

# 目 錄

中文摘要-----	I
英文摘要-----	II
壹、前言-----	1
貳、文獻回顧-----	3
一、盾殼黴菌基本性質-----	3
二、盾殼黴菌代謝物質之應用-----	6
(一) 抗病原菌-----	6
(二) 抑制癌細胞-----	9
(三) 酵素應用-----	13
(四) 其他代謝物質-----	15
三、盾殼黴菌培養基之探討-----	17
參、材料與方法-----	19
一、試驗材料-----	19
(一) 內生真菌-----	19
(二) 受試病原菌-----	19
(三) 受試細胞-----	19
(四) 培養基與試藥-----	19
二、實驗儀器-----	21
三、實驗方法-----	22
(一) 病原菌純化及培養基製備-----	22
1、病原菌純化-----	22
2、真菌培養基的製備-----	22
(二) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 外觀形態及生長-----	22
1、固態培養生長形態-----	22

2、液態培養生長形態-----	22
(三) 試驗設計-----	22
1、固態發酵最適化培養-----	22
(1) 不同溫度生長表現-----	22
(2) 不同 pH 值生長表現-----	23
(3) 不同碳源影響-----	23
(4) 不同氮源影響-----	23
(5) PB 試驗設計-----	23
(6) 部份因子試驗設計-----	24
(7) 組成份濃度範圍-----	25
(8) 中心混成設計-----	25
(9) 最適化培養-----	26
2、使用軟體-----	26
3、抑菌物質測試-----	26
(1) 抑菌物質萃取-----	26
(2) 含菌培養基製備-----	26
(3) 抑菌能力測定-----	27
4、液態發酵最適化培養-----	27
(1) 種菌製備-----	27
(2) 液態培養-----	27
(3) 菌絲體乾重測定-----	28
(4) 殘糖含量測定-----	28
(5) 有機溶劑萃取-----	28
(6) 活性物質分析-----	28
(7) 部份因子試驗-----	29

5、活性物質之細胞毒性測試-----	29
(1) 細胞計數-----	29
(2) 細胞染色固定-----	29
(四) 發酵槽試驗-----	31
肆、結果與討論-----	40
一、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 之生長條件探討-----	40
(一) 培養溫度的影響-----	40
(二) pH值的影響-----	40
二、菌絲生長之最適培養基組成份探討-----	44
(一) 不同碳源的影響-----	44
(二) 不同氮源的影響-----	46
(三) 無機鹽類的影響-----	48
(四) 菌絲生長之培養基關鍵組成份確定-----	51
(五) 菌絲體生長之培養基濃度範圍-----	54
(六) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM生長最適化-----	56
三、產抑菌物質之最適培養基組成份探討-----	67
(一) 不同碳源的影響-----	67
(二) 不同氮源的影響-----	67
(三) 無機鹽類的影響-----	70
(四) 抑制金黃葡萄球菌物質之培養基關鍵組成份確定-----	73
(五) 抑制金黃葡萄球菌之培養基濃度範圍-----	76
(六) 產抑制金黃葡萄球菌物質之培養基最適化-----	78
四、液態培養基培養試驗-----	88
(一) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 代謝物之細胞毒殺性-----	88

(二)生物活性物質之 HPLC 分離-----	93
(三) <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 液態培養之環境因子影響-----	99
(1) 發酵時間-----	99
(2) 溫度對液態培養之影響-----	101
(3) 起始 pH 值對液態培養之影響-----	103
(4) 碳源對液態培養之影響-----	105
(5) 氮源對液態培養之影響-----	105
(四)攪拌式發酵槽培養試驗-----	108
伍、結論-----	115
陸、參考文獻-----	116
柒、附錄-----	122

## 圖 次

附圖一、內生真菌 <i>Coniothyrium minitans</i> 形態-----	5
附圖二、Coniothyrione 結構式-----	7
附圖三、Macrosphelide A 結構式-----	8
附圖四、Mycosporulone 結構式-----	9
附圖五、Palmarumycin CP1、PX-916 結構式-----	12
附圖六、Diepoxin $\sigma$ 、SR7 結構式-----	12
附圖七、抑菌環之測量方法-----	27
附圖八、DAPI 結構式-----	30
圖一、各微量元素對Plackett-Burman試驗結果之分析(菌絲生長) ----	50
圖二、各培養基對 $2^{5-1}$ 部分因子試驗的結果(菌絲生長)-----	53
圖三、Peptone、ZnSO <sub>4</sub> 的添加對於 <i>Coniothyrium sp.</i> CSM菌落生長範圍之影響-----	63
圖四、 <i>Coniothyrium sp.</i> CSM培養七天之生長情況-----	65
圖五、各微量元素對Plackett-Burman試驗結果之分析(對金黃葡萄球菌之抑菌環)-----	72
圖六、各培養基對 $2^{3-1}$ 部分因子試驗的結果。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)-----	75
圖七、Peptone、NaNO <sub>3</sub> 的添加對於 <i>Coniothyrium sp.</i> CSM 抑菌能力之影響-----	81
圖八、 <i>Coniothyrium sp.</i> CSM培養七天後對金黃葡萄球菌之抑菌環大小-----	87
圖九、 <i>Coniothyrium sp.</i> CSM 之粗萃取物於不同濃度對細胞毒性測試-----	89

圖十 (A) 、 <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-----	91
圖十 (B) 、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 之粗萃取物加入 Huh7 肝癌細胞 24 及 48 小時之細胞型態圖-----	92
圖十一、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析-----	95
圖十二 (A) 、 <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-----	96
圖十二 (B) 、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 2 之細胞毒性測試-----	97
圖十二 (C) 、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 3 之細胞毒性測試-----	98
圖十三、搖瓶培養期間 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重、殘糖量、pH 值及產物濃度比例之變化-----	100
圖十四、攪拌式發酵槽之培養期間 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重、殘糖量、pH 值及產物濃度比例之變化-----	110
圖十五、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 於攪拌式發酵槽培養五天之培養液乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析-----	111
圖十六(A)、目標產物 Fraction-3 加入對肺癌細胞中反應之 DAPI 染色圖(A)24 小時 (B)48 小時 (400X)-----	113
圖十六(B)、目標產物 Fraction-3 加入對肝癌細胞中反應之 DAPI 染色圖(A)24 小時 (B)48 小時 (400X)-----	114

## 表 次

附表一、Mycosporulone 對(1) 病原細菌(2) 病原真菌(3) 腫瘤細胞之抑制能力，並和其他常見藥物比較-----	10
附表二、內生真菌產生之胞外酵素-----	14
附表三、 <i>Coniothyrium</i> sp.新發現代謝物質之結構式-----	15
表一(A)、Plackett-Burman 試驗設計-----	32
表一(B)、Plackett-Burman 試驗設計培養基組成份-----	33
表二(A)、 $2^{5-1}$ 部分因子試驗設計-----	34
表二(B)、 $2^{5-1}$ 部分因子試驗設計之培養基組成份-----	35
表二(C)、 $2^{3-1}$ 部分因子試驗設計-----	36
表二(D)、 $2^{3-1}$ 部分因子試驗設計之培養基組成份-----	37
表三(A)、中心混成試驗設計-----	38
表三(B)、中心混成試驗設計之培養基組成份-----	39
表四、不同培養溫度對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長及抑菌環之影響-----	42
表五、不同起始pH值對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長及抑菌環之影響-----	43
表六、不同碳源對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長之影響-----	45
表七、不同氮源對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長之影響-----	47
表八、微量元素組成份對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM生長Plackett-Burman 試驗設計-----	49
表九、培養基組成份之 $2^{5-1}$ 部分因子試驗設計(菌絲生長) -----	52
表十、不同濃度試驗之培養基組成與結果(菌絲生長) -----	55

表十一、中心混成試驗之培養基組成與結果(菌落生長) -----	57
表十二、SAS對組成份中心混成試驗設計之變方分析表(菌落生長) -	59
表十三、組成份中心混成設計方程式之變方分析表(菌落生長) -----	60
表十四、(A) SAS正則分析表 (B)中心混成設計整體總合作用之變方 分析 (C)預測與試驗菌落生長之最適培養基組成-----	62
表十五、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM培養於PDA和最適生長培養基之抑菌 能力影響-----	66
表十六、不同碳源對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 於 PDA 上培養七天後對 金黃葡萄球菌之抑菌環影響-----	68
表十七、不同氮源對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於PDA上培養七天後對金 黃葡萄球菌之抑菌環影響-----	69
表十八、微量元素組成份對 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM抑菌環Plackett-Bur -man試驗設計-----	71
表十九、培養基組成份之 $2^{3-1}$ 部分因子試驗設計(對金黃葡萄球菌之抑 菌環) -----	74
表二十、不同濃度試驗之培養基組成與結果(對金黃葡萄球菌之抑菌 環) -----	77
表二十一、中心混成試驗之培養基組成與結果(對金黃葡萄球菌之抑 菌環) -----	79
表二十二、SAS對組成份中心混成試驗設計之變方分析表(對金黃葡 萄球菌之抑菌環) -----	82
表二十三、組成份中心混成設計方程式之變方分析表(對金黃葡萄球 菌之抑菌環) -----	83
表二十四、(A) SAS正則分析表 (B)中心混成設計整體總合作用之變 方分析 (C)預測與試驗抑菌環之最適培養基組成-----	85



表二十五、溫度對搖瓶培養之 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重及產物 濃度之影響-----	102
表二十六、起始 pH 值對搖瓶培養之 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重 及產物濃度之影響-----	104
表二十七、碳源對搖瓶培養之 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重及產物 濃度之影響-----	106
表二十八、氮源對搖瓶培養之 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM 菌絲乾重及產物 濃度之影響-----	107
表二十九、 <i>Coniothyrium</i> sp. CSM於搖瓶及發酵槽培養時之發酵參數 -----	112

## 摘 要

盾殼黴菌 (*Coniothyrium* sp.) 為重要的生物防治菌之一，其二次代謝物具有多種生物活性，如抗病原菌、抑制癌細胞及酵素的產生，因此在醫藥及食品上為新的產品開發菌源。本論文之研究以本土植物棕葉狗尾草 (*Setaria palmifolia* Stapf) 莖部分離得到之內生真菌 *Coniothyrium* sp. CSM 進行試驗，經培養基萃取後可得抑制人類肺腺癌 (A549) 及人類肝癌 (Huh 7) 細胞株和病原菌 *Staphylococcus aureus* 之產物。再以回應曲面法設計改善培養基組成份，來提升菌絲生長和代謝物產量。固態培養下，培養於溫度 30 °C 和培養基起始 pH 值為 4-5 時，為此菌之較佳生長條件。經培養基修飾，以添加蛋白胨和 ZnSO<sub>4</sub> 能有效提升菌絲生長；而添加蛋白胨和 NaNO<sub>3</sub> 則能提升生活性物質產生。另由液態發酵萃取發酵液後可得抑制癌細胞之代謝物質，其萃取物在 48 小時對肺癌細胞及肝癌細胞生長抑制率 IC<sub>50</sub> 為 1.12 µg/mL 及 0.36 µg/mL。經 HPLC 純化過程來提升目標代謝物之效益，進一步以發酵槽進行量產測試。目前將以分離純化和結構式分析來得知產物特性，進一步改善培養條件和萃取分離產物方式來提升抑制癌細胞之活性物質產量。

## Abstract

Some *Coniothyrium* fungal strains have been reported to have the capability to synthesize secondary metabolites with antibacterial, antifungal, or antialgal activities. An endophytic strain of *Coniothyrium* sp. was isolated from the stem of palm grass (*Setaria palmifolia* Stapf) in our laboratory. The extract of this fungal culture exhibited an anti-proliferative effect on cancers and bacteria (*Staphylococcus aureus*). The objective of this study is to find out the optimal conditions for producing these bioactive compounds. The experimental data have showed that the optimal fermentation temperature was 30°C, and the optimal pH was 4-5. Modified media for the best yield of bioactive cultural extracts were determined, and a set of manipulation parameters for fermentation was decided. The anticancer components of the cultural extracts were partially purified using HPLC technique. The IC<sub>50</sub> of the partial purified extracts against human lung adenocarcinoma A549 cells and human hepatocarcinoma Huh 7 cells were 1.12 µg/ml and 0.36 µg/ml after 48 h incubation, respectively. The major anticancer compound of the culture extract has been tried to identify.

## 壹、前言

抗生素長期大量使用，使得病原菌產生抗藥性，新抗生素篩選一直是藥物研發的重點；此外食品加工業尋求天然物替代化學合成保存劑亦是研究的重要課題。利用微生物產生的生物活性物質取代化學合成物質已成為新的趨勢。在許多可應用的微生物中，內生真菌是豐富的活性物質來源，例如抗菌、抗蟲害及酵素等物質，並廣泛的存在於大自然中，且有快速生長的能力，已成為現在開發新物質的主要來源之一。

內生真菌盾殼黴菌為發展快速的生物防治菌之一，已有產品在市面販售，主要做為抵抗農產品上之植物病原真菌。盾殼黴菌對於寄生之植物無致病性，並能有效抵抗外來病原菌。盾殼黴菌在生長過程中所形成的孢子對於病原真菌有抑制的效果，除了在菌體本身的抑制效果，經由代謝所分泌至胞外的物質也具有生物活性。部分研究已成功由培養基中分離出抗病原菌物質，對於抑制真菌及細菌皆有明顯的效果。抑制癌細胞物質也被分離出來，對於乳腺癌細胞及前列腺癌細胞都具抑制活性，研究中對於上述的活性物質都已經成功得知結構分子，也進一步探討其作用機制。由於盾殼黴菌產二次代謝物種類繁多，且具不同生物活性，因此在測試二次代謝物的生物活性和鑑定代謝物質的結構式是目前研究的重點。此外，培養過程中受到環境因子的影響對於代謝途徑的改變也會造成產物的變化，故要有效的提高活性物質的產量且穩定的控制生產也是重要的研究目標。

本實驗目的為利用本土植物分離出的盾殼黴菌 *Coniothyrium* sp. CSM，經萃取後得到其二次代謝物進行活性測試，期望獲得抑制病原菌或是癌細胞生長之物質。另外由於菌株培養易受到環境、時間及營養源等影響，所以利用回應曲面法設計，尋找菌株生長及產代謝物質

之最適培養基組成份和培養條件，並嘗試以發酵槽試驗培養菌體大量生產代謝物質，除了可增加菌絲體和代謝物質產量外，在製備上也可有效降低生產成本。並進一步收集分離純化之代謝物質，以不同方式萃取純化來提高產物回收效率並進行結構式鑑定分析。

## 貳、文獻回顧

### 一、盾殼黴菌基本性質

盾殼黴菌 (*Coniothyrium* sp.) 隸屬於半知菌亞門 (Deuteromycotina)、腔孢綱 (Coelomycetes)、球殼孢目 (Sphaeropsidales) 的真菌。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 最為適宜。在空氣相對濕度為 90 % 以上時，盾殼黴菌分生孢子能迅速萌發 (Campbell, 1947)。

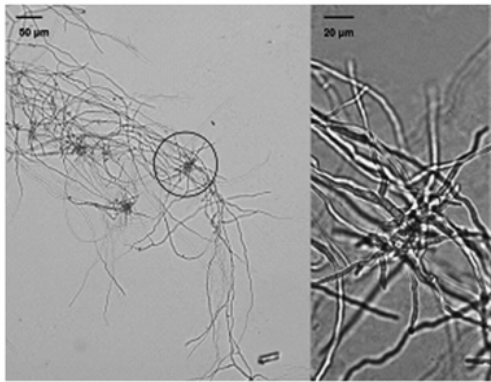
盾殼黴菌能寄生核盤菌 (*Sclerotium sclerotiorum*)、小核盤菌 (*Sclerotium minor*) 等植物病原真菌中 (Campbell, 1947)，能減少病原菌對植物引起的白黴、腐根及落葉等病癥 (Whipps *et al.*, 1992)。具有對核盤菌專一性強、作用時間長、對植物無致病性等特點。它能透過孢子或菌絲侵染宿主之菌絲和菌核行破壞性寄生作用、產生抗真菌物質和溶菌作用，而殺死病原菌的菌絲體和菌核。一般可從植物組織中或是土壤內分離得到菌株 (張，2008)。

盾殼黴菌除了對病原性真菌有寄生作用，亦有對於產代謝物抗細菌及抗真菌的生理活性。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)。

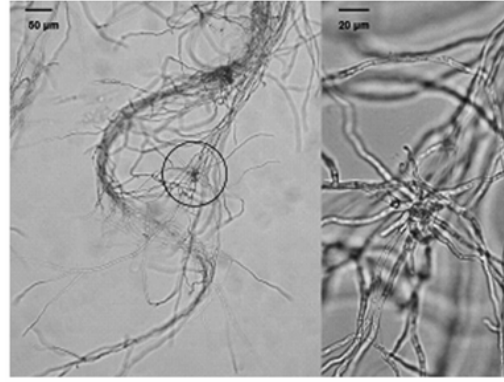
由外觀形態上，盾殼黴菌菌絲為有色棉絮狀，菌落呈現平盤狀並規則的以圓形或橢圓形生長。而分生孢子 (conidia) 是盾殼黴菌在土壤中存活的主要形式，也是傳播的重要媒介和生物防治劑中的重要成分之一。其分生孢子產在由氣生菌絲分化形成的分生孢子器 (pycnidium) 內，屬於單孢、有色，約為 10 μm 之圓形或橢圓形。然而真菌的產孢受到營養、空氣、溫度及二次代謝物

等許多因素的影響，也涉及到許多代謝途徑的調控。在沒有產孢能力的突變型菌株裡除了菌落型態及菌落色素改變外，對寄主之菌核治病力也會產生差異（附圖一）。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。也造成其具有廣泛的分佈性，除了在最先由 Campbell (1947) 於美國本土分離獲得，陸續在世界各地都有篩選到不同特性的盾殼黴菌菌株 (Gong *et al.*, 2007)。

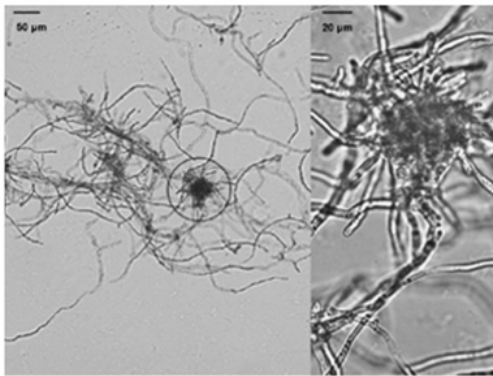
(A)



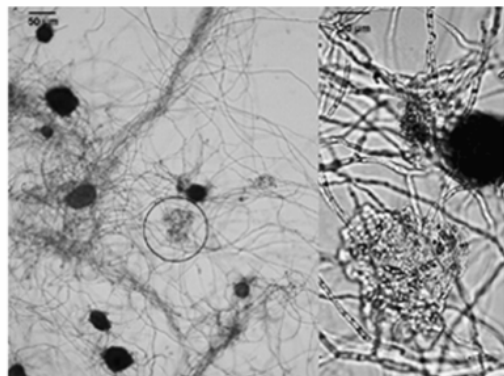
(D)



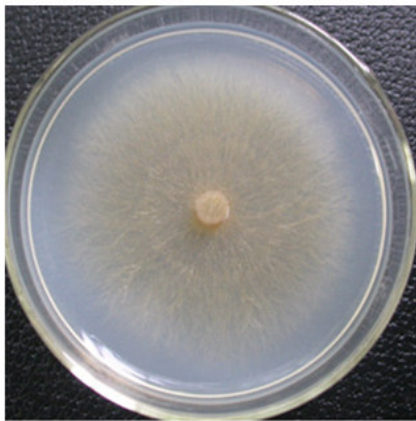
(B)



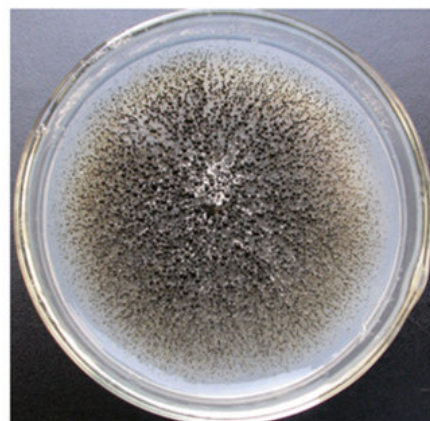
(E)



(C)



(F)



附圖一、內生真菌 *Coniothyrium minitans* 形態 (Gong *et al.*, 2007)

突變型 *C. minitans* ZS-1T2029 菌絲形態 (A)60 小時 (B) 108 小時在顯微鏡下觀察 (C)PDA 上培養 10 天後形態。  
野生型 *C. minitans* ZS-1 菌絲形態 (D)60 小時 (E)108 小時在顯微鏡下觀察 (F)PDA 上培養 10 天後形態。



## 二、盾殼黴菌代謝物質之應用

盾殼黴菌的研究主要在生物學、生態學、生物控制劑及發酵應用等方面。分離純化有效的二次代謝物質是研究重點，近來也有一些分子生物學研究對盾殼黴菌中具活性代謝物質之基因進行轉殖。例如將基因轉殖進入大腸桿菌或仙人掌桿菌，應用發酵系統來進行大量表現；將基因利用感染方式或是直接轉殖插入菸草或萵苣等植株內來表現，以抑制或分解外來毒性物質，抵抗病原菌的侵襲 (Vrije *et al.*, 2001)；將盾殼黴菌內木聚糖酶基因 (cxy1) 用 ATMT 法轉殖進入植物體內，培育具有可表現基因 cxy1 活性的突變型植株，對抗病原真菌感染 (Lu *et al.*, 2004)；此外，盾殼黴菌可以在高 pH 值環境下生長，因此複製其耐鹼相關基因可以為建構抵抗鹼性土壤的作物提供基因片段 (張，2006)。

由植株或樹幹中篩選分離不同的盾殼黴菌菌株，進行測試代謝物質的活性，其功能歸納如下：

### (一) 抗病原菌

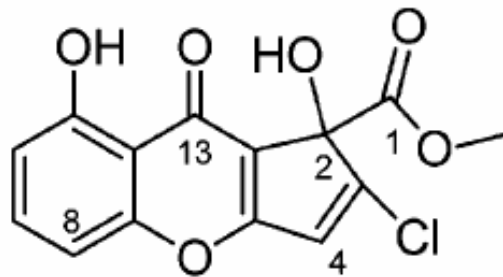
目前在許多藥物的使用下，逐漸出現抗藥性的病原菌，對於臨床或是傳染疾病上，都對人體產生嚴重的威脅。而許多利用化學合成方式製藥也產生了研發新的合成途徑不便及高成本的情形。因此利用微生物的二次代謝物來尋找新的活性物質開始受到重視。

#### 1、Coniothyrione

由內生真菌 *C. cerealis* MF7209 分離出二次代謝物 Coniothyrione 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。Coniothyrione 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。

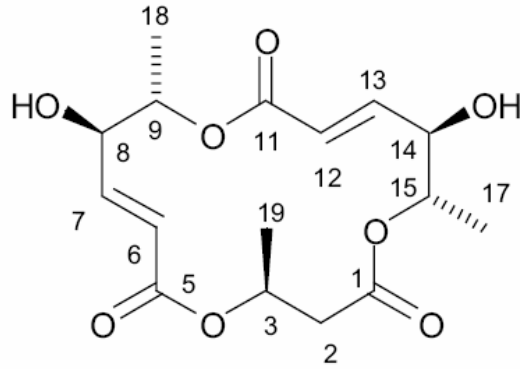
對於病原細菌 *Staphylococcus aureus* 最小抑制濃度為 32  $\mu\text{g/ml}$ ，且測得抑制蛋白質合成  $\text{IC}_{50}$  值為 5  $\mu\text{g/ml}$ ，另外得知對抑制 DNA 合成  $\text{IC}_{50}$  值為 3  $\mu\text{g/ml}$ 。對於 *Bacillus subtilis* 和 *Haemophilus influenzae* 最小抑制濃度為 16  $\mu\text{g/ml}$ ，對 *Streptococcus pneumoniae* 及 *Enterococcus faecalis*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



附圖二、Coniothyriol A 結構式

## 2、Macrosphelide A

由內生真菌 *C. minitans* 二次代謝物中萃取，分離得到四種相似的化合物，其中以 Macrosphelide A 抑制真菌生長能力最強，可抑制菌絲體的生長。對於病原真菌 *Sclerotium sclerotiorum* 和 *Sclerotium cepivorum* 抑制效果  $\text{IG}_{50}$  (抑制 50% 真菌生長所使用的代謝物濃度) 分別為 46.6  $\mu\text{g/ml}$  及 2.9  $\mu\text{g/ml}$ 。當濃度提升為 175  $\mu\text{g/ml}$  時，可完全的抑制 *Sclerotium cepivorum*。附圖三為其結構式，(McQilken *et al.*, 2003)。



附圖三、Macrosphelide A 結構式

### 3、降解草酸能力

草酸 (Oxalic acid) 是一種植物毒素，對許多植物、動物及微生物具有毒害性。大多的植物病原真菌皆會分泌草酸，對於植物組織產生毒殺性，例如會引起農作物莖部腐敗和植株落葉的 *Sclerotinia* sp.，對於農產品及食品造成重大的影響 (Yang *et al.*, 2007)。

草酸影響植物的主要機制有許多種，包括對環境的酸化，促使聚半乳糖醛酶和部分蛋白質分解酶活性增加及螯合植物細胞壁上鈣離子來破壞植物細胞壁。另外會中斷氣孔的開合以及抑制植物本身自我防護的酵素，如聚酚氧化酶等，造成植物受到外來的損傷。而 *C. minitans* 可以有效的分解草酸的生成，研究指出在培養基中添加 0.8 mM 至 28 mM 不同濃度的草酸培養 *C. minitans* 15 天後，可分解 86 % 至 92 % 的草酸，並使周遭環境 pH 值上升至弱鹼狀態。雖然目前尚未得知其所有的抑制草酸作用機制，但發現 *C. minitans* 可利用酵素分解來有效的減少草酸，並抑制植物病原真菌且會讓周遭環境的 pH 值上升，而降低對植物及動物的毒害 (Ren *et al.*, 2007)。

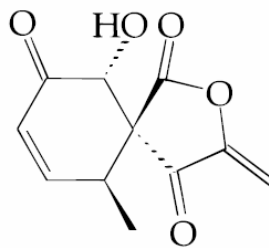
## (二) 抑制癌細胞

在抗腫瘤物質的研究中利用真菌的代謝物質來分離活性物質已經是種新的趨勢 (Guiraud *et al.*, 1998)。盾殼黴菌產生可抑制癌細胞的代謝物如下：

### 1、Mycosporulone

由 *C. sporulosum* 的培養液中萃取分離得到具有多種活性的代謝物質 Mycosporulone。其對人類正常肺組織細胞 (MRC<sub>5</sub>) 濃度提升至 100µg/ml 依然不具毒殺性，對於人類乳腺癌細胞 (MDA-MB231)、前列腺癌細胞 (PC3) 和大鼠白血病細胞 (L-1210) 的抑制效果 IC<sub>50</sub> 分別為 7.7 µg/ml、2.6 µg/ml 及 0.3 µg/ml。其效用和常見的抗癌藥物 Taxol 和 Adriamycin 比較下雖然活性較小 (附表一)，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。

另外 Mycosporulone 也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 µg/ml。對於病原真菌 *Candida albicans*、*Candida tropicalis* 及 *Cryptococcus neoformans* 皆有最小抑制濃度為 14 µg/ml。與常見抗生素的比較下(附表一)，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.*, 1998)。



附圖四、Mycosporulone 結構式

附表一、 Mycosporulone 對(1) 病原細菌(2) 病原真菌(3) 腫瘤細胞之抑制能力，並和其他常見藥物比較 (Guiraud *et al.*, 1998)。

1. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of **1**, Kanamycin, Streptomycin, and Penicillin G toward Pathogenic Bacteria

pathogen	<b>1</b> <sup>a</sup>	kanamycin <sup>a</sup>	streptomycin <sup>a</sup>	penicillin G <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	14	28	28	560
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	140	140	560
<i>Staphylococcus aureus</i> (r) <sup>b</sup>	14	14	14	560
<i>S. aureus</i>	420	140	420	14
<i>Streptococcus faecalis</i>	280	560	420	14

<sup>a</sup> Results are means of three determinations and are expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . <sup>b</sup> Resistant to penicillin.

2. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of **1**, Ketoconazole, Amphotericin B, and Nystatin toward Pathogenic Yeasts

pathogen	<b>1</b> <sup>a</sup>	ketoconazole <sup>a</sup>	amphotericin B <sup>a</sup>	nystatin <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i>	14	280	420	14
<i>C. glabrata</i>	420	14	140	28
<i>C. parapsilosis</i>	28	560	560	560
<i>C. tropicalis</i>	14	560	560	14
<i>C. tropicalis</i> R2 <sup>b</sup>	14	140	> 560	14
<i>Cryptococcus neoformans</i> 1	280	56	140	14
<i>Cr. neoformans</i> 2	14	280	140	14

<sup>a</sup> Results are means of three determinations and are expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . <sup>b</sup> Resistant to amphotericin.

3. Cytotoxicity (MRC<sub>5</sub>) and Antitumor Activity (MDA-MB 231, PC<sub>3</sub>, L-1210) of **1** as Compared with Taxol and Doxorubicin

compound	MRC <sub>5</sub>	MDA-MB 231	PC <sub>3</sub>	L-1210
taxol <sup>a</sup>	nd	0.0030 ± 0.0002	0.0027 ± 0.0001	0.0140 ± 0.0001
doxorubicin <sup>a</sup>	nd	0.0900 ± 0.0050	0.1900 ± 0.0010	0.0200 ± 0.0002
<b>1</b> <sup>a</sup>	> 100	7.70 ± 0.20	2.60 ± 0.17	0.30 ± 0.01

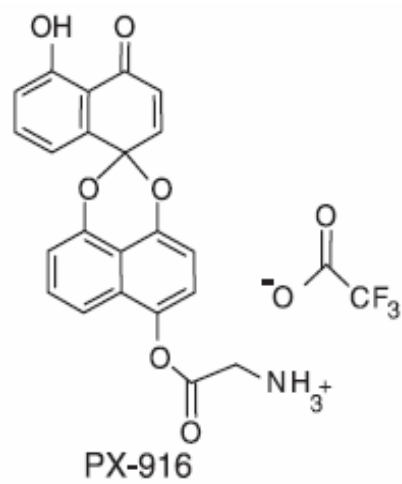
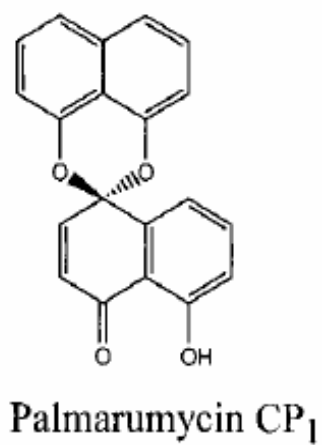
<sup>a</sup> Results are means of three determinations and are expressed as lethal doses giving 50% of mortality ( $\mu\text{g/mL}$ ) ± standard deviation.

## 2、Palmarumycins

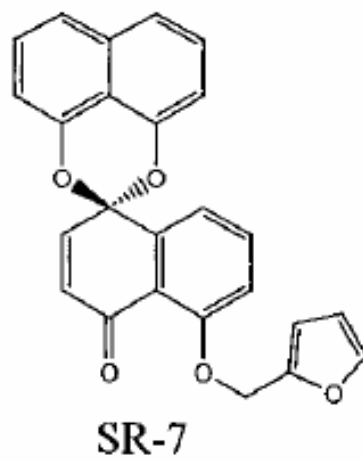
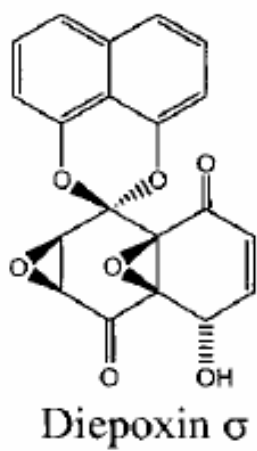
從 *C. palmarum* 和部分的 *Coniothyrium* sp. 代謝物中分離得到一種新的活性物質 Palmarumycins CP1，經由構型上轉化獲得許多的衍生物質，皆具有和 Palmarumycins CP1 相似的生物活性，能抑制病原細菌、真菌的生長及抑制腫瘤細胞的生成 (Krohn *et al.*, 1994)。

Palmarumycin CP1 可有效抑制 thioredoxin-1 (Trx) 的過量表現，而許多腫瘤細胞的增生是由於 Trx 的過表現。但 Palmarumycin CP1 在體內溶解效果不佳，進一步由代謝物中分離得到水溶性較佳的前驅物 PX-916 進行測試，其可在進入細胞後進行分解成為 Palmarumycin CP1 而有效的抑制 Trx 和 TrxR-1 過量表現。Palmarumycin CP1 及 PX-916 對於抑制乳腺癌細胞 MCF-7 之  $IC_{50}$  分別為 1.0  $\mu$ M 和 3.1  $\mu$ M，附圖五為其結構式 (Powis *et al.*, 2006)。

Palmarumycin CP1 及其衍生物 Diepoxin  $\sigma$  和 SR7 對於人類乳腺癌細胞 MCF-7 抑制能力  $IC_{50}$  分別為 0.96、1.64 和 1.13  $\mu$ M；而對人類乳腺癌細胞 MDA-MB-231 之  $IC_{50}$  個別為 2.61、2.01 和 2.44  $\mu$ M。其作用機制在於調控細胞週期的  $G_2/M$  期，進一步的控制細胞分裂。附圖六為其結構式 (Lazo *et al.*, 2001)。



附圖五、Palmarumycin CP<sub>1</sub>、PX-916 結構式



附圖六、Diepoxin  $\sigma$ 、SR7 結構式

### (三) 酵素應用

盾殼黴菌具有應用潛力的酵素有 Laccase 及  $\beta$ -1,3-glucanase，另也具有多種酵素活性 (附表二)。

#### 1、Laccase

利用 *C. minitans* 發酵產生大量的氧化還原酵素 Laccase (EC 1.10.3.2)。Laccase 為一醣蛋白，主要作用於催化自由基反應，可在提供四個電子狀況下催化氧還原成水。在自然界中當內生真菌進入木本植物寄生時，木質素的分解過程中產生對菌絲具毒性的物質，而 *C. minitans* 產生此酵素的特性為清除此有毒物質。試驗結果經由發酵槽培養 *C. minitans* 可較搖瓶培養提高 4 倍產量且經由純化過程可以得到酵素專一性活性為 9.9 mkat/mg，而約每升的發酵液可得到 120 mg 之酵素 (Jagroop *et al.*, 1998)。

#### 2、 $\beta$ -1,3-glucanase

*C. minitans* 寄生於植物病原真菌 *S. sclerotiorum* 時，以胞外酵素  $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) 及 chitinase (EC 3.2.1.14) 作用，分解宿主細胞壁上  $\beta$ -1,3-glucanase 而侵入細胞內並破壞宿主菌絲及菌核形成。 $\beta$ -1,3-glucanase 能使 *C. minitans* 新生菌絲在 *S. sclerotiorum* 菌落中生長，也能在 *S. sclerotiorum* 感染的植物組織中生長，因而抑制病原性真菌的寄生而減少農作物受感染的損失，如向日葵的枯萎、豆科的白黴病及油菜的掉葉等。 $\beta$ -1,3-glucanase 的產生受到環境 pH 值的影響，在 mPDB (modified potato dextrose broth) 中培養 *C. minitans* 最佳 pH 範圍在 4-6，其可產生  $\beta$ -1,3-glucanase 活性達 827-854  $\mu$ g glucose/ml/min。故當有效的控制環境因子能使真菌產生更多的酵素，且提升活性，並有效的運用於農產品的疾病防治 (Li *et al.*, 2007)。



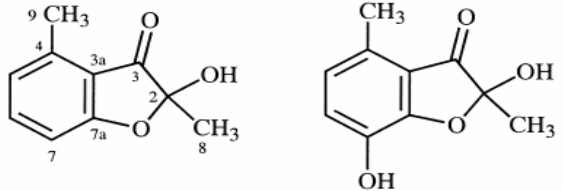
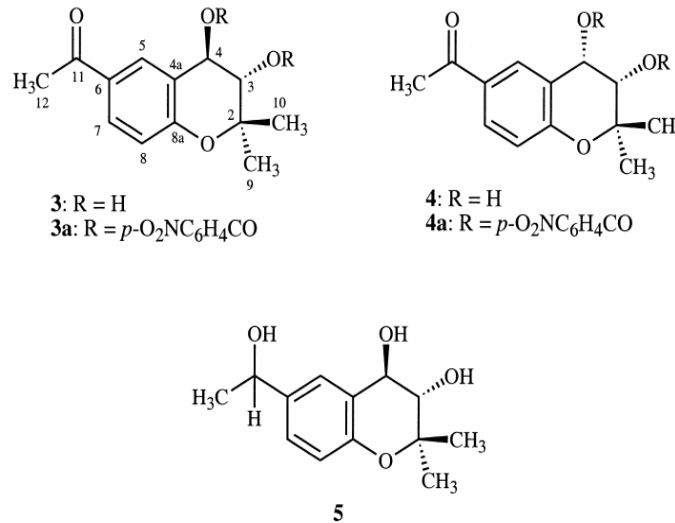
附表二、內生真菌產生之胞外酵素 (Schulz *et al.*, 2001)。

Isolate	Protease	Amylase	Phenol oxidase	Lipase	Cellulase	Xylanase	Pectin lyase
<i>Fusarium</i> sp. 1	+	+	-	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp. 2	-	+	+	+	+	+	-
<i>Fusarium</i> sp. 3	-	+	+	+	+	+	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	+	+	+	+	+	-
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	+	+	+	nt	-	-	-
<i>Phialophora</i> sp.	-	+	+	+	nt	nt	-
<i>Coniothyrium palmarum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Geniculosporium</i> sp.	+	-	-	+	+	-	-
<i>Phomopsis</i> sp.	+	-	-	+	+	+	+

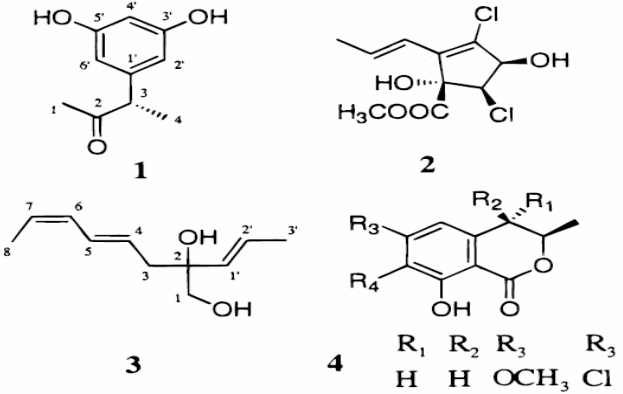
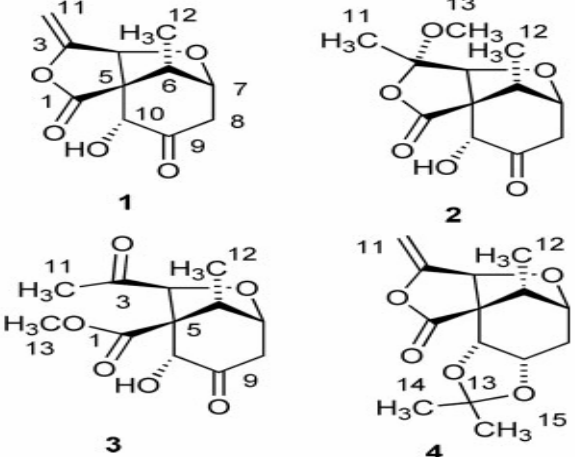
nt, not tested; +, present; -, absent.

(四) 其他代謝物質

附表三、*Coniothyrium* sp. 新發現代謝物質之結構式 (Machida *et al.*, 2001, Holler *et al.*, 1998, Krohn *et al.*, 2007)。

Microbial strain	Nature products	Structure	Biologically active
<i>Coniothyrium minitans</i>	Benzofuranone (1) ,(2)	 <p>1 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>      2 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub></p>	not tested
	Chromane (3) ,(4) ,(5)	 <p>3: R = H 3a: R = <i>p</i>-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO</p> <p>4: R = H 4a: R = <i>p</i>-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO</p> <p>5</p>	not tested

附表三、*Coniothyrium* sp.新發現代謝物質之結構式(續上頁)。

Microbial strain	Nature products	Structure	Biologically active
<i>Coniothyrium</i> sp.	<p>(<i>p</i>-hydroxyphenyl) ethanol (1) (3) 2-(hydroxymethyl) furan (2)(4)</p>	 <p>1 2 3 4</p>	<p>antibacterial antifungi antialga</p>
	<p>Massarilacetones E (1) Massarilacetones F (2) Massarilacetones G (3) Massarilacetones acetone (4)</p>	 <p>1 2 3 4</p>	<p>not tested</p>

### 三、盾殼黴菌培養基之探討

真菌在不同營養成分的培養基下生長，二次代謝物的產生會有所差異。培養基的碳源在微生物的生長中主要為提供能源及細胞的生合成。不同的碳源會影響菌體的生長與代謝物的生成，大部份的碳源皆可被菌體吸收利用而提供代謝產物所需的能量 (Yang *et al.*, 2007)。培養基氮源分成有機氮源和無機氮源兩種，前者常見為胺基酸、酵母萃取物、麥芽萃取物等；後者為銨鹽類或硝酸鹽類等 (Litchfield *et al.*, 1967)。而氮源濃度對於菌絲型態亦會有差異，部分研究顯示，當使用高濃度的氮源 (100-500mmol  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 會產生較多的平滑菌絲球；而在低濃度的氮源 (1-5mmol  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 時則會產生較鬆散的菌絲 (胡, 1994)。因此培養基中的碳氮比 (總碳量和總氮量的比值) 會影響到菌絲的生長速率、代謝產物的濃度和菌絲體中蛋白質和脂質的含量。適合的碳氮比對於二次代謝物生成具有關鍵影響。當真菌在深層培養下添加適當的無機鹽類有助於菌絲體生長與多醣體等二次代謝物產生。而無機鹽類的主要作用為構成細胞組成成份、影響酵素的組成及維持活性和調節新陳代謝 (Park *et al.*, 2001)。

自然環境中發現的 *Coniothyrium* sp. 能夠寄生並抑制 *Sclerotinia* sp. 的生長。而在常見培養基 PDA 上同時培養 *C. minitans* 和 *S. sclerotiorum* 的情況下，兩者之間的生長競爭作用是相近的，顯示出 PDA 可能並非促使 *C. minitans* 產生抑制病原真菌代謝物的良好培養基 (Li *et al.*, 1995)。因此利用改善培養基成份來促進不同的二次代謝物產生，以獲得有效的活性物質及提高產量。

改善培養基中成份，適量的澱粉、尿素、磷酸氫鉀、氯化鈣、氯化鎂、硫胺素及微量元素之用量下提高 *C. minitans* 的孢子產量。利用  $2^{7-3}$  之部分因子中心混成設計，將 18 個實驗組數據分析後，得知僅有

澱粉、尿素及微量元素達顯著水準。再以此三種營養源進行  $2^3$  全因子中心混成設計，最後發現極值點之所在，當澱粉為 139.67 g/L、尿素為 4.63 g/L 和微量元素為 68.09 ml/L 時，預測產孢量可達  $2.86 \times 10^{10}$ ，再經由實驗所得產孢量為  $2.4 \times 10^{10}$ ，和預估值無顯著差異，較原先提高為 5 倍左右 (Ooijkaas *et al.*, 1999)。

採用來源廣泛，價格低廉的麩皮作為發酵基質來進行 *C. minutans* 的孢子生產，作為生物農藥具有商業效益。研究得知麩皮在 115 °C 加熱 20 min，並調節 pH 為 6 時，固態發酵培養 7 天可以得到孢子量為  $9.5 \times 10^9$  (陳，2004)。

由於盾殼黴菌具易培養、生長快速、成本低廉和透過突變提升菌種效能等優點，配合適當的條件進行發酵槽的培養方式，放大生產過程，達到穩定控制菌種及發酵內部條件，以減少生產成本，有效提高菌體和代謝物的產量為目的，增加在食品和醫藥工業上發展空間及經濟價值 (Vrije *et al.*, 2001)。

## 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本土內生真菌盾殼黴菌(*Coniothyrium* sp. CSM)。

#### (二) 受試病原菌

東海食品科學系保存病原菌株金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

#### (三) 受試細胞

人類肺腺癌細胞 A549 (BCRC 60074)、人類肝癌細胞 Huh7 (RCBC 60169),購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

#### (四) 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. 細菌培養基

(1) Nutrient broth (NB), pH 6.8±0.2。

Gelatin peptone	5 (g/L)
Beef extract	3

(2) Nutrient agar (簡稱 NA)

Bacto agar	15 (g/L)
Nutrient broth	13

3.細胞培養基

(1) DMEM cell culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium), pH7.0±0.2。

DMEM basal medium

Fetal bovine serum	10%
L-glutamine	2mM
Non-essential amino acid	1% (5mL)
Penicillin and Streptomycin	10U/ml and 10 µg/mL
Sodium pyruvate	1 µM
D-Glucose	1.75g

D-Glucose 1.75g 溶於 5ml 無菌水中，再過 0.22µm 過濾模之後加入 medium 中。

(2) 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、離心機 (1) 低溫離心機 (Hettich, Janpen)。  
(2) 高速冷凍離心機 (Hettich,Germany)。
- 5、位像差光學顯微鏡 (Olympus BH-2, Janpen)。
- 6、無菌濾紙圓片 (Weacor, U.S.A.)。
- 7、紫外燈箱和照相設備 (Vilber Lourmat, France)。
- 8、烘箱 (Risen, Taiwan)。
- 9、冷凍乾燥旋轉濃縮機 (VV2000, Heidolph, Germany)。
- 10、攪拌式發酵槽 (MG1000S-7L, Taiwan)。
- 11、均質機 (Osterizer, U.S.A.)。
- 12、HPLC (High performance liquid chromatography)。
  - (1) L-6200A Intelligent pump (Hitachi, Janpan)
  - (2) L-4200 UV-Vis Detector (Hitachi, Janpan)
  - (3) Bischoff RI Detector Model-8110 (Hitachi, Janpan)
  - (4) D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi, Janpan)
  - (5)分析型管柱 Hypersil HS C18 5  $\mu\text{m}$  250 $\times$ 4.6 mm (Thermo Hypersil - Keystone,U.S.A.)  
Lichrospher 100 NH<sub>2</sub> 5  $\mu\text{m}$  250 $\times$  4 mm (Thermo Hypersil -Keystone,Germany)
  - (6)半製備型管柱 Hypersil HS C18 8  $\mu\text{m}$  250 $\times$ 10mm (Thermo Hypersil -Keystone, U.S.A.)



### 三、實驗方法

#### (一) 病原菌純化及培養基製備

##### 1、病原菌純化

由甘油小管中取測試菌種 *S. aureus*，以一個接種環的量三區劃線於 Nutrient agar (NA) 上，37 °C 培養 16 小時。挑出單一菌落後，以革蘭氏染色鏡檢，確定病原菌型態，再劃線培養於 5 mL NA 斜面培養基。

##### 2、真菌培養基的製備

將 PDA 配置後以 121 °C、15 分鐘滅菌，在配製不同條件時，將滅菌後溶融態 PDA 添加入營養成分，倒入培養皿混勻，待凝固後使用。

#### (二) *Coniothyrium* sp. CSM 外觀形態及生長

##### 1、固態培養基生長形態

將 *Coniothyrium* sp. CSM 以 0.45 cm 打孔器挖取菌塊至於 PDA 上培養 7 天後觀察生長形態並以螺旋測微尺測量菌落大小。

##### 2、液態培養基生長形態

*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) 試驗設計

##### 1、固態發酵最適化培養

###### (1) 不同溫度的生長表現情形

以 0.45 cm 打孔器挖取 *Coniothyrium* sp. CSM 菌塊置於 PDA 上，在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 環境下培養 7 天後測量菌落直徑大小及抑菌物質萃取。

## (2) 不同 pH 值的生長表現情形

將 PDA 調整起始 pH 值為 4、5、6、7、8、9、10，另以未做調整的 PDA 做對照組，以 0.45 cm 打孔器挖取 *Coniothyrium* sp. CSM 菌塊置於 PDA 上，培養 7 天後測量菌落直徑大小及抑菌物質萃取。

## (3) 不同碳源影響

取 0.5 %、1.0 %、1.5 %、3.0 % 不同濃度之葡萄糖、果糖、半乳糖、麥芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖及甘油分別添加至 PDA 內，另以未做調整的 PDA 做為對照組，以 0.45cm 打孔器挖取 *Coniothyrium* sp. CSM 菌塊置於 PDA 上，培養 7 天後測量菌落直徑大小及抑菌物質萃取。

## (4) 不同氮源影響

取濃度 0.5 %、1.0 %、1.5 %、3.0 % 的酵母萃取物、麥芽萃取物、蛋白脲、胰化蛋白脲、尿素及磷酸氫銨添加至 PDA 內，另以未做調整的 PDA 做為對照組，以 0.45 cm 打孔器挖取 *Coniothyrium* sp. CSM 菌塊置於 PDA 上，培養 7 天後測量菌落直徑大小及抑菌物質萃取。

## (5) Plackett-Burman (PB) 試驗設計篩選金屬離子組成分

Plackett 與 Burman 於 1946 年提出部分因子設計法，其可利用  $n$  個實驗組來測定  $n-1$  個因子對反應的影響，但  $n$  需為 4 的整數倍（如：8、16...等）。下列為  $n=8$ 、12、16、20 及 24 之  $-1$  和  $+1$  之排列。

$n = 8$	+++ - + - -
$n = 12$	++ - + + + - - - + -
$n = 16$	++++ - + - + + - - + - - -
$n = 20$	++ - - + + + + - + - + - - - - + + -
$n = 24$	++++ + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

依此列為第一行或第一列，而第二行(或列)則是移去第一行(或列)之第一位，並將第一位改成最後一位，依此類推，列出  $n-1$  行(或列)之排列，最後一行(或列)則全部補入  $-1$  來完成整個實驗設計。

因 Plackett-Burman 設計可用極少之實驗組來處理較多的實驗因子，故在培養基設計上，常用於初期實驗時篩選之用。當參考文獻難尋或預嘗試未曾使用之培養基成分時，則可利用此設計，但此設計僅可估算因子對應變數之線性關係。

此試驗採七因子(7 factors)、二階層(2 levels)之 PB 試驗設計，七個實驗因子分別為  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{ZnSO}_4$ ，並將各個因子正規化成  $-1$  和  $+1$  之高低階層，以菌落生長直徑和抑菌環為回應值(response)，各因子濃度範圍如表一所示。

#### (6) 部分因子試驗設計判斷關鍵組成分

此設計可知不同因子對目標函數之影響效應，但因為各成分因子的嘗試範圍不盡相同。為方便設計將各因子簡化為  $-1$  至  $+1$  之正規化水準(coded level)。此設計以立體座標的三個軸分別表示三因子的水準變化，而每個實驗點則位於立方體之各頂點上。此設計優點為：  
(a) 各實驗點間彼此對稱故實驗上所產生之變異(variable)即可抵銷。  
(b) 此種正交(orthogonal)設計可減輕迴歸計算，也可節省計算時間。

根據此設計法則，實驗個數會隨著因子之數目增加而成倍數增長，因此為減輕負擔，可刪除不重要的因子，只針對影響因子作測試或利用部分因子設計法取代，也就是拿完整因子之有效部分進行分析，其實驗結果仍具有相近之效果，在不失精確度的情況下，以較少的實驗得到完全因子設計相似之效果，其實驗點數設計有總實驗點的  $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/8$ 、 $1/16$  …等。而以一個  $n$  個變數之因子統計而言，實驗所得知數據可用最小平方法(least square method)迴歸得下列方程式：

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \cdots + a_nX_n + a_{12}X_1X_2 + \cdots + a_{23}X_2X_3 + \cdots + a_{n-1,n}X_{n-1}X_n$$

$$= a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j$$

而  $Y$  = 理論回應值；為  $a_0$  常數項； $a_1 \sim a_n$  分別為  $X_1 \sim X_n$  的係數； $a_{12} \sim a_{n-1,n}$  為交互作用項之係數； $X_1X_2 \sim X_{n-1}X_n$  為交互作用項。

可由係數可判斷因子的影響，正值為正影響；負值則是負影響，係數愈大表回應值影響愈大。當實驗因子數目增加時，實驗組會隨之呈倍數增加，故受測因子過多時，可使用部分因子設計(fractional factorial design)取代 (Perry, 1989)。

部分因子試驗因生長及抑菌作用不同而改變，生長條件採用 sucrose、peptone、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 作為試驗因子。抑菌物質條件採用 sucrose、peptone、NaNO<sub>3</sub> 作為試驗因子。將其正規化成 -1 和 +1 階層，濃度範圍如表二所示。

#### (7) 組成分濃度範圍

由上述部分因子設計得到的培養基條件，經由逐步增加比例測試，達最大產量而得到各因子的濃度範圍。

#### (8) 中心混成設計決定培養基最適組成分條件

中心混成設計(Central composite design)為了彌補測試水準在二水準階層設計上之不足，可利用中心混成設計法補充軸向點(Axial points)以及中心點(Central points)。軸向點是指由原點沿著中心軸向外延伸適當距離下所設計的實驗點，對於一個二因子的問題來說，在這種組合下共可產生四種水準組合，即  $(-\alpha, 0)$ 、 $(+\alpha, 0)$ 、 $(0, -\alpha)$  與  $(0, +\alpha)$ ；而中心點則是在原點  $(0, 0)$  進行重複實驗，其目的除了提供二階模式迴歸計算所需數據之外，且可藉由重覆實驗估計來自儀器或是人為所造成的純實驗誤差，如此一來，各成份因子的測試範圍以涵蓋中心點、軸延伸點及立方體之頂點等五個測試水準  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ 。

$\alpha$ )，因此具有旋轉性(Rotatability)的優點。而 FCCD 亦是反應曲面設計之一，為  $\alpha$  以  $\pm 1$  替代，其他和中心混成設計相同，其優點為各因子只取 3 個水準，因子水準的範圍限制為立方體範圍，且此範圍的軸點會以面和面方式對稱呈現。其缺點為不具旋轉性，但當因子水準範圍為立方體範圍時則旋轉性不具重要的影響，亦能滿足推算反應曲面之需求 (Montgomery, 1996)。

