

壹、前言

植物內生真菌是一種生長在植物莖葉當中，沒有明顯生活週期或是病徵的真菌，在自然界中具有重要的生態作用。大部份內生真菌與寄主會產生互利共生的現象，為了保護寄主及本體自身的安全，往往會產生一些具有生物活性，例如抗菌、抗蟲害等的二次代謝物質。1993年美國科學家 Strierle 從太平洋短葉紅豆杉分離出可產生紅豆杉醇 Taxol 的真菌菌株 *Taxomyces andrenae*，激發了研究內生真菌生物活性物質的熱潮。

食品製造業使用許多化學合成的食品保存劑，這些化學物質往往會造成食品安全上的疑慮，例如亞硝酸鹽會形成致癌物質。因此基於安全性的考量，從自然的材料當中開發天然之生物保存劑已成為必然的趨勢。

本實驗的主要目的是從本土植物中所分離出的內生真菌之代謝物質當中，經由分析純化出具有抑制病原細菌、真菌的生長，或是可以抑制癌細胞生長等生物活性的物質，期望能開發新的食品保存劑或新的藥物。



貳、文獻回顧

在許多已知的自然產物中，微生物扮演著一個具有豐富活性代謝物質的來源，從微生物中萃取得到的代謝物質具有廣泛的應用性，例如：抗生素、免疫抑制劑及抗癌劑等...。在過去四年中已經發現有超過 230 多種的二次代謝物質從 70 多種與植物相關聯的微生物中分離出來，包括結構式、活性以及與寄主植物間的關係也一一被研究透徹，而其中又以內生真菌為一種新興起的活性物質來源 (Gunatilaka *et al.*, 2006)。

一、內生真菌簡介

(一) 內生真菌定義及研究歷史

內生真菌是一種廣泛存在於草類和木本植物之植物體內部的真菌，與腐生真菌不同的是它們能夠造成植物系統性的感染，但暫時性不會引起寄主之外表病徵或造成明顯的傷害 (Wang *et al.*, 2002)。

在十九世紀首度在禾本科植物的葉片中發現內生真菌的存在開始，便展開一連串對於內生真菌的研究，初期多著重於將內生真菌從植物本體分離、體外培養和內生真菌的親緣鑑定與分類，對於它們與寄主之間的關係也是一研究的方向 (Lewis *et al.*, 1924)；之後將內生菌的範圍縮小為不引起植物寄主外表明顯病徵者，藉此排除掉一些腐生真菌的種類 (Carrol *et al.*, 1986)。進一步研究發現內生真菌在生長過程中所分泌的某些二次代謝物不僅僅只是應用在與寄主間的交互作用，例如禾本植物多與其內生真菌行互利共生關係，而是對食草動物本體消化、免疫等系統也會產生影響 (Clay *et al.*, 1989)；較具突破性的發展是美國蒙大拿州立大學的研究學者從短葉紅豆杉的韌皮部分離到一株內生真菌 *Taxomyces andreanae*，此菌可以產生與寄主樹皮當中所分離出的抗癌藥物 Taxol 結構相同的二次代謝物質，經由動物及臨床實驗證明對於乳癌及卵巢癌有治療效果，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)。近年來對於內生真菌二次代謝物質活性的研究與日俱增，藉由簡易的化

學法萃取，期望從中開發新的醫用藥物、抗生素以及食品添加物。

(二) 內生真菌特性

根據內生真菌與寄主的關係將其分成草本及木本植物兩個部分 (Weber *et al.*, 2004)：

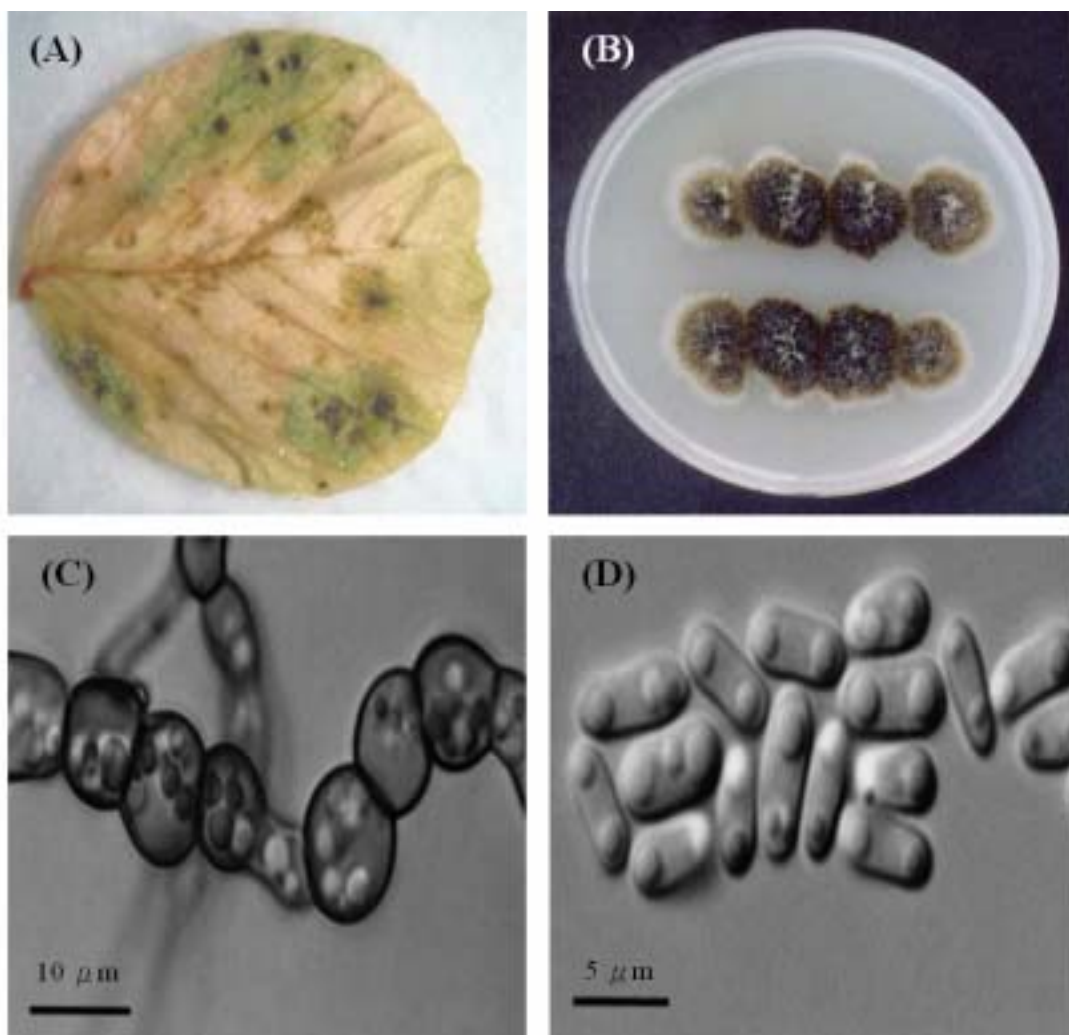
1. 草本植物內生真菌

草本植物多與其內生真菌行互利共生的途徑，有些於共生期間會產生毒性二次代謝物質以保護寄主避免草食動物的啃食。內生真菌會分泌一些真菌毒素 (mycotoxin) 來幫助寄主抵抗病蟲害 (Agee *et al.*, 1994)，另外還可增強植物忍受逆境的能力。而內生真菌需要從植物體內吸取少量養分，以供生存所需之用，比較有名的是 *Neotyphodium* sp.，透過促進植株根系發育、葉片生長及氣孔開關等作用，可以提高禾本植物寄主本身的抗旱性 (李，2006)。

2. 木本植物內生真菌

木本植物因體積較大的關係通常會同時被幾種內生真菌寄生，有些內生真菌並不會像草本真菌會產生保護寄主的二次代謝物，反而會在寄主瀕臨死亡時轉變植物病原性真菌繼續生長，例如: *Fusarium*. sp (Kuldau *et al.*, 2000)。

目前發現的內生真菌大多是子囊菌綱 (Ascomycetes)，也包括少部分的擔子菌及接合菌及其衍生菌種 (文，2004)，但最常被分離出的內生真菌是不完全菌綱 (*Fungi Imperfecti* 或 Deuteromycetes)，其生理週期有待進一步的研究 (任，2001)。內生真菌寄生於寄主的型態如附圖一所示，圖中是 *Phoma medicaginis* E01071 在 *Medicago sativa* 之乾燥葉片及 maltose extract agar (MEA) 上的狀態，(A) 圖葉片上黑點處便是受感染的地方；以及在電子顯微鏡下其菌絲及分生孢子的型態 (Weber *et al.*, 2004)。



附圖一、*Phoma medicaginis* E01071 內生真菌形態。

(a) 人工感染 *Medicago sativa* 乾燥葉片第 0 天 (b) 在 MEA 上生長一個禮拜的情形 (c) 顯微鏡下此內生真菌在 MEA 生長三週後菌絲型態 (d) 室溫下培養兩週之分生孢子型態。

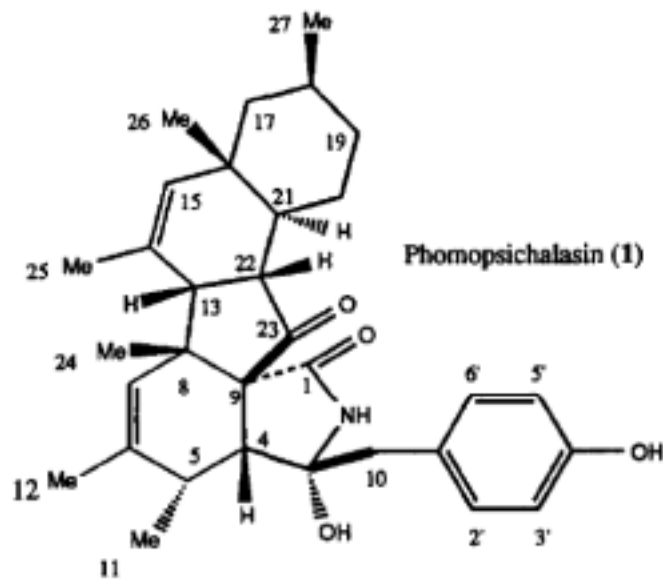
二、內生真菌特異代謝物質及其應用

內生真菌在生長過程中會產生許多二次代謝物質，大多是屬於多環化合物，其中具有許多抑制病原細菌及真菌的功效，此外還發現有些具有抑制癌症細胞生長的能力。

(一) 抗病原細菌二次代謝物

1. Phomopsichalasin

內生真菌 *Phomopsis* sp. 會產生 phomopsichalasin，當每片圓型濾紙上含有 4 μg 的 phomopsichalasin 時，對於病原細菌 *Bacillus subtilis* 抑菌環為 0.12 cm，對於 *Salmonella enterica* 有 0.11 cm，而 *Staphylococcus aureus* 則有 0.08 cm (Horn *et al.*, 1995)，附圖二為其結構式。

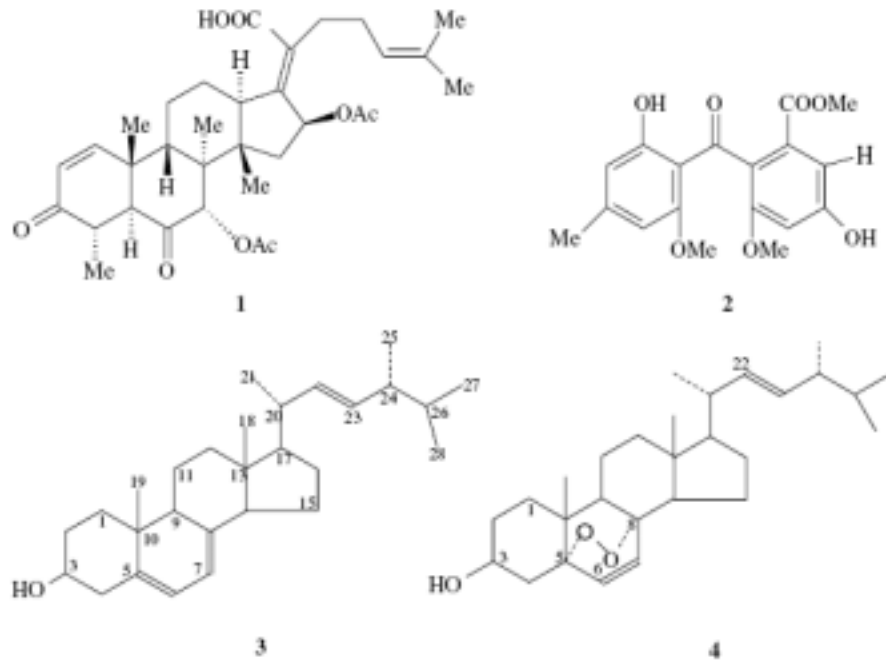


附圖二、Phomopsichalasin 結構式。

2. Helvolic acid

人類幽門桿菌已經被證實是形成慢性胃炎的原因之一，研究人員首次從藥用草本植物 *Cynodon dactylon* 中分離出 *Aspergillus* sp. (Strain #CY725)，尤其二次代謝物中萃取出四種化合物 Helvolic acid、monomethylsulochrin、ergosterol 和 3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxy- ergosta-6, 22-diene (附圖三)，其對於人類幽門螺旋桿菌 *Helicobacter pylori* 036 的最小抑制濃度分別為 8.0, 10.0, 20.0 和 30.0 μg /

ml。而其中Helvolic acid對於其他病原細菌 *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* 和 *Candida albicans*之最小抑制濃度分別為 15.0, 20.0 和 30.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Li *et al.*, 2005)。

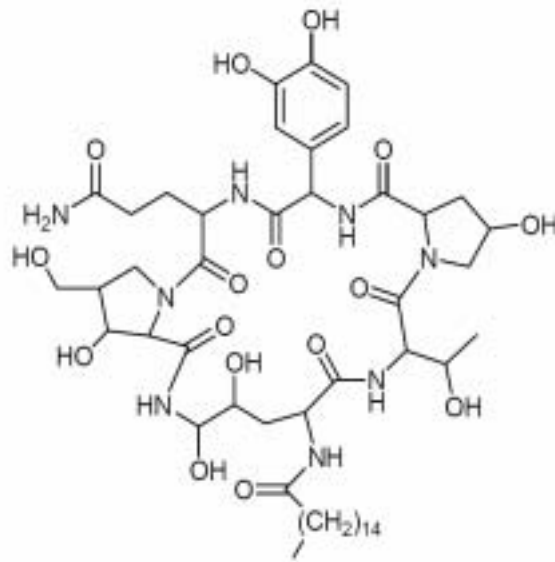


附圖三、(1) helvolic acid (2) monomethylsulochrin (3) ergosterol 和 (4) 3b-hydroxy-5a,8a-epidioxy-ergosta-6,22-diene 的結構式。

(二) 抗病原真菌二次代謝物

1. Cryptocandin

從 *Cryptosporiopsis cf. quercina* 中找到 Cryptocandin (附圖四)，是第一種屬於 cytochalasin (細胞鬆弛素或松胞素式) 的化合物 (Strobel *et al.*, 1999)，以三個環狀結構取代 cytochalasin 的 macrolide 環，cytochalasin 類的物質會抑制形成細胞骨架之肌動蛋白的聚合 (宋，2000)，主要會使細胞分裂受阻，染色體及DNA斷裂，導致細胞死亡，在細胞核內會有雙核 (Binucleus) 及微核 (Micronucleus) 的產生。可以由微核產生率來判定此化合物對病原性真菌細胞的毒性。附表一是此化合物與其他兩種抗真菌劑對五種人類病原性真菌的抑制效果實驗，證實對於人類病原真菌具有良好的抑制效果。



附圖四、Cryptocandin 結構式。

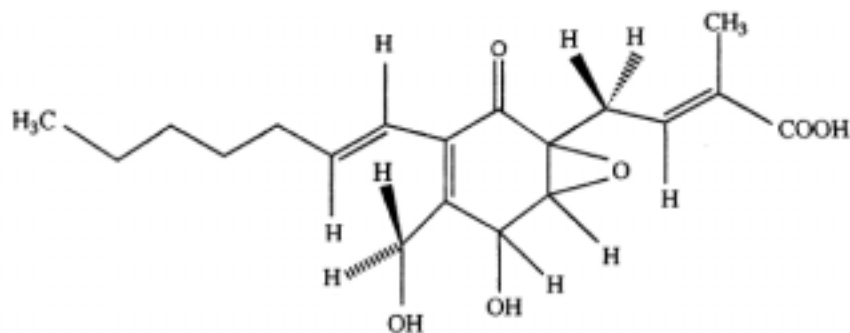
附表一、純化的 cryptocandin 與其他抗真菌劑對多種人類病原真菌之最小抑制濃度
(Strobel *et al.*, 1999)。

Test fungal Pathogen	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$) of antifungal agent:		
	Cryptocandin	Echinocandin B	Amphotericin B
<i>Candida albicans</i>	0.03	0.3	0.04
<i>Cryptococcus neoformans</i>	> 20	> 20	0.04
<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 20	> 20	0.03
<i>Candida parapsilosis</i>	2.5	-	0.01
<i>Histoplasma capsulatum</i>	0.01	-	0.01

-, Not tested

2. Ambuic acid

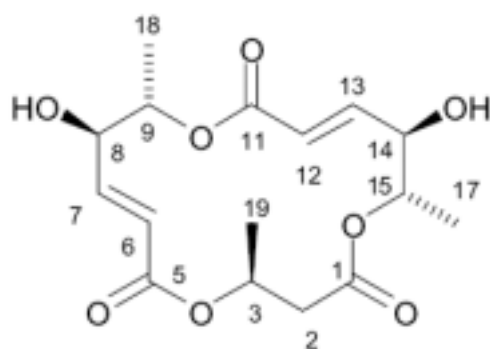
於 *Pestalotiopsis* spp. 及 *Monochaetia* sp. 等的內生真菌中發現 Ambuic acid (附圖五) 的存在，經實驗證實 25 μg 的 Ambuic acid 對於生長在 PDA 上五天的病原性真菌 *Pythium ultimum* 其抑菌環大小約 2.0 cm 左右；而對於 *Cephalosporium gramineum* 的抑菌效果也有 1.4 cm 左右，以下是其結構式 (Li *et al.*, 2001)。



附圖五、Ambuic acid 結構式。

3. Macrosphelide A

內生真菌 *Coniothyrium minitans* 中萃取出 Macrosphelide A (附圖六)，對於病原性真菌 *Sclerotium sclerotiorum* 和 *Sclerotium cepivorum* 具有抑制效果，其對於兩株真菌的 IG₅₀ (median growth inhibition concentration) 分別為 46.6 及 2.9 μg / ml，附圖六為其結構式 (McQilken *et al.*, 2003)。



附圖六、Macrosphelide A 結構式。

(三) 抑制癌細胞方面

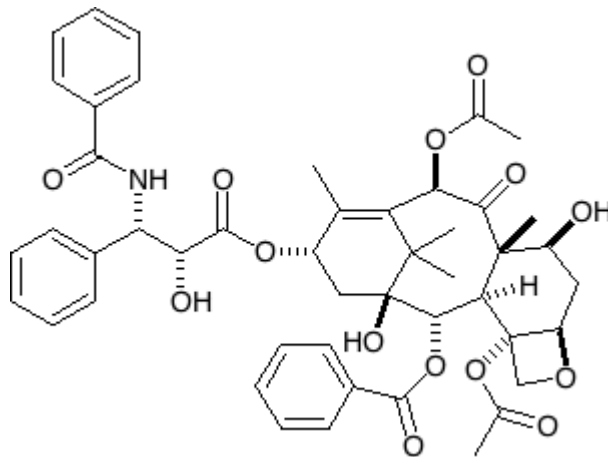
從內生真菌分離出的純物質，有些具有抑制癌細胞生長甚至會誘導其走向細胞凋亡 (apoptosis) 途徑之功用，而細胞凋亡，又稱細胞程式性死亡，是指細胞在一定的生理或病理條件下，遵循自身的程式，自己結束其生命的過程。細胞凋亡為主動的、基因控制的、高度有序的一系列生理反應，是一種對周圍細胞及組織傷害最小的一種細胞自殺性死亡。研究學者期望內生真菌所產生之活性二次代謝物質能啟動癌細胞自行產生細胞凋亡的現象，以達到癌細胞自我抑制生長的目標。附表二為細胞凋亡與細胞壞死之比較。

附表二、細胞凋亡與細胞壞死之比較

	病理特徵	
	細胞凋亡 (Apoptosis)	細胞壞死 (Necrosis)
死亡模式	單一細胞	一群相鄰的細胞
細胞大小	縮小、破碎	腫脹
細胞膜	保持完整性、起皸、磷脂 phosphatidylserine 外現	平滑、早期分解
粒線體	膜通透性增加 內容物外流至細胞質中 (Cytochrome C、Apaf-1) 結構相對保持完整	腫脹 結構紊亂
胞器外型	收縮形成「細胞凋亡小體」	腫脹、胞器瓦解
核仁	染色質：凝結成塊、破碎	核膜瓦解
DNA 降解	破碎：核苷酸自 3'端內側切割 電泳下形成階梯狀 DNA 出現在細胞質中	分散的、隨機的
細胞降解	胞吞作用、無發炎反應產生	巨噬細胞侵入、有發炎反應產生

