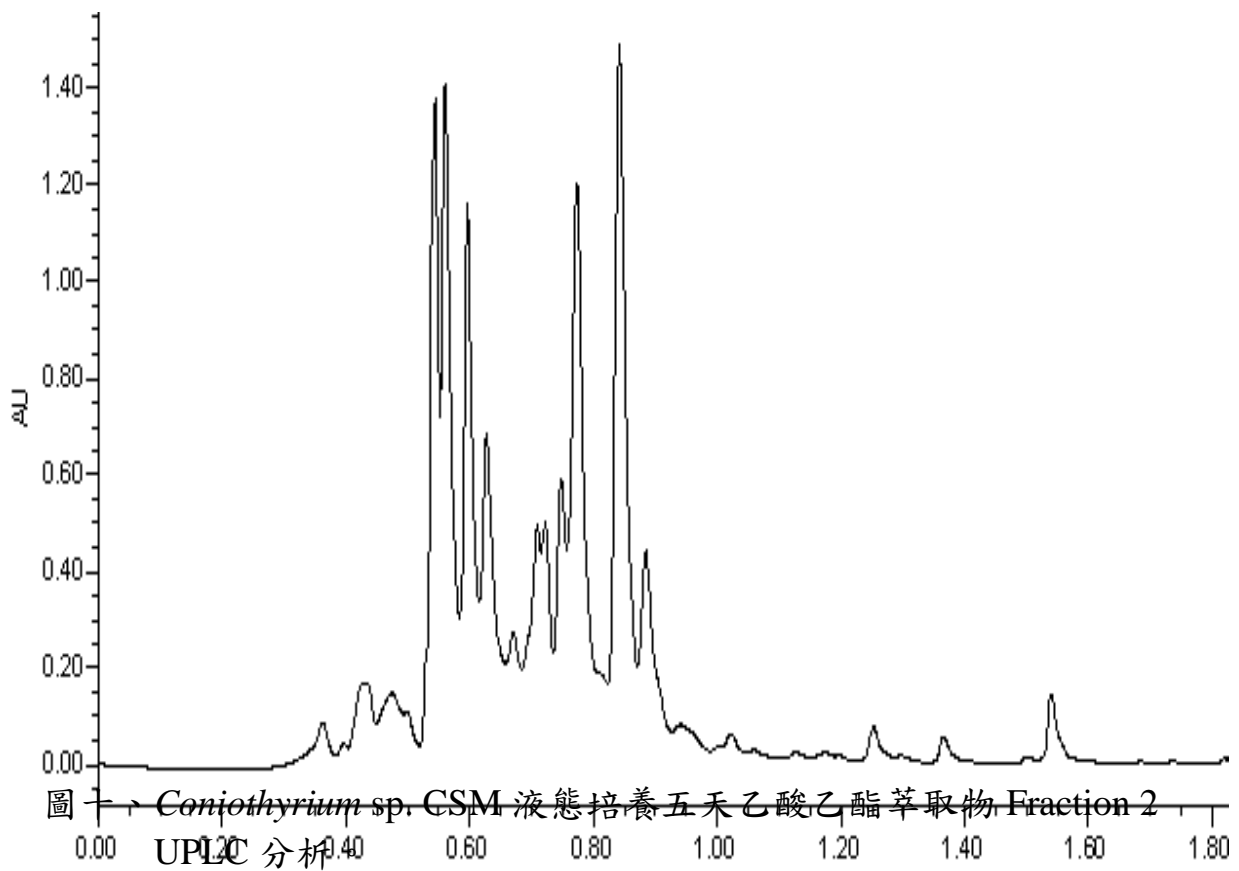


Fig. 10. The UPLC analysis of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts Fraction 2 that incubated in liquid culture for five days.

## 五、結論

*Coniothyrium* sp. CSM 之發酵液萃取物，對於抑制癌細胞有顯著的效果，經 UPLC 分析圖譜對照下得知萃取物中含有一有效活性物質 BFA。藉由探討液態培養基之碳、氮源，發現對於 BFA 並沒有顯著提升的效果。

藉由攪拌式發酵槽培養 *Coniothyrium* sp. CSM 可以提升 BFA 的產量，約為 47 mg/L。未來可望經由修飾其培養基或以更有效率之萃取及純化方法達到提高 BFA 產量的目的。