生長因子以 peptone、 $ZnSO_4$  為實驗因子而產抑制金黃葡萄球菌物質之因子則用 peptone、 $NaNO_3$ ，其濃度以表三所示。

### (9) 最適化培養

依照 STATGRAPHICS Plus 設計出的培養基比例做為實驗組，進行固態培養，另外以 PDA 做為對照組，對兩者進行比較。

## 2、使用軟體

使用的軟體為 STATGRAPHICS Plus Version 5.1 (StatPoint, Inc., Virginia, U.S.A.)、The SAS system Version 8.01(SAS Institute Inc., N.C., U.S.A.)。

## 3、抑菌物質測試

### (1) 抑菌物質萃取

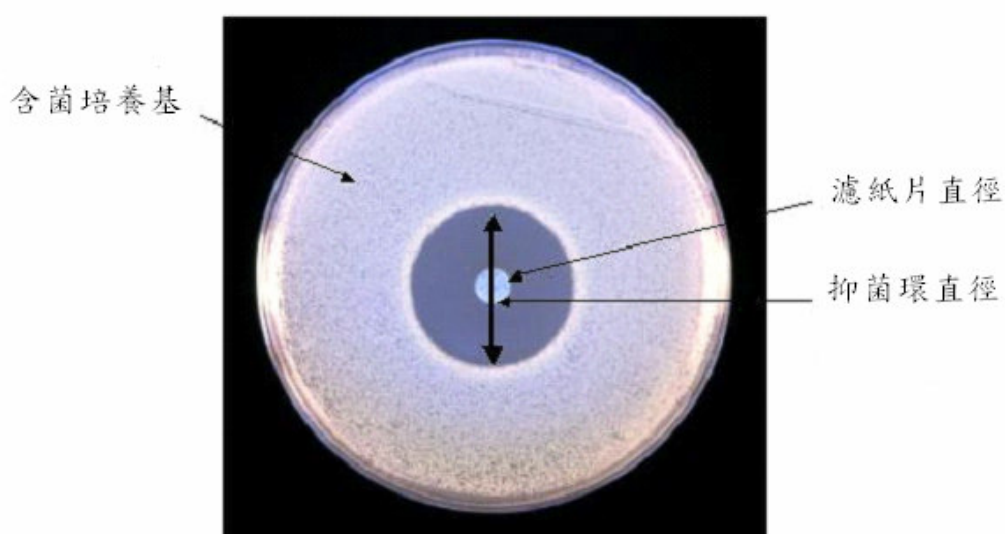
將 *Coniothyrium* sp. CSM 在 PDA 固態培養基上培養 7 天，取兩片培養基連同菌體一起打碎於 50 ml 離心管中，加入 95 % EtOH、10 mL，靜置 20 分鐘後離心，6000 rpm、20 分鐘後取上清液置於錶玻璃上揮發，用 100  $\mu$ l 無菌水洗下。

### (2) 含菌培養基的製備

在斜面培養基上純化好的病原菌，挑出單一菌落培養於 6 mL Nutrient broth (NB) 中，37 °C 下以 150 rpm 震盪培養 16 小時。取 0.1 mL 菌液與培養基 NA 充分混合，凝固後使用。

### (3) 抑菌能力測定

用直徑 0.55 cm 的圓形濾紙片吸取 10  $\mu$ l 覆溶在無菌水中的萃取物，再將濾紙片平貼在含菌培養基上，培養 16 個小時再觀察其抑菌環的大小。並且利用不同濃度的抗生素之抑菌效果，來對照真菌萃取液的抑制能力。利用螺旋測微尺測量抑菌環透明圈的兩條直徑，相加除以二之後再減去濾紙片直徑（約 0.55 公分），即為萃取物之抑菌環大小(附圖七)。



附圖七、抑菌環之測量方法

## 4、液態發酵最適化培養

### (1) 種菌製備

將培養在 PDA 上 9-11 天的真菌，用直徑 0.84 cm 的挖孔器挖取 10 顆圓形菌塊，置於 100 mL M broth 液態培養基中以 150 rpm, 25  $^{\circ}$ C 培養 5 天，以此作為種菌。

### (2) 液態培養條件

用均質機將種菌打碎，取 5 % 的種菌加入 800 mL M broth 中，以 150 rpm, 25  $^{\circ}$ C 培養 14 天。另改變培養之條件，以不同的碳源及氮

源添加、不同培養溫度和不同起始 pH 值進行培養 5 天，並測量其菌絲體乾重、pH 值變化、殘糖含量及活性物質萃取。

### (3) 菌絲體乾重測定

將培養液以烘乾之濾紙進行抽氣過濾，將濾紙上菌絲體以蒸餾水沖洗三次後，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。

### (4) 殘糖含量測定

取發酵液於 4 °C 下，經冷凍離心 (10500× g, 30 分鐘)後，取上清液經 0.2 μm 濾膜過濾，以分析管柱 Lichrospher 100 NH<sub>2</sub> (5 μm)，250 mm × 4 mm，在移動相 85 % 乙腈 (Acetonitrile)，流速為 1.0 ml/min，以 Bischoff model 8110 RI detector 進行偵測。取 10 μl 濾液進行 HPLC 分析，再經由標準品之標準曲線進行對照。

### (5) 有機溶劑萃取

真菌培養 5 天後，分離菌絲體及培養液，利用冷凍濃縮將培養液濃縮 10 倍 (800 mL 濃縮至 80 mL)，再用等體積乙酸乙酯激烈震盪數分鐘後靜置一天。將 80 mL 有機層取出揮發後復溶於 10 mL DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 中，將粗萃取物濃度調整為 4 mg/ml 後進行細胞毒性測試。另一方面將 80 mL 有機層取出揮發後復溶於 10 mL 甲醇中，以 HPLC 作有效成分分析。

### (6) 活性物質分析

以半製備型管柱 Hyperpre Hs C18 8 μm 250×10 mm，移動相為 70 % 乙腈 (Acetonitrile)，流速 1.0 mL/min，注入樣品 50 μl/次，偵測時間是 30 分鐘，偵測波長為 210 nm。分成三個 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 50 μg/μl，做細胞毒性測試。

## 5、活性物質之細胞毒性測試

### (1) 細胞計數

(i) 調整人類肝癌細胞株 Huh7 (10% FBS DMEM) 以及人類肺腺癌細胞株 A549 (5% FBS RPMI) 的濃度到  $5 \times 10^4$  cells/ml, 取 1 mL/well 至 12 孔盤中, 在 5%CO<sub>2</sub>、37°C 培養箱培養 24 小時。

(ii) 將細胞培養 24 小時後, 加入真菌粗萃取物, 由於萃取物溶在 DMSO 裡面, 而 DMSO 對於細胞有毒殺性, 必須將含量控制在 1/1000 以下。不同濃度的萃取物分別添加至新的培養液中, 再將 12 孔盤中的培養液吸出, 加入新的含真菌粗萃取液的培養基, 在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培養箱培養 24 小時及 48 小時。

(iii) 另一方面, 將三個 HPLC 收集區濾液樣品加入新的培養液中, 加入 12 孔盤中, 在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培養箱培養 24 小時及 48 小時, 再進行細胞計數。

(iv) 利用血球計數器計算細胞存活率

細胞存活率 (%) =

(實驗組的存活細胞數目平均值 / 控制組的存活細胞數目) × 100

### (2) 細胞染色固定

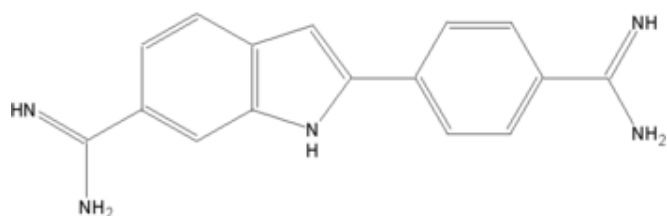
#### (i) 原理

當細胞培養結束後, 先添加福馬林將細胞固定在 12 孔盤上, 再利用螢光染劑 DAPI 染細胞核, 藉由 DAPI 染色可觀察到細胞核形態的變化, 觀察細胞是否有行細胞凋亡的路徑, 若行細胞凋亡細胞形態會成圓球狀, 核內 DNA 會先濃縮後被裂解成片段狀, 不均勻且聚集在核內。

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (附圖八) 是一種能與 DNA 結合的螢光染劑, 能夠穿透過完整的細胞膜與細胞核內的雙股



DNA 結合。在螢光顯微鏡觀察下，DAPI 染劑是利用紫外光波長的光線激發。當 DAPI 與雙股 DNA 結合時，最大吸收波長為 358 nm，最大發射波長為 461 nm，其發散光的波長範圍含蓋了藍色至青綠色。



附圖八、 DAPI 結構式

#### (ii)方法

經過加藥處理 24 小時以後，在常溫下將培養在 12 孔盤中的細胞培養基去除，加入少量一倍濃度的 PBS 清洗之後，加入 1 mL、2 % Paraformaldehyde (福馬林) 靜置 20 分鐘，將細胞固定在盤上，接著去除福馬林，加入 1 ml PBS 放於震盪器上清洗 5 分鐘，重複兩次後置於 4 °C 冰箱保存。

染色部分先以 1 ml Triton X-100 (不含 1 % Bovine Serum Albumin, BSA) 讓細胞膜穿孔使染劑容易進入，室溫下靜置 30 分鐘後，PBS 震盪清洗 5 分鐘三次，將 PBS 去除，加入 1 ml DAPI (working solution conc. = 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，避光靜置 10 分鐘，可先在螢光顯微鏡下觀察染色情形，若未明顯可再染 5 分鐘，作用完畢用 PBS 震盪清洗 5 分鐘兩次、10 分鐘兩次後即可觀察染色情形。

#### (四) 發酵槽試驗

利用攪拌式發酵槽 (agitated fermentor) 進行培養，觀察其生長，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：

- (1) 培養溫度: 25 °C
- (2) 攪拌葉片: 六片標準式渦輪葉
- (3) 攪拌速度: 150 rpm
- (4) 接種量: 5 % 種菌培養液
- (5) 通氣量: 1 vvm
- (6) 培養體積: 2 L

表一(A)、Plackett-Burman 試驗設計。

Table 1(A)、Plackett-Burman experimental design.

No.	CaCl <sub>2</sub>	CuSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	KCl	MgSO <sub>4</sub>	NaNO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
14	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
15	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
16	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
17	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
18	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
19	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1
20	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
21	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
22	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
23	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
24	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

表一(B)、Plackett-Burman 試驗設計培養基組成份。

Table 1(B)、The medium ingredients of Plackett-Birman experimental design.

Independent variables (%)	Coded levels	
	+1	-1
CaCl <sub>2</sub>	0.01	0
CuSO <sub>4</sub>	0.002	0
FeSO <sub>4</sub>	0.001	0
KCl	0.05	0
MgSO <sub>4</sub>	0.05	0
NaNO <sub>3</sub>	0.2	0
ZnSO <sub>4</sub>	0.02	0

表二(A)、 $2^{5-1}$  部分因子試驗設計。

Table 2(A)、 $2^{5-1}$  fractional factorial experimental design.

NO.	Sucrose	Peptone	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1

表二(B)、 $2^{5-1}$  部分因子試驗設計之培養基組成份。

Table 2(B)、The medium ingredients of  $2^{5-1}$  fractional factorial experimental design.

Independent variables	Coded levels	
	+1	-1
Sucrose	1.5	0
Peptone	1.0	0
CaCl <sub>2</sub>	0.01	0
MgSO <sub>4</sub>	0.05	0
ZnSO <sub>4</sub>	0.02	0

表二(C)、 $2^{3-1}$  部分因子試驗設計。

Table 2(C)、 $2^{3-1}$  fractional factorial experimental design.

No.	Sucrose	Peptone	NaNO <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

表二(D)、 $2^{3-1}$  部分因子試驗設計之培養基組成份。

Table 2(D)、The medium ingredients of  $2^{3-1}$  fractional factorial experimental design.

Independent variables (%)	Coded levels	
	+1	-1
Sucrose	1.5	0
Peptone	1.0	0
NaNO <sub>3</sub>	0.2	0



表三(A)、中心混成試驗設計 (A)生長因子，(B)抑菌因子(*S.aureus*)。

Table 3(A)、Central composite experimental design. (A)Growth factor，(B)Inhibitor factor (*S.aureus*)。

(A)

NO.	Peptone	ZnSO <sub>4</sub>
1	-1	-1
2	0	-1
3	+1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	+1	0
7	-1	+1
8	0	+1
9	+1	+1

(B)

NO.	Peptone	NaNO <sub>3</sub>
1	-1	-1
2	0	-1
3	+1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	+1	0
7	-1	+1
8	0	+1
9	+1	+1

表三 (B)、中心混成試驗設計之培養基組成份 (A)生長因子，(B)抑菌因子(*S.aureus*)。

Table 3 (B)、The medium ingredients of central composite experimental design. (A) Growth factor，(B) Inhibitor factor (*S.aureus*)。

(A)

Independent variables (%)	Coded levels		
	+1	0	-1
Peptone	1.0	0.5	0
ZnSO <sub>4</sub>	0.02	0.01	0

(B)

Independent variables (%)	Coded levels		
	+1	0	-1
Peptone	1.0	0.5	0
NaNO <sub>3</sub>	0.2	0.1	0

## 肆、結果與討論

### 一、*Coniothyrium* sp. CSM之生長條件探討

本研究所用的盾殼黴菌菌株為*Coniothyrium* sp. CSM，其代謝物初步檢測結果顯示具有抑制病原菌、人類肺腺癌和肝癌細胞能力(洪，2007)。為提高這種生物活性代謝物的產量，先尋求其生長條件之最適溫度及pH值。

#### (一) 培養溫度的影響

在20、25、30、35 °C的溫度下培養*Coniothyrium* sp. CSM 7天，觀察其菌落生長變化，並對抑菌能力進行測試。結果如表四，30 °C為最佳的生長溫度，生長菌落大小達3.92 cm，菌絲生長較為緊密，由中央接種點向外圍呈放射狀生長並可觀察到明顯的孢子產生，外圍新生菌絲體呈白色，而中心點較為老化的菌絲為淡褐色。35 °C時菌落明顯變小為1.96 cm且並無孢子產生，但依然可以生長。野生型之*Coniothyrium minitans* 在0-30 °C可菌絲生長及孢子產生，最適溫度為20 °C (Campbell *et al.*, 1947)。

對於金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的抑制能力在不同溫度下會有差異。當培養溫度為30°C時，*Coniothyrium* sp. CSM之代謝物質具有最佳的抑制效果，抑制*S. aureus*抑菌環為 0.58 cm。

#### (二) pH值的影響

實驗中以HCl和NaOH調整培養基起始pH值範圍在4-10間，而控制組pH值約為4.6。結果如表五，經由試驗結果發現，在不同起始pH值培養下，菌落生長大部分並無顯著的差異 ( $P < 0.05$ )，皆維持在2.4-2.6 cm，且菌絲呈現緊密並皆有產孢的情形。然而代謝物抑菌能力隨著pH值的上升而逐漸下降，當培養在PDA上pH範圍在4-5之間抑菌效果最佳，當培養基起始pH值呈中性或偏鹼時其抑菌能力則降低

與控制組具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

在文獻研究中指出pH 4.5-6.2時是盾殼黴菌產孢子的最適條件，而菌絲生長則是處在pH 3.3-5.6時最大量 (McQuilken *et al.*, 1997 ; Ooijkaas *et al.*, 1999)。而在PDA上培養後發現在pH值為4時有最大的菌絲產量，而在5.8-6範圍時產孢量會達最高。推測產孢和菌絲生長是處在不同階段生長期，因此所需的環境也有所差異 (Shi *et al.*, 2007)。

此外，偏酸性的pH值環境對於盾殼黴菌產生抑菌物質是有正向的影響。由未調整之PDB培養*C. minitans*後，對於盤核菌的抑制能力只有9-18 %，且最終pH值為弱酸性至中性。但經由調整PDB起始pH值範圍至3-5時，則可提升抑制盤核菌達46-67 %，最終pH值為酸性 (Yang *et al.*, 2008)。顯示在偏酸的环境下是有利於抑菌物質的產生。而另一項研究中指出，在基礎培養基PDB中添加草酸下培養盾殼黴菌，其抑制病原真菌能力較未添加時強 (Ren *et al.*, 2007)。而結果和上述文獻中對照下，結果相似，得知偏酸的环境有利於*Coniothyrium* sp. CSM生成具活性的二次代謝物較佳。

表四、不同培養溫度對*Coniothyrium* sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長及抑菌環之影響。

Table 4、Effect of different incubation temperature on mycelia growth and inhibition zone by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

	Inhibition zone (cm)	Growth zone (cm) <sup>1</sup>
Tested pathogenic bacteria species		
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>1</sup>		
Temperature		
20°C	0.27±0.01 <sup>C</sup>	2.06±0.27 <sup>C</sup>
25°C	0.40±0.05 <sup>B</sup>	2.99±0.19 <sup>B</sup>
30°C	0.58±0.04 <sup>A</sup>	3.92±0.08 <sup>A</sup>
35°C	0.34±0.04 <sup>BC</sup>	1.96±0.15 <sup>C</sup>

註: Growth zone為培養皿上菌絲生長之直徑。

註: 1: Means of triplicates ± standard deviation.

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

表五、不同起始pH值對*Coniothyrium* sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長及抑菌環之影響。

Table 5、Effect of different initial pH on mycelia growth and inhibition zone by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

	Inhibition zone (cm)	Growth zone (cm) <sup>1</sup>
Tested pathogenic bacteria species		
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>1</sup>		
pH value		
Control	0.35±0.04 <sup>A</sup>	2.44±0.26 <sup>AB</sup>
pH 4	0.32±0.01 <sup>AB</sup>	2.26±0.09 <sup>AB</sup>
pH 5	0.30±0.01 <sup>ABC</sup>	2.43±0.09 <sup>AB</sup>
pH 6	0.27±0.02 <sup>BC</sup>	2.65±0.11 <sup>A</sup>
pH 7	0.27±0.04 <sup>BC</sup>	2.27±0.20 <sup>AB</sup>
pH 8	0.25±0.02 <sup>CD</sup>	2.11±0.26 <sup>B</sup>
pH 9	0.19±0.04 <sup>D</sup>	2.22±0.23 <sup>B</sup>
pH 10	0.19±0.01 <sup>D</sup>	2.28±0.03 <sup>AB</sup>

註:Control為未調整之基礎培養基，起始pH值為4.6。

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).

## 二、菌絲生長之最適培養基組成份探討

*Coniothyrium* sp. CSM在培養過程中容易因為養分不足而改變生長形態，因此為使菌種特性保持穩定，將修飾固態培養基使菌落生長達最佳化。以此固態培養做為種菌於未來進行液態發酵，期望於液態發酵下能增加菌絲生長及活性物質產量。

### (一) 不同碳源的影響

在PDA培養基中添加1.5 %不同碳源，與未添加的控制組相比較，*Coniothyrium* sp. CSM菌落生長的差異如表六。除了添加果糖及蔗糖會使菌絲增加 (2.95 cm及3.07 cm，與對照組具顯著差異 ( $P < 0.05$ ))，其次以添加麥芽糖使菌絲量增加，其他種類的碳源，菌絲則無顯著增加。

試驗之PDA中已含有碳源葡萄糖，而再添加另一種碳源進行培養，推測由兩種碳源提供下能對菌體生長及代謝呈正向幫助。由文獻中指出，以兩種碳源幾丁質和葡萄糖培養下得到的酵素產物高於單獨添加幾丁質或是葡萄糖的情形，推測此兩種碳源同時存在於培養基中對*C.minitans*之代謝物產生誘導的效用進而增加產量 (馬，2006)。

表六、不同碳源對*Coniothyrium* sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長之影響。

Table 6、Effect of different carbon source on mycelia growth by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

No	Carbon source	Growth zone (cm) <sup>1</sup>
1	PDA+1.5% Glucose	2.37±0.01 <sup>D</sup>
2	PDA+1.5% Fructose	2.95±0.01 <sup>A</sup>
3	PDA+1.5% Galactose	2.30±0.18 <sup>D</sup>
4	PDA+1.5% Maltose	2.74±0.01 <sup>B</sup>
5	PDA+1.5% Sucrose	3.07±0.01 <sup>A</sup>
6	PDA+1.5% Lactose	2.62±0.08 <sup>BC</sup>
7	PDA+1.5% Mannose	2.43±0.02 <sup>CD</sup>
8	PDA+1.5% Glycerol	2.27±0.02 <sup>D</sup>
9	Control (PDA)	2.41±0.03 <sup>CD</sup>

註: 1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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



## (二) 不同氮源的影響

再以1%的不同氮源試驗對菌絲生長的差異，結果如表七。結果顯示有機氮源皆對菌絲生長有顯著的增加 ( $p < 0.05$ )，其中添加酵母萃取物、麥芽萃取物、蛋白胨之菌絲體皆能提升至3.80 cm左右，有機氮源能提供較複雜且多的胺基酸。而無機氮源則是不被菌體所利用，菌絲體和控制組相較之下受到抑制，呈現緩慢生長的情形，約為1.0 cm之菌落。而菌落生長所需氮源以1%蛋白胨添加來進行探討。

無機氮源無法滿足菌體生長及產孢所需，可能原因在於無機氮源無法提供部分菌體生長或合成代謝物質所需之胺基酸，導致其生長緩慢 (田，2006)。有研究顯示以尿素為氮源配合澱粉為碳源情況下可讓 *C. minutans* 有利於菌絲生長及產孢，在培養基中同時提升尿素濃度和澱粉濃度可以增加產孢之速率 (Ooijkaas *et al.*, 2000)。此結果與本試驗不相同，推測可能因為該菌種具有產尿素分解酶基因，並且在碳氮比的比例一定維持下得以獲得固定之養分來成長。

表七、不同氮源對*Coniothyrium* sp. CSM於PDA上培養七天後菌絲生長之影響。

Table 7、Effect of different nitrogen source on mycelia growth by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

No	Nitrogen source	Growth zone (cm) <sup>1</sup>
1	PDA+1% Yeast extract	3.88±0.05 <sup>A</sup>
2	PDA+1% Malt extract	3.78±0.02 <sup>A</sup>
3	PDA+1% Tryptone	2.52±0.04 <sup>B</sup>
4	PDA+1% Peptone	3.94±0.07 <sup>A</sup>
5	PDA+1% Urea	0.79±0.00 <sup>D</sup>
6	PDA+1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.12±0.11 <sup>C</sup>
7	Control (PDA)	2.41±0.03 <sup>B</sup>

註: 1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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

### (三) 無機鹽類的影響

無機鹽類會影響微生物生長及代謝，本實驗選用CaCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、ZnSO<sub>4</sub>等七種無機鹽依據Plackett-Burman試驗設計，探討七種鹽類對於生長和抑菌活性的影響。濃度範圍和測得數具結果如表八。表中得知最大菌落為第8號試驗 (3.39 cm)。經由統計分析後，結果如圖一顯示CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>及ZnSO<sub>4</sub>對菌體生長具有正向顯著影響，CuSO<sub>4</sub>和FeSO<sub>4</sub>雖會產生負向的影響但不顯著，NaNO<sub>3</sub>和KCl則是具正向影響但不顯著。具有顯著影響之無機鹽CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>及ZnSO<sub>4</sub>分別再以單獨因子進一步測試。並採用這三種無機鹽配合碳源為蔗糖及氮源為蛋白胨做為*Coniothyrium* sp. CSM生長之培養基最適化組成份探討。

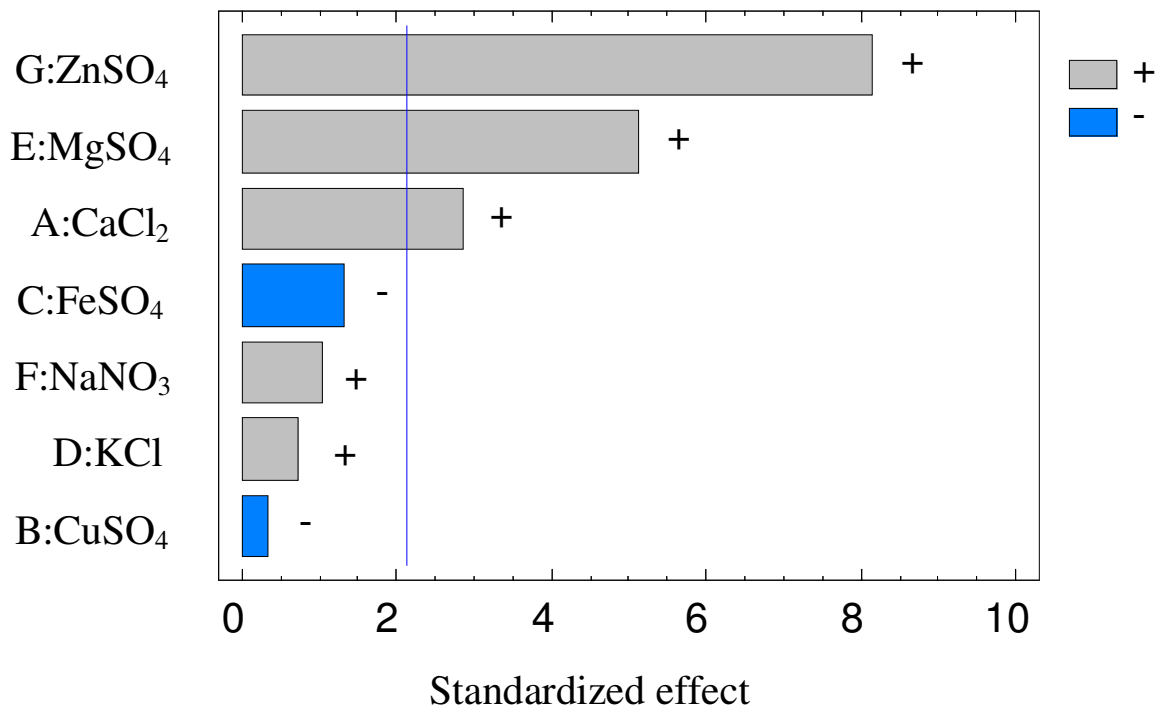
表八、微量元素組成份對*Coniothyrium* sp. CSM生長Plackett-Burman  
試驗設計。

Table 8、Plackett-Burman experimental design for screening suitable trace  
element ingredients to mycelia growth of *Coniothyrium* sp.CSM.