1. Taxol

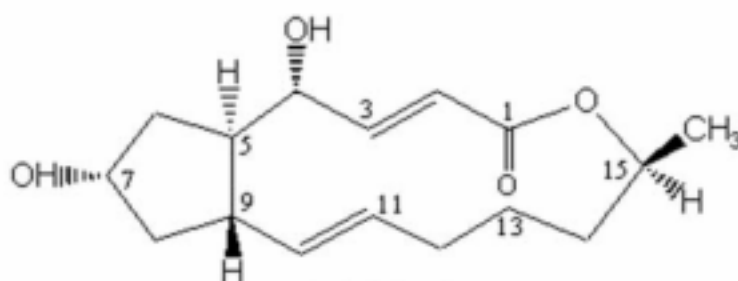
從 *Taxomyces andreanae* 的二次代謝物中分離得到與其寄主樹皮當中萃取出
的抗癌藥物相同的活性物質 Taxol (附圖七, Stierle *et al.*, 1993), 同樣也在喜馬拉
雅西藏紅豆杉內皮上分離出的內生真菌 *Pestalotiopsis microspora* 分離出此物質
(Strobel *et al.*, 1996)。美國 FDA (Food and Drug Administration, 食品藥物管理署)
於 1993 年批准此藥物用於對常規化治療無效之卵巢癌與乳癌, 作用是在癌細胞
分裂期, 會與細胞核內作為細胞骨架主要之微管蛋白 (Microtubulin) 結合, 使其
穩定而無法進行分解, 則細胞無法進行分裂停滯在中期 (Metaphase), 進而走向
細胞凋亡 (Haldar *et al.*, 1996)。



附圖七、Taxol 結構式。

2. Brefeldin A (BFA)

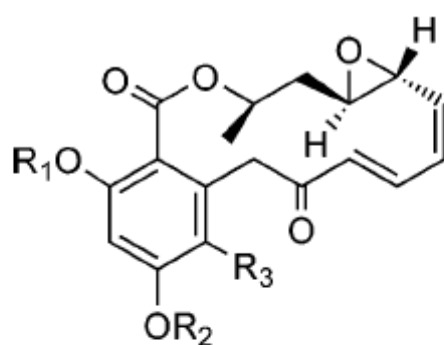
在 *Penicillium brefeldianum* 中首度發現 Brefeldin A (附圖八) 這種真菌二次代謝物質存在，具有抑制多種癌症細胞的效果 (Harri *et al.*, 1963)。2002 年之後研究證實 BFA 對於 MCF-7 乳癌細胞株的抑制率比 Taxol 強($IC_{50}=2:5$)，且在多種不同的內生真菌之代謝物質中皆可發現其存在(Wang *et al.*, 2002)。從 *Phoma medicaginis* 產生的 BFA 可以保有其真菌的生長環境，避免被其他真菌二次感染 (Weber *et al.*, 2004)。而活性作用是會抑制抑制 ARF-GEF (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)。



附圖八、Brefeldin A 結構式。

3. Radicol

Radicol 為一種 Hsp90 (Heat-shock protein, 熱休克蛋白) 的抑制劑，Hsp90 蛋白質會幫助腫瘤細胞所分泌的蛋白質摺疊，將其抑制之後便會使必須蛋白質因無法折疊而失去功能，進而導致腫瘤細胞走向細胞凋亡的途徑。從 *Ephedra fasciculata* 的莖中分離出一株內生真菌 *Chaetomium chiversii*，從 EtOAc 萃取物中發現 Radicol 極其類似物具有良好抑制人類乳癌細胞株 MCF-7 之 Hsp90 的功效 (Turbyville *et al.*, 2006)。附圖九為 Radicol 的結構式。

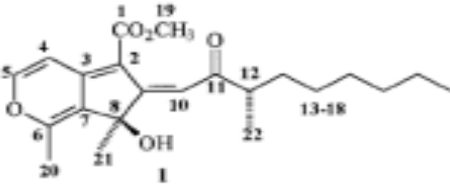
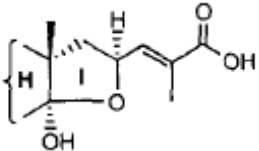
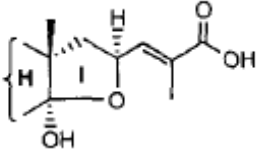


- 1 $R_1 = R_2 = H, R_3 = Cl$
- 2 $R_1 = R_2 = R_3 = H$
- 3 $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = Cl$
- 4 $R_1 = R_2 = CH_3, R_3 = Cl$
- 7 $R_1 = R_3 = H, R_2 = CH_3$
- 8 $R_1 = R_2 = CH_3, R_3 = H$

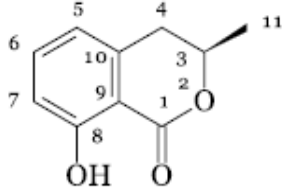
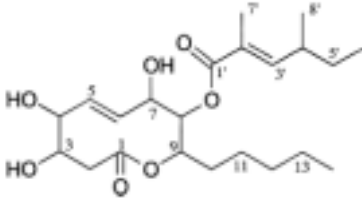
附圖九、Radicol 結構式。

(四) 其他多種活性

附表三、內生真菌所產生之天然活性物質。

Microbial strain	Nature products	Structure	Biological activity	Reference
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Sequoiaatone C		抗鹵蟲 (Brine shrimp) LD ₅₀ ^a : 300-600 μM	Stierle <i>et al.</i> , 2001 Stierle <i>et al.</i> , 2003
<i>Nodulisporium</i> sp.	Nodulisporic acid A1		抗蟲效果 LC ₅₀ ^b : 0.5 ppm against <i>A. aegypti</i> LC ₅₀ : 0.3 ppm against <i>L. seracata</i>	Hensens <i>et al.</i> , 1999
	Nodulisporic acid A2			

附表三、內生真菌所產生之天然活性物質(續上頁)。

Microbial strain	Nature products	Structure	Biological activity	Reference
<i>Penicillium Janczewskii</i>	Mellein		抗病毒，抑制 HCV (Hepatitis C virus) protease IC ₅₀ : 35 μM	Dai <i>et al.</i> , 2001
<i>Phomopsis</i> sp	Phomol		抗發炎，對鼠耳水腫有約 53.20%的抑制率	Weber <i>et al.</i> , 2004

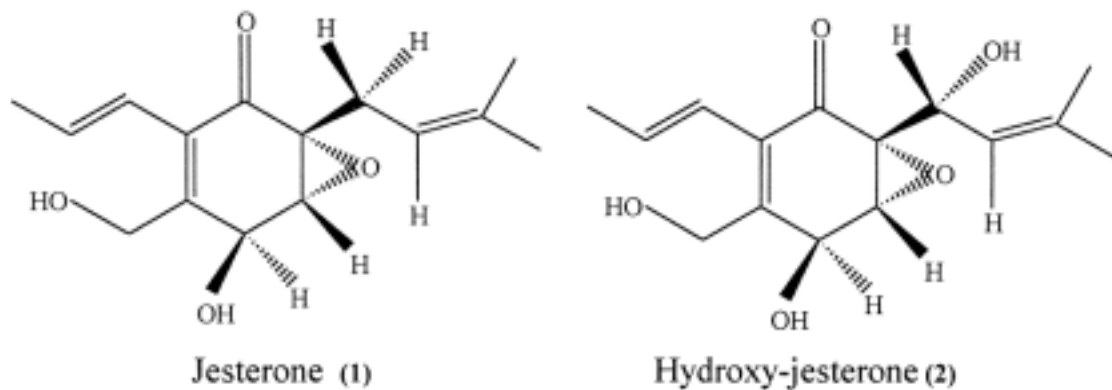
^a - Medium lethal dose. ^b - Medium lethal concentration.

三、內生真菌於食品科技上的應用

內生真菌在生長過程中會產生一些特殊的二次代謝物質，除了應用於農業或醫療方面，對於食品產業也有相當不錯的應用前景。

(一) 抗黴菌活性

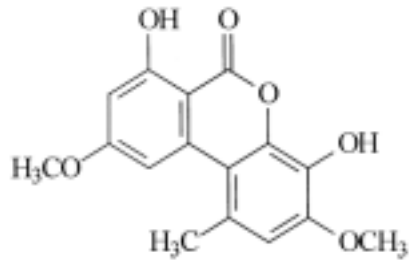
Jesterone 及 Hydroxyjesterone (附圖十) 兩者是從 *Fragraea bodenii* 植物中分離出的內生真菌 *Pestalotiopsis jesteri* 經過 23°C 培養 21 天所產生的抗黴物質。對於一些病原性真菌及黴菌具有不錯的抑制效果，其中 Jesterone 對 *Aphanomyces* sp. (絲囊黴菌可能會引起豌豆根腐病，造成農產品的損失) 及 *Phytophthora cinnamomi* (根腐菌，會引起百合或梨子等的根部迅速腐爛) 兩種黴菌的最小抑制濃度皆為 6.5 µg/ml，比 Hydroxyjesterone 高出許多 (Li, 2001)。



附圖十、 Jesterone 及 Hydroxy-jesterone 結構式。

(二) 抗氧化活性

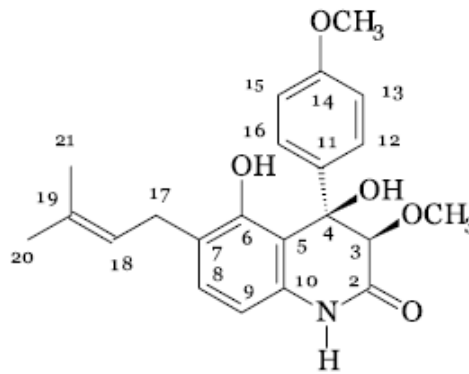
Graphislactone A 是從 *Cephalosporium* sp. IFB-E001 所得到的活性物質 (附圖十一)，具有抗氧化，清除自由基的功能。研究指出其 LDL IC₅₀ (Medium inhibition concentration of low density lipoprotein) 為 7.3 µM，小於常見抗氧化劑 Butylated Hydroxy Toluene (BHT) 之 LDL IC₅₀: 20.7µM，表示其抗氧化性較 BHT 強，期望將來可以運用於食品產業之抗氧化添加劑 (Song *et al.*, 2005)。



附圖十一、Graphislactone A 結構式。

(三) 促進植物根的發育

研究發現從內生真菌 *Penicillium janczewskii* 中分離出來的物質 Peniprequinolone (附圖十二) 有促進稻米的根部發育的現象，濃度約在 100-300 mg / l (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2005)；但也有發現約 10 mg / l 時的濃度便可以抑制 40% 茶樹花粉管的生長，而達 100 mg / l 時則可完全抑制 (Kimura *et al.*, 1996)，因此如何將其活性物質妥善運用於適當的植株中便是未來值得研究與探討的。

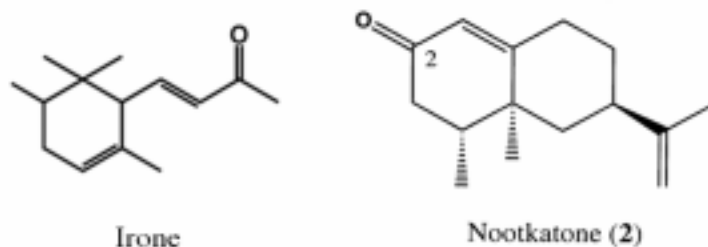


附圖十二、Peniprequinolone 結構式。

(四) 香氣物質

德國鳶尾 *Iris germanica* 的根狀莖中分離出一株會產生鳶尾酮 (Irone, 附圖十三) 這種香氣物質的內生真菌-米根黴菌 (*Rhizopus oryzae*)，鳶尾酮具有紫羅蘭香味，常用於製造香精或化妝品，同時也可運用至食品產業作為天然添加物 (張, 1999)。而從 *Botryosphaeria dothidea* 這株內生真菌當中，找到一種香氣物質 Nootkatone 香柏酮，

為一種 sesquiterpene，具有降低體脂率的功能以及應用至化妝品和食品上的香料。以往在葡萄柚中可以萃取得到但是成本較高，後來發現可以利用發酵此真菌的方式來大量生產以降低成本的消耗 (Furusawa, 2005)。



附圖十三、Irone 及 Nootkatone 結構式。

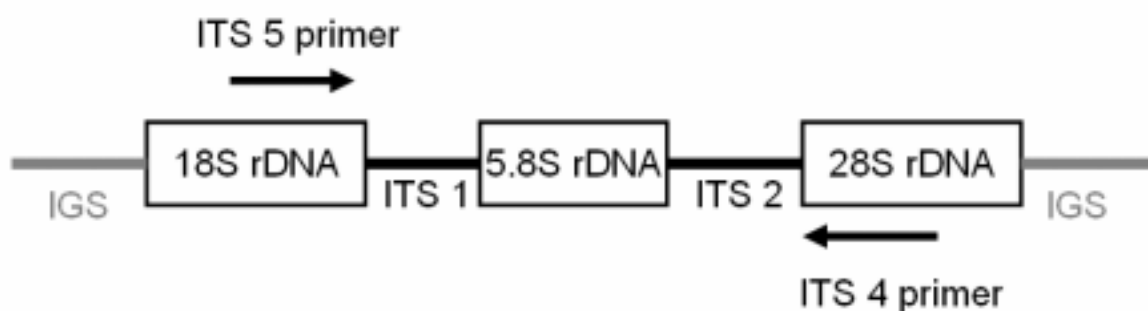
四、內生真菌近年來的發展趨勢

由於內生真菌在自然界中的角色特殊，為了保障自己生存的環境，因而產生許多具有特殊功能的二次代謝物。近年來不斷的從各種植物的根莖葉，甚至是種子當中分離出不同種類內生真菌的存在，可知其為十分龐大的族群，由於已知真菌種類只佔整體自然界中的 5% (Gunatilaka, 2006)，因此值得研究的範圍很廣。許多研究報導從多種藥用植物當中分離出會產生多種藥理活性物質的內生真菌 (邱，1994；馬，1999)，也因此證明了內生真菌具有參與植物藥物中活性成分的合成 (張，2002)。

現今大部份內生真菌分離是先經過將寄主植物組織表面進行嚴格消毒，殺死存在於表面的微生物後，取其內部組織置於適當培養基中進行生長 (張，1999)，一方面會先從其是否產生具有特殊功能之代謝物質著手研究，透過不同培養基的篩選及適當的萃取，以及特殊活性測試進而分離出純物質，以紅外線吸收光譜偵測可能含有之官能基，再利用核磁共振 NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 鑑定其結構式後，用質譜儀 MS (Mass Spectrometry) 確定其分子量大小，進而準確的定出純物質的結構式。

另一方面利用分子生物法，藉由核糖體 DNA (rDNA) 基因序列來快速鑑定真菌種類。真核生物的 rDNA 是一群縱線串連排列的基因家族，含有許多重複單位，每個單位是由一段可轉錄基因及非轉錄基因間隔區 (Intergenic spacers, IGS) 所組成的。而在可轉錄區域中包含 5.8S、18S 及 28S 三種基因，其之間各有一內轉錄間格區

(Internal transcribed spacers, ITS)，分別稱為 ITS 1 及 ITS 2 在同種類生物體中 ITS 1 及 ITS 2 基因序列具有高度保留性 (Conservation)，而非同種生物體則差異性較大，因此利用適當的引子 (primers) 加上 PCR (Polymerase chain reaction) 方式來擴增 ITS 1 及 ITS 2 的序列，經過 DNA 定序比對之後便可確定真菌種類為何 (袁，1997)，取代傳統需經過特定環境及時間培養真菌後，利用其孢子及菌絲型態，或是生長狀態來鑑定真菌種類，不但耗費時間且鑑定人員也是需要對真菌相當了解及經驗豐富才能準確判斷其種類。



附圖十四、真菌 rDNA 基因之基本結構及 PCR 兩個引子位置圖 (黃，2001)。

由於真菌具有易培養，易控制，生長快速及成本較低等優點，並可透過突變菌株來提高菌種的性能，或者利用培養基組成份的探討，來量產所需要的活性物質，加上使用發酵槽便可以大規模生產，同時也可以保護瀕臨絕種之藥用植物的生長，因此具有相當看好的應用前景 (曾，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 50 株本土內生真菌之分離菌株，編號 001-050。

(二) 受試病原菌

東海食品科學系保存病原菌株 *Bacillus cereus*、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus* 及 *Serratia liquefaciens*。保存病原真菌株 *Aspergillus niger*、*Botrytis cinerea* 及 *Rhizopus oryzae*。

(三) 受試細胞

人類肺腺癌細胞 A549、肝癌細胞 Huh7，正常細胞有大鼠主動脈血管平滑肌細胞 (Aortic smooth muscle cell) 及新生大鼠心臟內皮細胞 (Neonatal rat heart endothelial cell)。

(四) 培養基與試藥

1. 真菌培養基

(1) Modified mycological medium (簡稱 M)，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 (簡稱 PDA)

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

2. 細菌培養基

(1) LB (Luria-Bertaini agar)

Bacto agar	15 (g/L)
Sodium Chloride	10
Tryptone	10
Yeast extract	5

(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), pH 7.0 ± 0.2 。

DMEM basal medium

Fetal bovine serum	10%
L-glutamine	2 mM
Non-essential amino acid	1% (5 ml)
Penicillin and Streptomycin	10 U/ml and 10 μ g/ml
Sodium pyruvate	1 μ M

另外取 D-Glucose 1.75 g 溶於 5 ml 無菌水中，再過 0.22 μ m 過濾膜之後加入 medium 中。

(2) RPMI-1640 cell culture medium, pH 7.0 ± 0.2。

RPMI-1640 basal medium

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

二、實驗儀器

見附錄一。

三、實驗方法

(一) 病原菌純化及培養基的製備

1、病原菌純化

測試菌種 *B. cereus*、*E. coli*、*Sal. typhimurium*、*Staph. aureus* 及 *S. liquefaciens* 三區劃線於 NA 上，37°C 培養 16 小時，挑出單一菌落後，做革蘭氏染色鏡檢，確定其病原菌型態後，劃線培養於 5 ml NA 斜面培養基。

保存病原真菌株 *A. niger*、*B. cinerea* 及 *R. oryzae* 刮取菌絲接種於 PDB 中活化。培養於 23°C、3-7 天之後取 1 接種環的量劃線接種於 50 ml PDA 斜面培養基上培養 23°C、3-7 天。

2、含菌培養基的製備

在斜面培養基上純化好的病原菌以 1 ml 無菌水洗下，取 0.1 ml 的菌液與培養基 NA 充分混合，凝固後使用。病原性真菌方面，純化好的真菌以 10 ml 無菌水洗下菌絲及孢子，取 0.1 ml 的菌液與培養基 PDA 充份混合，凝固後使用。

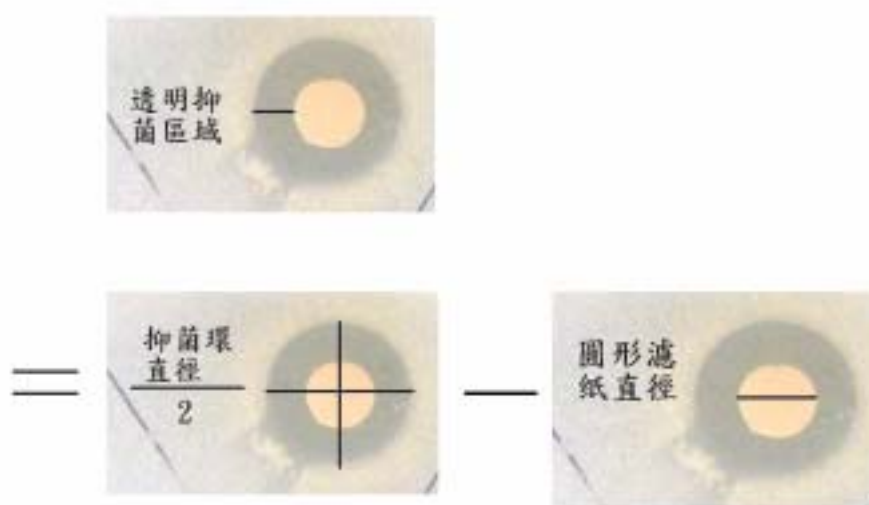
(二) 抑菌物質產生之內生真菌篩選

1、抑菌物質測試

將從中研院取得之 50 株內生真菌培養在 PDA 固態培養基上，分別培養 5、7、9、11 天，利用打孔器切割真菌體約直徑 0.84 cm 的圓形菌塊，將真菌體面 (Mycelia) 與培養基面 (Medium) 平貼於含有病原菌的 NA 培養基上，37°C 培養 16 小時，測量抑菌環之直徑大小 (cm)。將兩種菌塊平貼於含有病原真菌之 PDA 培養基上，23°C 培養三天後觀察其抑菌環大小。

2、抑菌物質之萃取

由上述實驗篩選過後的內生真菌分別培養於 PDA 上 5、7、9、11 天，取兩片培養基連同菌體一起打碎於 50 ml 離心管中，加入 10 ml、95% EtOH，靜置 20 min 後離心，6000 rpm、20 min 後取上清液置於錶玻璃中揮發，用 100 μ l 無菌水洗下，濃縮 100 倍；再用直徑 0.63 cm 的圓片濾紙吸取萃取液 (飽和 10 μ l) 後平貼於含五種病原菌及三種病原真菌的培養基上，分別於 16 小時 (病原細菌) 及 3 天 (病原真菌) 後觀察其抑菌環大小，圖四為抑菌環測量方式，所要求的是圖中透明的區域，首先量透明圈的兩條直徑，相加除以二後減掉濾紙片的直徑大小 (約 0.63 公分) 即代表濾紙片上所含物質之抑菌環大小。