除了 BFA 外之 *Coniothyrium* sp. CSM 發酵液粗萃取物，經 HPLC 分離成二個區分樣品 Fraction - 1、Fraction - 2 (F-1, F-2)，將兩個樣品分別進行細胞毒性測試，結果顯示 F-2 抑制癌細胞效果優於 F-1。

由於 BFA 對於正常細胞也具有毒害性，加上水溶性不佳，使其成為臨床藥物方面受到阻礙。未來將以分析儀器進行分析和分離，期望 Fraction - 2 中具有其他抑制癌細胞等的活性物質。

## 陸、參考文獻

洪筱雯。2007。本土內生真菌生物活性物質之篩選。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

紀仁翔。2009。內生真菌 *Coniothyrium* sp. CSM 生物活性物質最適化發酵條件的探討。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

師俊玲、堵國成、陳堅。2004。盾殼黴菌在油菜菌核病菌生物防治中的應用。中國生物工程雜誌, 23: 27-31

姜道宏、李國慶、易先宏。1998。盾殼黴所產抗細菌物質的特性。植物病理學報。28: 29 - 32

張姝、張永杰。2008。植病生防菌盾殼黴的分子生物學研究進展。微生物學通報。35: 1485-1489。

趙詠梅。2005。The potential role of c-Jun in hepatocytes under ER stress。國立成功大學生物化學暨分子生物研究所碩士論文。

劉萬雲、方美娟、許鵬翔、黃耀堅、趙玉芬。2005。產胞外布雷菲德菌素A青黴發酵條件的研究。微生物學通報。32: 52-57

鄭裕國、王亞軍、薛鋒、薛亞平、沈寅初。2009。布雷正青霉變種 ZJB082702 及其發酵製備布雷菲德菌素 A 的應用。China Patent 101445784

Anders N., Jurgens G., 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci.* 65: 3433-3445.

Betina V., Betinova M., Kutkova M., 1966. *Arch. Mikrobiol.* Effects of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. 55: 1-16

Betina V., Drobnica L., Nemeč P., Zemanova M. 1964. Study of the antifungal activity of the antibiotic, cyanein. *J. Antibiot.* 17: 93-95

Betina V., Fuska J., Kjaer A., Kutkova M., Nemeč P., Shapiro R.H., 1966. Production of cyanein by *Penicillium simplicissimum*. *J. Antibiotics, Ser. A.* 19:115-122

- Betina V., Nemec P., Dobias J., Barath A., 1962. Cyanein, a new antibiotic from *Penicillium cyaneum*. *Folia microbiologica*. 7: 353 - 357.
- Boland G. J., Hall R., 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Plant Pathol.* 16: 93 -108
- Campbell W.A., 1947. A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. *Mycologia*. 39 : 190 - 195
- Coombe R. G., Jacobs J. J., Watson, T. R. 1968. Constituents of some *Alternaria* species. *J. Chem.* 21: 783-788.
- Dasgupta A., Wilson D.W., 2001. Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J. Gen Virol.* 82: 1561 -1567.
- Driouich A., Jauneau A., Staehelin L.A., 1997. 7-Dehydrobrefeldin A, a naturally occurring brefeldin A derivative, inhibits secretion and causes a *cis-to-trans* breakdown of Golgi stacks in plant cells. *Plant Physiol.* 113: 487-492.
- Entwistle I, D., Howard C, C., Johnstone R, A, W., 1974. Isolation of brefeldin A from *Phyllosticta medicaginis*. *Phytochemistry*. 13:173-174
- Evans G., Cartwright, J. B., White N. H., 1967. The production of a phytotoxin nectrolide by some root surface isolates of *Cyindrocarpum radicum*. *Plant Soil*. 26: 253-260.
- Gabriella P., Anna M., Daniela P., Giuseppe D., 1999. Brefeldin A: a specific inhibitor of cell wall polysaccharide biosynthesis in oat coleoptile segments. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 33 - 40
- Gillingham A. K., Munro S., 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23: 579 - 611.
- Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F., Gusmao N. B., 1999. Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone. *J. Nat. Prod.* 62 : 1222-1224.
- Harri E., Loeffler W., Sigg H. P., Staehelin H., Tamm C., 1963. Über die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* Dodge. *Helv. Chim. Acta.* 46:1235 -1239.
- Harry M., Scot R., Leonard S., 1994. Brefeldin A inhibits protein



synthesis through the phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of eukaryotic initiation factor-2. *FEBS Lett.* 350: 143-146

Hayashi T., Takatsuki A., Tamura G., 1974. The action mechanism of brefeldin A. I. Growth recovery of *Candida albicans* by lipids from the action of brefeldin A. *J Antibiot.* 27: 65-72.