NO.	Concent ration: (%)							Growth zone (cm)
	CaCl <sub>2</sub>	CuSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	KCl	MgSO <sub>4</sub>	NaNO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	
1	0.01	0	0.001	0	0	0	0.02	2.88
2	0.01	0.002	0	0.05	0	0	0	2.84
3	0	0.002	0.001	0	0.05	0	0	2.64
4	0.01	0	0.001	0.05	0	0.2	0	2.62
5	0.01	0.002	0	0.05	0.05	0	0.02	3.37
6	0.01	0.002	0.001	0	0.05	0.2	0	2.8
7	0	0.002	0.001	0.05	0	0.2	0.02	2.93
8	0	0	0.001	0.05	0.05	0	0.02	3.39
9	0	0	0	0.05	0.05	0.2	0	2.57
10	0.01	0	0	0	0.05	0.2	0.02	3.44
11	0	0.002	0	0	0	0.2	0.02	3.08
12	0	0	0	0	0	0	0	2.49
13	0	0.002	0	0.05	0.05	0.2	0	2.74
14	0	0	0.001	0	0.05	0.2	0.02	3.20
15	0.01	0	0	0.05	0	0.2	0.02	3.23
16	0	0.002	0	0	0.05	0	0.02	3.27
17	0	0	0.001	0	0	0.2	0	2.57
18	0	0	0	0.05	0	0	0.02	2.86
19	0.01	0	0	0	0.05	0	0	2.97
20	0.01	0.002	0	0	0	0.2	0	2.64
21	0.01	0.002	0.001	0	0	0	0.02	2.77
22	0	0.002	0.001	0.05	0	0	0	2.23
23	0.01	0	0.001	0.05	0.05	0	0	2.92
24	0.01	0.002	0.001	0.05	0.05	0.2	0.02	3.58

註：培養時間為七天 (二重複)。

Standardized Pareto Chart for Growth zone



圖一、各微量元素對Plackett-Burman試驗結果之分析。(菌絲生長)

Fig. 1、Affects of different trace element ingredients in Plackett-Burman experimental design. (Growth zone)

#### (四) 菌絲生長之培養基關鍵組成份確定

由前述Plackett-Burman設計試驗結果得知無機鹽的添加結果，以CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>對於*Coniothyrium* sp. CSM菌絲生長有顯著正向影響。而於碳源試驗中以添加蔗糖為較佳，於氮源試驗中以添加蛋白胨生長較佳。故以蔗糖、蛋白胨、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>五個試驗因子做為尋找菌絲生長最適培養基之2<sup>5-1</sup>部分因子試驗設計。將其正規化為+1及-1階層來尋找具影響作用的組成份，經由部分因子試驗可得知各因子分別對於結果之主要效應。濃度和結果如表九。

菌絲生長最大範圍為第4號試驗，其次是16號試驗，然而16號試驗多添加了CaCl<sub>2</sub>和MgSO<sub>4</sub>，由STAGRAPHICS軟體分析結果之Pareto Chart顯示蔗糖、CaCl<sub>2</sub>和MgSO<sub>4</sub>對菌絲的生長無顯著的影響，如圖二。根據2<sup>5-1</sup>部分因子試驗數據分析所產生的迴歸方程式為：

$$\text{Growth zone} = 3.26062 + 0.133125 \times \text{Sucrose} + 0.299375 \times \text{Peptone} + \\ 0.188125 \times \text{CaCl}_2 + 0.093125 \times \text{MgSO}_4 + 0.324375 \times \text{ZnSO}_4$$

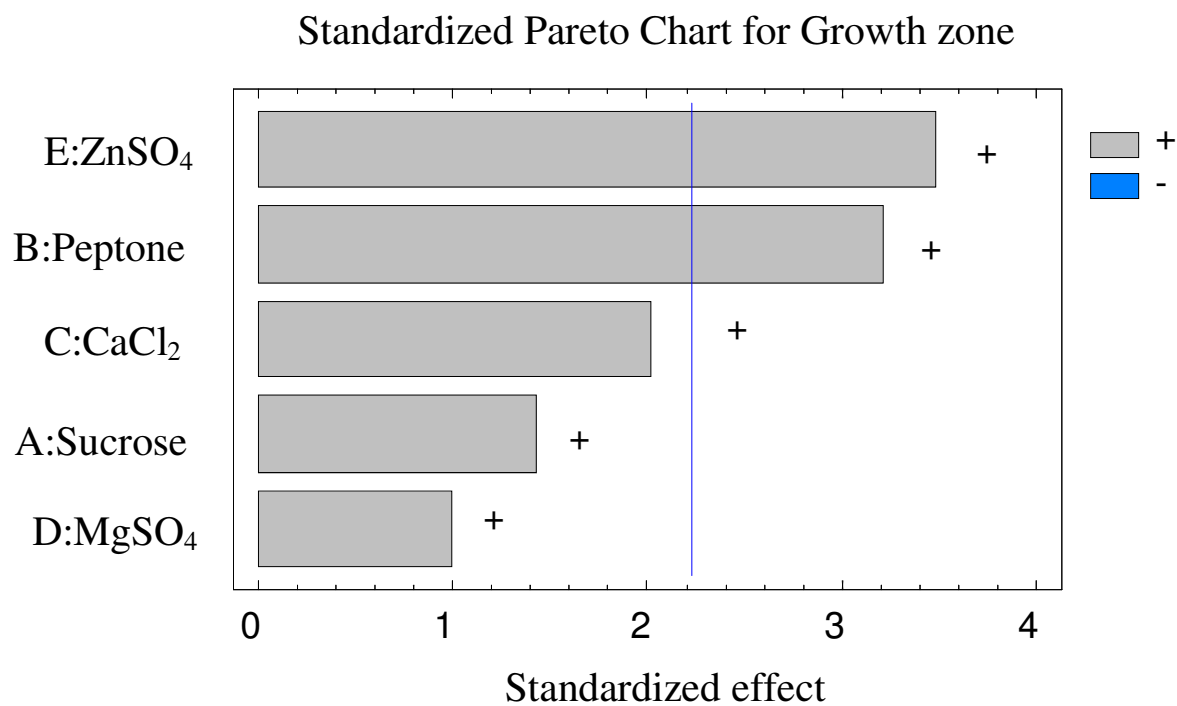
試驗的因子皆具有正向的關係，而以蛋白胨和ZnSO<sub>4</sub>對實驗結果最為顯著。在基礎培養基中PDA可能明顯缺乏氮源而導致蛋白胨提供菌絲生長主要關鍵氮源，蔗糖、CaCl<sub>2</sub>和MgSO<sub>4</sub>的迴歸係數較低並非關鍵的生長因子，故在之後的培養基組成試驗僅添加蛋白胨和ZnSO<sub>4</sub>於PDA中。

表九、培養基組成份之 $2^{5-1}$ 部分因子試驗設計。(菌絲生長)

Table 9、 $2^{5-1}$  fractional factorial experimental design for screening suitable medium ingredients. (Growth zone)

NO.	Concentration (%)					Growth zone (cm)
	Sucrose	Peptone	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	
1	0	0	0	0	0.02	2.51
2	1.5	0	0	0	0	2.54
3	0	1	0	0	0	2.57
4	1.5	1	0	0	0.02	4.32
5	0	0	0.01	0	0	2.84
6	1.5	0	0.01	0	0.02	3.48
7	0	1	0.01	0	0.02	3.57
8	1.5	1	0.01	0	0	3.51
9	0	0	0	0.05	0	2.64
10	1.5	0	0	0.05	0.02	3.14
11	0	1	0	0.05	0.02	3.46
12	1.5	1	0	0.05	0	3.40
13	0	0	0.01	0.05	0.02	3.99
14	1.5	0	0.01	0.05	0	2.55
15	0	1	0.01	0.05	0	3.44
16	1.5	1	0.01	0.05	0.02	4.21

註：培養時間為七天 (二重複)。



圖二、各培養基對  $2^{5-1}$  部分因子試驗的結果。(菌絲生長)

Fig. 2、Analysis of different medium ingredients in  $2^{5-1}$  fractional factorial experimental design. (Growth zone)



#### (五)菌絲體生長之培養基濃度之範圍

由部份因子試驗得知蛋白朊和 $ZnSO_4$ 對於菌絲生長具顯著效應。根據前述實驗中所使用的濃度正規化+1及-1做為探討範圍，再將因子濃度由-1逐漸提升濃度至+1。觀察其結果的改變。

經不同的試驗將濃度逐步提升而觀察是否呈現正相關，濃度範圍及結果如表十。比較後發現，隨著濃度的提升菌絲生長之範圍也逐漸增加，而在蛋白朊為0.6 %和 $ZnSO_4$ 為0.012 %之後生長會趨於平緩(4 cm)，之後超越蛋白朊為0.8 %和 $ZnSO_4$ 為0.016 %菌絲生長反而緩慢。意味著最適化的蛋白朊濃度在0.8-1.0 %之間， $ZnSO_4$ 在0.16-0.20 %之間。

表十、不同濃度試驗之培養基組成與結果。(菌絲生長)

Table 10、The medium ingredients and results of design with different concentration. (Growth zone)

NO.	Concentration (%)		Growth zone (cm)
	Peptone	ZnSO <sub>4</sub>	
1	0.000	0.000	3.99±0.05 <sup>C</sup>
2	0.200	0.004	3.39±0.12 <sup>D</sup>
3	0.400	0.008	3.45±0.09 <sup>D</sup>
4	0.600	0.012	4.34±0.23 <sup>B</sup>
5	0.800	0.016	4.59±0.01 <sup>A</sup>
6	1.000	0.020	4.46±0.03 <sup>AB</sup>

註：培養時間為七天。

註：1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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

#### (六) *Coniothyrium* sp. CSM生長最適化

利用回應曲面法設計實驗，尋找蛋白朊和 $ZnSO_4$ 最佳生長時之最適值。將兩者因子正規化為+1、0及-1等三個階層，由前述實驗濃度範圍之中間濃度為中心點，以中心點增減0.5%為蛋白朊的比例，增減0.01%為 $ZnSO_4$ 之比例，包含 $2^2$ 全因子設計加上4個中心點設計及1個中心點，共9個試驗，其試驗濃度及結果如表十一所示，得知 *Coniothyrium* sp. CSM生長最大的菌落產生在第8號試驗 (4.50 cm)，其培養基比例為Peptone :  $ZnSO_4$  = 0.5% : 0.02%。但在第7號試驗中只添加0.02%之 $ZnSO_4$ 卻明顯的降低菌落生長範圍，顯示在缺乏氮源的情況下，菌落並無法有效利用 $ZnSO_4$ 且單獨添加過多的 $ZnSO_4$ 會造成生長的抑制。

表十一、中心混成試驗之培養基組成與結果。(菌落生長)

Table 11、The medium ingredients and results of the central composite experimental design. (Growth zone)

NO.	Concentration (%)		Growth zone (cm)
	Peptone	ZnSO <sub>4</sub>	
1	0	0	2.87
2	0.5	0	3.38
3	1	0	3.97
4	0	0.01	3.45
5	0.5	0.01	4.38
6	1	0.01	3.79
7	0	0.02	2.82
8	0.5	0.02	4.50
9	1	0.02	3.90

註：培養時間為七天 (二重複)。

將試驗結果輸入STAGRAPHICS軟體分析，所得之迴歸係數列於表十二，其迴歸方程式為：

$$\text{Growth zone} = 2.7580700 + 3.3831580 \times \text{peptone} + 85.824561 \times \text{ZnSO}_4 - 2.5031580 \times \text{peptone}^2 - 10.000000 \times \text{ZnSO}_4 \times \text{peptone} - 3057.8947 \times \text{ZnSO}_4^2$$

在表十二中，迴歸係數中以 $\text{ZnSO}_4$ 之一次項和peptone、 $\text{ZnSO}_4$ 交互項具有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，其餘之係數無顯著差異，顯示兩個因子之間交互作用的可能。其檢定係數 ( $R^2$ ) 值達0.81，表示迴歸方程式無法完全解釋實驗數據，此變因可能來自於菌種本身突變性所帶來的不穩定，另也受到培養基中交互作用的影響而改變。

將試驗結果輸入SAS分析，結果如表十三。由變方分析可知，只有二次項達顯著 ( $P < 0.05$ )，而一次項和模式項之迴歸係數未達顯著，其迴歸模式之F值為1.37。在誤差項 (residual) 中之欠合度 (lack of fit) 之F值為7.95，不具顯著性 ( $P < 0.05$ )，表示由此實驗數據所回歸出之二次多項式模式可適切表達試驗數據，並無配適不足的情況。

表十二、SAS對組成份中心混成試驗設計之變方分析表。(菌落生長)

Table 12、 The analysis of variance of the central composite experimental design. (Growth zone)

Parameter	DF	Standard Error	t Value	Probability
Intercept	1	0.316546	8.71	0.0003**
peptone	1	1.003767	3.37	0.7896
ZnSO <sub>4</sub>	1	50.18836	1.71	0.0378*
peptone*peptone	1	0.892850	-2.80	0.1479
ZnSO <sub>4</sub> *peptone	1	35.52750	-0.28	0.0199*
ZnSO <sub>4</sub> *ZnSO <sub>4</sub>	1	2232.125	-1.37	0.2990

$$R^2 = 0.8137$$

\* : Significant at 5 % level

\*\* : Significant at 1 % level

表十三、組成份中心混成設計方程式之變方分析表。(菌落生長)

Table 13、Analysis of variance of central composite experimental design.  
(Growth zone)

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Probability
Linear	2	1.144667	0.3379	4.53	0.0753
Quadratic	2	1.601395	0.4728	6.34	0.0425*
Crossproduct	1	0.010000	0.0030	0.08	0.7896
Total Model	5	2.756062	0.8137	1.37	0.0658
Residual					
Lack of Fit	3	0.582302	0.194101	7.95	0.1137
Pure Error	2	0.048800	0.024400		
Total Error	5	0.631102	0.126220		

$$R^2 = 0.8137$$

\* : Significant at 5 % level

回歸方程式利用SAS軟體進行正則分析 (Canonical analysis)，如表十四 (A)，其消除一次項後將二次方程式轉換得正則方程式：

$$Y = 4.414 - 0.304Z_1 - 0.628Z_2$$

其中Y為菌落生長大小， $Z_1$ 為蛋白胨， $Z_2$ 為 $ZnSO_4$ 。方程式中之係數皆為負值，具有極大值  $(Z_1, Z_2) = (0.300, 0.297)$ 。換算後各成份對應濃度為peptone = 0.650 %， $ZnSO_4 = 0.013$  %，如表十四 (C)。與STA-GRAPHICS分析估計結果，如圖三。由分析後之圖型 (A) 為一曲面圖，在曲面最高點為估計結果之最大值，再以圖型 (B) 之等高線圖，對應座標軸上各因子之濃度，可估計結果為peptone = 0.670 %， $ZnSO_4 = 0.013$  %，結果與SAS分析相似。

而在表十四 (B) 為兩個變數對於菌絲生長的整體總和作用之變方分析表，由表中可知兩者未能有效達顯著性，必須由彼此之間之交互作用達成正向性。再根據預測之培養基濃度進行三重複試驗，結果為(4.45, 4.47, 4.55)，所得之菌落大小為 $4.50 \pm 0.08$  cm，和經電腦分析預測之4.41 cm沒有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，因此推斷以此營養源之濃度可使*Coniothyrium* sp. CSM生長較佳。



表十四、(A) SAS正則分析表 (B)中心混成設計整體總合作用之變  
方分析 (C)預測與試驗菌落生長之最適培養基組成。

Table 14、(A) The canonical analyzed table calculated by SAS. (B) Anal-  
-ysis of variance of central composite design for studying the  
overall effects. (C)The predicted and practiced value of the  
optimum concentration of medium.

(A)

Eigenvalues	Peptone	ZnSO <sub>4</sub>
-0.30385	-0.077421	0.996999
-0.62773	0.996999	0.077421

(B)

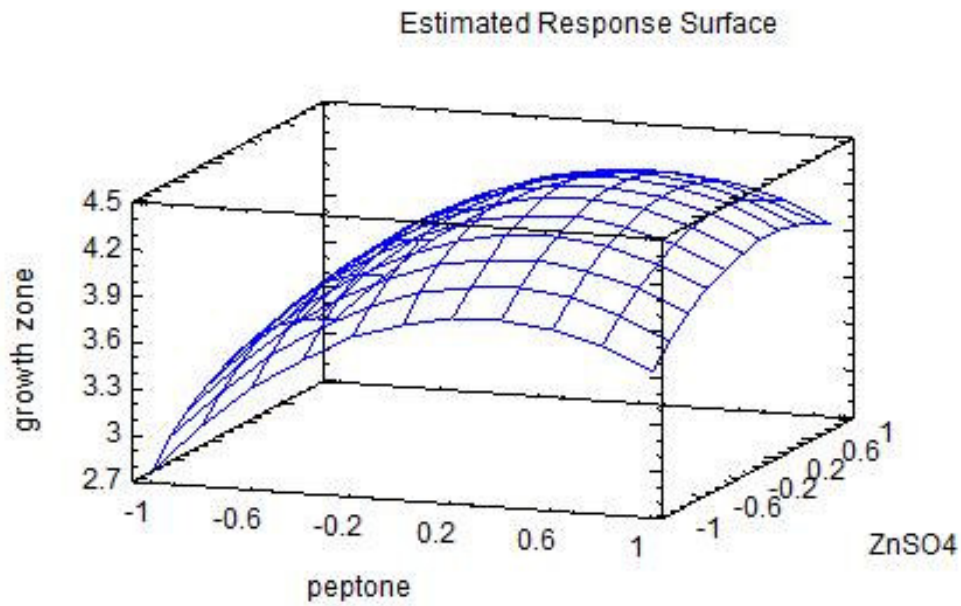
Factor	DF	Sum of Squares	Mean square	F value	Probability
Peptone	3	1.914685	0.638228	5.06	0.0565
ZnSO <sub>4</sub>	3	0.478952	0.159651	1.26	0.3807

(C)

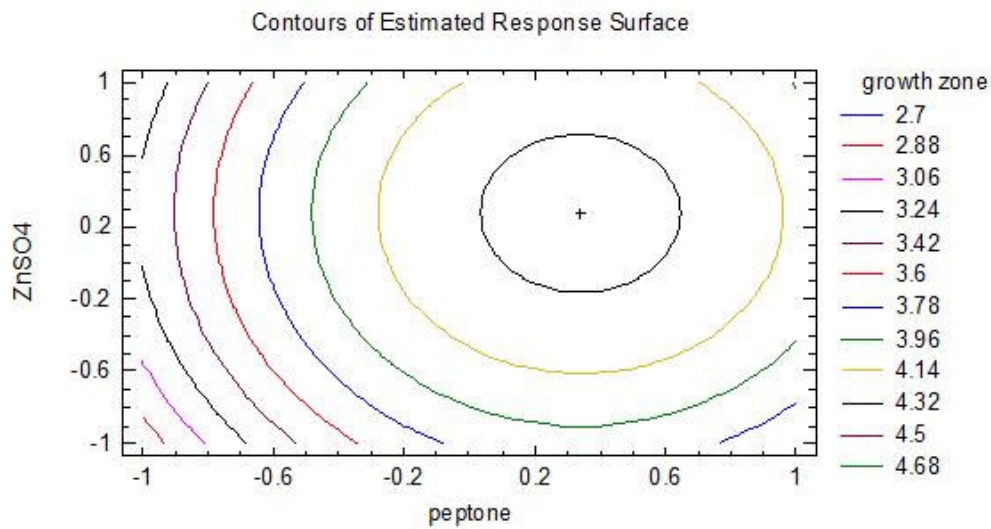
	Concentration (%)		Growth zone (cm)
	Peptone	ZnSO <sub>4</sub>	
Theoretical value	0.650	0.013	4.41 <sup>A</sup>
Practice value	0.650	0.013	4.50±0.08 <sup>A</sup>

A : Practice value are not significantly different with theoretical value  
(P < 0.05)

(A)



(B)



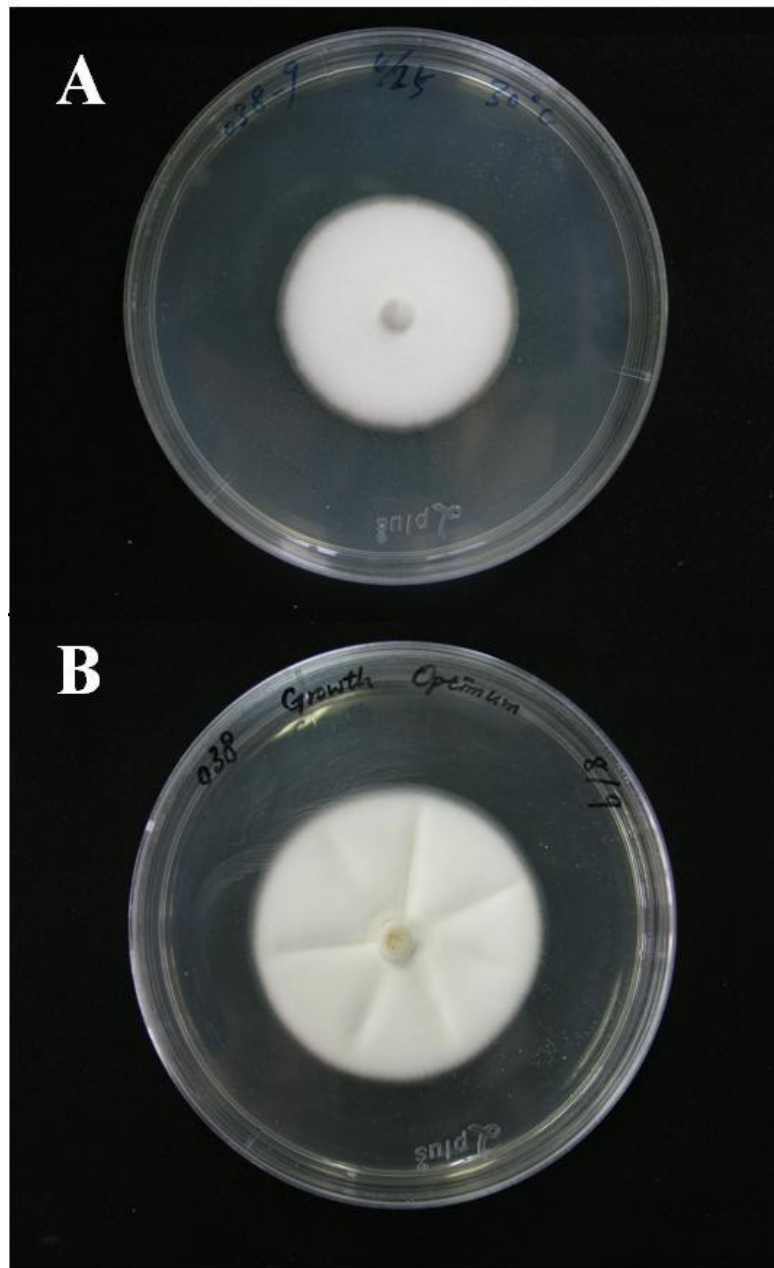
圖三、Peptone、ZnSO<sub>4</sub>的添加對於*Coniothyrium* sp. CSM菌落生長範圍之影響。(A)反應曲面圖 (B)等高線圖

Fig. 3、Effect of mycelia growth of *Coniothyrium* sp. CSM at various concentrations of peptone and ZnSO<sub>4</sub>. (A) Response Surface of the proportion (B) Contours of the proportion

進一步將 *Coniothyrium* sp. CSM 分別培養於最適生長條件培養基和基礎培養基 PDA，觀差其外觀的變化，兩者在菌絲生長皆為白色且呈現平盤放射狀生長，並有緊密聚集菌絲形成菌落的特性。而兩者不同培養基在菌落大小上呈現差異，且菌絲以最適培養基培養下生長較為緊密。修正後培養基之菌落大小和基礎培養基呈現顯著差異，由原先約 3.0 cm 擴大至約 4.5 cm，如圖四。

由前述試驗中得知 *Coniothyrium* sp. CSM 具有抑制病原細菌之能力，對於抑制革蘭氏陽性菌效益較大，其抑菌能力來自於培養基上所含二次代謝物質 (洪，2007)。因此經由對固態培養基萃取後，試驗對 *S. aureus* 的抑菌能力。以 PDA 和最適生長培養基兩種，分別接種 *Coniothyrium* sp. CSM 培養七天後萃取，得到對 *S. aureus* 之抑菌力，如表十五。

由結果中得知隨著菌落生長提升其抑菌能力並無顯著提升，培養在最適生長培養基下所產生的抑菌環 (0.41 cm)，和培養於基礎培養基上所形成的抑菌環 (0.40 cm) 並無顯著差異。推測在最適生長培養基培養下能有效提升菌落生長，可做為未來種菌的培養和保存，但無法有效提升抑菌能力，故接續試驗中將探討產 *S. aureus* 抑菌物質最適化之培養基。



圖四、*Coniothyrium* sp. CSM培養七天之生長情況。(A)於基礎培養基上(B)於最適培養基上

Fig. 4、Mycelia growth of *Coniothyrium* sp. CSM that incubated for 7 days. (A) on basal medium (B) on optimum medium

表十五、*Coniothyrium* sp. CSM培養於PDA和最適生長培養基之抑菌能力影響。

Table 15、Effect of PDA and optimization of growthful medium on inhibition zone by *Coniothyrium* sp.CSM incubated for 7 days.

	Media	
	PDA	Optimum medium of mycelia growth
Inhibition zone (cm) <sup>1</sup>	0.40±0.04 <sup>A</sup>	0.41±0.02 <sup>A</sup>

註: 1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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

### 三、產抑菌物質之最適培養基組成份探討

最適生長培養基下無法產生抑制*S. aureus*代謝物質最佳化，因此以PDA做為基礎培養基進行組成份之探討，期望經修飾後之培養基能使抑菌物質有效提升。

#### (一) 不同碳源影響

為探討不同碳源對*Coniothyrium sp.* CSM抑菌能力的影響，添加不同濃度之碳源於PDA中，培養七天後，用乙醇對培養基進行萃取，對病原菌進行抑菌測試，結果如表十六。數據顯示在抑制*S. aureus*方面，添加果糖和蔗糖可產生較大的抑菌環 (0.5 cm)，兩者在不同的濃度下皆和控制組具顯著差異 ( $P < 0.05$ )，添加蔗糖使*Coniothyrium sp.* CSM代謝產物活性最強。甘油及半乳糖對於抑菌能力並無增加，葡萄糖、麥芽糖、乳糖和甘露糖則在高濃度下沒有顯著的增加抑菌能力，但甘露糖在低濃度的情形會有增加抑菌能力。

#### (二) 不同氮源影響

試驗中以六種有機氮源和無機氮源添加於PDA後，接種*Coniothyrium sp.* CSM培養七天再萃取培養基來進行 *S. aureus*之抑菌環測試，結果如表十七。

使用氮源的添加對於代謝物物質的產生具有相當大的影響，以1.0 % 之蛋白胨 (peptone)做為氮源對*S. aureus*產生的抑菌環最佳 (0.5 cm)，和控制組具有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。酵母萃取物及無機氮源無助於抑菌物的產生，其中添加無機氮源反而使*Coniothyrium sp.* CSM在生長受到抑制菌落縮小，無法產生抑菌物質。添加酵母萃取物雖能使菌落生長，但其抑菌能力則下降。因此以1 %的蛋白胨做為*Coniothyrium sp.* CSM在抑制*S. aureus*時修飾培養基之氮源的選擇。

表十六、不同碳源對 *Coniothyrium* sp. CSM 於 PDA 上培養七天後對金黃葡萄球菌之抑菌環影響。

Table 16、Effect of different carbon source on inhibition zone of *Staphylococcus aureus* by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

Carbon source	Tested pathogenic bacteria species					<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Glucose	Fructose	Galactose	Maltose	Sucrose	Lactose	Mannose	Glycerol	Control
	Inhibition zone (cm) <sup>1</sup>								
Concentration									
0.5%	0.26±0.05 <sup>JKLM</sup>	0.44±0.04 <sup>CDEF</sup>	0.31±0.02 <sup>HIJKLM</sup>	0.31±0.01 <sup>HIJKLM</sup>	0.54±0.08 <sup>AB</sup>	0.38±0.01 <sup>DEFGH</sup>	0.46±0.06 <sup>BCDE</sup>	0.24±0.04 <sup>LM</sup>	0.25±0.01 <sup>JKLM</sup>
1.0%	0.30±0.04 <sup>HIJKLM</sup>	0.47±0.06 <sup>BCD</sup>	0.36±0.05 <sup>EFGHI</sup>	0.37±0.04 <sup>DEFGHI</sup>	0.52±0.06 <sup>ABC</sup>	0.26±0.02 <sup>JKLM</sup>	0.42±0.07 <sup>CDEFG</sup>	0.24±0.05 <sup>KLM</sup>	
1.5%	0.35±0.06 <sup>EFGHIJK</sup>	0.47±0.02 <sup>BCD</sup>	0.21±0.05 <sup>MN</sup>	0.27±0.05 <sup>IJKLM</sup>	0.57±0.03 <sup>A</sup>	0.31±0.05 <sup>HIJKLM</sup>	0.29±0.01 <sup>HIJKLM</sup>	0.25±0.05 <sup>JKLM</sup>	
3.0%	0.34±0.05 <sup>FGHIJKL</sup>	0.46±0.01 <sup>BCD</sup>	0.13±0.01 <sup>N</sup>	0.26±0.04 <sup>JKLM</sup>	0.45±0.08 <sup>BCDE</sup>	0.32±0.08 <sup>HIJKL</sup>	0.26±0.01 <sup>JKLM</sup>	0.21±0.02 <sup>MN</sup>	

註:1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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

表十七、不同氮源對*Coniothyrium* sp. CSM於PDA上培養七天後對金黃葡萄球菌之抑菌環影響。

Table 17、Effect of different nitrogen source on inhibition zone of *Staphylococcus aureus* by *Coniothyrium* sp. CSM on PDA incubated for 7 days.