附圖十六、抑菌環測量方式。

根據不同濃度的抗生素對於不同病原菌的抑制效果，來對照真菌萃取物的抑菌能力。

(三) 內生真菌之分子生物鑑定

1、實驗方法

1.1 內生真菌基因體 DNA 之抽取

所使用的是 FastDNA[®] Kit (BIO 101, U.S.A)。刮取培養在 PDA plate 上的真菌菌絲約 0.2 g 於 kit 中所附有的 Lysing Matrix tubes，由於真菌細胞壁為幾丁聚醣所組成，因此需使用特殊砂礫來磨碎。加入 BIO 101 buffer，內含 CLS-Y (800 μ l)、PPS (200 μ l)、PVP (40 μ l for 0.1-1%)及 β -mercaptoethanol (36 μ l for 1-3%)。將小管置於 Fast Prep 儀器上，於程度 4 震盪 25 秒後冰浴 2 分鐘，重複震盪 3-4 次。再以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液 600 μ l 及等量之 Binding Matrix 至新管中，混合均勻且在室溫下靜置 5 分鐘。以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 500 μ l SEMS-M buffer，混合均勻，離心 3 分鐘，去除上清液，再離心 1 分鐘，同樣去除上清液，最後加入 100 μ l DES buffer (Deionized water) 放置室溫約 2-3 分鐘，離心 1 分鐘，取上清液保存於-20°C。利用 0.8% Agarose gel、1 K basepair Marker、110 伏特電壓及 1/10 倍體積的 tracking dye 進行電泳分析，確認有抽取到真菌基因體 DNA。

將其真菌 DNA 用去離子水稀釋 100 倍後，經由分光光度計測得在波長 260 nm 下之吸光值，經由換算將各真菌 DNA 濃度稀釋成 25 μ g/ml，作為 DNA 模板之用。

1.2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

1.2.1 Primers

ITS 4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Primer 1)

ITS 5 : 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (Primer 2)

ITS 4 會結合在 28S rDNA 前端基因序列上，而 ITS 5 則結合在 18S rDNA

後段序列上，經由 PCR 擴增部分 18S rDNA、ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2 及部分 28S rDNA 序列。

1.2.2 PCR 反應內容物 (μl)

Total 體積(μl)	25	100
DNA template	1 (25 μg/ml)	4
Primer 1	0.25 (10 μM)	1
Primer 2	0.25 (10 μM)	1
dNTP	0.25 (10 mM)	1
Mg ²⁺	1.5 (25 mM)	6
10x Taq buffer	2.5	10
Taq	0.2	0.8
dd H ₂ O	19.05	76.2

1.2.3 PCR condition

94°C 反應 5 分鐘，之後 94°C 反應 1 分鐘，58°C 反應 1 分鐘，72°C 反應 1 分鐘此三步驟進行 30 個循環，72°C 反應 7 分鐘，最後冷卻於 4°C。

1.3 電泳膠體分析

主要利用分子量大小檢測 PCR 產物正確性。使用 2% 的 Agarose gel 及 100 basepair 的 Marker，經由電泳觀察片段分子量大小。之後將 PCR 反應物的量放大到總體積 100 μl (各體積如上所示) 後進行膠上純化，回收正確分子量的片段。

1.4 PCR 產物膠上純化

將從 Agarose gel 回收的 PCR 片段利用 Gel-MTM Extraction system (Amersham Biosciences, Italy) 進行純化。首先將切下的片段連同膠體置入 microtube 中，加入 500 μl GEX buffer，於 60°C 下 5-10 分鐘，待膠體完全溶解，

於室溫冷卻。之後將溶液加入內附的管柱中，其銜接 1.5 ml Microtube，13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除下清液，加入 500 μ l WF buffer，同樣離心 1 分鐘，去除下清液。加入 700 μ l WS buffer (內含 EtOH) 離心 1 分鐘，去除下清液。將管柱於 37°C 烘箱中放 10 分鐘後置於新的 Microtube 上，加入 40 μ l Elution buffer (無菌水)，靜置 1-2 分鐘，離心 1 分鐘，得到純化後的真菌 DNA 片段後經 2% Agarose gel 電泳分析確認。

1.5 接合作用 (Ligation)

使用 yT&A cloning kits (Yeastern Biotech Co., R.O.C)，將確認過分子量大小、純化過之真菌 DNA 片段取 6 μ l 與 kit 中之 BufferA、B、yT&A 載體 (Vector) (圖五) 及 T4 ligase 各 1 μ l 充分混合，總體積 10 μ l。放置於 4°C overnight 或是 25°C 1 小時。

1.6 轉形作用 (Transformation)

取 *E. coli* 勝任細胞 (*ECOS 101*, Yeastern Biotech Co., R.O.C) 40 μ l 及 Ligation 後之樣品 5 μ l 混合均勻，置於冰上 15 分鐘後，於 42°C 水浴 45 秒，利用熱能使細菌細胞膜穿孔而真菌 DNA 片段得以進入。冷卻 3 分鐘，將混合液體 50 μ l 塗抹於含有 IPTG (Isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside)、Ampecillin 及 X-Gal 的 LB plate 上，37°C 培養 16 小時，挑取白色菌落經由 PCR 來篩選接合正確片段的菌落。

1.7 篩選正確之重組載體

1.7.1 Primers

M13 universal primer :

5'GTTTTCCCAGTCACGAC3' (Primer 1)

M13 reverse primer :

5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC3' (Primer 2)

1.7.2 PCR 反應內容物 (μl)

Tatal 體積(μl)	10/管
DNA template	
Primer 1	0.1 (10 μM)
Primer 2	0.1 (10 μM)
dNTP	0.1 (10 mM)
Mg ²⁺	0.6 (25 mM)
10x Taq buffer	1
Taq	0.08
dd H ₂ O	8.02

使用無菌牙籤挑取少許白色菌落，點在 LB plate (含 1% Ampecillin、IPTG 及 X-Gal)，37°C 培養 16 小時做保存；另外將沾有白色菌落的牙籤與 PCR 反應內容物充份混合作為 DNA 模板。

1.7.3 PCR condition

95°C 反應 10 分鐘，之後 95°C 反應 30 秒，50°C 反應 30 秒，72°C 反應 45 秒此三步驟進行 25 個循環，72°C 反應 7 分鐘，最後冷卻於 4°C。將 PCR 產物利用 2% Agarose gel，100 basepair Marker 電泳分析後經分子量大小確認。將轉殖進正確片段大小的白色菌落挑取一些於 3 ml 含 1% Ampecillin LB 液態培養基，37°C 震盪培養 16 小時後抽取重組質體。

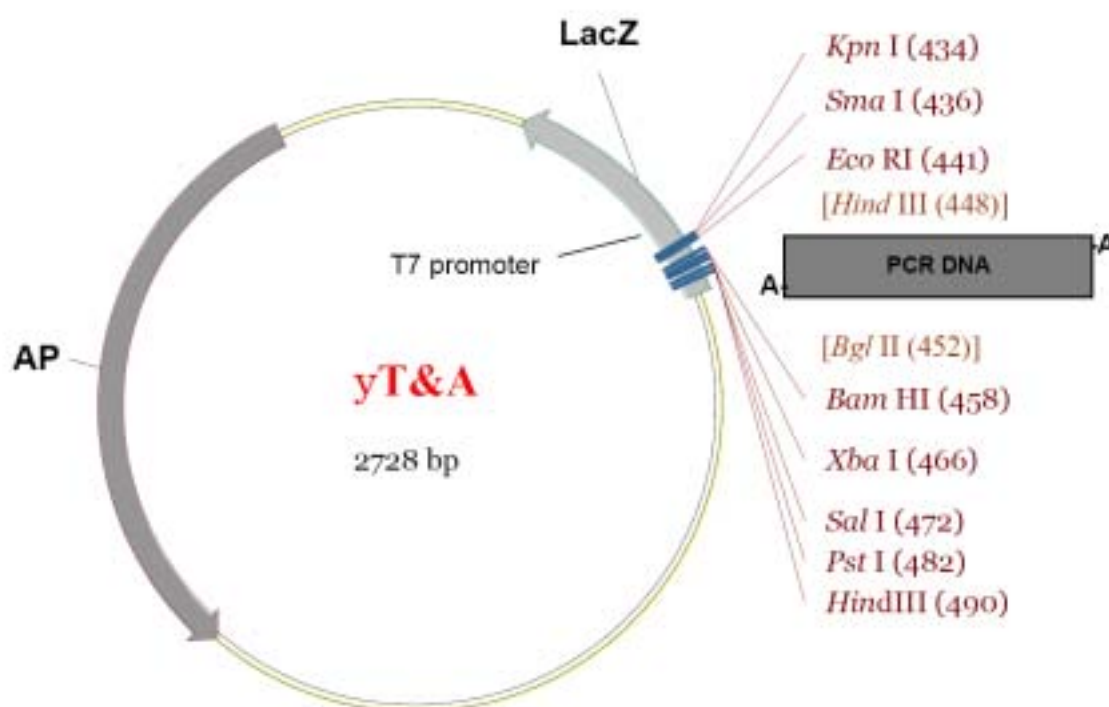
1.8 重組質體 DNA 之抽取

使用 Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System Kit (VIOGENE)，將培養好的菌液在 10,000 rpm 下離心 10 分鐘，去除上清液後加入 250 μl MX 1 buffer (內含 RNase 需保存於 4°C) 混合均勻，轉移至 1.5 ml Microtube 中，加入 250 μl MX 2 buffer 輕輕混合，室溫放置 5 分鐘後加入 350 μl MX 3 buffer 輕輕混合，離心 10 分鐘。將上清液轉移至 Mini-MTM 小管中離心 1 分鐘，去除液體，加入 500 μl WF

buffer 離心 1 分鐘，去除液體，再加入 700 μ l WS buffer (內含乙醇) 離心 1 分鐘，離心 1 分鐘去除液體，再離心 3 分鐘，將 Mini-MTM 小管放置於 60°C 烘箱中去除剩餘的乙醇，轉移至 1.5 ml Microtube 上，加入 30 μ l 無菌水靜置 2 分鐘後，離心 2 分鐘，將質體 DNA 於 -20°C 保存。

1.9 定序

將抽取出的質體 DNA 取 9 μ l 加上 1 μ l (10 mM) 的 primer (yT&A forward primer 或 yT&A reverse primer，簡稱 TAF 或 TAR)，送交中央研究院植物暨微生物學研究所 R208 室定序。



附圖十七、yT&A 載體基因圖譜。

Multiple Cloning region	434 bp to 490
<i>lac Z</i> gene	511 to 149
Ampr gene	2528 to 1671
T7 promoter	402 to 439
M13 universal primer	359 to 375
M13 reverse primer	528 to 507

(四) 產生抑菌物質之內生真菌外觀形態及生長

1. 固態培養基上的形態

篩選出產生抑菌物質之內生真菌 038，隨時間的變化觀察其 1-10 天在 PDA 培養基上的生長情形及型態。

2. 顯微鏡下菌絲形態

在乾淨的凹槽玻片，以塑膠滴管吸取少量融溶態 PDA 入凹槽內，待凝固後以接種針勾取少許真菌菌絲接種其上，蓋上蓋玻片。在 plate 中放置 U 型玻棒及濕潤濾紙片，將 slide 置於 U 型玻棒上，於 23°C 培養兩天後，顯微鏡下觀察菌絲體形狀。

(五) 液態培養內生真菌抑菌物質之萃取

1、菌元製備

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°C 培養 5 天，以此作為菌元。

2、液態培養條件

用均質機將菌元打碎，取 5% 的菌元加入 400 ml M broth 及 PDB 中，以 150 rpm，25°C 培養 5 天。

3、有機溶劑萃取

真菌培養 5 天後，分離菌絲體及培養液，利用冷凍濃縮的方式將培養液濃縮 10 倍 (400 ml 濃縮至 40 ml)，再用等體積的 ethyl acetate 激烈震盪數分鐘後，靜置一天，將 40 ml 有機層取出揮發後復溶於 5 ml 1X PBS (phosphate buffered saline) 中，pH 6.6-7.0 之間做為測試樣品。之後將樣品大量製備至 10 ml 再進行細胞毒性及抑菌測試。另一方面將 40 ml 有機層取出揮發後復溶於 5 ml 甲醇中，以

HPLC 作有效物質分析。

(六) 抑菌物質之細胞毒性測試

1. PDA 培養及液態培養之細胞毒性測試

調整人類肺癌細胞株 A549 (培養基為 5% FBS RPMI 1640)的濃度到 5×10^4 cells/ml，取 1 ml/well 培養於 12 孔盤中 24 小時，之後每孔加入 900 μ l 不同稀釋濃度的真菌萃取物質 (PDA 培養基利用 95%乙醇及乙酸乙酯萃取，M brtoth 及 PDB 利用乙酸乙酯萃取，四個樣品皆稀釋 2 倍及 10 倍，2 倍稀釋的樣品培養基濃度調至 2 倍避免稀釋後細胞死亡是因為培養基的營養因子過於稀少的的原因)，培養於 5% CO₂、37°C 培養箱，控制組使用的是一倍濃度的 PBS，以相同的稀釋倍數加入細胞中，每個濃度作三重複，分別於加入後 24 小時利用血球計數器計算其細胞存活率。細胞存活率(%)=

$$(\text{實驗組的存活細胞數目平均值} / \text{控制組的存活細胞數目平均值}) \times 100$$

2. 液態培養乙酸乙酯萃取物之細胞毒性測試

調整人類肺癌細胞株 A549 (培養基為 5% FBS RPMI 1640)、肝癌細胞株 Huh7 (10% FBS DMEM)、Smooth muscle cell (培養基為 1% FBS DMEM) 及 Neonatal rat heart endothelial cell (心臟內皮細胞，培養基為 1% FBS DMEM) 的濃度到 5×10^4 cells/ml，取 1 ml / well 培養於 12 孔盤中 24 小時，之後每孔加入 900 μ l 不同稀釋濃度的真菌萃取物質 (2 倍、10 倍及 50 倍)，培養於 5% CO₂、37°C 培養箱，控制組使用的是一倍濃度的 PBS，以相同的稀釋倍數加入細胞中，每個濃度作二重複，分別於加入後 24 小時及 48 小時利用血球計數器計算其細胞存活率。

(七) 液態培養乙酸乙酯萃取物之抑菌測試

用直徑 0.63 cm 的圓片濾紙吸取萃取液 (飽和約 10 μ l) 後平貼於含四種病原菌 *Bacillus cereus*、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus* 的 NA 培養基上，觀察其抑菌環大小。用等量的 PBS 作為控制組。

(八) 內生真菌活性物質之初步分析

1. 全光譜測定

將內生真菌培養液濃縮由乙酸乙酯萃取出物質揮發後復溶於甲醇中，*Cono.* #038 稀釋 400 倍，*Eu.* #039 稀釋 200 倍，經全光譜掃描結果，選擇 210 nm 作為偵測波長，以半製備型管柱分離，收集之沖提液。

2. 第一次 HPLC 分離

所使用的半製備型管柱是 Hyperpre Hs C18 8 μ 250 \times 10 mm (Thermo, Germany)，移動相為 70% Acetonitrile，流速 1.0 ml/min，注入樣品 50 μ l/次，偵測時間是 30 min，偵測波長為 210 nm，感度 10，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 (Dimethyl Sulfoxide) 中(需避光)，將其濃度調整到 100 μ g/ μ l，做細胞毒性測試，另外製備一份樣品復溶於 100% 甲醇中進行 HPLC 分析。將標準品 Brefeldin A (BFA, 1 mg/ml) 取 10 μ l，以相同 HPLC 條件與 *Eu.* #039 之萃取物分析圖比對，觀察利用 M broth 培養是否能產生 BFA。

(九) HPLC 產物之活性測試

1. 抑菌測試

用直徑 0.63 cm 的圓片濾紙吸取四個 HPLC 收集區液體 (飽和約 10 μ l) 後平貼於含四種病原菌 *B. cereus*、*E. coli*、*Sal. typhimurium*、*S. aureus* 的 NA 培養基上，以及三種病原性真菌 *A. niger*、*B. cinerea* 及 *R. oryzae* 的 PDA 培養基上，觀察其抑菌環大小，用等量的 DMSO 作為控制組。

2. 細胞毒性測試

由於 DMSO 對於細胞有毒性，因此將其含量控制在 1/1000 以下。將四個收集區濃度控制在 100 µg/ml、10 µg/ml、5 µg/ml、2.5µg/ml 及 1 µg/ml，調整人類肺癌細胞株 A549 及肝癌細胞株 Huh7 的濃度到 5×10^4 cells / ml，取 1 ml / well 培養於 12 孔盤中 24 小時後加入五個不同稀釋度的樣品，培養 24 及 48 小時觀察細胞毒性效果。

3. 第二次 HPLC 分離及製備有效成分

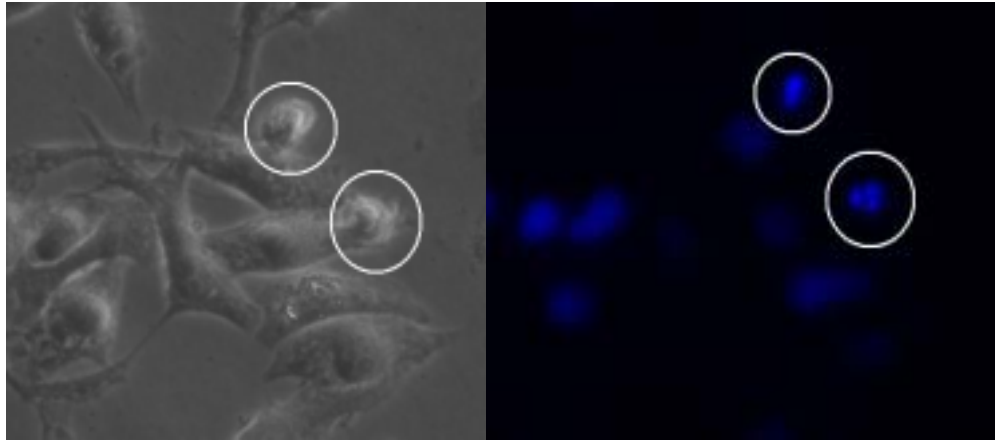
使用半製備型管柱是 Hyperpre Hs C18 8u 250×10 mm，移動相為 70% 甲醇，流速 1.5 ml/min，注入樣品 30 µl/次，偵測時間是 30 min，偵測波長為 210nm，感度 10，進一步分離有效成分並大量收集。

4. 細胞固定染色

4.1 原理

利用福馬林將細胞固定在 12 孔盤上，再以螢光劑 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染細胞核，觀察細胞是否有進行細胞凋亡路徑。

DAPI，是一種能與 DNA 結合的螢光染劑，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。如附圖十八所示，左邊是細胞形態，右邊是經 DAPI 染色後的結果，在顯微鏡下可以看出若是行細胞凋亡中的細胞，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，如兩圖中白色圓圈處，其細胞形態已漸成圓球狀且核內 DNA 呈現片段狀態。



附圖十八、DAPI 染色。

4.2 實驗方法

在常溫下將 12 孔盤中欲固定的細胞培養基去除，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，將細胞固定於盤上，之後去除福馬林，加入 1 ml 的 PBS 震盪清洗 5 分鐘，重複兩次後置於 4°C 冰箱保存。

染色部分先用 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，去除 PBS 加入 1 ml DAPI (working solution conc.=1 $\mu\text{g/ml}$) 避光靜置 10 分鐘，先在螢光顯微鏡下觀察染色程度，若還未明顯則再染 5 分鐘。作用完畢用 PBS 震盪清洗 5 分鐘兩次、10 分鐘兩次後觀察細胞核染色情形。

5. 流式細胞儀 (Flow cytometer) 分析細胞生長週期之分佈

5.1 原理

主要是為了快速偵測一顆接著一顆流動於液體水柱 (fluid stream) 中的顆粒或細胞，除了可鑑定細胞的標記外，還可分析細胞的分裂週期、DNA 含量、細胞凋零死亡 (apoptosis)、細胞內鈣離子的濃度變化、pH 值之改變...等等。可以在活體細胞測定，也可利用細胞的特性，例如顆粒大小或是追蹤膜上所帶的蛋白質不同來分離不同種類的細胞。

加上特定染劑，便可以得知細胞是否進行細胞凋亡程式。本次實驗所使用的是 PI (Propidium Iodide) 單染法，其為一種核酸特異性染劑，PI 吸收波長 536 nm，螢光波長 623 nm。在直方圖上，橫軸是 PI 的螢光量，縱軸是細胞數目：

(1) Sub G1 (Gap 1)

可以初步推測是可能行細胞凋亡後死亡的細胞，由於凋亡後的細胞大小並不會碎裂，而是核內核酸會被酵素剪切成碎片狀，經由 PI 染色後位於之區域。

(2) G1 (Gap 1)

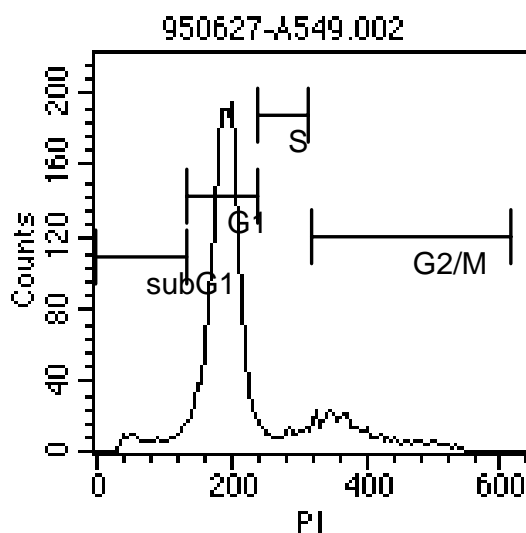
代表正常細胞的含量，染色體數目為 2 套。

(3) S (Synthesis)

代表細胞正在複製狀態。

(4) G2/M (Gap 2/Mitosis)