Horakova K., Betina V., 1977. Cytotoxic activity of macrocyclic metabolites from fungi. *Neoplasma.* 24:21-27.

Irurzun A., Perez L., Carrasco L., 1993. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* 336: 496 -500.

Jackson C. L., Casanova J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of Guanine - nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10: 60-67.

Jianfeng W., Yaojian H., Meijuan F., Yongjie Z. , Zhonghui Z. , Yufen Z., Wenjin S., 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. And *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 34 : 51-57

Jinnouchi H., Yagishita K., 1981. Studies on synergisidin. *J. Antibiot.* 34: 51-60.

Krohn K., Ullah Z., Hussain H., Florke U., Schulz B., Draeger S., Pescitelli G., Salvadori P., Antus S., Kurtan T., 2007. Massarilactones E-G, new metabolites from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp. associated with the plant *Artimisia maritime*. *Chirality.* 19 : 464-470.

Klausner R.D., Donaldson J.G., Lippincott-Schwartz J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116: 1071-1080.

Lazo J. S., Tamura K., Vogt A., Jung J. K., Rodriguez S., Balachandran R., Day B.W., Wipf P., 2001. Antimitotic actions of a novel analog of the fungal metabolite Palmarumycin CP1. *Pharmacol Exp Ther.* 296 : 364-371.

Lee T.H., Linstedt A.D., 1999. Osmotically induced cell volume changes alter anterograde and retrograde transport, Golgi structure, and COPI dissociation. *Mol. Biol. Cell.* 10: 1445-1462.

McQuilken M. P., Gemmell J., Hill R. A., Whipps J. M., 2003. Production

of macrospore A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 219 : 27-31.

McQuilken M P., Gemmell J., Whipps J M., 2002. Some nutritional factors affecting production of biomass and antifungal metabolites of *Coniothyrium minitans*. *Biocontrol Sci Techn.* 12 : 443- 454.

Mirazimi A., Bonsdorff C. H., Svensson L., 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* 217: 554 -563.

Mortimer P. H., DiMenna M. E., White E. P., 1978. Mycotoxic Fungi. *Mycotoxins Mycotoxicoses*. 2: 219-228.

Mosesso E., Corpina R.A., Goldberg J., 2003. Crystal structure of ARF1-Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol. Cell.* 12: 1403-1411.

Mouratou B., Biou V., Joubert A., Cohen J., Shields D. J., Geldner N., Jurgens G., Melancon P., Cherfils J., 2005. The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf. *BMC Genomics*. 6: 20-27

Muthumeenakshi S, Goldstein A L, Stewart A., 2001. Molecular studies on intraspecific diversity and phylogenetic position of *Coniothyrium minitans*. *J. Mycol. Res.* 105 : 1065 - 1074

Nebenfuhr A., Ritzenthaler C., Robinson D.G., 2002. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130 : 1102-1108.

Ondeyka J.G., Zink D., Basilio A., Vicente F., Bills G., Diez M. T., Motyl M., Dezeny G., Byrne K., Singh S.B., 2006. Coniothyron, a chlorocyclopentadienylbenzopyrone as a bacterial protein synthesis inhibitor discovered by antisense technology. *J. Nat. Prod.* 70 : 668-670.

Pelham H.R., 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell.* 67: 449 - 451.

Phillips L.R., Wolfe T.L., Malspeis L., Supko J.G., 1998. Analysis of brefeldin A and the prodrug breflate in plasma by gas chromatography with mass selective detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16: 1301-1309.

Powis G., Wipf P., Lynch S. M., Birmingham A., Kirkpatrick D. L., 2006. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin based inhibitors of thioredoxin reductase. *Mol Cancer Ther.* 5 : 630 - 636.