Tested pathogenic bacteria species		<i>Staphylococcus aureus</i>					
		Inhibition zone (cm) <sup>1</sup>					
Nitrogen source	Yeast extract	Malt extract	Tryptone	Peptone	Urea	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Control
Concentration							
0.5%	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.18±0.02 <sup>G</sup>	0.21±0.03 <sup>FG</sup>	0.51±0.06 <sup>B</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.32±0.02 <sup>DE</sup>
1.0%	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.37±0.04 <sup>CD</sup>	0.21±0.04 <sup>FG</sup>	0.62±0.05 <sup>A</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	
1.5%	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.41±0.02 <sup>C</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.47±0.07 <sup>B</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	
3.0%	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.26±0.03 <sup>EF</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.34±0.06 <sup>D</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	0.00±0.00 <sup>H</sup>	

註:1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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



### (三)無機鹽類的影響

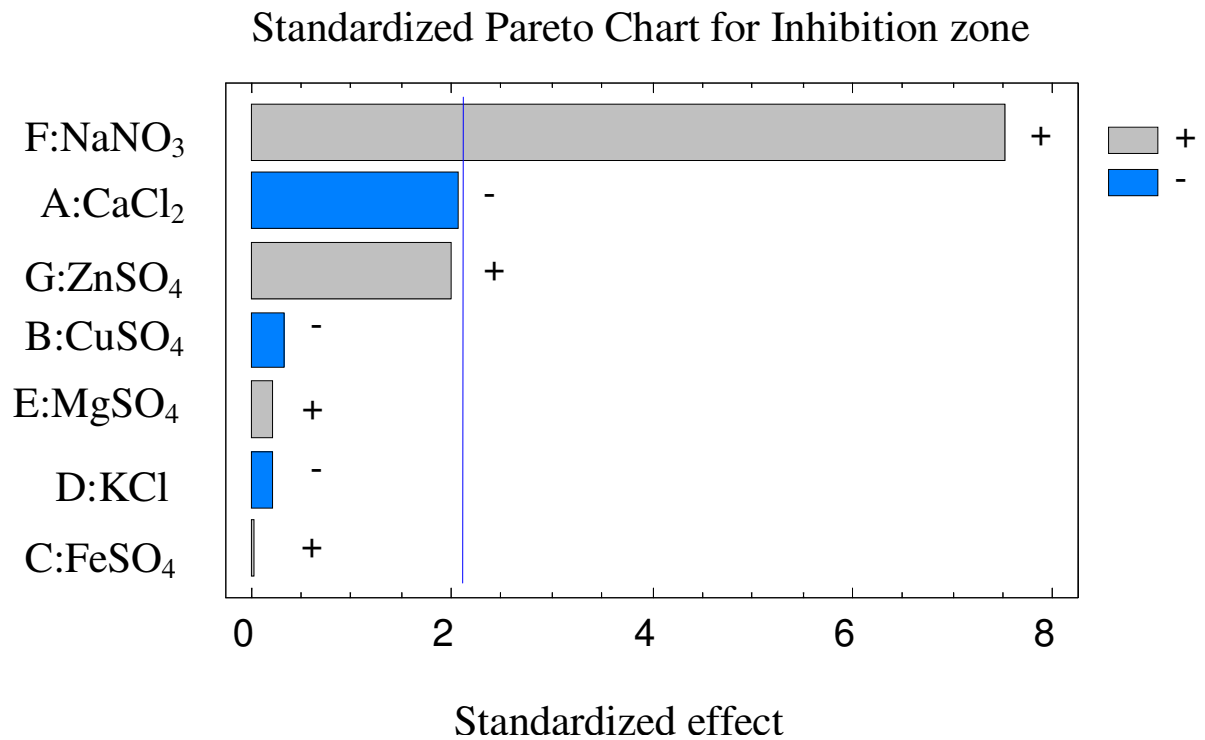
抑菌物質的活性，同樣受到不同鹽類的影響對*S. aureus*的抑菌能力的影響不同，分析如圖五。針對*S. aureus*的抑制力方面，最大抑菌環為第11號試驗 (0.90 cm) (表十八)。以NaNO<sub>3</sub>效果最佳，達顯著差異。而其餘的無機鹽不論具正或負影響皆無達顯著差異。可能添加濃度的不足或是多種因子之間的交互影響而較無明顯效果。ZnSO<sub>4</sub>雖然對於菌絲生長為正向顯著，但對於抑制*S. aureus*活性雖為正向但不顯著，顯示抑菌物質可能和生長並無正相關。由此結果在抑制*S. aureus*方面，選擇NaNO<sub>3</sub>配合碳源為蔗糖、氮源為蛋白胨進行部分因子試驗設計來探討*Coniothyrium* sp. CSM抑制*S. aureus*之培養基最適化組成份。

表十八、微量元素組成份對*Coniothyrium* sp. CSM 抑菌環之Plackett-Burman試驗設計。

Table 18、Plackett-Burman experimental design for screening suitable trace element ingredients to inhibition zone of *Coniothyrium* sp.CSM.

NO.	Concent ration : (%)							Inhibition zone (cm)
	CaCl <sub>2</sub>	CuSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	KCl	MgSO <sub>4</sub>	NaNO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	
1	0.01	0	0.001	0	0	0	0.02	0.35
2	0.01	0.002	0	0.05	0	0	0	0.21
3	0	0.002	0.001	0	0.05	0	0	0.45
4	0.01	0	0.001	0.05	0	0.2	0	0.66
5	0.01	0.002	0	0.05	0.05	0	0.02	0.24
6	0.01	0.002	0.001	0	0.05	0.2	0	0.49
7	0	0.002	0.001	0.05	0	0.2	0.02	0.84
8	0	0	0.001	0.05	0.05	0	0.02	0.36
9	0	0	0	0.05	0.05	0.2	0	0.68
10	0.01	0	0	0	0.05	0.2	0.02	0.87
11	0	0.002	0	0	0	0.2	0.02	0.90
12	0	0	0	0	0	0	0	0.26
13	0	0.002	0	0.05	0.05	0.2	0	0.55
14	0	0	0.001	0	0.05	0.2	0.02	0.58
15	0.01	0	0	0.05	0	0.2	0.02	0.60
16	0	0.002	0	0	0.05	0	0.02	0.51
17	0	0	0.001	0	0	0.2	0	0.73
18	0	0	0	0.05	0	0	0.02	0.40
19	0.01	0	0	0	0.05	0	0	0.21
20	0.01	0.002	0	0	0	0.2	0	0.50
21	0.01	0.002	0.001	0	0	0	0.02	0.15
22	0	0.002	0.001	0.05	0	0	0	0.28
23	0.01	0	0.001	0.05	0.05	0	0	0.34
24	0.01	0.002	0.001	0.05	0.05	0.2	0.02	0.72

註：培養時間為七天 (二重複)。



圖五、各微量元素對Plackett-Burman試驗結果之分析。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)

Fig. 5、Affects of different trace element ingredients in Plackett-Burman experimental design. (Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

#### (四)、抑制金黃葡萄球菌物質之培養基關鍵組成份確定

經由Plackett-Burman試驗設計得知添加 $\text{NaNO}_3$ 可使*Coniothyrium* sp. CSM抑制金黃葡萄球菌能力提升。因此以 $\text{NaNO}_3$ 配合碳源為蔗糖及氮源為蛋白胨進行 $2^{3-1}$ 部分因子測試。將三個因子正規化為+1及-1，試驗設計及結果如表十九。

結果顯示最大的抑菌環在第8號實驗達 (0.83 cm)，其和對照組 (第1號試驗)相比增加約0.5 cm。經由軟體分析，Pareto Chart結果如圖六。由圖中得知三個因子皆為正向影響，蛋白胨和 $\text{NaNO}_3$ 呈現顯著效應。並由三個因子產生之迴歸方程式為：

$$\text{Inhibition zone of } S. \text{ aureus} = 0.59 + 0.0175 \times \text{Sucrose} + 0.135 \times \text{Peptone} \\ + 0.095 \times \text{NaNO}_3$$

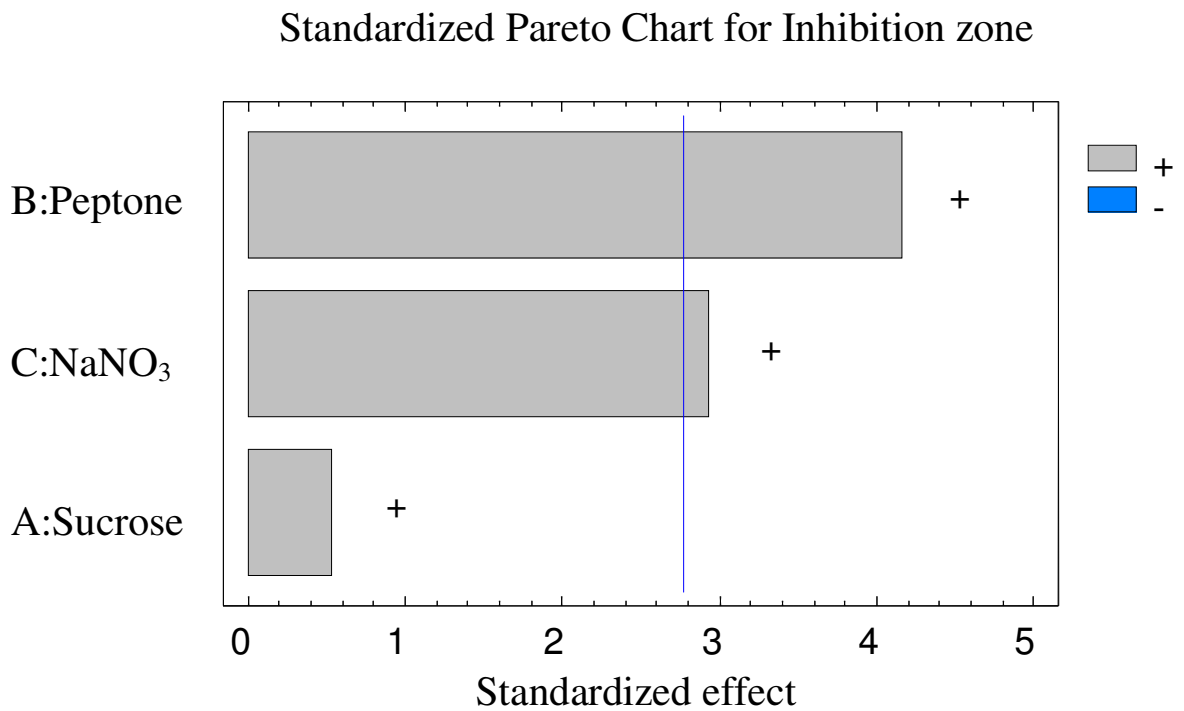
故在之後探討抑菌能力的培養基中，以蛋白胨和 $\text{NaNO}_3$ 作為添加於PDA中營養因子，並試驗其濃度範圍。

表十九、培養基組成份之 $2^{3-1}$ 部分因子試驗設計。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)

Table 19、 $2^{3-1}$  fractional factorial experimental design for screening suitable medium ingredients. (Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

NO.	Concentration (%)			Inhibition zone (cm)
	Sucrose	Peptone	NaNO <sub>3</sub>	
1	0	0	0	0.27
2	1.5	0	0	0.35
3	0	1	0	0.66
4	1.5	1	0	0.70
5	0	0	0.2	0.65
6	1.5	0	0.2	0.55
7	0	1	0.2	0.71
8	1.5	1	0.2	0.83

註：培養時間為七天 (二重複)。



圖六、各培養基對 $2^{3-1}$ 部分因子試驗的結果。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)

Fig. 6、Analysis of different medium ingredients in  $2^{3-1}$  fractional factorial experimental design. (Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

#### (五)、抑制金黃葡萄球菌之培養基濃度範圍

相似於菌絲生長探討條件方式，以前述試驗的濃度範圍做為探討範圍，在正規化後由-1逐漸提升濃度至+1。而試驗結果可以發現隨著實驗因子的濃度提升，抑制力也呈現提升（約0.9 cm），但在濃度到達+1狀況時卻開始降低抑制病原菌的能力（0.7 cm），如表二十。因此得知濃度達+1後往上提升會呈現負向的關係。而由外觀上觀察，其試驗中的菌體生長皆相同且菌落大小上並無顯著差異，可能是由二次代謝物受到營養物質濃度不同而使代謝途徑的改變的影響，而二次代謝物質並沒有隨著菌絲生長而呈現正向相關性。因此推測其產抑菌物最大值時培養基中蛋白胨濃度在0-0.5 %， $\text{NaNO}_3$ 濃度在0-0.1 %之間，並以全因子試驗設計進行探討。

表二十、不同濃度試驗之培養基組成與結果。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)

Table 20、The medium ingredients and results of design with different concentration. (Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

NO.	Concentration (%)		Inhibition zone (cm)
	Peptone	NaNO <sub>3</sub>	
1	0.00	0.00	0.43±0.07 <sup>C</sup>
2	0.25	0.05	0.98±0.07 <sup>A</sup>
3	0.50	0.10	0.92±0.06 <sup>A</sup>
4	0.75	0.15	0.90±0.03 <sup>A</sup>
5	1.00	0.20	0.69±0.05 <sup>B</sup>

註：培養時間為七天。

註：1 : Means of triplicates ± standard deviation.

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



#### (六)、產抑制金黃葡萄球菌物質之培養基最適化

在前述的實驗中選擇以蛋白胨和 $\text{NaNO}_3$ 做為試驗因子，期望增加抑制*S. aureus*之代謝物。採用前述之中心混成試驗，對培養基進行探討。馬等 (2006) 學者改善培養基條件，以葡萄糖、幾丁質及增加磷酸氫鉀等微量元素來增加盾殼黴菌產幾丁質酶產量。相較之下，文獻以碳源為增加產量之主要因子，而本試驗以氮源為代謝物質之主要因子，可能是在於基礎培養基上的差異。

以蛋白胨和 $\text{NaNO}_3$ 做為添加於培養基之營養源，正規化為+1、0及-1，以0.5 %為蛋白胨之中心點增減0.5 %為比例，另 $\text{NaNO}_3$ 以0.1 %為中心點增減0.1 %為比例。其實驗設計及結果如表二十一。

表二十一、中心混成試驗之培養基組成與結果。(對金黃葡萄球菌之  
 抑菌環)

Table 21、The medium ingredients and results of the central composite  
 experimental design. (Inhibition zone of *Staphylococcus  
 aureus*)

NO.	Concentration (%)		Inhibition zone (cm)
	Peptone	NaNO <sub>3</sub>	
1	0	0	0.40
2	0.5	0	0.95
3	1	0	0.77
4	0	0.1	0.87
5	0.5	0.1	1.01
6	1	0.1	0.85
7	0	0.2	0.80
8	0.5	0.2	1.08
9	1	0.2	0.84

註：培養時間為七天 (二重複)。

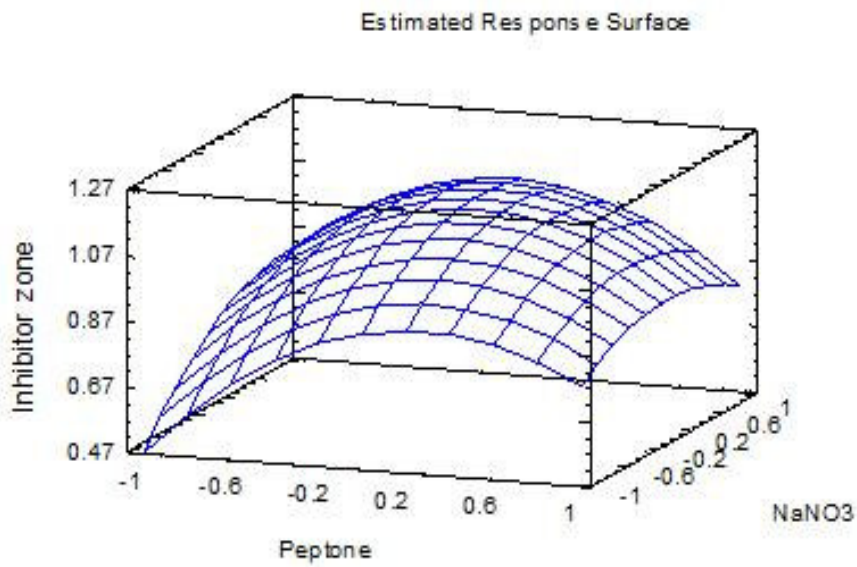
將結果輸入軟體分析，可得知回歸方程式為：

$$\text{Inhibition zone} = 0.477917 + 1.237500 \times \text{peptone} + 3.420833 \times \text{NaNO}_3 - 0.940000 \times \text{peptone}^2 - 1.675000 \times \text{NaNO}_3 \times \text{peptone} - 8.000000 \times \text{NaNO}_3^2$$

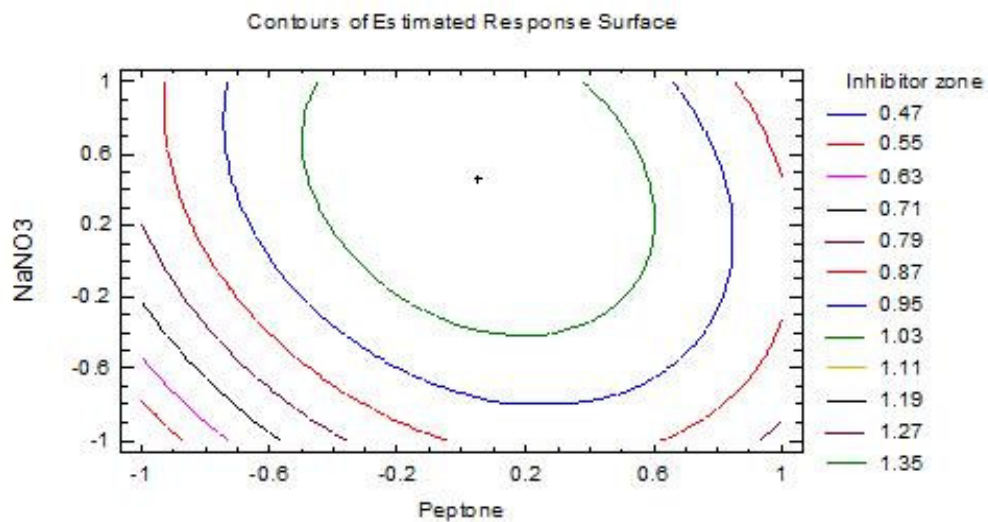
發現在蛋白胨之二次項會產生負向顯著影響，且兩者之間交互項亦為負向，因此對於兩個因子只添加少量便會改變結果，且兩者間交互作用並無法增加抑菌能力。由蛋白胨和NaNO<sub>3</sub>對抑制*S. aureus*之抑菌環的回應曲面圖及等高線圖，如圖七。得知圖中最適培養基比例約為peptone = 0.526 %，NaNO<sub>3</sub> = 0.145 %。

表二十二分析結果具有顯著之回歸係數為NaNO<sub>3</sub>一次項 (P < 0.05)，而peptone之一次項及二次項皆為極顯著性 (P < 0.01)。但兩因子間交互作用無顯著性，故顯示兩因子間無交互作用之可能性，只有peptone二次項為顯著相同，且其檢定係數值 (R<sup>2</sup>) 為0.89，表示此回歸方程式有微量不足以解釋其試驗結果。而於表二十三中變方分析可知，二次項和模式項具顯著差異 (P < 0.05)，但一次項及交互作用項並不具顯著性。

(A)



(B)



圖七、Peptone、 $\text{NaNO}_3$ 的添加對於*Coniothyrium* sp. CSM 抑菌能力之影響。(A)反應曲面圖 (B)等高線圖

Fig. 7、Effect of antibacterial of *Coniothyrium* sp. CSM at various concentrations of peptone and  $\text{NaNO}_3$ . (A) Response Surface of the proportion (B) Contours of the proportion

表二十二、SAS對組成份中心混成試驗設計之變方分析表。(對金黃葡萄球菌之抑菌環)

Table 22、 The analysis of variance of the central composite experimental design. (Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

Parameter	DF	Standard Error	t Value	Probability
Intercept	1	0.079069	6.04	0.0018**
peptone	1	0.250729	4.94	0.0043**
NaNO <sub>3</sub>	1	1.253646	2.73	0.0413*
peptone*peptone	1	0.223023	-4.21	0.0084**
NaNO <sub>3</sub> *peptone	1	0.887435	-1.89	0.1177
NaNO <sub>3</sub> *NaNO <sub>3</sub>	1	5.575587	-1.43	0.2108

$R^2 = 0.8863$

\* : Significant at 5 % level

\*\* : Significant at 1 % level

表二十三、組成份中心混成設計方程式之變方分析表。(對金黃  
葡萄球菌之抑菌環)

Table 23、Analysis of variance of central composite experimental design.  
(Inhibition zone of *Staphylococcus aureus*)

Regression	DF	Type I Sum of Squares	R-Square	F Value	Probability
Linear	2	0.083367	0.2408	5.29	0.0583
Quadratic	2	0.195414	0.5644	12.41	0.0115*
Crossproduct	1	0.028056	0.081	3.56	0.1177
Total Model	5	0.306837	0.8863	7.79	0.0209*
Residual					
Lack of Fit	3	0.039327	0.013109	524.36	0.0019**
Pure Error	2	0.00005	0.000025		
Total Error	5	0.039377	0.007875		

$$R^2 = 0.8863$$

\* : Significant at 5 % level

\*\* : Significant at 1 % level

將分析後之回歸方程式利用SAS軟體進行正則分析 (Canonical analysis)，結果如表二十四 (A)，其消除一次項後將二次方程式轉換得正則方程式：

$$Y = 1.070 - 0.069Z_1 - 0.246Z_2$$

其中Y為抑菌環， $Z_1$ 為蛋白胨， $Z_2$ 為 $\text{NaNO}_3$ 。正則方程式中之係數皆為負值，表示不論變因之Z值為正或負值水準變化，皆會使回應值下降，因此回應曲面法中產生極大值  $(Z_1, Z_2) = (0.032, 0.598)$ 。換算後各成份對應濃度為peptone = 0.516 %， $\text{NaNO}_3$  = 0.160 %，如表二十四 (C)，與STAGRAPHICS分析結果peptone = 0.526 %， $\text{NaNO}_3$  = 0.145 %略為差異。

而在表二十四 (B) 為兩個變數對於菌絲生長的整體總和作用之變方分析表，由表中可知 $\text{NaNO}_3$ 未能有效達顯著性，但peptone具有顯著性，因此推測氮源的添加為主要增加產量之變因之一，而 $\text{NaNO}_3$ 則在濃度上修正後才能具有增加產量之可能。試驗最終再根據預測之培養基濃度進行三重複試驗 (1.04, 1.03, 1.00)，所得之抑菌環為1.02 cm，和經電腦分析預測之1.07 cm沒有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，故以此營養源之濃度做為最適培養基以促使*Coniothyrium* sp. CSM代謝抑制*S. aureus*之物質。

表二十四、(A) SAS正則分析表 (B)中心混成設計整體總合作用之變  
方分析 (C)預測與試驗抑菌環之最適培養基組成。

Table 24、(A) The canonical analyzed table calculated by SAS. (B) Anal-  
-ysis of variance of central composite design for studying the  
overall effects. (C)The predicted and practiced inhibition  
zone of the optimum concentration of medium.