代表細胞準備行有絲分裂，染色體數目為 4 套。



5.2 實驗方法

為了得知內生真菌經乙酸乙酯萃取後，得到的活性物質是否可影響細胞生長週期，先將 A549 肺癌細胞以及 Huh7 肝癌細胞的濃度調整為 1.5×10^5 cells/ml，取 3 ml 培養於 6 公分 dish plate 上 24 小時後，加入 3 ml/plate 的真菌萃取物質 Compound 1，對 A549 加入的濃度為 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 及 0.015 $\mu\text{g/ml}$ ，而對 Huh7 加入

的濃度是 $0.015 \mu\text{g/ml}$ 及 $7.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ，還有添加培養基的控制組，在 37°C 、 5% CO_2 培養 24 及 48 小時，之後將存活及凋亡的細胞收集在同一 15 ml 離心管中，0.5 ml 培養基潤洗 plate 再加入離心管中，以 900 rpm 離心 5 min，去除上清液後以 1 ml PBS 潤洗 cell pellet，將細胞液移至微離心管中，再用 0.5 ml 的 PBS 潤洗，同樣以 900 rpm 離心 5 min，去除 PBS 後一邊 Vortex 細胞一邊緩慢地加入 1 ml 70% 乙醇固定細胞週期的狀態，必須確定乙醇與細胞充份混合均勻，於 4°C 下固定 30 min 後保存。

5.3 PI 染色

先將 PI (working conc.= $40 \mu\text{g} / \text{ml}$)及 RNase A($0.1 \text{mg} / \text{ml}$)與 1ml 的 PBS 混合均勻成 PI solution 後置於冰上 (需避光)，再將固定好的細胞在 4°C 下離心 3 分鐘，去除乙醇；每種樣品加入 1 ml 的 PI solution，輕混均勻，放置 37°C 培養箱 30 分鐘後，放在冰上保存，再以流式細胞儀分析。

(十) 化學結構式分析

1. 全光譜分析

將單離出來的化合物冷凍乾燥製成粉末，將其復溶於 70% 的甲醇中，進行全光譜掃描。

2. IR 吸收光譜分析 (Infrared Absorption Spectrum)及 NMR- ^1H 譜

交由化學系楊定亞老師實驗室進行化學結構式之初步分析。光譜解析以化學位移 (Chemical shift, δ)表示。

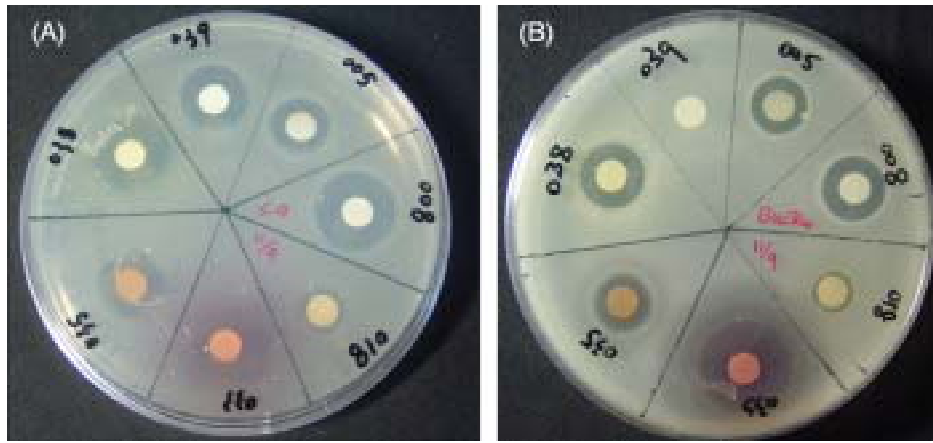
肆、結果與討論

一、含抑菌物質之內生真菌篩選

(一) 抑制病原細菌

實驗結果發現，將編號 000-050 內生真菌在 PDA 上培養 5、7、9 及 11 天，分別測試其真菌體面 (Mycelia) 與培養基面 (Medium) 的抑菌效果，發現其中六株編號 005、008、033、035、038 及 039 的內生真菌對於 G⁺ 菌具有較大的抑菌效果 (圖一)，因此取兩片培養基打碎經 10 ml 95% EtOH 萃取後復溶於 100 μ l 的無菌水中，取 10 μ l 加至濾紙中測試，同樣觀察 5、7、9、11 天的抑菌效果。到第七天時，其中 005、008、033、035、038 及 039 六株其酒精萃取物 (Extract) 對於 G⁽⁺⁾ 菌 *B. cereus* 及 *S. aureus* 具有較大的抑菌環。*S. aureus* 是 008 抑制效果最強，大小為 0.87 公分；038 抑菌效果次之，大小為 0.93 公分；039 第三為 0.83 公分 (圖三 (A))；而對 *B. cereus* 是 033 第一為 1.09 公分，038 與 008 並列第二 0.87 和 0.85 公分；005 第三為 0.44 公分 (圖三(B))。

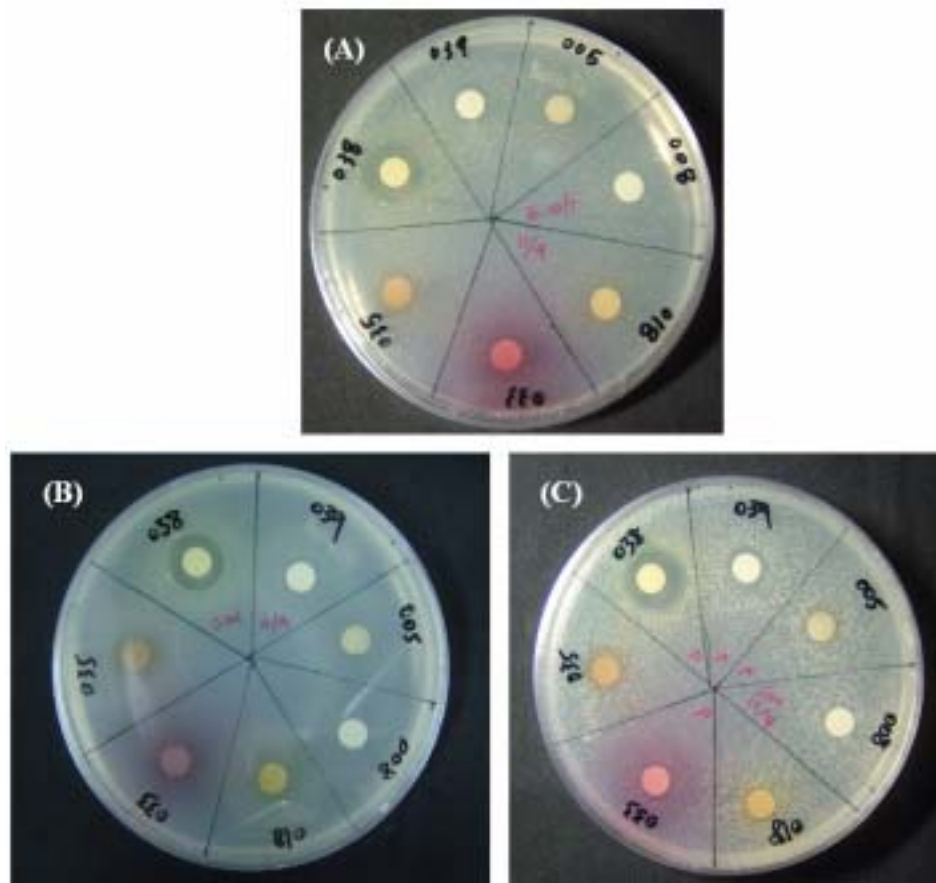
至於 G⁽⁻⁾ 菌 *E. coli*、*Sal. typhimurium* 及 *Ser. Liquefaciens* 以 038 培養到第七天的真菌對於其三種 G⁽⁻⁾ 病原細菌抑制效果最大 (圖二)，抑菌環大小分別為 0.73、0.61 及 0.83 公分；039 第二分別為 0.24、0.22 及 0.27 公分 (圖十四)。在 018 及 033 之萃取物方面具有深黃色及紅色色素的存在，其抑菌效果是否因為色素所導致的，未來可以將其萃取物質進行 HPLC 分析及抑菌測試後得以了解。



圖一、內生真菌 PDA 培養第七天之乙醇萃取物對 G (+) 菌的抑菌環大小。

(A) *S. aureus* (B) *B. cereus*

Fig. 1. Inhibition zones for G (+) bacteria of endophytic fungi EtOH extracts which incubated on PDA for seven days. (A) *S. aureus* (B) *B. cereus*



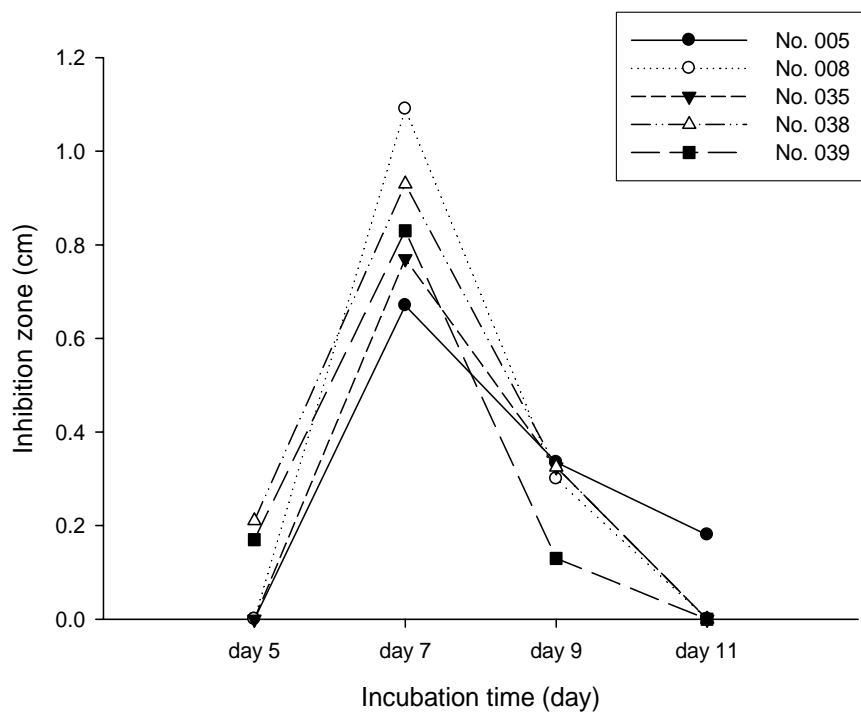
圖二、內生真菌固態培養第七天之乙醇萃取物對 G (-) 菌抑菌環大小。

(A) *E. coli* (B) *Sal. typhimurium* (C) *Ser. liquefaciens*。

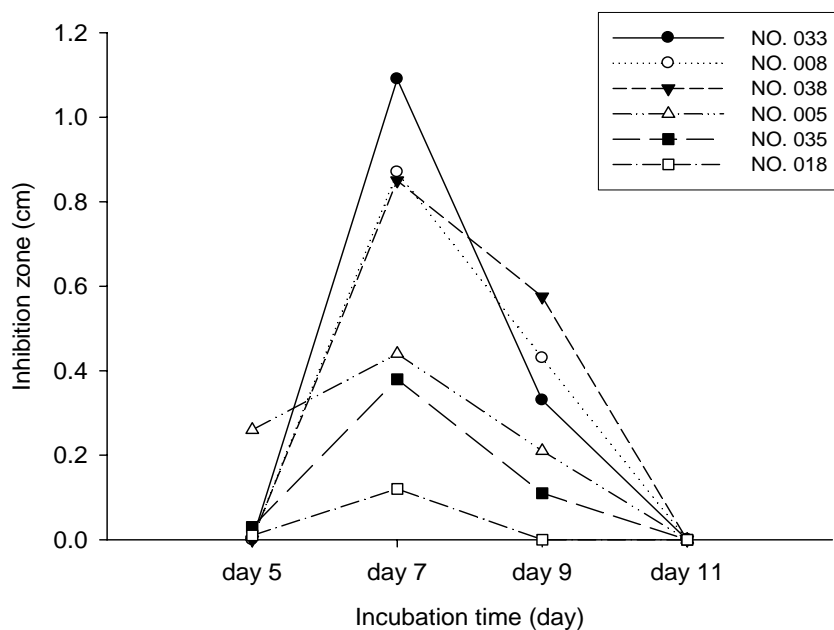
Fig. 2. The endophytic fungal inhibition zones to G (-) bacteria of EtOH extracts that incubated on PDA for seven days.

(A) *E. coli* (B) *Sal. typhimurium* (C) *Ser. liquefaciens*

(A)



(B)



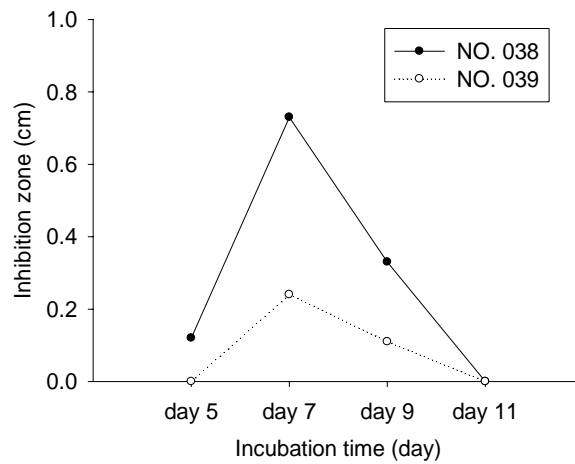
圖三、PDA 培養之內生真菌乙醇萃取物對 G(+) 的抑菌作用之時間效應。

(A) *S. aureus* (B) *B. cereus*.

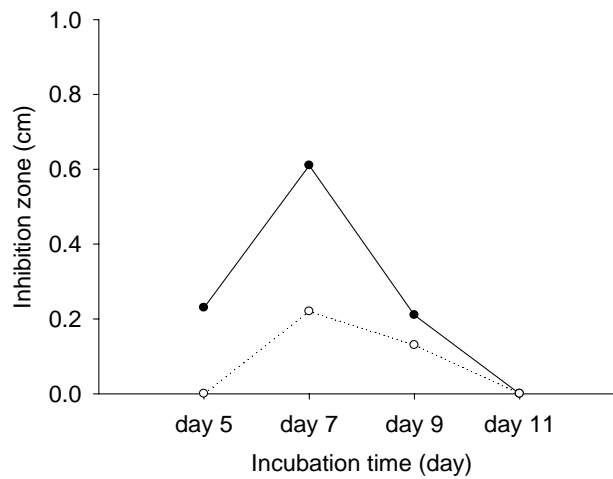
Fig. 3. The time effect of endophytic fungal EtOH extracts on PDA culture for G(+).

(A) *S. aureus* (B) *B. cereus*.

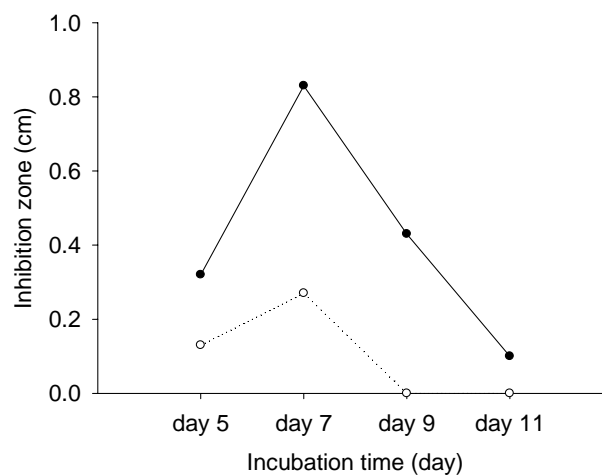
(A)



(B)



(C)



圖四、PDA 培養之內生真菌乙醇萃取物對 G (-) 的抑菌環作用之時間效應。

(A) *E. coli* (B) *Sal. thyphimurium* (C) *Ser. liquefaciens*.

Fig. 4. The time effect of endophytic fungal EtOH extracts on PDA culture for for G (-) bacteria. (A) *E. coli* (B) *Sal. thyphimurium* (C) *Ser. liquefaciens*.

(二) 抗生素濃度對於病原菌抑菌比較

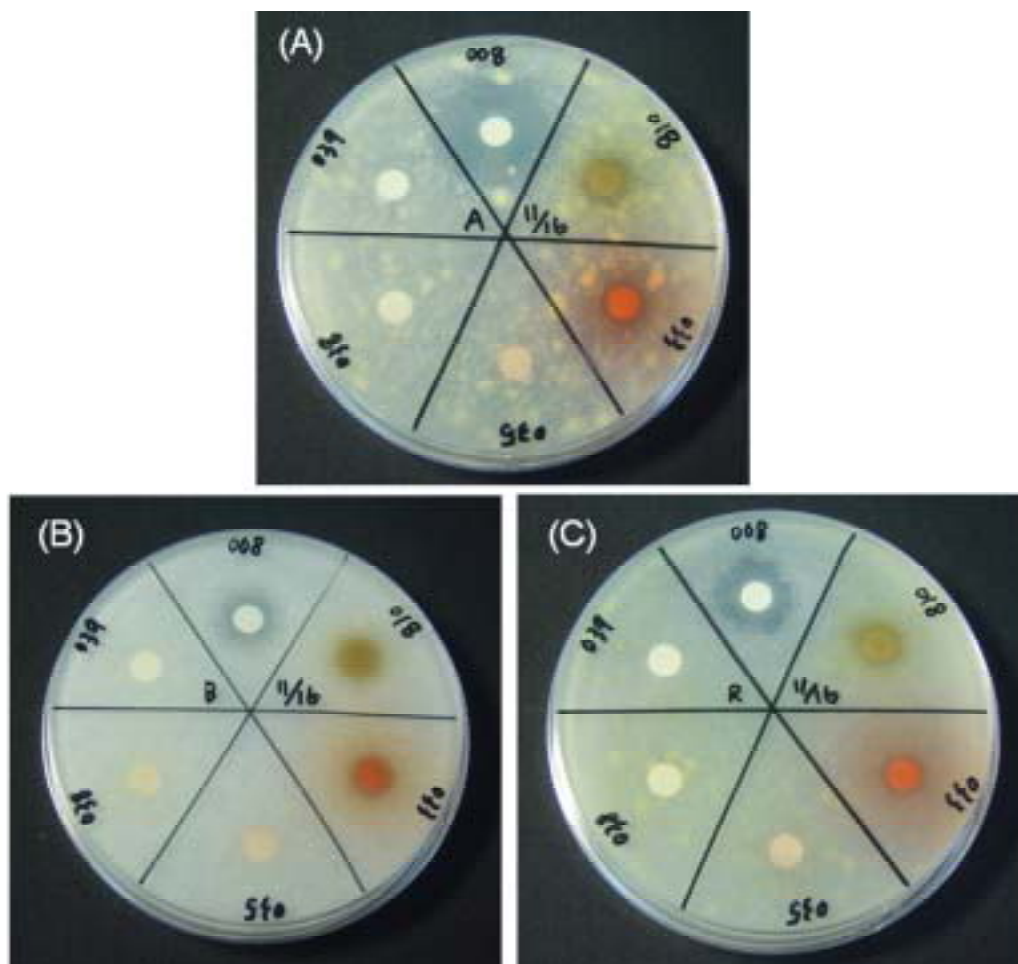
依照抗生素對於不同病原菌的抑制效果來對照 038 及 039 真菌酒精萃取物質的抑菌效果，如附錄二及三所示。結果發現 038 對 *B. cereus* 其抑菌效果是約 Ampicillin 5.08mg/ml 及 Tetracycline 640 $\mu\text{g/ml}$ ；而對於 *S. aureus* 是 Ampicillin 14.3 $\mu\text{g/ml}$ 與 Tetracycline 212.8 $\mu\text{g/ml}$ 。而對 *E. coli* 是 Ampicillin 109.5 $\mu\text{g/ml}$ 以及 Tetracycline 124.9 $\mu\text{g/ml}$ ；對 *Sal. Thyphimurium* 則是 Ampicillin 431.1 $\mu\text{g/ml}$ 及 Tetracycline 90.9 $\mu\text{g/ml}$ 。

編號 039 內生真菌萃取物質則是對 *B. cereus* 沒有抑菌效果，對於 *S. aureus* 是 Ampicillin 9.9 $\mu\text{g/ml}$ 與約 Tetracycline 135.3 $\mu\text{g/ml}$ 之間。而對 *E. coli* 是小於 Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ 以及約 Tetracycline 38.9 $\mu\text{g/ml}$ ；對 *Sal. Thyphimurium* 則 Ampicillin 201.7 $\mu\text{g/ml}$ 及約 Tetracycline 23.6 $\mu\text{g/ml}$ 。

(三) 抑制病原真菌

選取對病原性細菌有抑制效果的內生真菌 005、008、033、035、038 與 039 六種內生真菌培養 5、7、9 及 11 天對於 *Aspergillus niger*，發現在乙醇萃取物中除了 008 的抑菌環大小到了第十一天之後仍有增加的傾向（第 11 天 1.59 公分，圖五及表一），以及 005 是第九天具最大抑菌環 1.53 公分，其餘四種內生真菌的抑菌效果再培養到第七天時達到最大，033-0.19 公分、035-0.40 公分、038-0.25 公分及 039-0.17 公分。在 Mycelia 及 agar 大部份可以看到培養到第十一天抑菌作用也跟著提高。對於 *Botrytis cinerea* 而言，是以 008 其 Mycelia、agar 及酒精萃取物具抑制作用，其餘的真菌也有靜菌作用。

六內生真菌中對 *Rhizopus oryzae* 的抑制效果最小，但仍以 008 的抑菌效果最好，其培養到第十一天的酒精萃取物可以達到 1.07 公分的抑菌環。選擇既可抑制病原性細菌也可對病原性真菌進行抑制或靜菌作用的內生真菌 005、008、033、035、038 及 039 與不同濃度之常用抗生素 Ampicillin 和 Tetracyclin 作比較，以及五種內生真菌之分子鑑定。



圖五、內生真菌 PDA 培養第十一天之乙醇萃取物對三種病原真菌之抑菌環大小。

(A) *Aspergillus niger* (B) *Botrytis cinerea* (C) *Rhizopus oryzae*

Fig. 5. Inhibition zones of endophytic fungi EtOH extracts for three pathogenic fungi which incubated on PDA for eleven days.