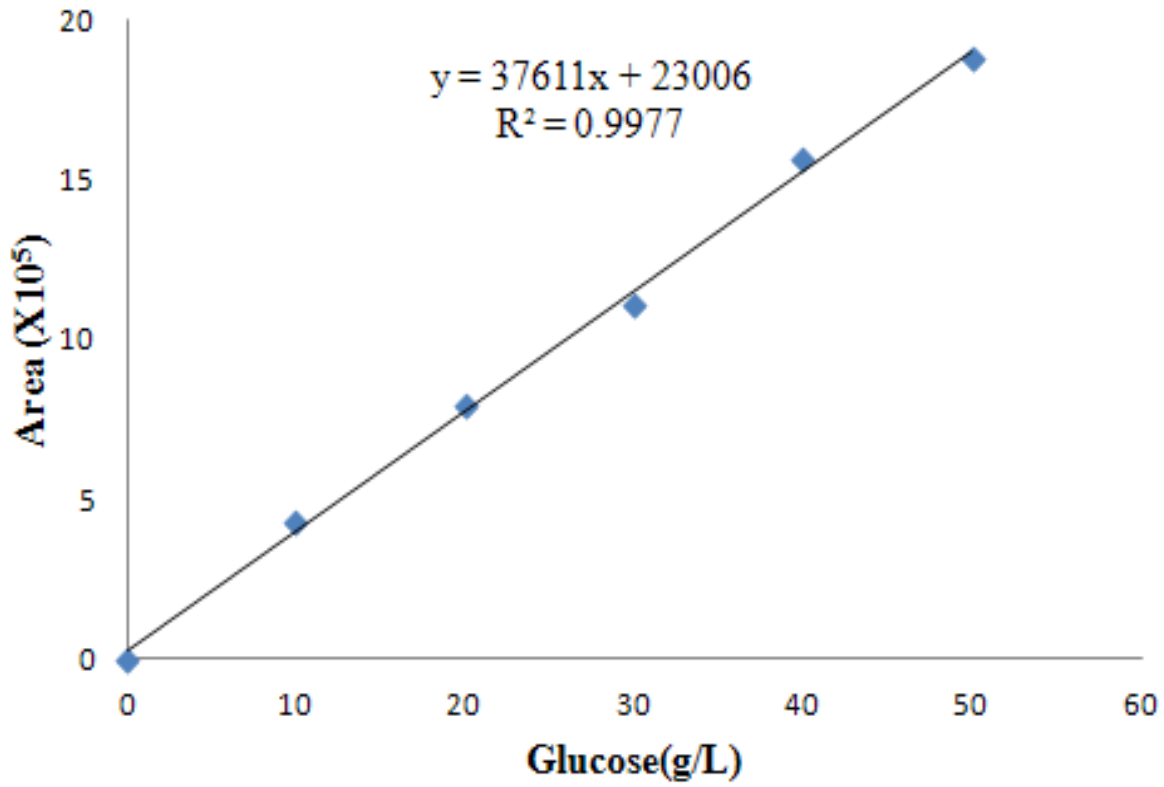
- Sata M., Moss J., Vaughan M., 1999. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP ribosylation factors. *PNAS*. 96: 2752 - 2757.
- Sausville E. A., Duncan K.L., Senderowicz A., Plowman J., Randazzo P.A., Kahn R., Malspeis L., Grever M. R., 1996. Antiproliferative effect *in vitro* and antitumor activity *in vivo* of brefeldin A. *Canc J Sci Am*. 2: 52-58.
- Singleton V. L., Bohonos N., Ullstrup A., 1958. Decumbin, a new compound from a species of *Penicillium*. *J. Nature*. 181: 1072-1073.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260: 214-216.
- Suikkanen S., Antila M., Jaatinen A., Vihinen-Ranta M., Vuento M., 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*. 316 : 267-280.
- Suzuki Y., Tanaka H., Aoki H., Tamura T., 1970. Ascotoxin (decumbin) a metabolite of *Ascochyta imperfecta* Peck. *Agric. Biol. Chem.* 34: 395-413.
- Takatsuki A., Yamaguchi I., Tamura G., Misato T., Arima K., 1969. Correlation between the anti-animal and anti-plant-virus activities of several antibiotics. *J. Antibiot.* 22: 442-445
- Tamura G., Ando K., Suzuki S., Takatsuki A., Arima K., 1968. Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J. Antibiotics*, 21: 160-161.
- Turner G J , Tribe H T. 1975. Preliminary field plot trials on biological control of *Sclerotinia trifoliorum* by *Coniothyrium minitans*. *J. Plant Pathol* . 24 :109-113.
- Wang J., Huang Y., Fang M., 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol Med Mic*. 34: 51 - 57.
- Weber R.W.S., Stenger E., Meffert A., Hahn M., 2004. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a

strategy for habitat conquest .*Mycol. Res.* 108: 662 -671.

Whipps J. M., Gerlagh M., 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol . *J . Mycol Res.* 96 : 897-907.

## 柒、附錄

附錄一、葡萄糖之 HPLC 殘糖檢量線。



附錄二、Brefeldin A 濃度之標準曲線