(A)

Eigenvalues	Peptone	NaNO <sub>3</sub>
-0.069410	-0.245167	0.969481
-0.245590	0.969481	0.245167

(B)

Factor	DF	Sum of Squares	Mean square	F value	Probability
Peptone	3	0.193310	0.064437	8.18	0.0225*
NaNO <sub>3</sub>	3	0.102286	0.034095	4.33	0.0742

\* : Significant at 5 % level

(C)

Tested pathogenic bacteria species	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Concentration (%)		Inhibitor zone (cm)
	Peptone	NaNO <sub>3</sub>	
Theoretical value	0.516	0.160	1.07 <sup>A</sup>
Practice value	0.516	0.160	1.02±0.02 <sup>A</sup>

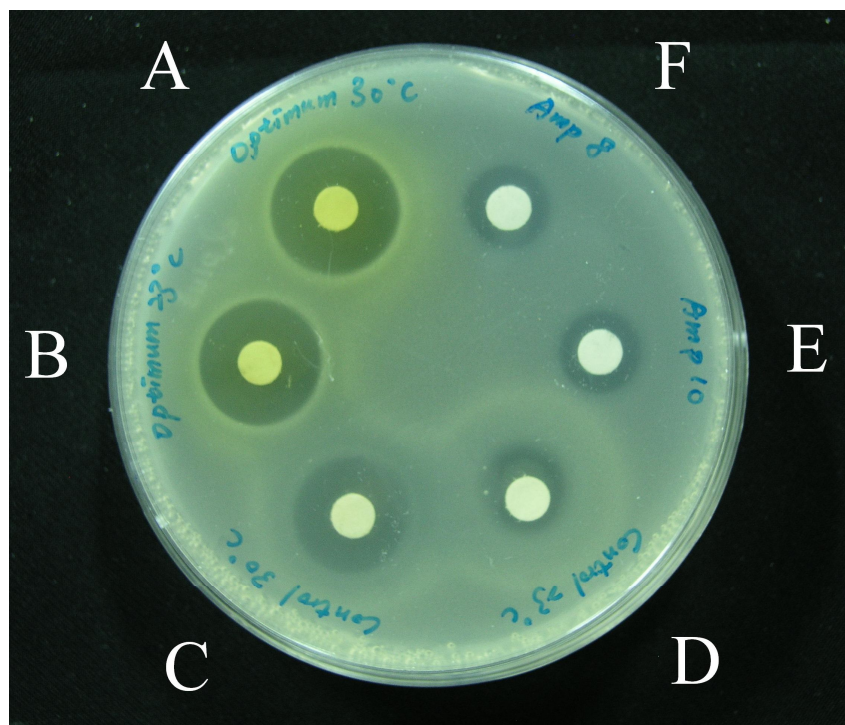
A : Practice value are not significantly different with theoretical value

(P < 0.05)



以能產生最多抑制*S. aureus*活性物的最適培養基進行試驗，經培養*Coniothyrium* sp. CSM七天後萃取培養基，與在基礎培養基PDA上之*Coniothyrium* sp. CSM培養物比較，並利用Ampicillin做為對照組，結果如圖八 (A-R)。依照抗生素不同濃度對於病原菌的抑制效果來對照*Coniothyrium* sp. CSM之萃取物質的抑菌效果 (如附錄一)。

結果顯示在基礎培養基所培養之*Coniothyrium* sp. CSM於不同培養溫度下 (30 °C及23 °C) 抑菌能力有所差異 (圖八中C和D)，對於*S. aureus* 抑菌環分別約為0.58 cm和0.4 cm。分別與使用Ampicillin之抑菌效果比較 (圖八中E和F)，對照後其效果約為Ampicillin 5.85 µg/mL及9.29 µg/mL。而經最適化後之培養基在不同溫度下(30 °C及23 °C)能使*Coniothyrium* sp. CSM對*S. aureus* 抑菌環提升約為1.08 cm和1.0 cm (圖八中A和B)，其效果約為Ampicillin 19.71µg/mL及16.96 µg/mL。其對於修飾前培養基提升約2.9倍之抑制*S. aureus*之抑菌力。藉由改善培養基來增加*Coniothyrium* sp. CSM二次代謝物之產量。



圖八、*Coniothyrium sp.* CSM 培養七天後對金黃葡萄球菌之抑菌環大小。(A:培養於 30 °C 之最適培養基；B:培養於 23 °C 之最適培養基；C:培養於 30 °C 之基礎培養基；D:培養於 23 °C 之基礎培養基；E: Ampicillin 10 µg/mL；F:Ampicillin 8 µg/mL。)

Fig. 8、Inhibition zones of *Coniothyrium sp.* CSM extracts for *Staphylococcus aureus* which incubated for 7 days. (A: on optimum medium with 30 °C；B: on optimum medium with 23 °C；C: on basal medium with 30 °C；D: on basal medium with 23 °C；E: Ampicillin 10 µg/mL；F:Ampicillin 8 µg/mL。)

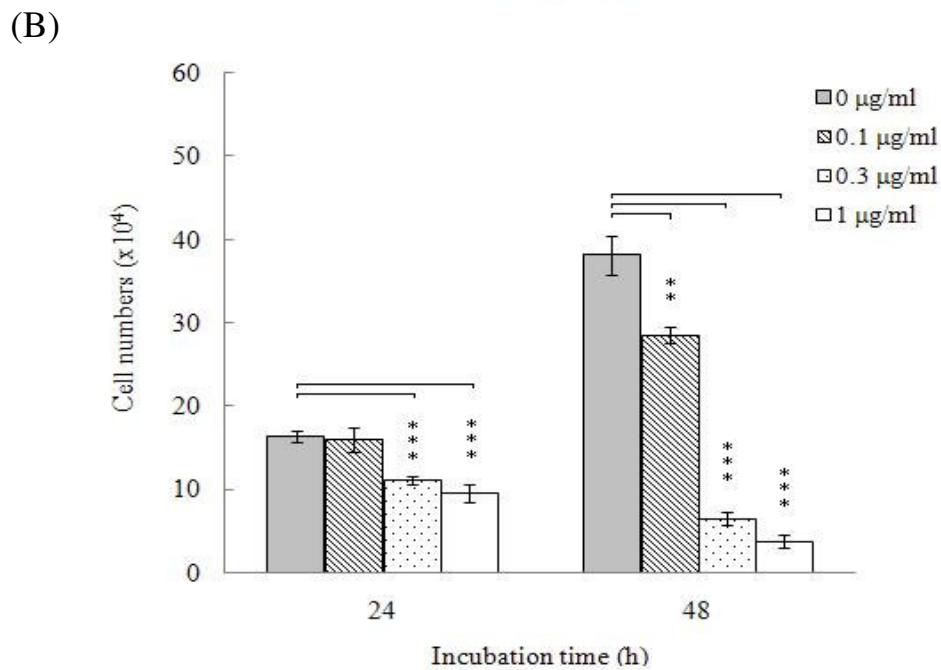
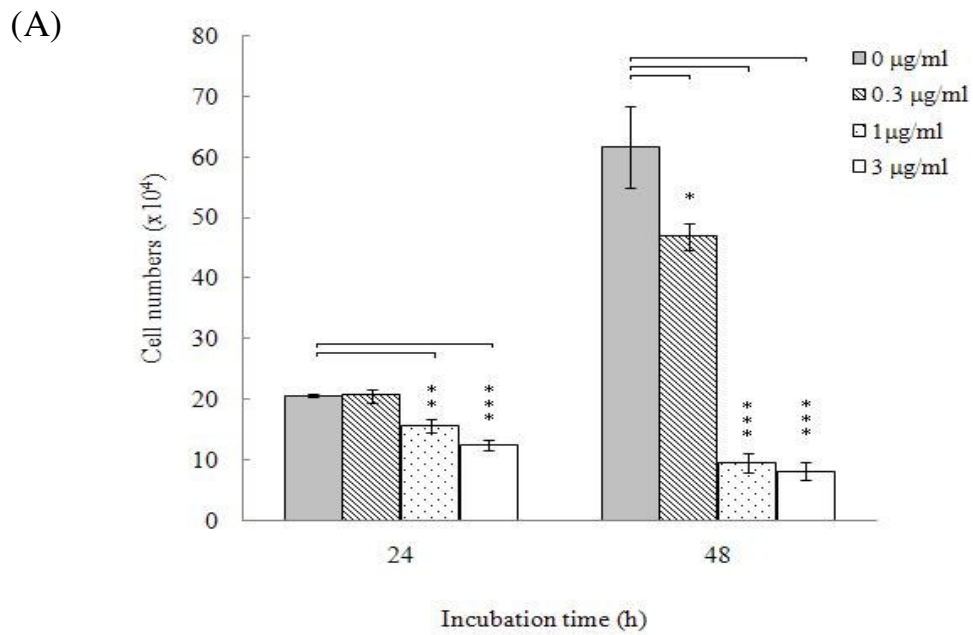
#### 四、液態培養基培養試驗

本實驗室試驗發現 *Coniothyrium* sp. CSM 於液態培養時之代謝產物具有抑制癌細胞之活性 (洪, 2007), 為確認此一生物活性物質, 本研究進行下列的試驗。

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

將 *Coniothyrium* sp. CSM 於 M broth 中進行搖瓶培養 5 天, 培養液以乙酸乙酯萃取後取得粗萃取物, 100 mL 之培養液約可得粗萃取物 4 mg。4 mg 粗萃取物覆溶於 1 mL 的 DMSO 做為樣品, 樣品經稀釋後對肺癌細胞 A549 和肝癌細胞 Huh7 進行細胞毒性測試結果, 結果如圖九。萃取物 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  對於 A549 具有明顯的抑制效果, 加藥後 24 小時細胞存活率下降至 60.0 %, 到 48 小時後效果更為顯著, 細胞存活率約為 13.2 %。稀釋樣品的效果明顯降低, 萃取物 3 倍稀釋加藥後 24 小時存活率是 75.5 %, 48 小時後細胞存活率降至 15.3 %, 亦有顯著效果。當稀釋至 10 倍後在 24 小時細胞存活率約 99.4 % 幾乎和對照組相同, 而到 48 小時之後細胞存活率為 75.8 %。顯示在低濃度樣品無法有效的抑制細胞生長, 而高濃度樣品可以在 48 小時後有效抑制。

對於 Huh7, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品加藥後 24 小時, 可觀察到 Huh7 細胞存活率為 59.2 %, 經 3 倍稀釋和 10 倍稀釋細胞存活率則分別為 69.2 % 及 98.3 %。而在 48 小時後, 在濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下細胞存活率約為 9.8 %, 3 倍及 10 倍稀釋細胞存活率亦下降至 17.1 % 和 74.8 %。Huh7 對萃取物的敏感性相對高於 A549。粗萃取物對 A549 於 24 小時之  $\text{IC}_{50}$  抑制率約為 3.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 至 48 小時  $\text{IC}_{50}$  約為 1.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。對 Huh7 方面在 24 小時之  $\text{IC}_{50}$  抑制率為 1.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  而 48 小時  $\text{IC}_{50}$  則為 0.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



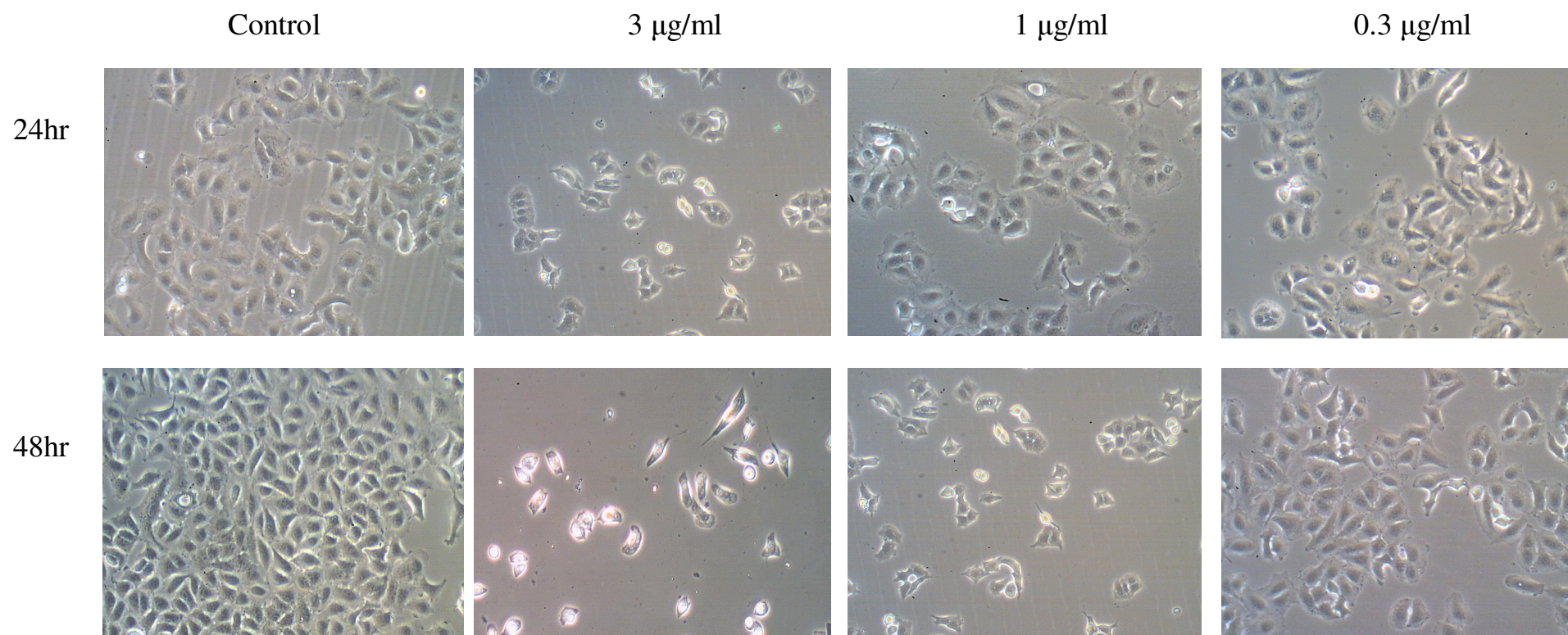
\* : Significant ( $P < 0.05$ ) 。 \*\* : Significant ( $P < 0.01$ ) 。

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

圖九、*Coniothyrium* sp. CSM 之粗萃取物於不同濃度對細胞毒性測試。(A)肺癌細胞 A549 (B)肝癌細胞 Huh7

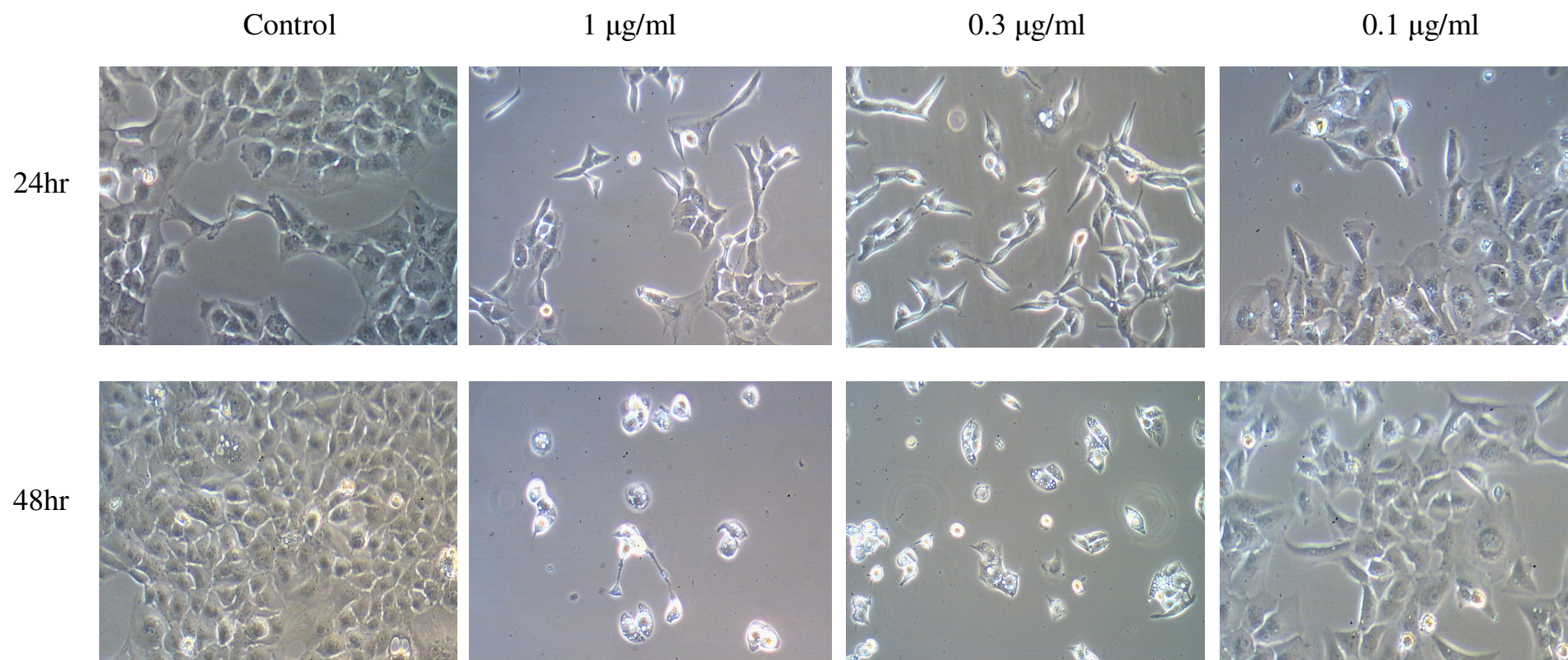
Fig. 9、The cytotoxic assay of crude extracts with different concentration of *Coniothyrium* sp. CSM. (A) A549 (B) Huh7

添加萃取物對 A549 及 Huh7 細胞型態發生改變，如圖十。對於 A549 試驗中，3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之試驗細胞外型變成較細長狀且數量減少，而到 48 小時後細胞呈現圓球狀並無法聚集附著於培養皿上，而 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亦有相同情形。而 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品則細胞型態並無改變呈現平滑緊貼於培養皿上，故可推測具毒殺性效用之細胞數減少和型態改變並非由細胞自身生理週期老化或貼附因子消失所導致。對 Huh7 則是在 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品添加後，在 24 小時細胞型態改變呈細長狀，到 48 小時則呈現圓球狀且數目明顯減少。而 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品則無明顯的使細胞型態改變，但對細胞數目則有抑制效果。



圖十 (A)、*Coniothyrium* 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。

Fig. 10 (A)、The A549 cell morphologies of crude extracts of *Coniothyrium* sp. CSM for 24 and 48 hours.



圖十 (B)、*Coniothyrium* sp. CSM 之粗萃取物加入 Huh7 肝癌細胞 24 及 48 小時之細胞型態圖。

Fig. 10 (B)、The Huh7 cell morphologies of crude extracts of *Coniothyrium* sp. CSM for 24 and 48 hours.

## (二)生物活性物質之 HPLC 分離

將粗萃取物 4 mg 復溶於甲醇之中進行 HPLC 分析，試著將活性物質分離出來。經 HPLC 分析後分為三個區域，如圖十一。由分析圖形中，將三個區域 Fraction 1(7-9 min)、Fraction 2 (9-14 min)、Fraction 3 (15-16 min)個別收集其沖提液，將其凍乾成粉後覆溶於 DMSO 中進一步進行細胞毒性測試，試驗其抑制細胞之活性物質於那個區域中。

試驗結果經由 100 mL 之發酵液中萃取可得約 4 mg 的粗萃取物並覆溶於 1.2 mL 甲醇中而得粗萃取液，經過 HPLC 分析後收集之不同片段得知其所占之比例，F-1 約為 0.5 mg，而 F-2 約為 1.4 mg，F-3 約為 0.5 mg。由回收結果發現損失部分產物可能為 HPLC 於此吸收光下沒有分析出之產物，後續試驗則進一步將分離之三個樣品對細胞進行毒性測試。

將三個區域 (F-1、F-2、F-3) 沖提液製備之乾燥樣品覆溶於 DMSO 進行細胞測試，其結果如圖十二。對於 A549 及 Huh7，3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 F-1 添加後 24 及 48 小時，其細胞存活率皆高於 90 %；推測 F-1 可能不具抑制癌細胞之活性。在 F-2 試驗中添加 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 A549，24 小時後細胞存活率降至 63.8 %，而 48 小時更降至 20.87 %；添加 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  於 24 小時後細胞存活率降至 67.4 %，而 48 小時後細胞存活率為 87.6 %，推測 F-2 樣品在低濃度下加藥 48 後無法有效抑制細胞生長，而添加 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  後對細胞已不具毒殺性。並得知 F-2 對於 A549 在 24 及 48 小時之  $\text{IC}_{50}$  分別約為 4.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 2.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

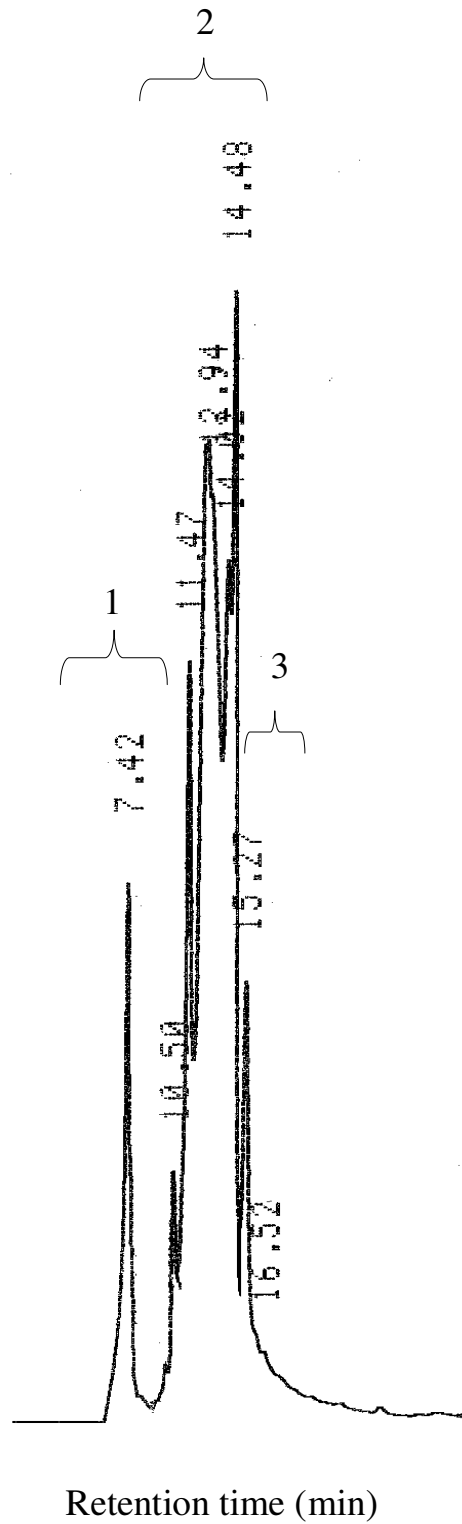
0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之 F-3 處理 A549，24 小時後細胞存活率降至 48.9 %，而 48 小時更下降至 21.9 %；以 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率降至 74.6 %，而 48 小時更降至 22.5 %，以 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率為 91.2 %，而 48 小時更下降至 40.7 %，低濃度



之 F-3 樣品於長時間下依然對於細胞具有毒殺性。並得知 F-3 對於 A549 在 24 及 48 小時之  $IC_{50}$  分別約為 0.29  $\mu\text{g/mL}$  及 0.02  $\mu\text{g/mL}$ 。

F-2 和 F-3 對於 Huh7 的試驗結果和 A549 相似，具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。F-2 以 3  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率降至 43.5 %，而 48 小時更降至 16.9 %，以 1  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率為 63.2 %，而 48 小時更降至 29.1 %，和抑制 A549 相比，F-2 對抑制 Huh7 更為有效。而稀釋為 0.3  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率為 85.2 %，而 48 小時為 86.3 %，對細胞已不具抑制效果。其對於 Huh7 在 24 及 48 小時之  $IC_{50}$  分別約為 2.42  $\mu\text{g/mL}$  及 1.16  $\mu\text{g/mL}$ 。

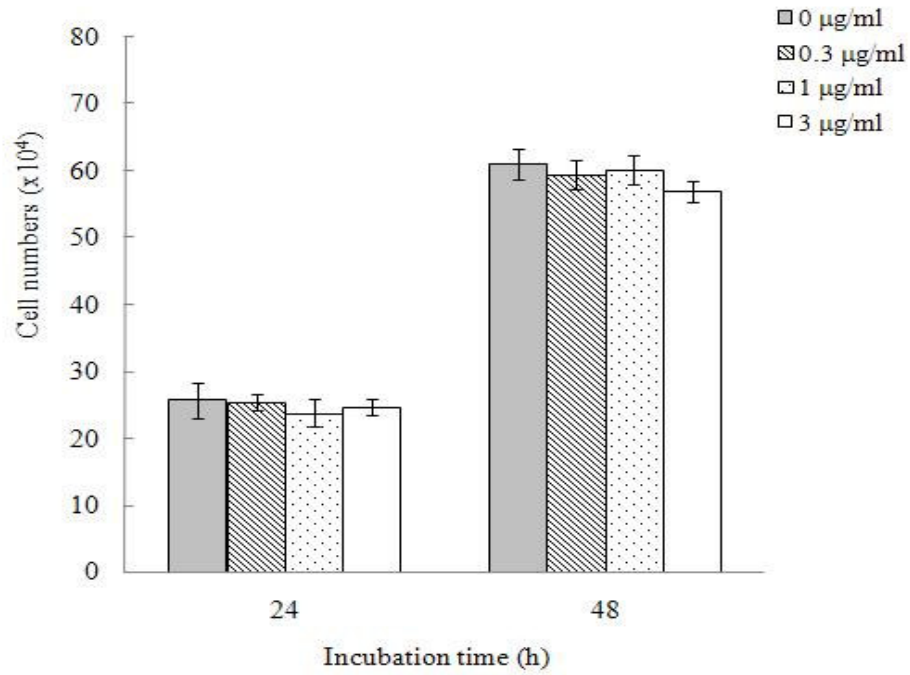
F-3 在 0.03  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率降為 62.7 %，而 48 小時更降至 20.0 %，以 0.01  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率降至 64.6 %，而 48 小時更降至 24.8 %，皆具極顯著差異 ( $P < 0.01$ )。以 0.003  $\mu\text{g/mL}$  添加下於 24 小時後細胞存活率為 94.2 %，而 48 小時為 60.3 %。對於 Huh7 在 24 及 48 小時之  $IC_{50}$  分別約為 0.04  $\mu\text{g/mL}$  及 0.002  $\mu\text{g/mL}$ 。就兩者癌細胞相較下，*Coniothyrium* sp. CSM 之代謝物質對抑制肝癌細胞效果較佳。



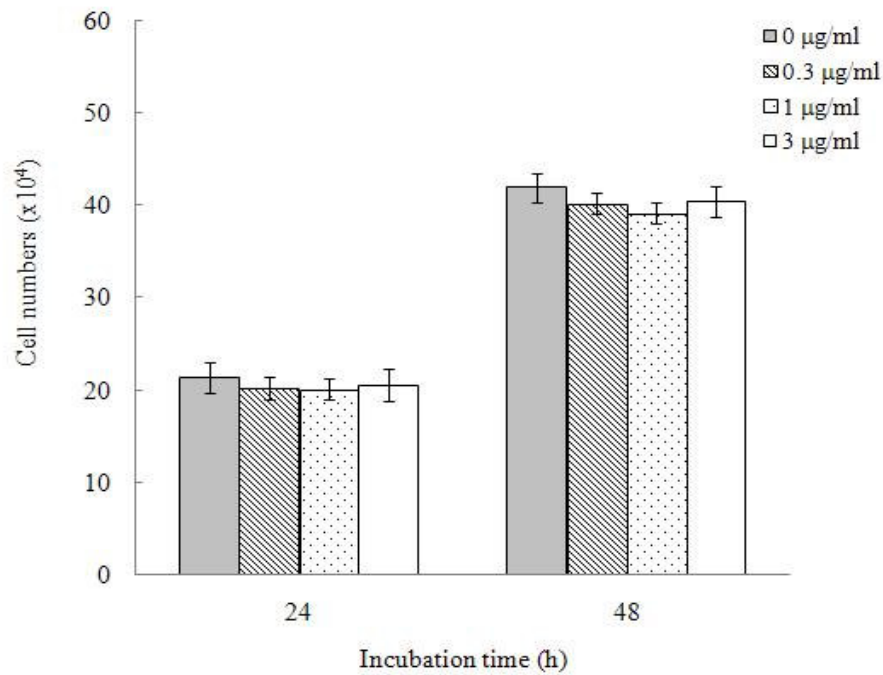
圖十一、*Coniothyrium* sp. CSM 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。

Fig. 11、The HPLC analysis of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts that incubated in liquid culture for five days.