(A) *Aspergillus niger* (B) *Botrytis cinerea* (C) *Rhizopus oryzae*

表一、六種內生真菌培養 7、9 及 11 天對三種病原真菌之抑菌環大小比較。

Table 1. The inhibition zone of six endophytic fungi that incubated for 7、9 and 11 days.

No. Endophytic fungi	Material	Tested pathogenic fungi species								
		<i>Aspergillus niger</i>			<i>Botrytis cinerea</i>			<i>Rhizopus oryzae</i>		
		Day7	Day9	Day11	Day7	Day9	Day11	Day7	Day9	Day11
005	Agar	×	0.30	0.65	0.12	×	×	×	0.12	×
	Mycelia	×	0.57	0.33	0.06	0.13	×	×	0.15	×
	Extract	1.50	1.53	1.44	×	0.06	×	×	×	0.9
008	Agar	×	0.23	0.70	×	0.01	0.08	×	0.06	0.30
	Mycelia	×	0.27	0.52	×	0.09	0.16	×	×	0.33
	Extract	0.25	0.59	1.59	×	0.31	0.36	×	×	1.07
033	Agar	×	×	×	靜菌	×	×	×	×	×
	Mycelia	×	×	×	×	0.24	0.30	×	×	×
	Extract	0.19	×	×	×	0.35	0.21	×	×	×
035	Agar	×	×	×	靜菌	×	×	×	×	×
	Mycelia	×	×	×	0.16	×	×	×	0.21	×
	Extract	0.40	×	×	×	×	×	×	×	×
038	Agar	×	0.35	0.21	0.09	×	×	×	×	靜菌
	Mycelia	×	0.23	0.35	0.21	靜菌	靜菌	×	×	0.17
	Extract	0.25	×	×	×	×	×	×	×	×
039	Agar	×	0.12	0.64	×	×	×	×	×	×
	Mycelia	×	0.14	0.56	0.07	×	×	×	×	×
	Extract	0.17	×	×	×	×	×	×	×	×

×: not detectable

二、內生真菌分子鑑定結果

分子鑑定結果如表二所示，百分比代表其 ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2 基因序列與 NCBI 資料庫比對之後的親緣相似度。結果顯示 005- *Botryosphaeria dothidea*、008- *Phialophora* sp.、035- *Alternaria tenuissima*、038- *Coniothyrium* sp. (以下簡稱 *Conio.* #038) 及 039- *Eupenicillium brefeldianum* (以下簡稱 *Eu.* #039)。008 雖然抑制效果最好，但屬於較嚴重的植物病原菌，且有文獻指出可能導致人體皮膚產生病變 (Hofmann, 2005)；而 038 雖然也有的種是屬於植物病原菌，但其中一種真菌已經被研究發現可以用來作為生物防治菌，用於抑制病原性真菌 (Vrije, 2001)；039 雖然鑑定結果加上之前文獻記載其會產生特定的抑癌物質-Brefeldin A (McCloud, 1995)，但可能由於所處地區不同而導致代謝物質有所差異，經過相同方法培養萃取後並沒有發現 Brefeldin A 的存在。

由上述抑菌實驗得知 *Conio.* #038 及 *Eu.* #039 同時具有有效抑制 G(+)及 G(-)病原性細菌的功效，而其餘真菌對 G(+)的抑制能力較強，但對 G (-)菌的抑制能力幾乎沒有，就廣泛性的抑菌效果而言選擇 *Conio.* #038 及 *Eu.* #039 內生真菌來作為本論文探討的主要依據。

表二、五株內生真菌之菌種鑑定結果。

Table 2. Five endophytic fungi.

菌種編號	菌種分類 (比對相似度)	真菌特性
005	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (99%),	屬於姚膠病菌，會引起梨輪紋病 (柯，1992)。
008	<i>Phialophora sp.</i> (95%)	瓶黴菌屬，造成大豆莖褐腐病，也有同屬的真菌會引起人類皮膚疣狀瘤的產生(Hofmann, 2005)
035	<i>Alternaria tenuissima</i> (99%)	交鏈孢菌，會引起交鏈黴葉斑病，是一種病原真菌，會感染人體真皮組織形成肉芽腫 (Robertshow, 2005)。
038	<i>Coniothyrium sp.</i> (95%)	盾殼黴屬，除了會引起玫瑰的枝葉枯黃，同屬的 <i>Coniothyrium minitans</i> 已被研發可用來作為生物防治菌中的抑真菌劑 (Vrije, 2001)。
039	<i>Eupenicillium brefeldianum</i> (98%)	<i>Eupenicillium brefeldianum</i> 會產生抗癌藥物 brefeldin A (McCloud, 1995)。

三、內生真菌生長及形態

Coniothyrium sp. (*Conio.* #038)

內生真菌 *Coniothyrium* sp. (盾殼黴屬) 隸屬於半知菌亞門、腔孢綱、球殼孢目真菌，表三是 *Conio.* #038 每天生長情形紀錄，圖六是其其在固態培養基上生長的形態，可以看到隨著天數的增加，菌體會隨之擴大，但生長到第九天的時候菌體便不再繼續擴增，而從之前的抑菌實驗也得知，到了第九天以後其抑菌效果也減少很多，表示抑菌物質的生產週期與真菌之生長週期可能成正相關性質。藉由位像差顯微鏡觀察內生真菌 *Conio.* #038 的菌絲型態，由圖中可以觀察生長到第四天時其菌絲成多核狀，平均每 3-4 個細胞核間形成一間隔 (圖八(A)箭頭處)，從較大的細胞核處有出芽生殖的現象產生。

Eupenicillium brefeldianum (*Eu.* #039)

根據台灣生物多樣性資訊網的資料顯示是屬於子囊菌門、子囊菌綱，中文名稱布式正青黴菌。表四及圖七顯示在固態培養的生長速度比 *Conio.* #038 要快速一點，且在體積上到了第八、九天仍可以繼續生長，直到佔滿整個 plate 為止。其抑菌效果到第七天為最大，第九天後便開始下降，表示抑菌物質產生並不會隨菌體增大而增加。由圖八(B)可知 *Eu.* #039 的細胞核較 *Conio.* #038 小且不清楚，菌絲分支較少，但與 *Conio.* #038 相似也是約 3-4 個細胞核會形成一個間隔 (箭頭處)。

表三、內生真菌 *Conio.* #038 的生長紀錄。

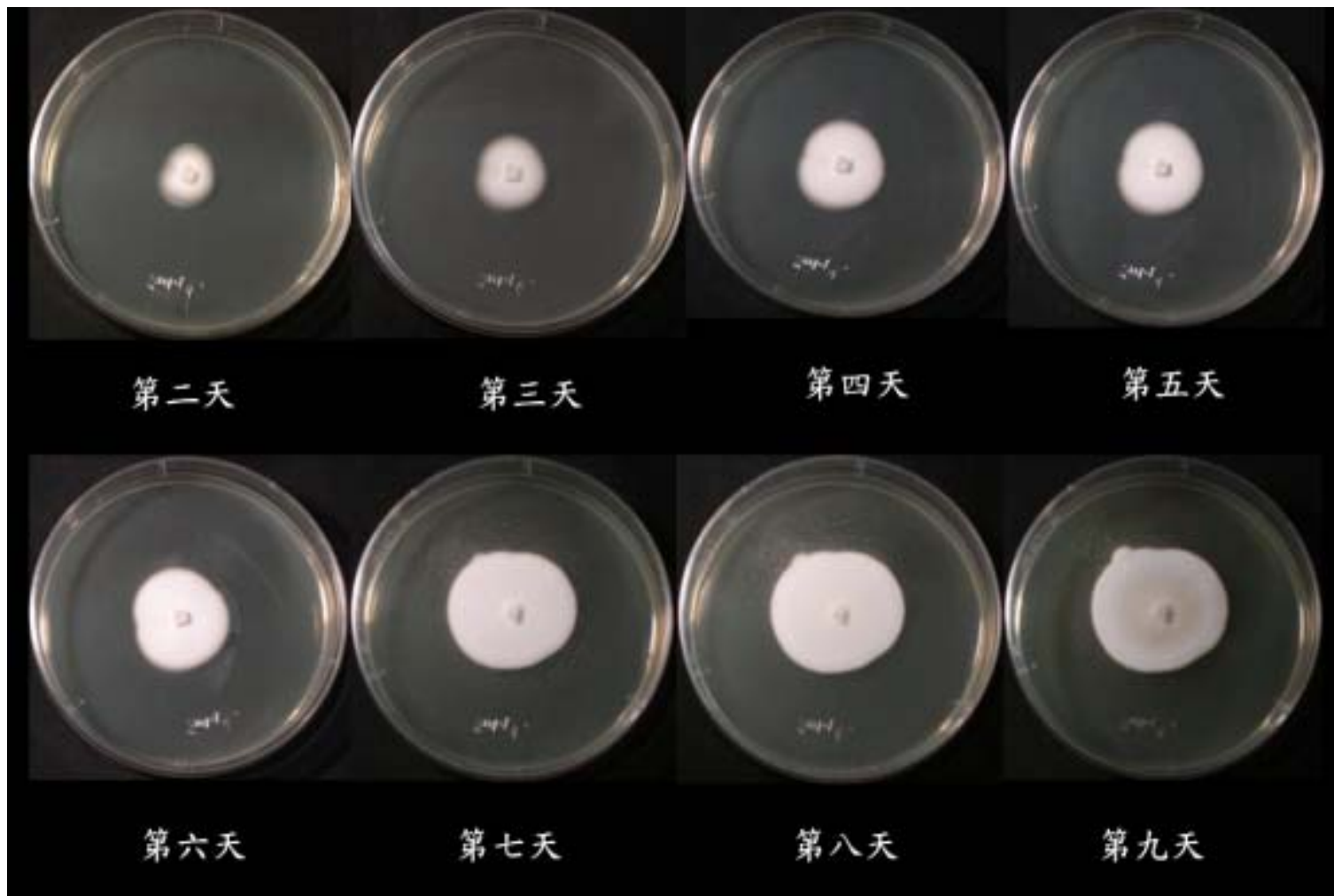
Table 3. The growth of endophytic fungus *Conio.* #038.

生長天數	生長紀錄
第一天	長出少許白色菌絲
第二天	白色菌絲體擴大至直徑約 1.41 公分
第三天	白色菌絲體直徑 1.93 公分，最外圍有一圈淡米色菌絲
第四天	白色菌絲體直徑 2.69 公分
第五天	白色菌絲體直徑 2.75 公分
第六天	白色菌絲體直徑 2.83 公分，外圍淡米色菌絲消失
第七天	菌絲體直徑 3.21 公分
第八天	菌絲體直徑 3.73 公分
第九天	菌絲體直徑 3.86 公分，生長速度開始減緩，中央出現褐色菌絲
第十天	菌絲體直徑 3.86 公分，已經不再擴增。

表四、內生真菌 *Eu.* #039 的生長紀錄。

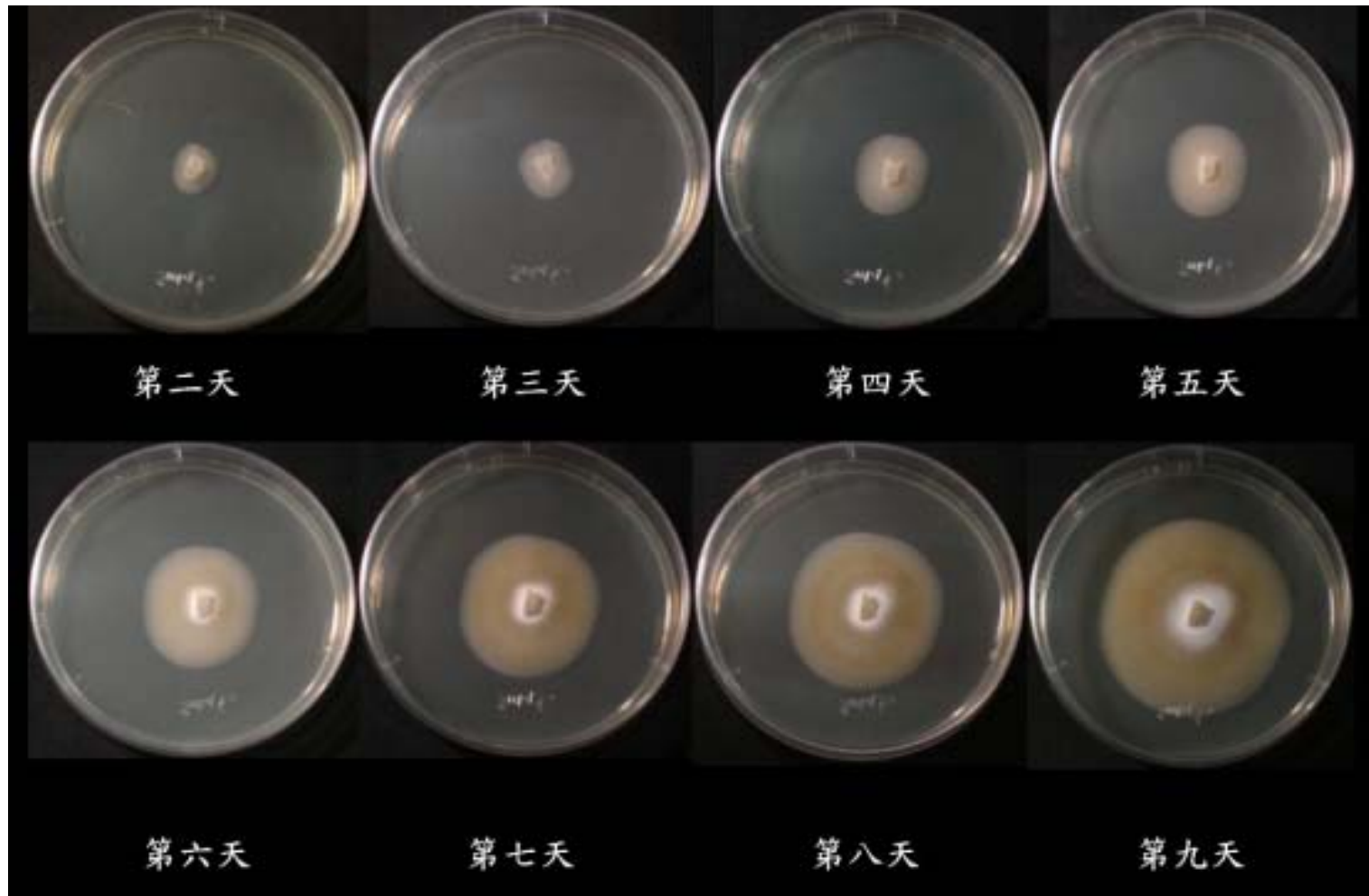
Table 4. The growth of endophytic fungus *Eu.* #039.

生長天數	生長紀錄
第一天	未長出菌絲
第二天	少許淡米色菌絲體生長，直徑為 1.16cm
第三天	菌絲體持續擴大，直徑 1.43 公分
第四天	米色菌絲體直徑 1.96 公分，中央出現較深米色的菌絲
第五天	菌絲體直徑 2.48 公分，深米色菌絲持續擴大
第六天	菌絲體直徑 3.21 公分，最中央出現少許白色菌絲。深米色部份轉為褐色。整體菌絲分成三層顏色：白色、褐色及米色
第七天	菌絲體直徑 3.86 公分，中央白色菌絲持續擴增，周圍褐色菌絲部份出現一圈年輪般淡黃的顏色區域
第八天	菌絲體直徑 4.17 公分，白色及淡黃年輪區域持續擴大
第九天	菌絲體直徑 5.22 公分，除白色區域持續擴大外，淡黃色年輪狀菌絲已擴大到最外層
第十天	菌絲體直徑 6.27 公分，中央白色菌絲，之後是褐色菌絲，最外圍是淡黃色年輪區域



圖六、內生真菌 *Conio.* #038 在 PDA 培養基上 2-9 天之生長情形。

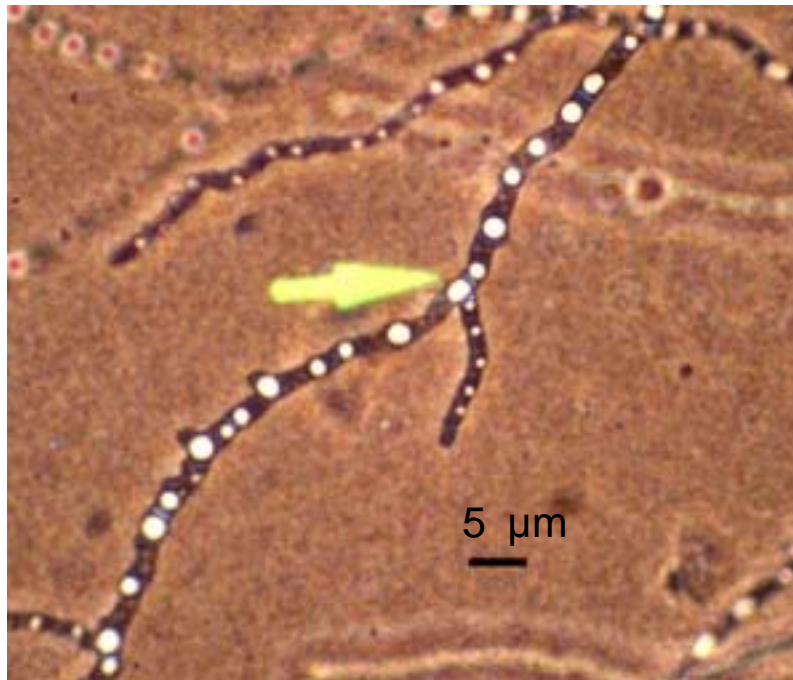
Fig. 6. The growth of *Conio.* #038 endophytic fungi that incubated on PDA for 2-10 days.



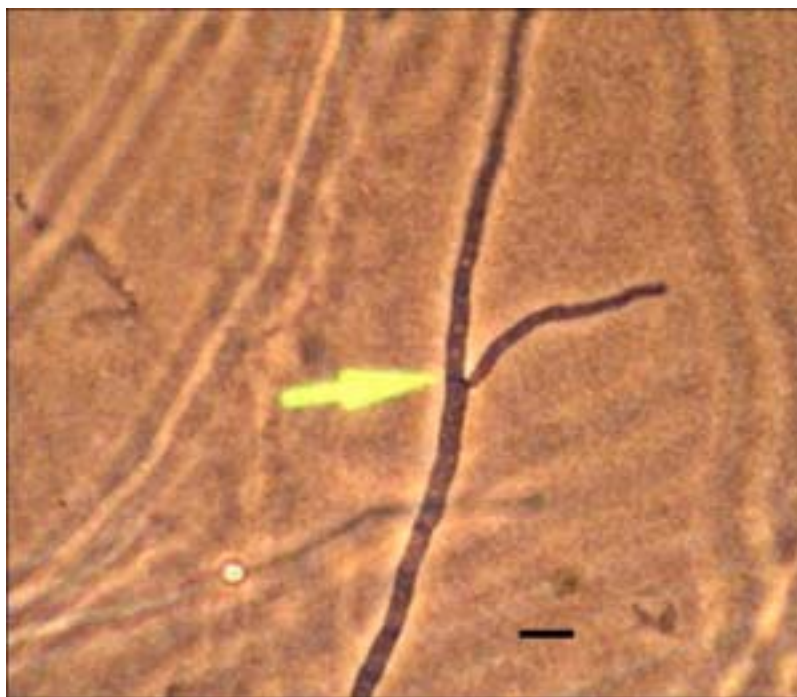
圖七、內生真菌 *Eu. #039* 在 PDA 培養基上 2-9 天之生長情形。

Fig. 7. The growth of *Eu. #039* endophytic fungi that incubated on PDA for 2-10 days.

(A)



(B)



圖八、內生真菌在顯微鏡下的菌絲形態，箭頭代表菌絲間隔處。

(A) *Conio.* #038 (B) *Eu.* #039, bar = 5 μm .

Fig. 8. The microscopy morphologies of endophytic funi (400X).

(A) *Conio.* #038 (B) *Eu.* # 039.

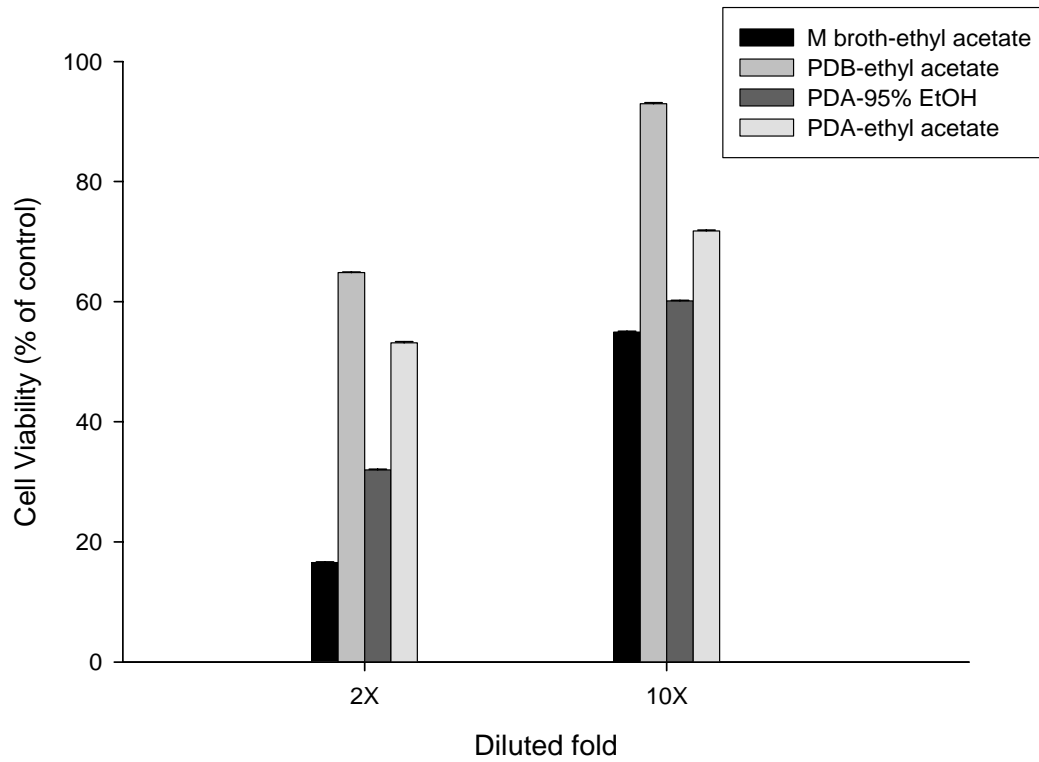
四、抑菌物質之細胞毒性測試

Conio. #038 與 *Eu.* #039 產生的抑菌物質對 G+及 G-菌均有抑制效果，為了解此物質對人體細胞的毒性，以作為開發藥物評估之依據。將兩種內生真菌 PDA 培養基之乙醇及乙酸乙酯萃取物及培養液（常見真菌液態培養基 PDB 與 M broth）之乙酸乙酯萃取物進行細胞毒性測試。

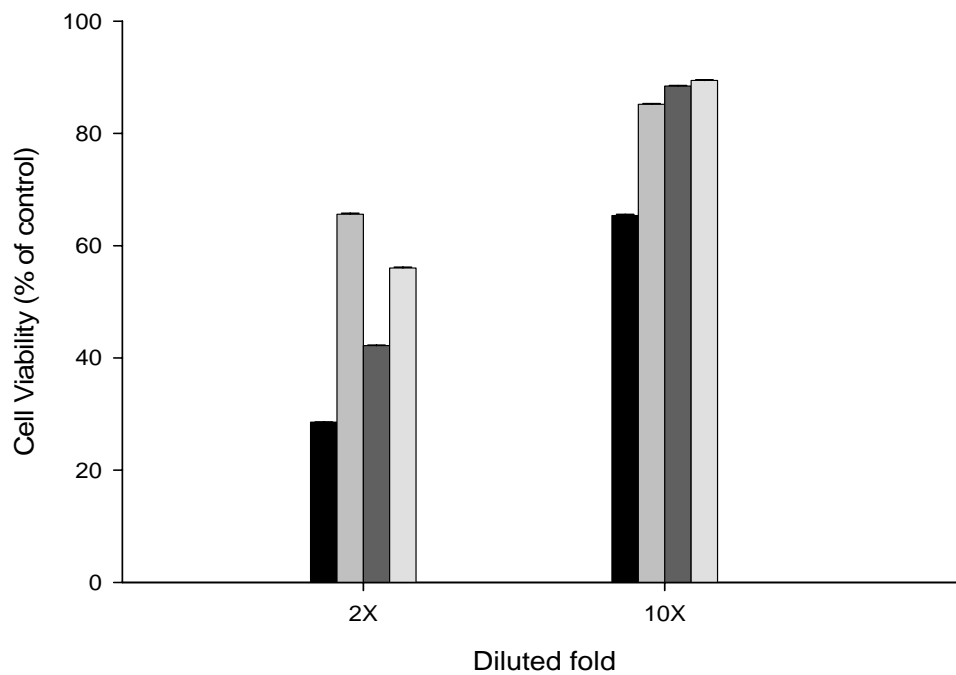
（一）細胞存活率

對於兩種內生真菌不同培養條件下之細胞存活率如圖九，可知利用 800 ml M broth 液態培養五天後濃縮成 80 ml，利用 80 ml 乙酸乙酯萃取一天後揮發，再復溶於 PBS，所獲得之初萃取物經 2 倍稀釋後的樣品對 A549 癌症細胞的毒殺性最強 (*Conio.* #038 對 A549 之細胞存活率為 16.59%, *Eu.* #039: 28.57%); PDA 培養七天取兩片培養基打碎利用乙醇萃取後復溶於 PBS 中的萃取物，經 2 倍稀釋者毒性次之 (*Conio.* #038: 31.98%, *Eu.* #039: 42.18%); 而利用 PDB 所培養後萃取出物質及 PDA 用乙酸乙酯萃取出物質抑制作用較小，且在 10 倍稀釋後四種樣品的細胞存活率皆提高至 50% 以上。根據培養基成分來說，M broth 與其他兩者不同處在含有少量的 Benzoic acid 目的是為了去除雜菌減少污染，以及當作真菌培養中所產生的一些環狀二次代謝物之基質，培養過程可能讓真菌產生較多量或特殊之二次代謝物質；而液態培養中又以 M broth 之萃取物對於人類癌症細胞之毒性也較 PDB 及 PDA 培養者強。由於液態培養較 PDA 培養可獲得較多的產物，在利用有機溶劑萃取過程中也較便利；因此便以 M broth 液態培養為主要培養條件。

(A)



(B)



圖九、内生真菌四種萃取物對 A549 細胞毒性測試。

(A) *Conio.* #038 (B) *Eu.* #039

Fig.9 .The cytotoxic assay of four *Conio.* #038 extracts for A549.

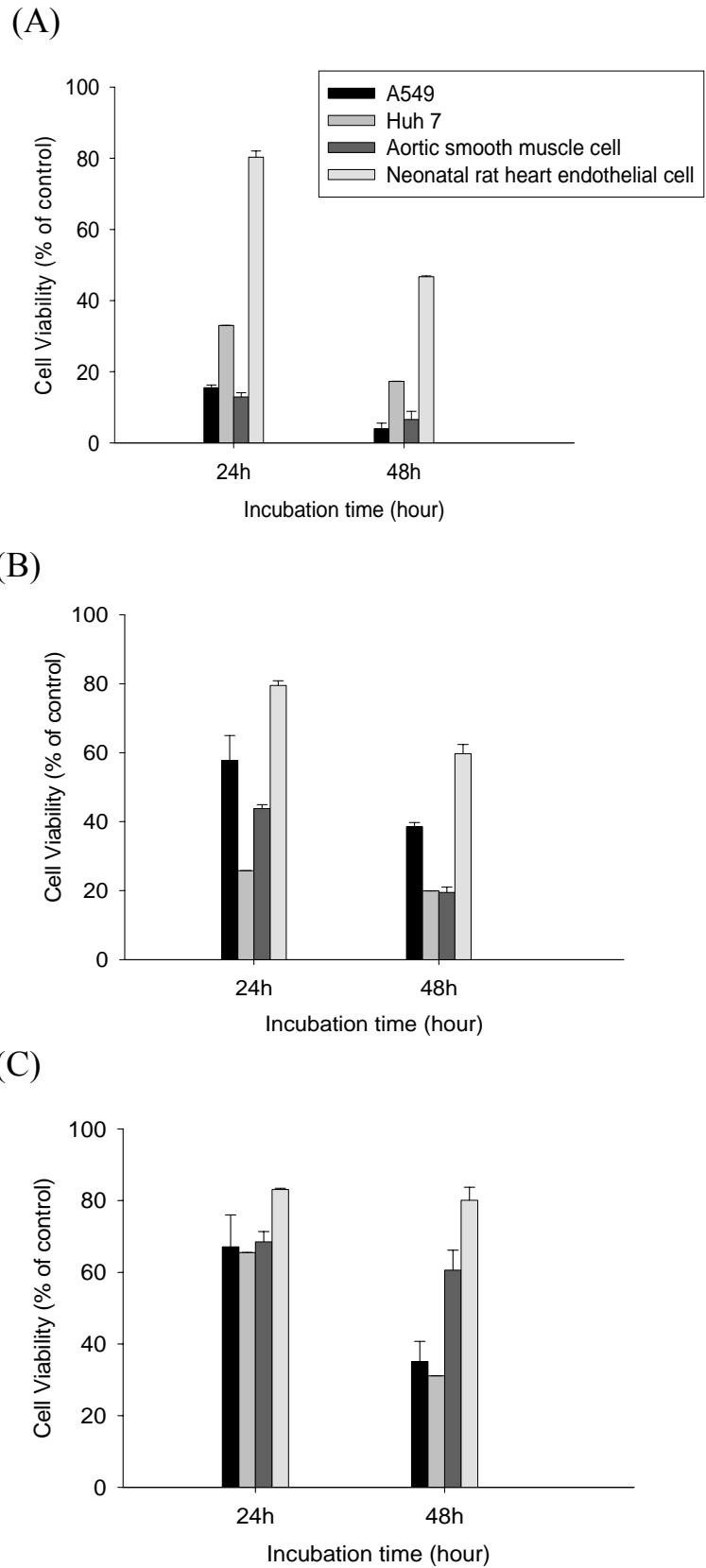
(A) *Conio.* #038 (B) *Eu.* #039

Conio. #038

圖十分別是 *Conio.* #038 真菌液態培養之乙酸乙酯萃取物 2 倍稀釋、10 倍稀釋及 50 倍稀釋對於人類肺癌細胞 A549、肝癌細胞 Huh7、Aortic smooth muscle cell 及 Neonatal rat heart endothelial cell 反應 24 及 48 小時之細胞毒性測試結果。由圖十 (A) 可以看出 2 倍稀釋的樣品對於 Neonatal rat heart endothelial cell 的毒殺性較弱，24 小時後細胞存活率仍有 80.3%，但是反應 48 小時後卻只剩下 46.7%；而對其他三種細胞的毒殺效果較大，其中又以對 A549 肺癌細胞的效果較好。圖十 (B) 是 10 倍稀釋樣品，可以看出依舊對於 Neonatal rat heart endothelial cell 的毒殺性較弱；對於 Huh7 的毒殺效果最好，在 24 小時細胞存活率只剩下 25.8%，48 小時後剩 19.9%。至於 50 倍稀釋的樣品加入細胞後 24 小時 (圖十 (C))，對於 A549、Huh7 及主動脈血管細胞的毒殺性相異不大，約為 65-68% 左右；而 48 小時後便有較明顯的毒殺效果出現，以 Huh7 細胞存活率 31.1% 為最低；而對於 Neonatal rat heart endothelial cell 的毒害性依舊較小。由於 Aortic smooth muscle cell 的生長速率較 Neonatal rat heart endothelial cell 快，推測樣品當中可能含有對於生長較快的細胞 (癌症細胞及肌肉細胞) 具有毒性之物質，在醫療方面與用於癌症治療上的藥物有相似的現象。

Eu. #039

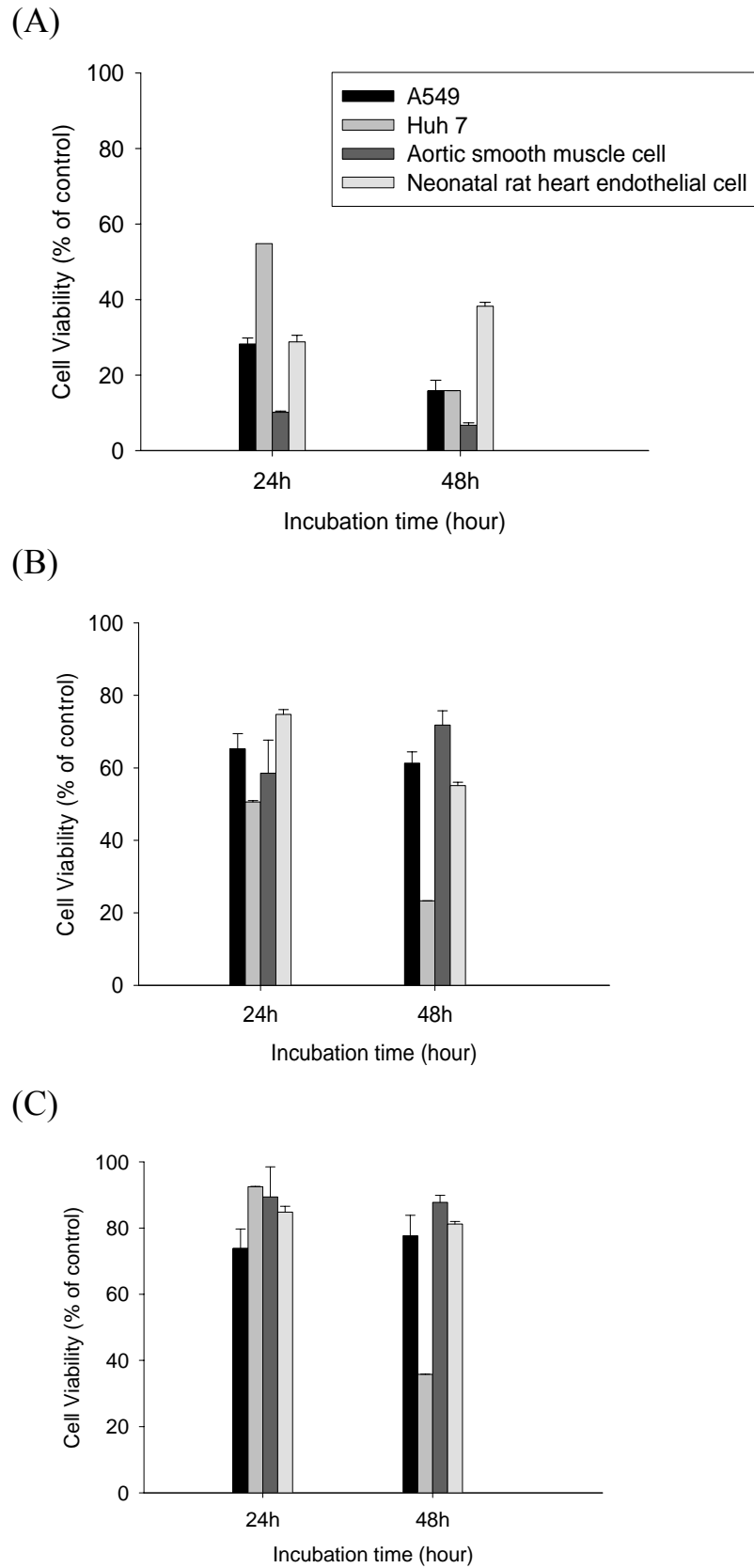
圖十一 (A) 是代表 2 倍稀釋的 *Eu.* #039 真菌液態培養後乙酸乙酯萃取物質細胞毒性測試。在加入後 24 小時觀察到對於正常細胞其毒害性較癌細胞強，推測應該也是因為樣品濃度太高所導致。圖十一 (B) 表示萃取物質 10 倍稀釋後對於人類肝癌細胞 Huh 7 的毒害性較其他三者強，於 48 小時更趨明顯。而 50 倍稀釋的樣品 (圖十一 (C)) 在 24 小時之後對於四種細胞存活率皆大於 70%，但在 48 小時之後可以看到 Huh 7 細胞存活率只剩 35.8%，而其餘三者只有下降 2% 左右，A549 還有升高的趨勢。由圖十和十一可以知道 *Conio.* #038 液態培養之乙酸乙酯萃取物不但對於癌症細胞毒性較 *Eu.* #039 強，且在正常細胞方面也較不容易造成毒害性，因此更具研究意義。



圖十、內生真菌 *Conio.* #038 乙酸乙酯萃取物質對四種細胞之毒性測試。

(A) 萃取物質 2 倍稀釋 (B) 10 倍稀釋 (C) 50 倍稀釋

Fig. 10. The cytotoxic assay of ethyl acetate extracts from endophytic fungi *Conio.* #038 for four cell. (A) two fold diluted (B) ten fold diluted (C) fifty fold diluted.



圖十一、內生真菌 *Eu.* #039 乙酸乙酯萃取物質對四種細胞之毒性測試。

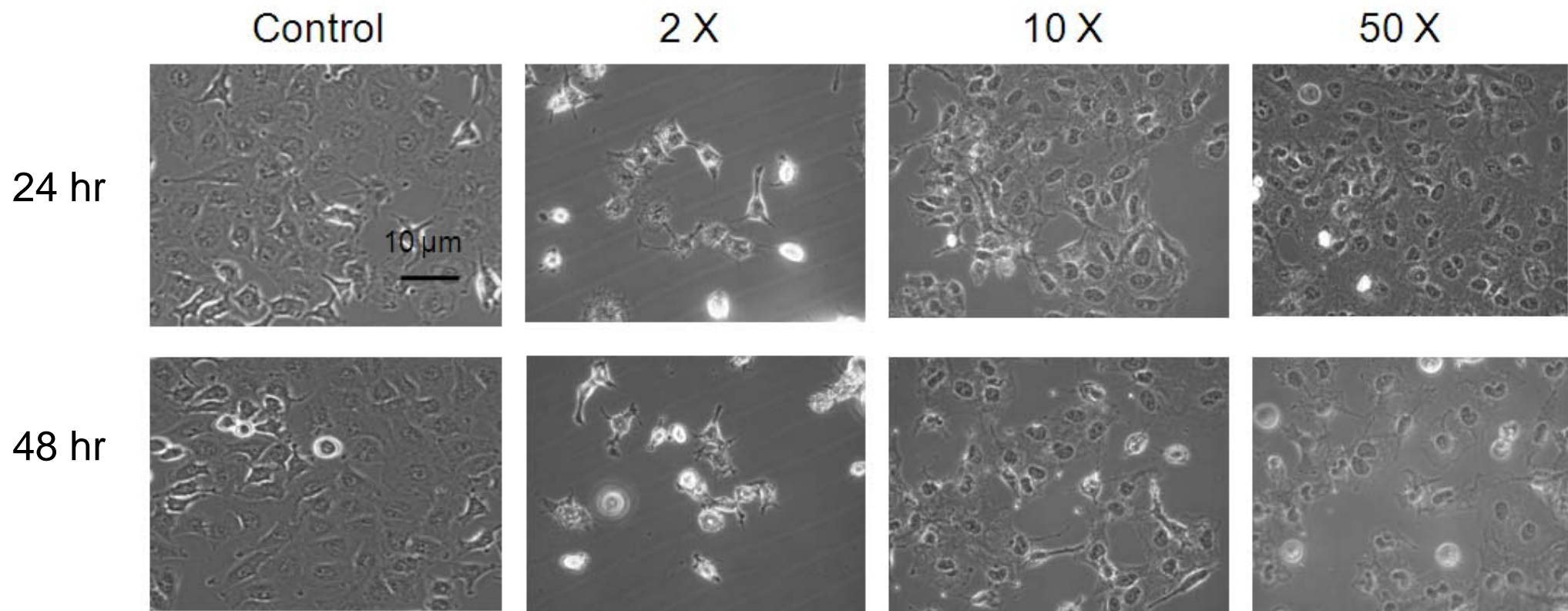
(A)萃取物質兩倍稀釋 (B)十倍稀釋 (C)五十倍稀釋

Fig. 11. The cytotoxic assay of ethyl acetate extracts from endophytic fungi *Eu.* #039 for four cell. (A) two fold diluted (B) ten fold diluted (C) fifty fold diluted.