(1)

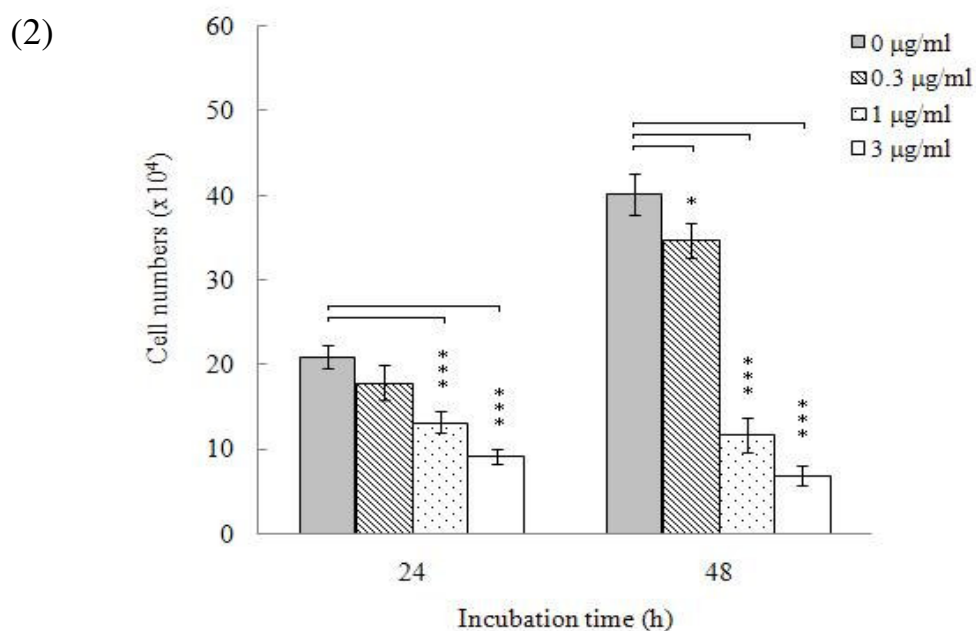
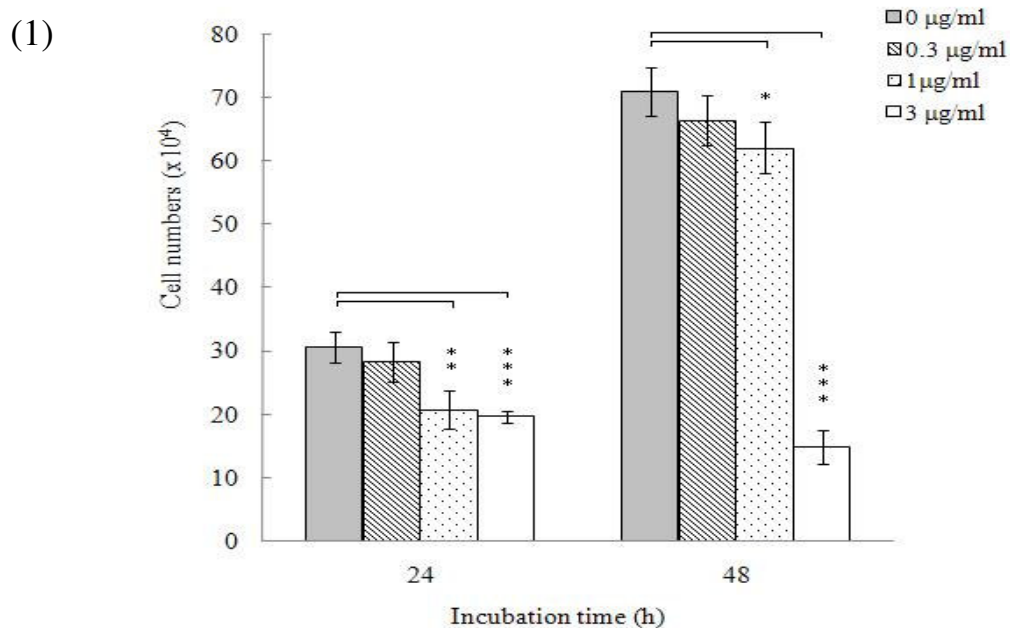


(2)



圖十二 (A)、*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)A549 (2) Huh 7。

Fig. 12 (A)、The cytotoxic assay for HPLC product of Fraction 1 of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts. (1)A549 (2) Huh7

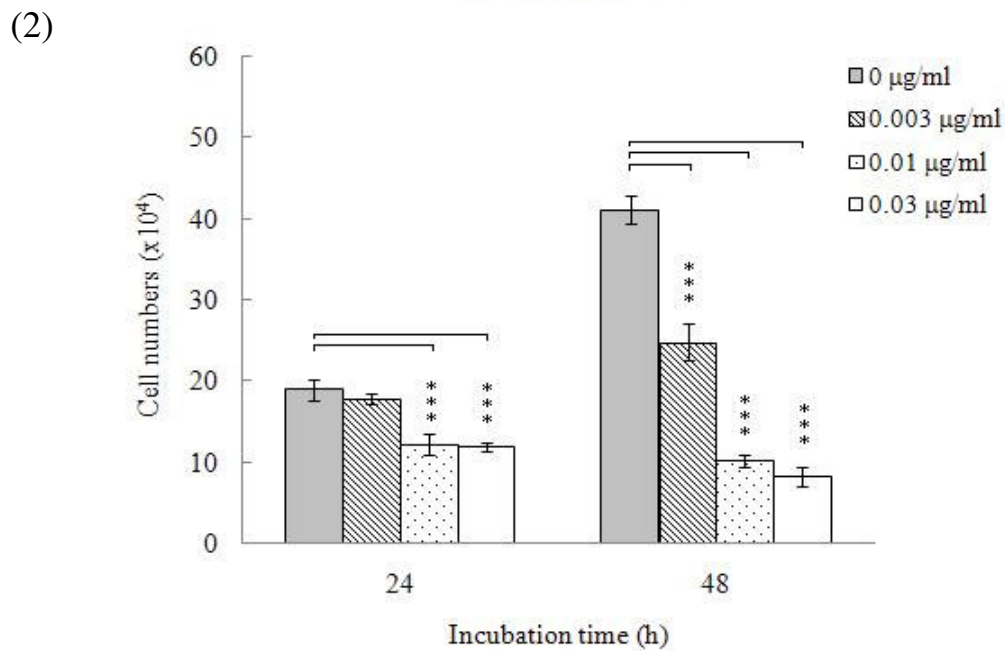
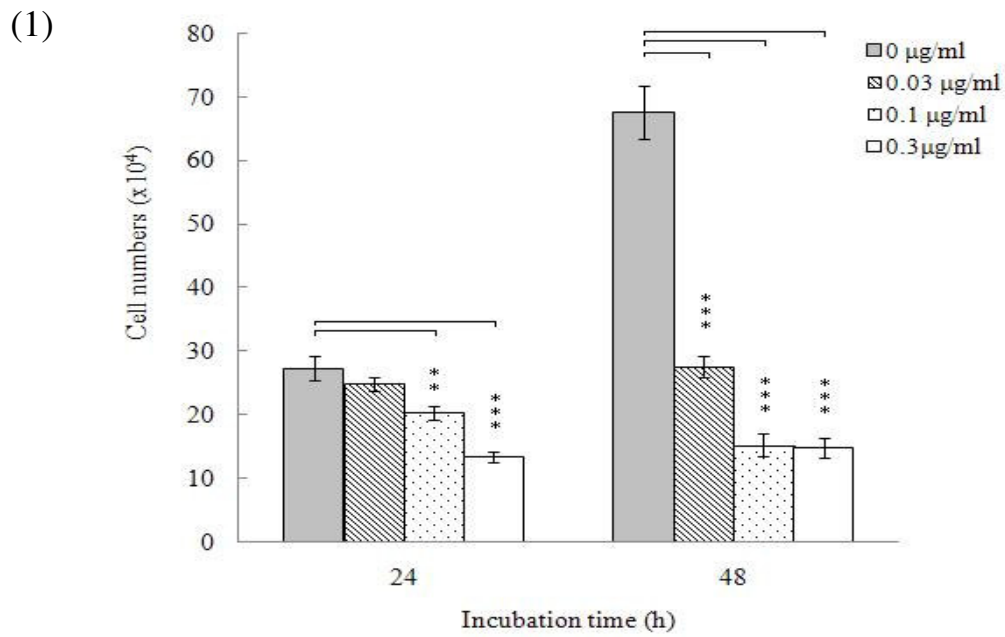


\* : Significant ( $P < 0.05$ ) 。 \*\* : Significant ( $P < 0.01$ ) 。

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

圖十二 (B)、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 2 之細胞毒性測試 (1)A549 (2) Huh 7 。

Fig. 12 (B)、The cytotoxic assay for HPLC product of Fraction 2 of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts. (1)A549 (2) Huh7



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

圖十二 (C)、*Coniothyrium* sp. CSM 乙酸乙酯萃取物經 HPLC 分離產物 Fraction 3 之細胞毒性測試 (1)A549 (2) Huh 7 。

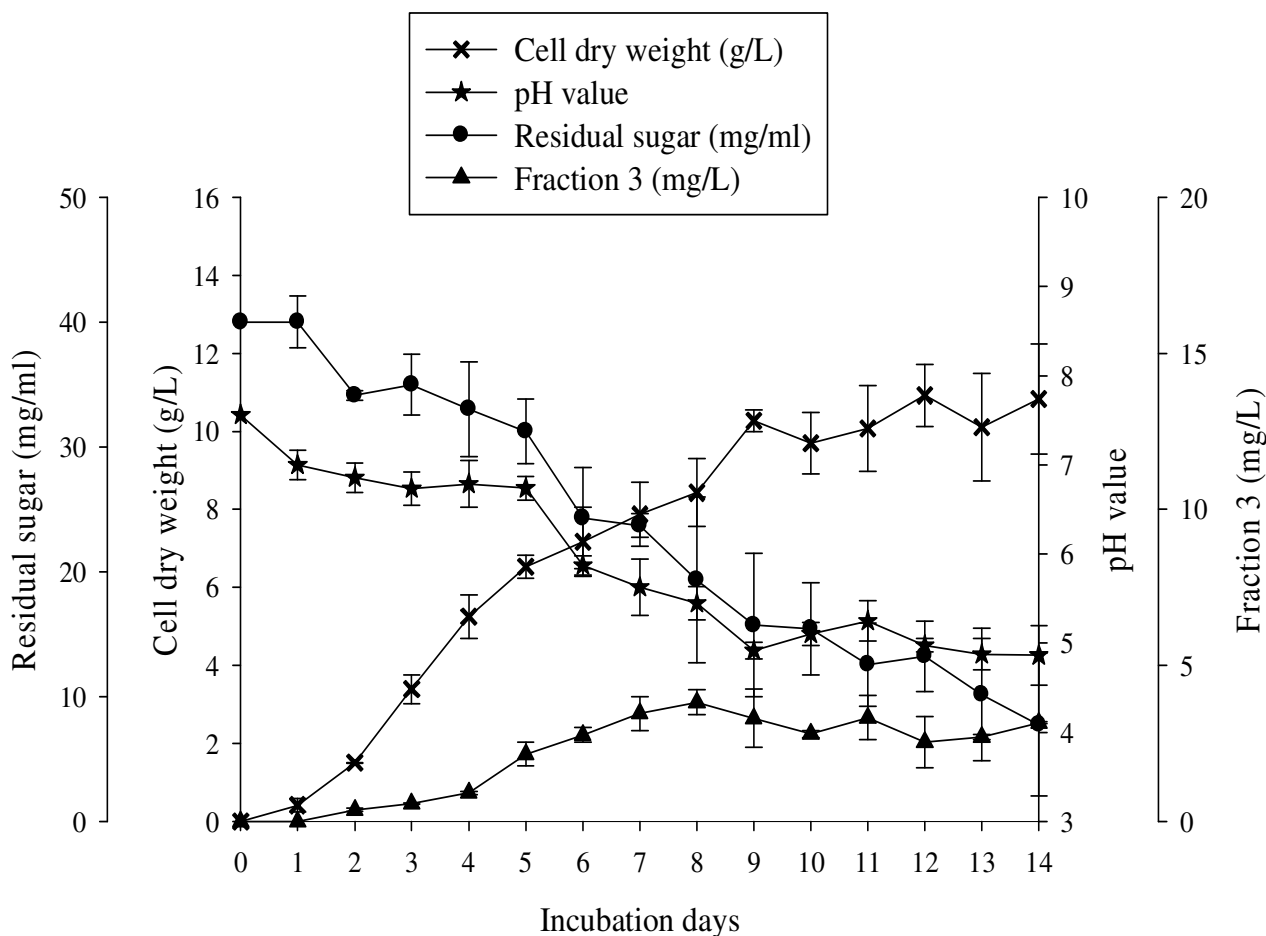
Fig. 12 (C)、The cytotoxic assay for HPLC product of Fraction 3 of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts. (1)A549 (2) Huh7

### (三) *Coniothyrium* sp. CSM 液態培養之環境因子影響

液態培養的發酵液含有抑制癌細胞生長的代謝物 (洪, 2007)。為尋求這種抗癌物質最佳發酵條件，進行下列試驗。

#### (1) 發酵時間

以搖瓶培養 *Coniothyrium* sp. CSM，培養時間全程為 14 天，在生長過程中細胞乾重、pH 變化、抗癌物濃度及殘糖量等變化，結果如圖十三。菌體培養 2-8 天為對數生長期，菌絲快速增加，於 9 天時達平穩期，菌絲乾重呈平穩波動。培養液 pH 值隨著培養時間增加而下降，可能是菌體分解醣類產生酸性物質。測定發酵液，殘糖量和 pH 下降趨勢相近，殘糖含量到 14 天時幾乎耗盡，但兩者的變化和抗癌物的濃度似無明顯相關性。抗癌物質在 5 天後濃度變化即趨於平緩，之後培養期間僅有些許波動，因此在之後試驗探討液態培養條件時將培養時間固定為 5 天。



圖十三、搖瓶培養期間 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、殘糖量、pH 值及產物濃度比例之變化。

Fig. 13、Changes of cell dry weight、residual sugar、pH value and concentration of products by *Coniothyrium* sp. CSM during incubation in shake flask culture.

## (2) 溫度對液態培養之影響

在不同溫度下液態培養 *Coniothyrium* sp. CSM，結果如表二十五。不同培養溫度菌絲乾重並無顯著差異，而抗癌物為 25 °C 下培養時有較佳的結果。可能是在此溫度下 *Coniothyrium* sp. CSM 生長及消耗養份較為快速而造成在代謝物質較佳，其菌絲體乾重為 6.5 g/L，產物濃度達 0.118。隨著溫度的提升其代謝之效果顯著下降 ( $P < 0.05$ )，在 35 °C 時降低至 0.003。其結果和固態培養略為差異，在固態培養時於 30 °C 具有較佳的生長及產物活性，而液態培養則為 25 °C。可能受到菌體在水活性不同而生長因子改變，其次在液態培養時具有震盪作用 (150 rpm) 使菌絲體間產生剪切力而對生長代謝影響。



表二十五、溫度對搖瓶培養之 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重及產物  
濃度之影響。

Table 25、Effect of temperature on cell dry weight and product  
concentration by *Coniothyrium* sp. CSM.

Temperature	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	Fraction 3 (mg/L) <sup>1</sup>
20°C	5.19±0.22 <sup>A</sup>	6.60±0.06 <sup>A</sup>	2.42±0.29 <sup>B</sup>
25°C	6.54±1.07 <sup>A</sup>	5.95±0.17 <sup>B</sup>	3.25±0.11 <sup>A</sup>
30°C	5.59±0.71 <sup>A</sup>	6.41±0.16 <sup>AB</sup>	0.93±0.24 <sup>C</sup>
35°C	4.55±0.45 <sup>A</sup>	6.40±0.07 <sup>AB</sup>	0.26±0.11 <sup>C</sup>

註：培養時間為 5 天。

註：1：Means of triplicates ± standard deviation.

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

### (3) 起始 pH 值對液態培養之影響

培養基之起始 pH 值影響微生物代謝、酵素調控及緩衝能力。基礎培養基以 HCl 和 NaOH 調整起始 pH 值為 4-10 做為試驗組，以未調整之 pH 值做為對照組 (pH = 7.56)，結果如表二十六。顯示在低 pH 值時菌體生長差。pH = 4 時菌絲無法聚集而以散布於培養基中，當 pH = 10 時菌體生長呈現集結球狀。pH 值 5-9 間的變化菌絲乾重無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。產物濃度隨著 pH 值上升而增加，但在 HPLC 圖形中發現 pH = 10 時三個區域之產物濃度皆下降，因此使第三個區域之濃度在相較下提升，故在相對濃度下高 pH 值之產物濃度增加，但其絕對濃度和對照組相較卻無增加趨勢。

此外由分析圖型中發現 pH = 10 之產物分離效果較好，周遭雜質波峰也受到影響而消失。因此推測高 pH 值使菌體部份代謝所需酵素或調控因子受到抑制而減少產物生成，而第三區域之產物雖也減少但不如第二區域大幅減少，故相對於比例則有提升作用。

表二十六、起始 pH 值對搖瓶培養之 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重及產物濃度之影響。

Table 26、Effect of initial pH value on cell dry weight and product concentration by *Coniothyrium* sp. CSM.

Initial pH	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	Fraction 3 (mg/L) <sup>1</sup>
4	4.12±0.60 <sup>C</sup>	4.13±0.17 <sup>E</sup>	0.01±0.00 <sup>D</sup>
5	6.39±0.46 <sup>AB</sup>	4.72±0.27 <sup>D</sup>	0.06±0.00 <sup>D</sup>
6	5.86±0.54 <sup>AB</sup>	4.70±0.14 <sup>D</sup>	0.23±0.03 <sup>D</sup>
7	6.32±0.31 <sup>AB</sup>	5.00±0.19 <sup>CD</sup>	2.85±0.17 <sup>B</sup>
8	6.39±0.28 <sup>AB</sup>	6.36±0.06 <sup>B</sup>	1.35±0.07 <sup>C</sup>
9	7.80±1.79 <sup>A</sup>	6.12±0.09 <sup>B</sup>	1.24±0.13 <sup>C</sup>
10	7.46±1.47 <sup>A</sup>	8.09±0.13 <sup>A</sup>	1.29±0.15 <sup>C</sup>
Control	6.02±0.00 <sup>AB</sup>	5.37±0.23 <sup>C</sup>	3.71±0.33 <sup>A</sup>

註：培養時間為 5 天。

註：Control 為未調整之基礎培養基，起始 pH 值為 7.56

註：1：Means of triplicates ± standard deviation.

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

#### (4) 碳源對液態培養之影響

以兩種單醣和三種雙醣 (添加量為 4%) 做為取代之碳源，基礎培養基含有 4% 葡萄糖。試驗結果如表二十七。顯示以葡萄糖、果糖及蔗糖所代謝產物濃度比例較佳，而以乳糖效果較差。結果和固態培養時相似，以果糖和蔗糖為產生具活性物質之較佳碳源。而在菌絲乾重除了乳糖較低和其他試驗具顯著差異 ( $P < 0.05$ )，其結果與菌絲生長皆相似。由培養液最終 pH 值觀察，以乳糖為碳源之最終 pH 值偏鹼，菌體乾重和其他試驗組具顯著差異，可能無法利用乳糖，菌絲體養分不足而發生自體分解導致 pH 值上升。

#### (5) 氮源對液態培養之影響

液態培養 *Coniothyrium* sp. CSM 所用之 M broth，已含有 Casein 和 Soybean meal，因此僅添加 1% 氮源於基礎培養基。試驗中用四種不同氮源添加，結果如表二十八。

文獻中 Cho 等人 (2002) 指出，液態培養真菌時以酵母萃取物和蛋白朮等有機氮源較無機氮源可提供較好之菌絲體生長。在以四種不同之有機氮源添加後試驗，其菌絲體生長以酵母萃取物為氮源時最佳，具顯著差異 ( $P < 0.05$ )，和文獻中比較相似，不過生長雖然快速但目標產物 (Fraction 3) 之濃度卻下降。麥芽萃取物和對照組之產物濃度為較佳，具顯著差異。蛋白朮能增加菌體乾重但目標產物之濃度銳減。

表二十七、碳源對搖瓶培養之 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重及產物  
濃度之影響。

Table 27、Effect of carbon sources on cell dry weight and product  
concentration by *Coniothyrium* sp. CSM.

Carbon sources (4.0 %)	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	Fraction 3 (mg/L) <sup>1</sup>
Fructose	5.80±0.74 <sup>A</sup>	5.70±0.02 <sup>D</sup>	2.70±0.84 <sup>BC</sup>
Galactose	5.45±0.42 <sup>A</sup>	6.26±0.11 <sup>C</sup>	1.73±0.01 <sup>CD</sup>
Maltose	5.26±0.30 <sup>A</sup>	7.14±0.32 <sup>B</sup>	2.59±0.78 <sup>BC</sup>
Sucrose	5.40±0.56 <sup>A</sup>	5.34±0.01 <sup>D</sup>	4.44±0.16 <sup>A</sup>
Lactose	3.69±0.08 <sup>B</sup>	8.22±0.20 <sup>A</sup>	0.40±0.03 <sup>D</sup>
Control	5.56±0.37 <sup>A</sup>	5.29±0.01 <sup>D</sup>	4.02±0.02 <sup>AB</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 ( $P < 0.05$ ).

表二十八、氮源對搖瓶培養之 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重及產物  
濃度之影響。

Table 28、Effect of nitrogen sources on cell dry weight and product  
concentration by *Coniothyrium* sp. CSM.

Nitrogen sources (1.5 %)	Cell dry weight (g/L) <sup>1</sup>	Final pH <sup>1</sup>	Fraction 3 (mg/L) <sup>1</sup>
Yeast extract	6.79±0.20 <sup>A</sup>	5.95±0.08 <sup>B</sup>	1.51±0.36 <sup>B</sup>
Malt extract	5.70±0.43 <sup>B</sup>	6.50±0.06 <sup>A</sup>	4.11±0.27 <sup>A</sup>
Tryptone	4.60±0.13 <sup>C</sup>	6.09±0.01 <sup>B</sup>	0.18±0.00 <sup>C</sup>
Peptone	5.83±0.77 <sup>B</sup>	5.93±0.04 <sup>B</sup>	0.02±0.00 <sup>C</sup>
Control	5.72±0.27 <sup>B</sup>	5.29±0.01 <sup>C</sup>	4.05±0.05 <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-C：Means followed by the same letters in the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### (四)攪拌式發酵槽培養試驗

搖瓶試驗時，利用三角錐形瓶震盪增加溶氧量並提供攪拌之效果，但無法控制通氣多寡。攪拌式發酵槽則有效率的提供並控制發酵過程之溶氧量，此外能均勻混合菌體、空氣和發酵液。

經由搖瓶試驗中探討不同發酵條件對於 *Coniothyrium* sp. CSM 的菌絲體形成及目標產物 F-3 濃度的變化，得知在溫度 25 °C 和起始 pH 值 7-8 之間為較佳發酵條件。而培養基的碳源及氮源修飾上並沒有得到顯著提升產量及菌絲體的培養基組成份，因此接續之發酵槽試驗並未改變培養基組成份，以基礎培養基進行測試，探討發酵槽之發酵結果。

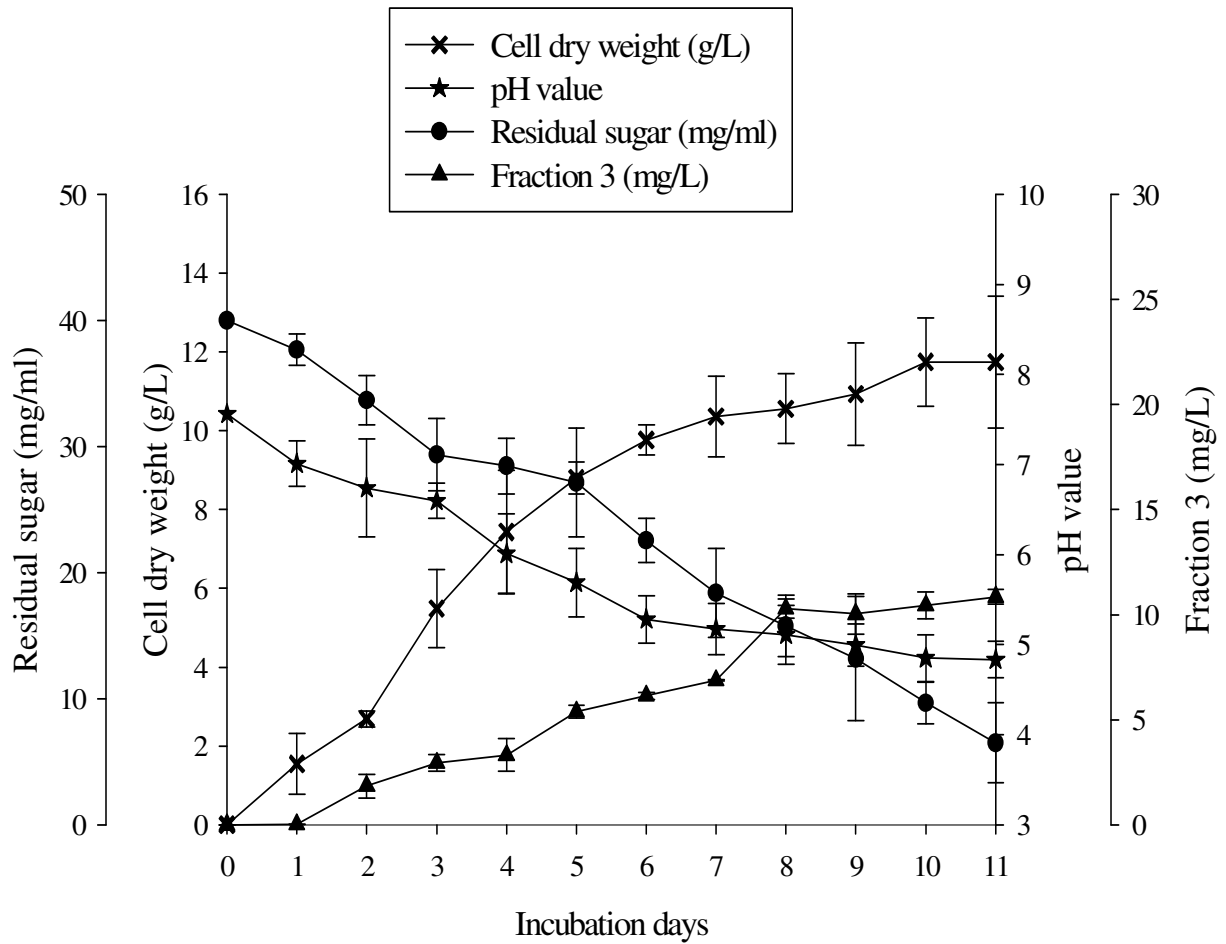
圖十四顯示在培養過程中發酵液之殘糖隨著菌體生長而下降，當發酵至 11 天時幾乎消耗殆盡。而 *Coniothyrium* sp. CSM 於 2 天後便進入對數生長期，菌絲乾重快速增加，而到 6 天後便趨於平緩，細胞乾重約為 12 g/L。相較於搖瓶試驗在發酵槽中菌體生長較為快速，可能受到通氣的增加且攪拌葉片提供剪切力加速菌絲體的打散，而使 *Coniothyrium* sp. CSM 加速生長。培養液之 pH 值隨著發酵時間而下降，結果和搖瓶試驗相似，可能為分解培養液中醣類而產生酸性物質，發酵末期 pH 值約為 4。在代謝產物中 2 天後即有目標產物的出現，而達 3 天時產物濃度已達高點，之後便趨於平緩維持一定濃度，試驗結果和搖瓶試驗相似，產物濃度當發酵達一定程度後變不再增加，且不隨菌絲體生長而使濃度比例增加，推測結果可能受到整體產物濃度皆提升。而目標產物之比例並無線性上升，在菌體生長過程呈穩定代謝狀態。