(二) 細胞形態之變化

在細胞型態及數目方面，圖十二是 *Conio.* #038 真菌液態培養 5 天後乙酸乙酯萃取物質，加入人類肺癌細胞 A549 後反應 24 或 48 小時，觀察細胞改變的現象(200X)。如圖十二 (A) 所示加入 2 倍稀釋樣品的細胞無論是 24 或 48 小時，數目明顯比控制組減少，且型態也變成較細長狀；10 倍及 50 倍相對控制組細胞數目較少，型態也稍稍改變但並沒有像 2 倍稀釋般的嚴重。而依控制組的細胞經過 24 及 48 小時數目增加及型態沒有改變，可以推測處理組的細胞數目及型態改變是樣品所造成而不是細胞本身因生理週期老化所導致。

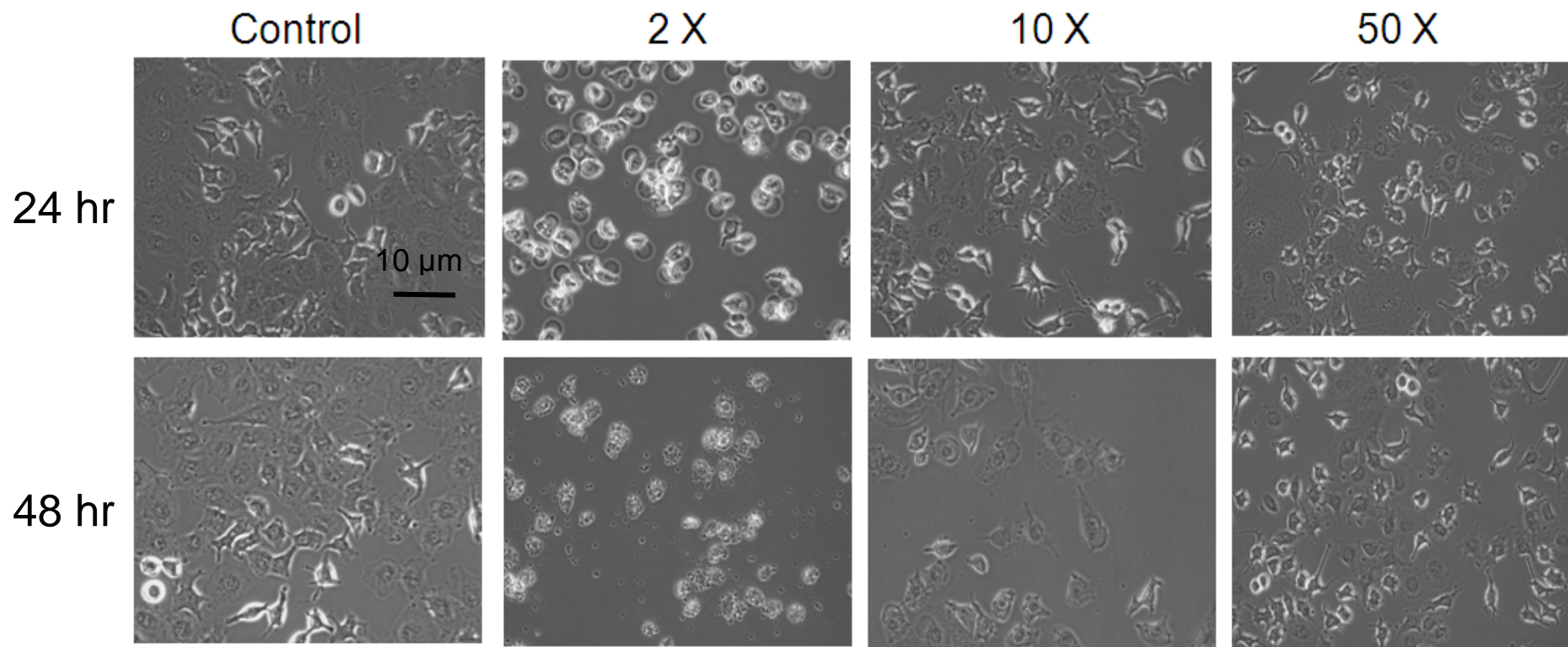
圖十三則是 *Eu.* #039 液態培養萃取物質對 A549 細胞毒性之細胞形態圖(100X)，由於放大倍率較小可以較容易看的出大範圍細胞型態的改變，從 (A) 2 倍稀釋樣品來看，在顯微鏡下明顯可以看出細胞加藥後 24 小時，細胞型態呈現較圓的狀況，由於細胞若是走向細胞凋亡途徑，外型會有起飽呈圓球狀的現象，所以結果表示 *Eu.* #039 之萃取物質會造成 A549 走向細胞凋亡的可能性增加。而 10 倍稀釋的樣品，就細胞數目而言在加藥 24 小時細胞數有比控制組較少，但 48 小時細胞數也有增加的現象，可能是因為藥效已被稀釋所導致不持久。50 倍稀釋的樣品便與控制組差異性不大。



圖十二、內生真菌 *Conio.* #038 萃取物質加入 A549 細胞 24 及 48 小時之細胞型態圖。

Fig. 12. The A549 cell morphologies of endophytic fungi *Conio.* #038 ethyl acetate extracts for 24 and 48 hours.

Bar = 10 μm



圖十三、內生真菌 *Eu.* #039 萃取物質加入 A549 細胞 24 及 48 小時之細胞型態圖。

Fig. 13. The A549 cell morphologies of endophytic fungi *Eu.* #039 ethyl acetate extracts for 24 and 48 hours.
Bar = 10 µm

五、內生真菌液態培養之乙酸乙酯萃取物抑菌測試

實驗結果對四種病原性細菌沒有抑菌環的生成，表示用液態培養後再用乙酸乙酯萃取出物質當中可能並不包括抑制細菌生長的活性，也許是因為固態與液態培養所走的代謝途徑不相同，產生不同的代謝物質所導致的結果。

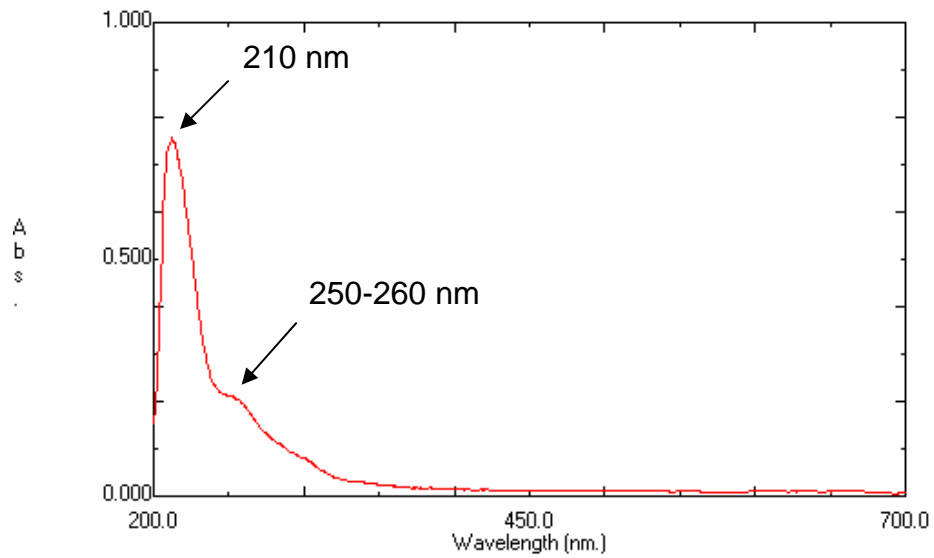
六、細胞毒性有效成分之分離

由於 *Conio.* #038 毒殺細胞能力優於 *Eu.* #039，為進一步瞭解其中有效成分，將 *Conio.* #038 之培養液以乙酸乙酯萃取後，再以半製備型 HPLC 分離。

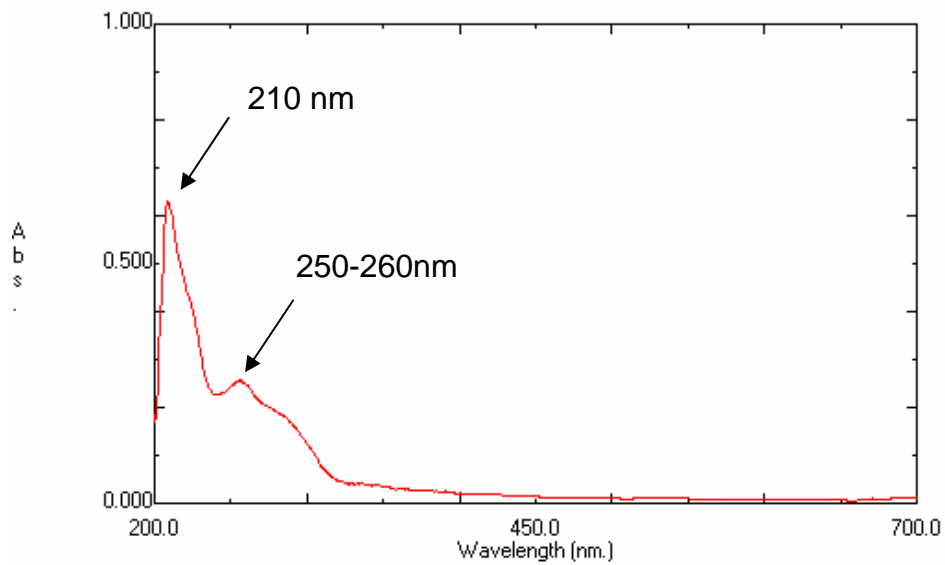
(一) 全光譜分析

由圖十四可知 (A) *Conio.* #038 與 (B) *Eu.* #039 之乙酸乙酯萃取液在波長 210 nm 處有最大吸光值，而 *Eu.* #039 除了在 210 nm 處有最大吸光值外，在約 250 nm 處有另一吸收波峰，由於環狀化合物的吸光區域在此，推測可能含有環狀化合物的存在。

(A)



(B)



圖十四、內生真菌 *Conio.* #038 及 *Eu.* #039 液態培養五天乙酸乙酯萃取物復溶於甲醇之紫外光-可見光光譜圖。

(A) 038- *Coniothyrium sp.* (B) 039- *Eupenicillium brefeldianum*

Fig. 14. UV-visible spectrum of the ethyl acetate extracts for endophytic fungi which redissolved in methanol 038 and 039 which incubated in liquid culture for five days.

(A) 038- *Coniothyrium sp.* (B) 039- *Eupenicillium brefeldianum*

(二) HPLC 第一次分析及細胞毒性測試

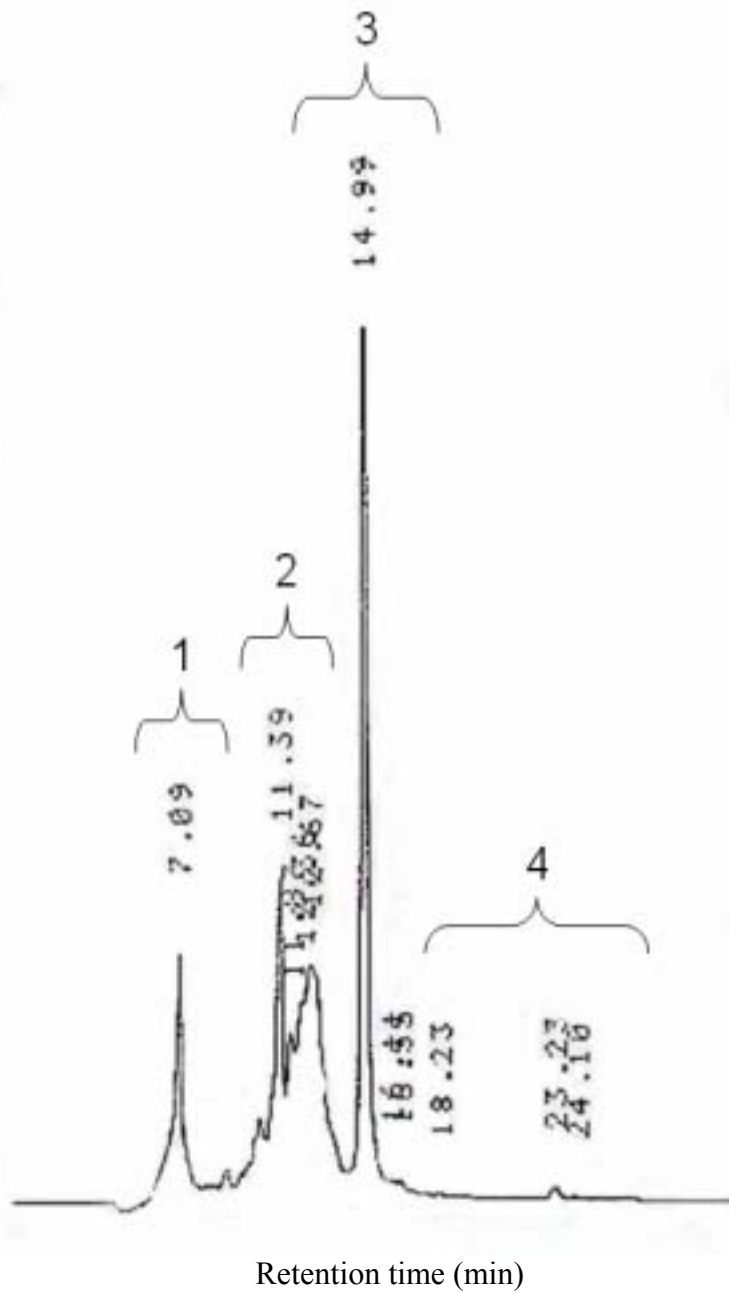
經 HPLC 分析後發現 Eu. #039 (圖十六) 所含物質較 *Conio.* #038 (圖十五) 複雜許多，且與 BFA 分析圖 (圖十七) 相比較發現並沒有 BFA 存在，因此之後實驗便以 *Conio.* #038 為主要探討對象。

將 HPLC 的吸光值定為 210 nm。將 *Conio.* #038 萃取物質以 HPLC 分析過後分成四個區域，如圖二十三分別為 Fraction 1 (7-10 min)、Fraction 2 (10-14 min)、Fraction 3 (14-17) min 及 Fraction 4 (17-26 min)。在四個收集區的抑菌測試結果並沒有發現其具抑制病原性細菌的作用。但就表十可知除了第一及第四區域較無抑制效果外，第二及三區域均有抑制癌細胞的效果，就兩者相比以 Fraction 3 的抑制兩種人類癌症細胞的效果較佳；對 A549 而言，樣品濃度到 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 時細胞存活率仍有明顯抑制效果(79.16%)；而對 Huh7 來說樣品濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ，細胞存活率仍只有 60.61%。

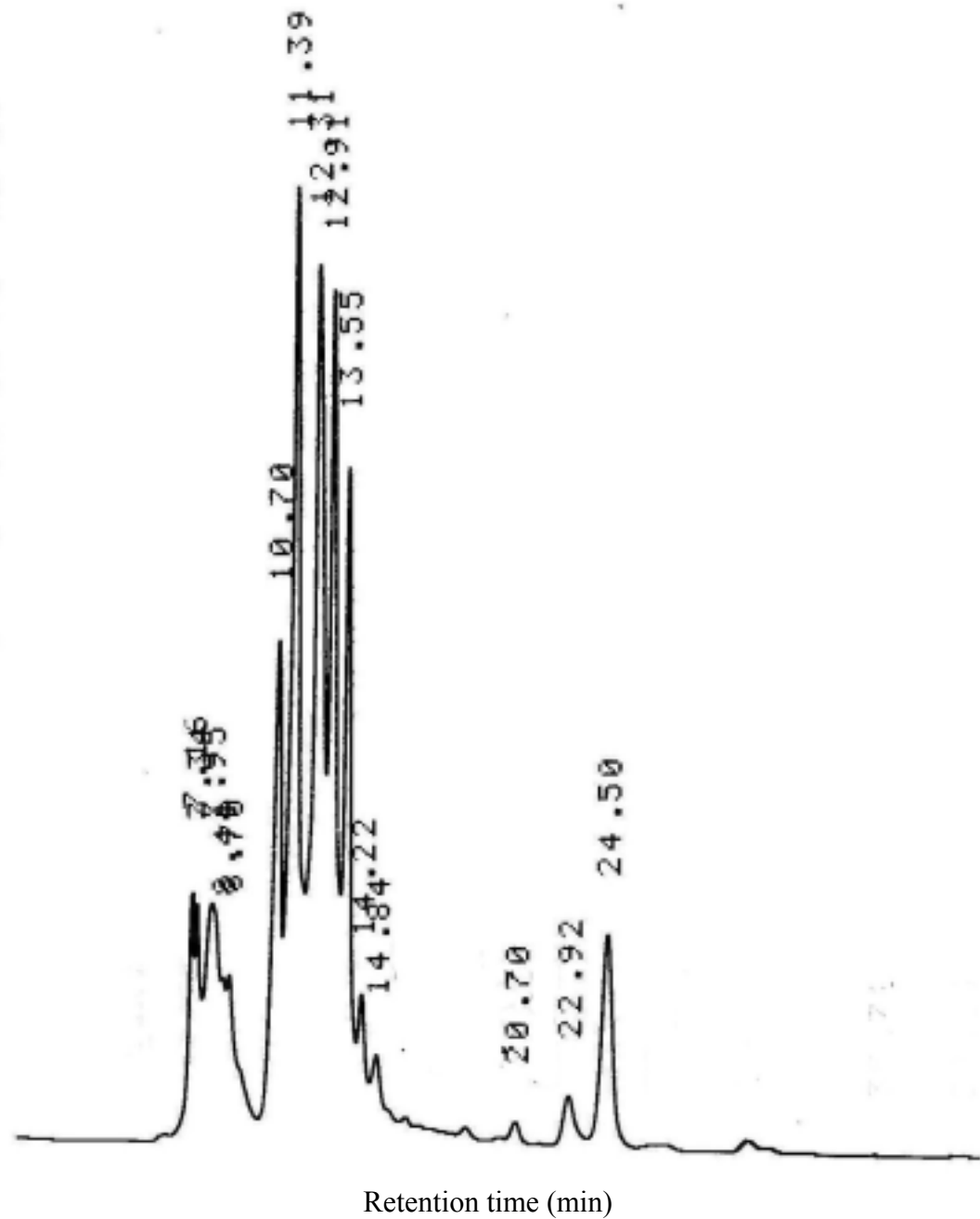
由於填充在 HPLC 管柱內的 C-18 膠體屬於非極性，表示其會抓住非極性物質，若使用高極性沖提液會使極性物質較快通過管柱而被偵測到，因此利用 C-18 管柱進行 HPLC 分析 *Conio.* #038 萃取物質後所得對於癌症細胞具有較強毒殺性之 Fraction 3 因為被偵測到的時間較晚，推測應屬於較非極性物質，之後將 Fraction 3 再作一次 HPLC 分析進行純化。

(三) Fraction 3 經 HPLC 分離 (第二次 HPLC 分離)

圖十八為 *Conio.* #038 Fraction 3 之 HPLC 分析圖，可以看到在 19.74 分鐘處一個較單獨的 peak，而 19 分鐘以前的物質經比對後發現應該是 Fraction 2 所殘留下來的，因此不列入收集範圍；由於 MeOH 的極性較 Acetonitrile 高，因此在 MeOH 當作沖提液的分析可以看到此 peak 會比用 Acetonitrile 當沖提液者較慢被偵測到。選定圖中 19.74 分鐘處的物質命名為 Compound 1，大量收集凍乾製成粉末後再進行細胞毒性測試。



圖十五、內生真菌 *Conio.* #038 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。
 Fig. 15. The HPLC analysis of the endophytic fungi *Conio.* #038 ethyl acetate extracts that incubated in liquid culture for five days.



圖十六、內生真菌 *Eu.* #039 液態培養五天乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析。
 Fig. 16. The HPLC analysis of the endophytic fungi *Eu.* #039 ethyl acetate extracts that incubated in liquid culture for five days.



圖十七、Brefeldin A (BFA) 標準品 1 mg/ml 之 HPLC 分析圖。
Fig. 17. HPLC analysis of BFA. BFA = 1 mg/ml.

表五、內生真菌 *Conio.* #038 乙酸乙酯萃取物其 HPLC 初步產物之細胞毒性測試。

Table 5. The cytotoxic assay for HPLC product of *Conio.* #038 ethyl acetate extracts.

(A) A549 (Control cell number = 47.5×10^4 cells/ml)

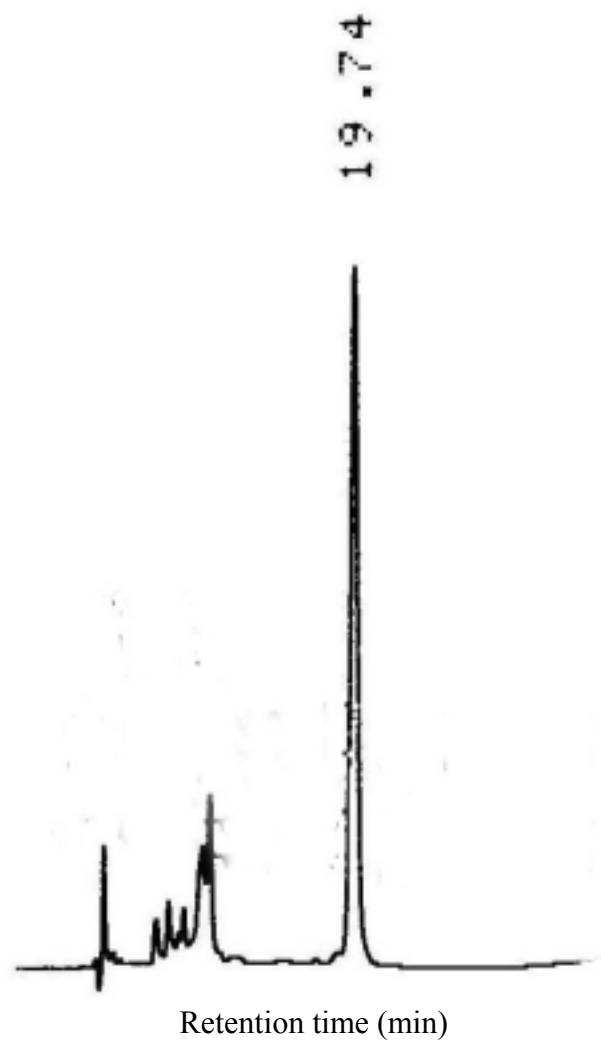
		Fraction powder concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
Fraction		100	10	5.0	2.5	1.0
1	Cell number	47.1 \pm 0.05	-	-	-	-
	Viability (%)	98.6	-	-	-	-
2	Cell number	30.3 \pm 0.12	41.9 \pm 0.12	46.7 \pm 0.16	-	-
	Viability (%)	63.79	88.21	98.32	-	-
3	Cell number	33.5 \pm 0.07	35.7 \pm 0.12	37.6 \pm 0.04	45.9 \pm 0.12	47.2 \pm 0.02
	Viability (%)	70.53	75.6	79.16	96.63	99.37
4	Cell number	46.4 \pm 0.02	-	-	-	-
	Viability (%)	97.68	-	-	-	-

(B) Huh 7 (Control cell 數 = 35.8×10^4 cells / ml)

		Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
Fraction		100	10	5.0	2.5	1.0
1	Cell number	35.3 \pm 0.04	35.2 \pm 0.08	-	-	-
	Viability (%)	98.6	98.32	-	-	-
2	Cell number	16.5 \pm 0.01	17.3 \pm 0.01	20.9 \pm 0.38	24.4 \pm 0.03	30 \pm 0.06
	Viability (%)	46.09	48.32	58.38	68.16	83.8
3	Cell number	10.2 \pm 0.06	13.1 \pm 0.04	16.7 \pm 0.04	18.8 \pm 0.14	21.27 \pm 0.29
	Viability (%)	28.49	36.95	46.65	52.51	60.61
4	Cell number	35.5 \pm 0.07	-	-	-	-
	Viability (%)	99.16	-	-	-	-

細胞數 = $\times 10^4$ cells / ml

- : not tested



圖十八、內生真菌 *Conio.* #038 液態培養五天乙酸乙酯萃取物的第三個區域之 HPLC 分析。

Fig. 18. The HPLC analysis that the third fraction of the endophytic fungi *Conio.* #038 ethyl acetate extracts that incubated in liquid culture for five days.