此外由 HPLC 分析下 (圖十五) 於發酵槽培養之產物濃度相對於以搖瓶試驗明顯提升。且在第三區域之目標產物濃度亦顯著提升，亦

能降低其他代謝物質之雜訊。可能此菌株為好氧菌，在受到通氣後菌體生長快速，而對於代謝活性增加使得有益於產物的提升。在比較 *Coniothyrium* sp. CSM 於搖瓶及發酵槽培養後之發酵參數 (表二十九)，搖瓶試驗中目標產物的產量在 5 天後趨於平穩且最高產量約為 1.37 mg/L，發酵槽培養之最高產量則為 10.4 mg/L，並於 8 天後趨於平穩 (圖十四)，而比產物產率 ( $Y_{p/x}$ ) 亦以發酵槽高於搖瓶試驗。菌絲體生成以發酵槽試驗具較高結果，於 11 天菌絲乾重達 11.74 g/L，搖瓶試驗則於 14 天達菌絲乾重 10.83 g/L，比生長速率 ( $\mu$ ) 呈現兩者相近的結果，然菌絲體生長速率 ( $Q_p$ ) 發酵槽高於搖瓶試驗，顯示在相同的培養基及環境下發酵槽培養具較佳的產率及菌體生長。

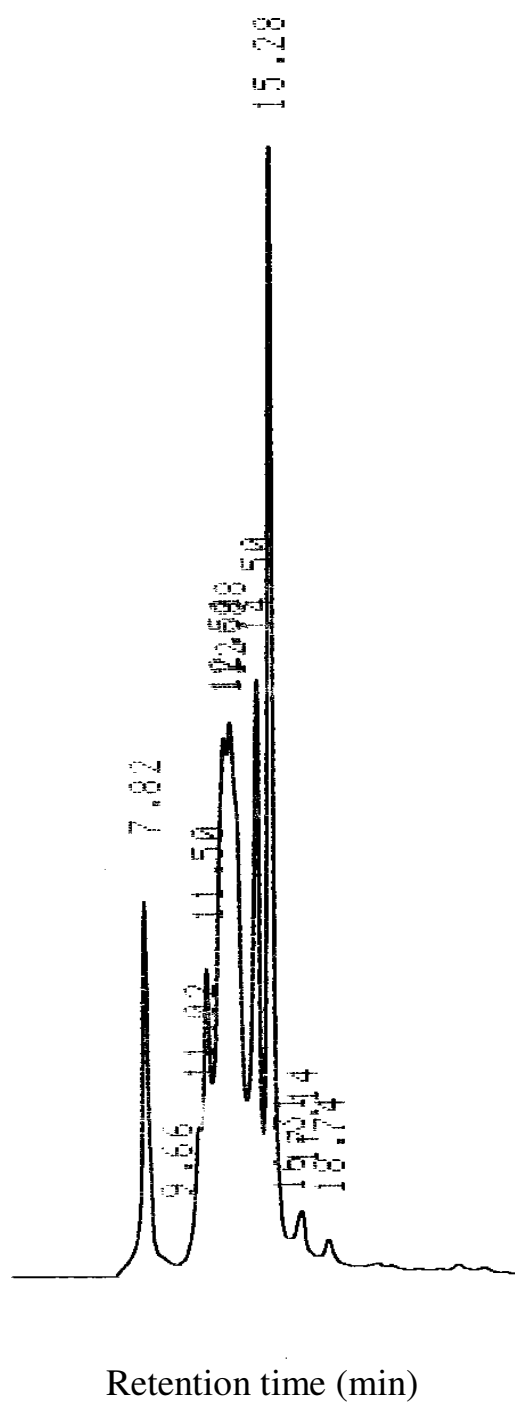
再將由發酵槽培養後所得之培養液，經萃取分離後對細胞進行毒性測試，觀察於 24 和 48 小時後是否產生細胞凋亡現象。以 DAPI 染色來觀察細胞型態的變化，結果如圖十六。顯示在 24 小時後肺癌細胞 (A549) 和肝癌細胞 (Huh7) 之細胞核內 DNA 出現皺縮及片段化的現象，而 48 小時後因細胞死亡而明顯的減少，因此在染色上觀察到的細胞也明顯減少，故經發酵槽內所產生之產物依然對細胞具毒殺性並可提升產量和縮短發酵時間。





圖十四、攪拌式發酵槽之培養期間 *Coniothyrium* sp. CSM 菌絲乾重、殘糖量、pH 值及產物濃度比例之變化。

Fig. 14、Changes of cell dry weight、residual sugar、pH value and concentration of products by *Coniothyrium* sp. CSM during incubation in agitated fermentor.



圖十五、*Coniothyrium* sp. CSM 於攪拌式發酵槽培養五天培養液之乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。

Fig. 15、The HPLC analysis of *Coniothyrium* sp. CSM ethyl acetate extracts that incubated in agitated fermentor for five days.

表二十九、*Coniothyrium* sp. CSM 於搖瓶及發酵槽培養時之發酵參數。

Table 29、Fermentation parameters of shake flask culture and fermentor by *Coniothyrium* sp. CSM.

Culture	$P_{\max}$	$X_{\max}$	$\mu$	$Q_p$	$Q_x$	$Y_{p/x}$	T
	mg/L	g/L	day <sup>-1</sup>	g/L/day		mg/g	day
Shake flask culture	5.88	10.83	0.84	0.42	0.77	0.54	14
Agitated fermentor	10.40	11.74	0.89	0.95	1.07	0.89	11

$P_{\max}$  : maximal yield of product

$X_{\max}$  : maximal yield of biomass

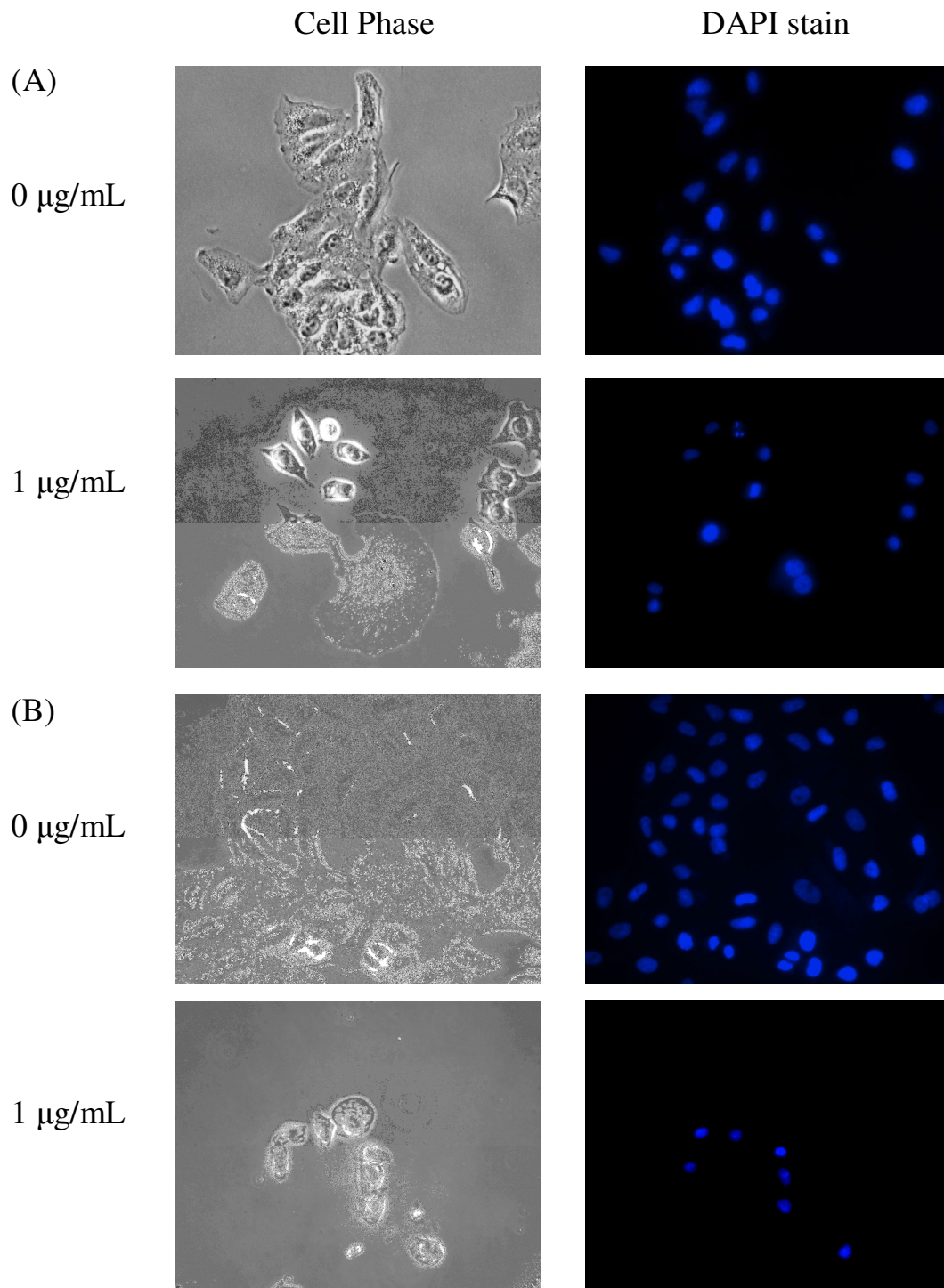
$\mu$  : specific growth rate

$Q_p$  : product formation rate

$Q_x$  : biomass formation rate

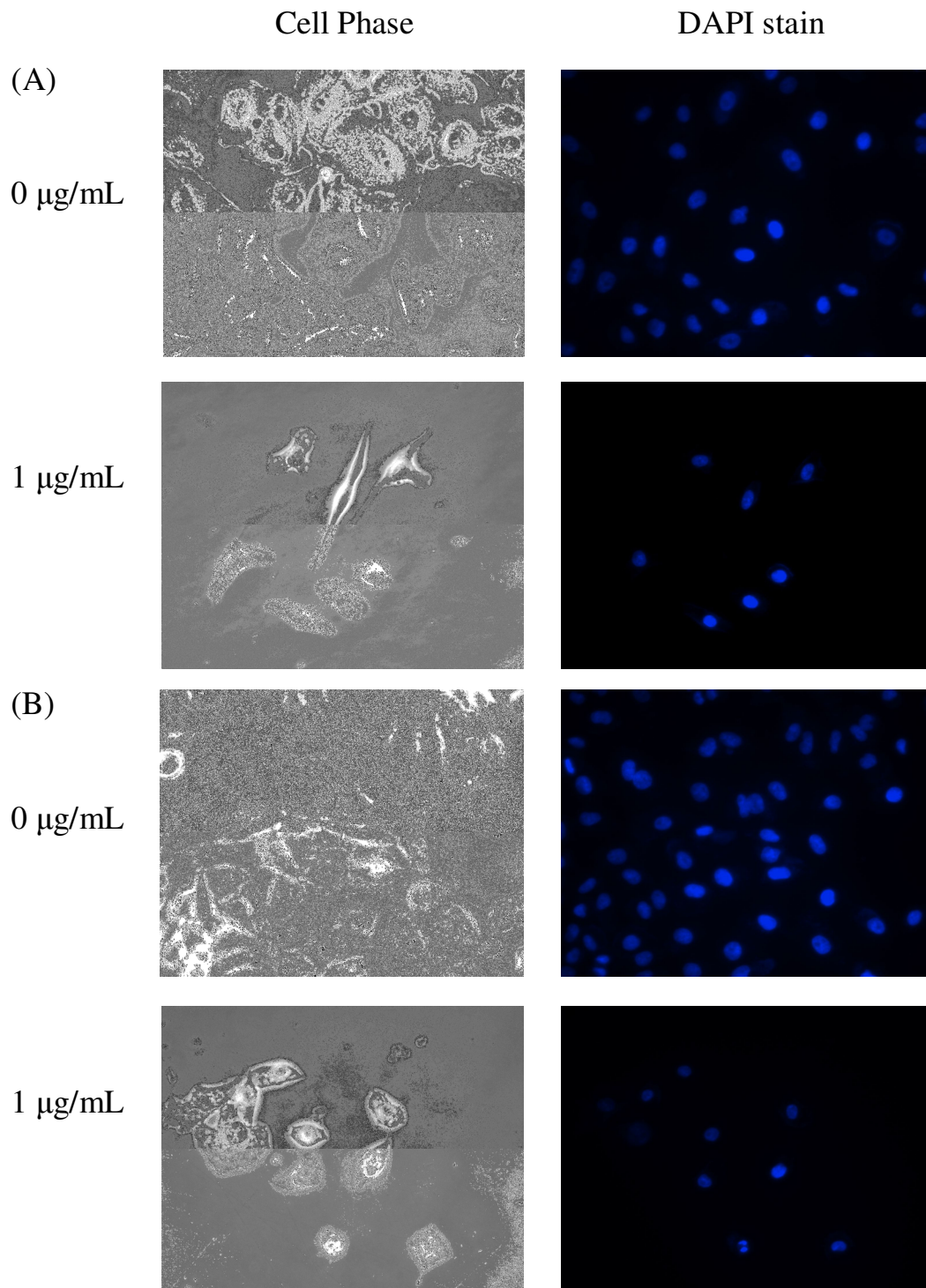
$Y_{p/x}$  : specific product yield

T : days to reach maximal biomass production



圖十六 (A)、目標產物 Fraction-3 加入對肺癌細胞中反應之 DAPI 染色圖 (A) 24 小時 (B) 48 小時。(400X)

Fig. 16 (A)、DAPI stain of A549 that added with Fraction-3. (A) 24hours (B) 48 hours (400X)



圖十六 (B)、目標產物 Fraction-3 加入對肝癌細胞中反應之 DAPI 染色圖 (A) 24 小時 (B) 48 小時。(400X)

Fig. 16 (B)、DAPI stain of Huh7 that added with Fraction-3. (A) 24hours (B) 48 hours (400X)

## 伍、結論

*Coniothyrium* sp. CSM 在固態培養下能產生白色菌絲且形成孢子，而二次代謝物具抑制病原菌之活性，藉由改變生長環境及修飾基礎培養基 PDA 來達到生長及增加抑菌物質之最佳化。在溫度為 30 °C 及培養基起始 pH 值為 4-5 時，為最適生長環境。

依據 *Coniothyrium* sp. CSM 於修飾培養基，對金黃葡萄球菌與仙人掌桿菌抑制能力的差異，推測 *Coniothyrium* sp. CSM 會產生不同的抑菌物。

在液態發酵下 *Coniothyrium* sp. CSM 所產的二次代謝物和固態發酵不同，其具有抑制癌細胞之活性。由 HPLC 分離粗萃取物可分得三個區分樣品 (F-1, F-2, F-3)，以 F-3 抑制癌細胞效果最佳，其次為 F-2，F-1 則不具抑制活性。

搖瓶試驗培養 *Coniothyrium* sp. CSM 約可得 5.88 mg/L 之 F-3 物質。以攪拌式發酵槽培養 *Coniothyrium* sp. CSM 可有效提升 F-3 的產量，約為 10 mg/L。未來將對培養基最適化組成份進一步測試來提高產率。此外，並將鑑定之 F-3 結構式，以更有效率之萃取及純化方法得到更高之產率。並進一步對於癌細胞之抑制途徑及原因進行探討，或應用於細胞之免疫系統及抗發炎效果，做為可使用在臨床上藥物之發展可能性。

## 陸、參考文獻

田雪亮，劉鳴韜，徐瑞富。2006。同心盾殼黴產孢條件研究。西北農業學報 15：107-109。

李昌憲，洪哲穎，熊光濱。1992。利用回應曲面法進行以 *Streptococcus faecalis* 生產酪胺酸脫羧酶之培養基最適化研究。中華農業化學會誌 30：264-272。

洪哲穎，陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素上之應用。化工。 39：3-18。

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。

胡琦桂。1994。真菌球狀菌絲體生長之探討。科學與技術 26：37-45。

高國倫。2006。重組大腸桿菌 p274 發酵生產降血壓胜肽能力之探討。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

馬麗娜，高俊明，李欣。2006。盾殼黴產幾丁質酶培養條件的研究。山西農業大學學報 26：329-332。

陳欣，李寅，堵國成，陳堅 2004。以麩皮為唯一底物生產 *Coniothyrium minitans* 孢子的研究。應用與環境生物學報。10：635-638。

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。

張祿。2006。盾殼霉耐鹼缺陷型突變種的篩選及相關基因克隆的初步研究。內蒙古農業大學碩士學位論文。

詹佳育。2002。利用紫外光誘發 *Leuconostoc mesenteroides* 突變以提高酒精發酵能力。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

羅國晏。2008。深層培養條件及發酵槽種類對桑黃菌 *Phellinus igniarius* 胞外多醣體產量及生理活性之影響。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

蕭明熙。1985。真菌代謝物之最近研究趨勢。國科會生物科學研究中心專刊。 12 : 163-183。

Brimner T. A., Boland G. J., 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agric.Ecosyst. Environ.* 100 : 3-16.

Campbell W.A., 1947. A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. *Mycologia.* 39 : 190–195.

Cheng J., Jiang D., Yia X., Fu Y., Li G., Whipps J.M., 2003. Production, survival and efficacy of *Coniothyrium minitans* conidia produced in shaken liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 227 : 127-131.

Cho Y. J., Park J. P., Hwang H. J., Kim S. W., Choi J. W., Yun J. W., 2002. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Appl. Microbiol. Lett.* 35 : 195-202.

Dahiya J. S., Singh D., Nigam P., 1998. Characterisation of laccase produced by *Coniothyrium minitans*. *J. Basic Microbiol.* 38 : 349-359.



Davis R. A., Longden J., Avery V. M., Healy P. C., 2008. The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 : 2836-2839.

Gong X., Fu Y., Jiang D., Li G., Yi X., Peng Y., 2007. L-Arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genet. Biol.* 44 : 1368-1379.

Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F., Gusmao N. B., 1999. Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone. *J. Nat. Prod.* 62 : 1222-1224.

Holler U., König G.M., Wright A.D., 1998. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *J. Nat. Prod.* 62 : 114-118.

Jagroop S. D., Dalel S., Poonam N., 1998. Characterisation of laccase produced by *Coniothyrium minitans*. *J. Basic Microbiol.* 38 : 349-359.

Kaouadjim M., 1993. Mycosporulone, a metabolite from *Coniothyrium Sporulosum*. *J. Nat. Prod.* 56 : 2189-2292.

Krohn K., Michel A., Flörke U., Aust H. J., Draeger S., Schulz B., 1994. Biologically active metabolites from fungi, 4. Palmarumycins CP<sub>1</sub>-CP<sub>4</sub> from *Coniothyrium palmarum*: isolation, structure elucidation, and biological activity. *Liebigs Annalen der Chemie* pp. 1093-1097.

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.

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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296 : 364-371.

Li G. Q., Wang D. B., Zhang S. H., Dan H. H., 1995. Studies on the mycoparasite *Coniothyrium minitans* I: characterization of biological properties and natural distribution in Hubei Province. *J. Huazhong Agric. Univ.* 14 : 125-129.

Litchfield J.H., 1967. Submerged culture of mushroom mycelium. *Microbial Technology.*, H. J. Peppler, Ed., Reinhold New York. pp. 107-144.

Lu Z. X., Laroche A., Hung H. C., 2004. Segregation patterns for integration and expression of *Coniothyrium minitans* xylanase gene in *Arabidopsis thaliana* transformants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45 : 23-31.

Machida K., Trifonov L.S., Ayer W. A., Lu Z. X., Laroche A., Huang H.C., Cheng K. J., Zantige J.L., 2001. 3(2H)-Benzofuranones and chromanes from liquid cultures of the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Phytochemistry.* 58 : 173-177.

McQuilken M. P., Budge S.P., Whipps J.M., 1997. Effects of culture media and environmental factors on conidial germination, pycnidial production and hyphal extension of *Coniothyrium minitans*. *Mycol. Res.* 101 : 11-17.

McQuilken M. P., Gemmell J., Hill R. A., Whipps J. M., 2003. Production of macrospheptide A by the mycoparasite *Coniothyrium*

*minitans*. FEMS Microbiol. Lett. 219 : 27-31.

Montgomery D. C., 1996. Design and analysis of experiments (4<sup>th</sup>). John Wiley and Sons. New York, U.S.A. pp. 10-20.

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

Ooijkaas L. P., Buitelaar R. M., Tramper J., Rinzema A., 2000. Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothyrium minitans* on agar media. Biotechnol. Bioeng. 69 : 292-300.

Ooijkaas L. P., Wilkinson E. C., Tramper J., Buitelaar R. M., 1999. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs. Biotechnol. Bioeng. 64 : 92-100.

Park J. P., Kim W., Hwang H.J., Yun J.W., 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. Appl. Microbiol. Letters. 33 : 6-81.

Perry D. H., 1989. Experimental design in biotechnology. Marcel Dekker INC. New York. pp. 23-90.

Plackett R. L., Burman J. P., 1945. The design of optimum multi-factorial experiments. Biometrika 33 : 305-325.

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.

Ren L., Li G. Q., Han Y. C., Jiang D. H., Huang H. C., 2007. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of  $\beta$ -1,3-glucanase of this mycoparasite. *Biolog. Contr.* 43 : 1-11.

Schulz B., Boyle C., Draeger S., Rommert A. K., Krohn K. 2001. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106 : 996-1004.

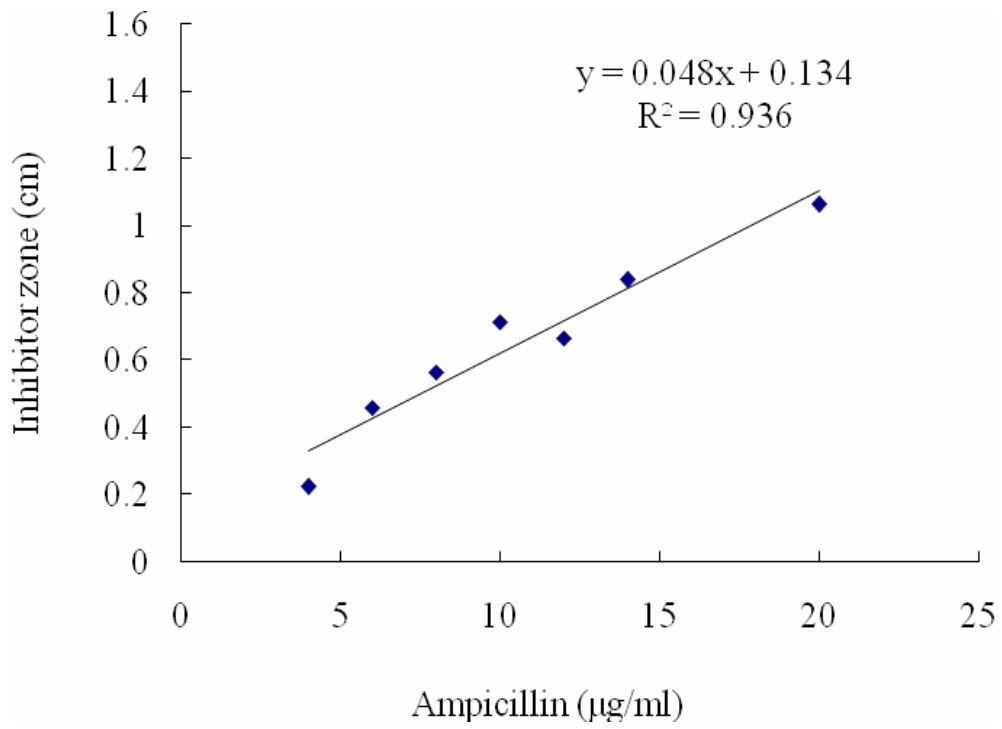
Shi J., Li Y., Zheng Y., Zhu Y., Zhang X., Du G., Chen J., 2007. Tryptophan supplementation and pH adjustment for optimizing the sporulation of *Coniothyrium minitans*. *Biotechnol. Lett.* 30 : 259-262.

Vrije T. de, Antoine N., Buitelaar R. M., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E. E., Luth P., Oostra J., Ravensberg W. J., Renaud R., Rinzema A., Weber F. J., Whipps J. M., 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 :58-68.

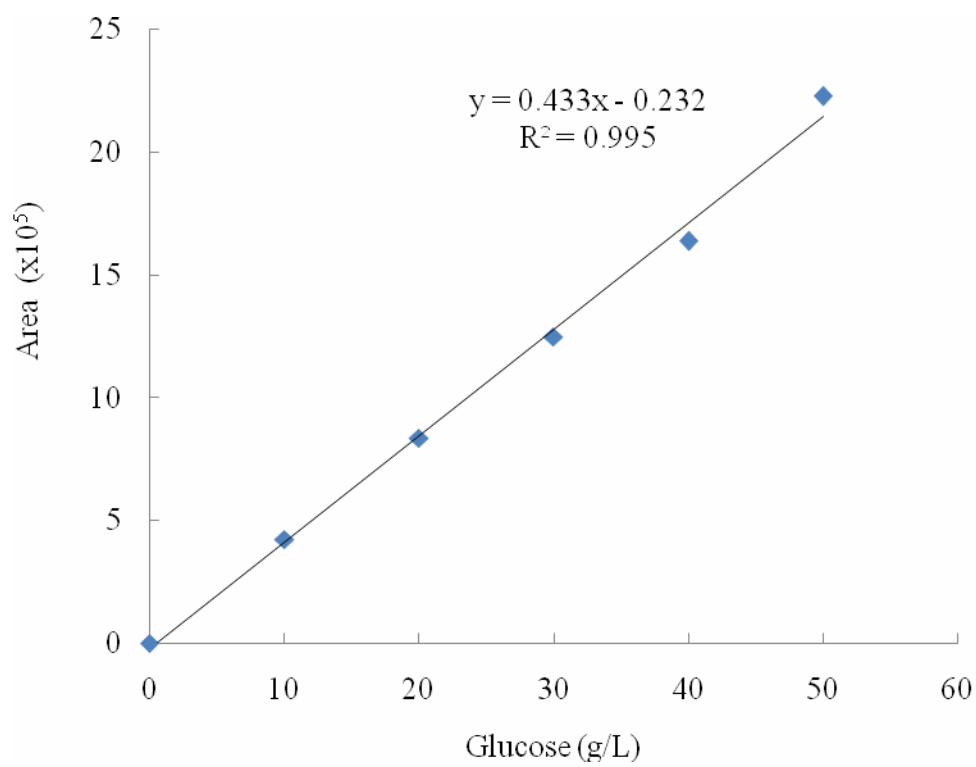
Yang R., Han Y., Li G., Jiang D., Huang H. C., 2008. Effects of ambient pH and nutritional factors on antifungal activity of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Biolog. Contr.* 44 : 116-127.

## 柒、附錄

附錄一、不同濃度的 Ampicillin 對金黃葡萄球菌之抑菌環大小。



附錄二、葡萄糖之 HPLC 殘糖檢量線。



附錄三、Fraction-3 濃度之標準曲線。