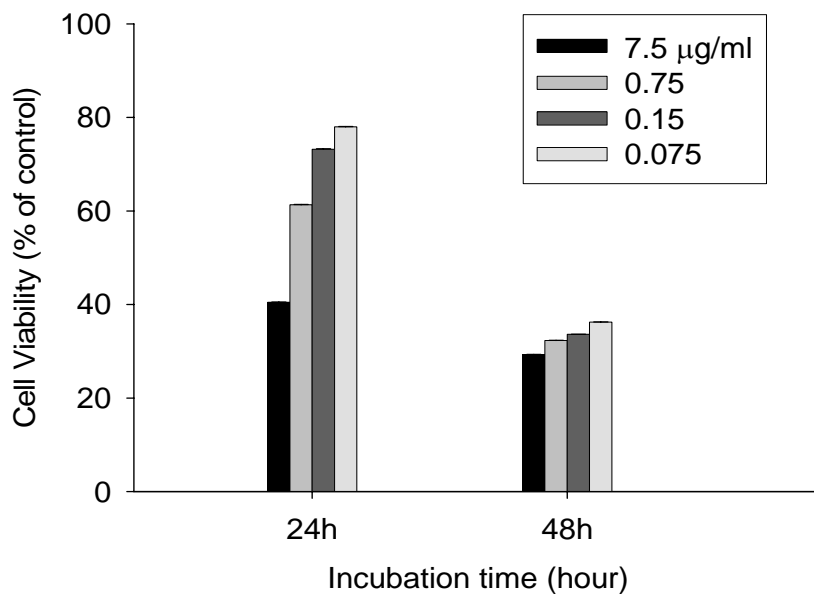
(四) Compound 1 之細胞毒性測試

對於人類腫瘤細胞 A549 及 Huh7 之細胞毒性如圖十九及二十所示，其中加入 Compound 1 後 24 小時，對 A549 而言在濃度 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 時的存活率為 40.48%，而到了 0.15 及 0.075 $\mu\text{g/ml}$ 這兩個濃度的存活率相去不遠，一個是 73.21% 另一個是 77.98%；而反應 48 小時後四種濃度的存活率皆約 30-40% 左右。

對於 Huh7 在樣品加入後 24 小時濃度 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 其細胞存活率為 36.23%，0.15 $\mu\text{g/ml}$ 則是 52.9%，0.075 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 兩者分別是 80.43% 及 85.51%；而 48 小時後除了 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 的存活率降至 17.73% 其他三者皆約在 35-40% 左右，表示 Compound 1 對於 Huh 7 的毒性較 A549 高。

(五) Compound 1 之 DAPI 染色結果

觀察加入 Compound 1 的細胞經過 24 及 48 小時反應後是否進行 apoptosis 現象。結果發現在作用 24 小時之後，A549 (圖二十一) 及 Huh7 (圖二十三) 細胞便已經有細胞核內 DNA 皺縮 (DNA condensation) 及片段化 (DNA fragment) 的現象產生。而在 48 小時處 (圖二十二與二十四) 細胞數減少很多且 DAPI 的量並沒有增加，原因可能是由於染的是存活細胞，而 48 小時後大部分已經進行 apoptosis 的細胞，會漂浮在培養基上，因此可能在清洗過程中流失掉，因此之後再由流式細胞儀來輔助證實細胞凋亡的現象。

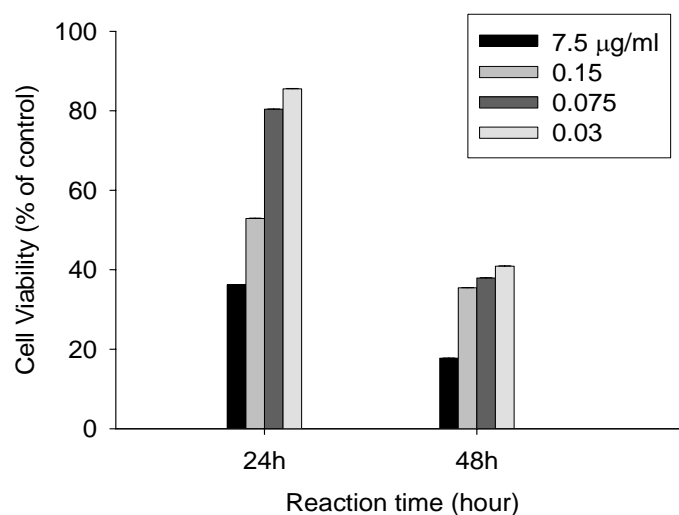


圖十九、Compound 1 對人類肺癌細胞 A549 之細胞毒性作用。

Fig. 19. The cytotoxic assay of compound 1 for A549.

24 hour Control cell number= 33.6×10^4 cells/ml.

48 hour Control cell number= 445.8×10^4 cells/ml.

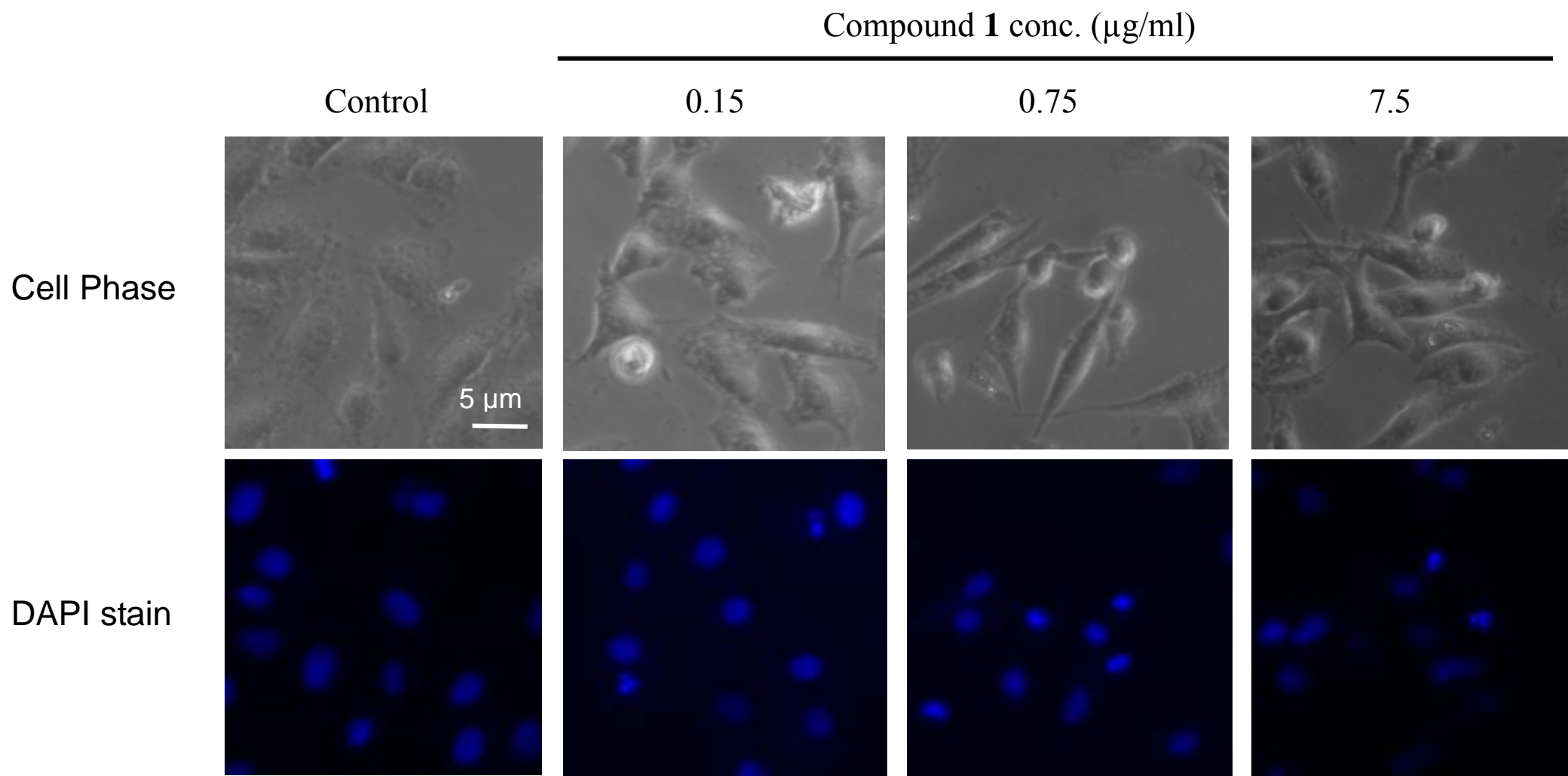


圖二十、Compound 1 對人類肝癌細胞 Huh 7 之細胞毒性作用。

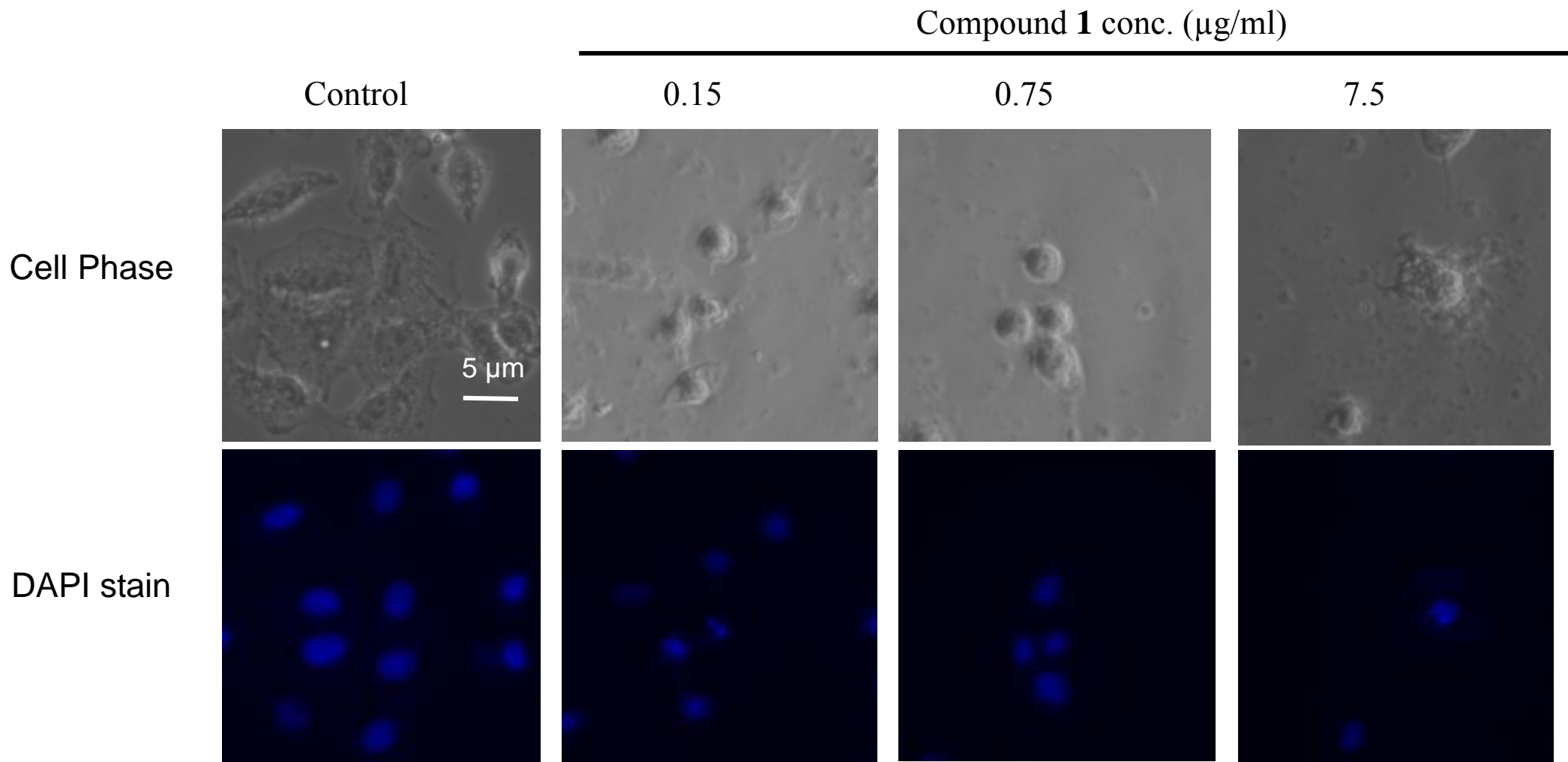
Fig. 20. The cytotoxic assay of compound 1 for Huh 7.

24 hour Control cell number= 25.6×10^4 cells/ml.

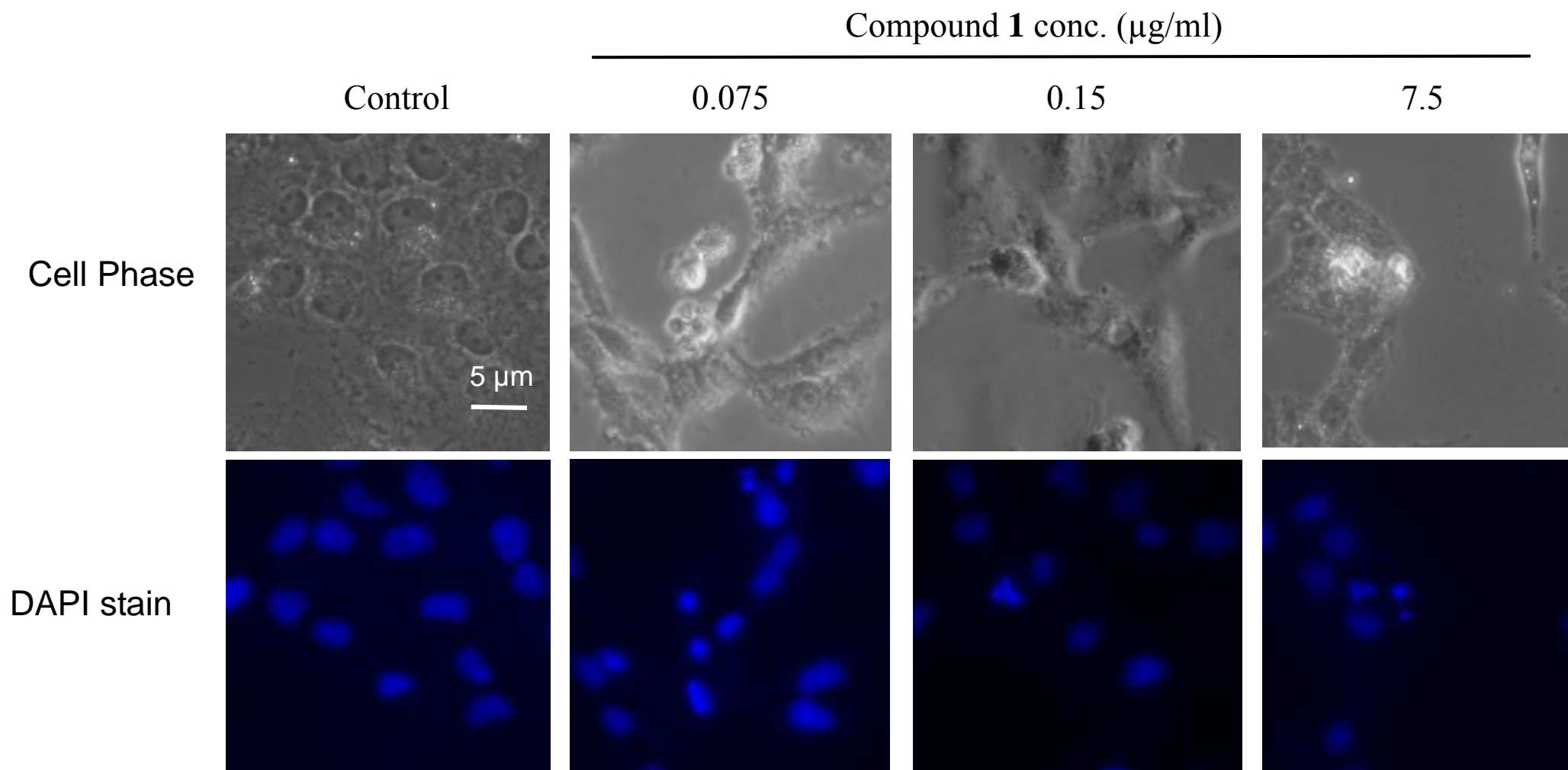
48 hour Control cell number= 40.6×10^4 cells/ml.



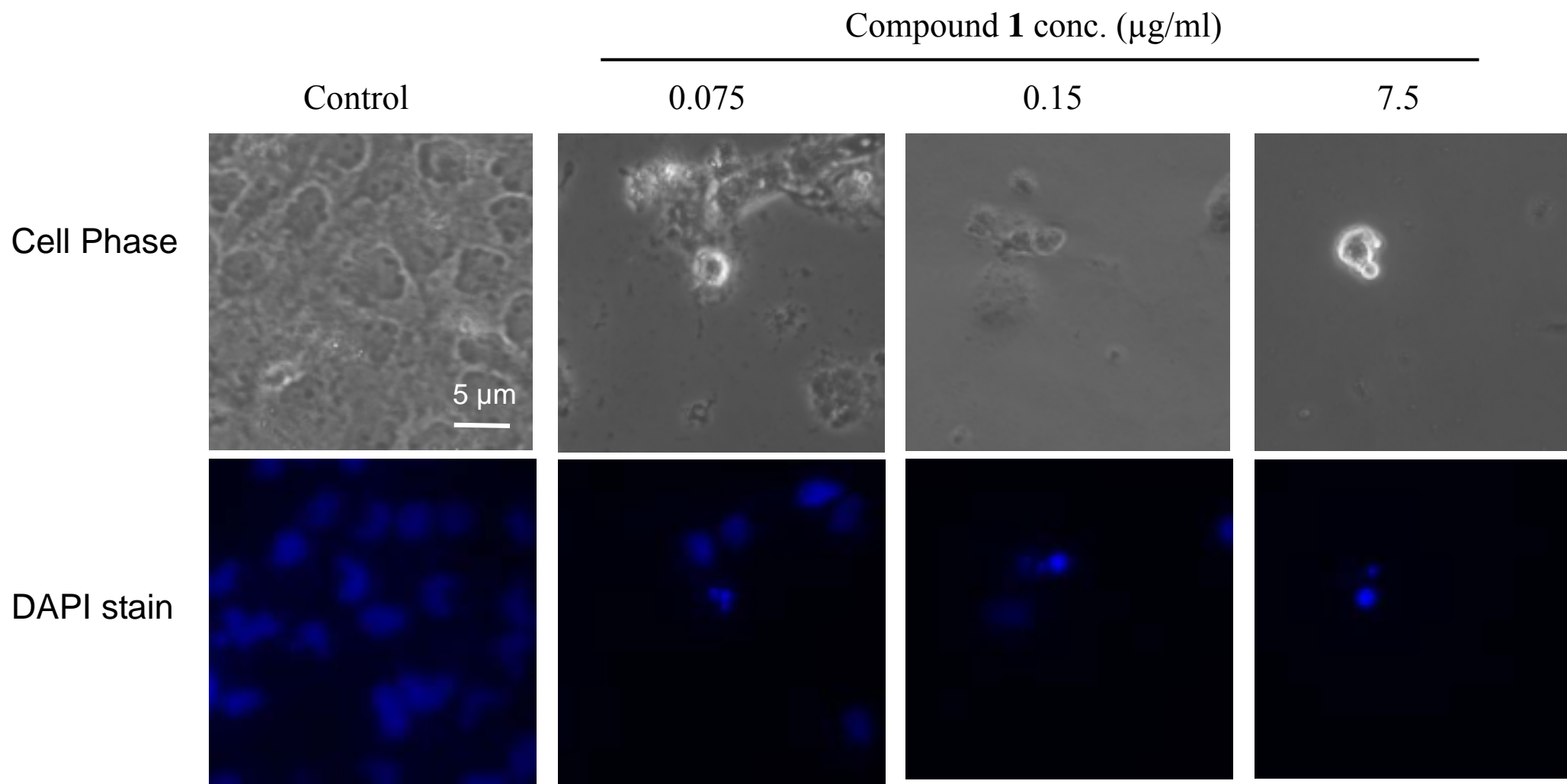
圖二十一、Compound **1** 加入 A549 中反應 24 小時之 DAPI 染色圖。
Fig. 21. DAPI stain of A549 that added with compound **1** for 24 hours. Bar = 5 μm .



圖二十二、Compound **1** 加入 A549 中反應 48 小時之 DAPI 染色圖。
Fig. 22. DAPI stain of A549 that added with compound **1** for 48 hours. Bar = 5 μm .



圖二十三、Compound 1 加入 Huh 7 中反應 24 小時之 DAPI 染色圖。
 Fig. 23. DAPI stain of Huh7 that added with compound 1 for 24 hours. Bar = 5 μm .



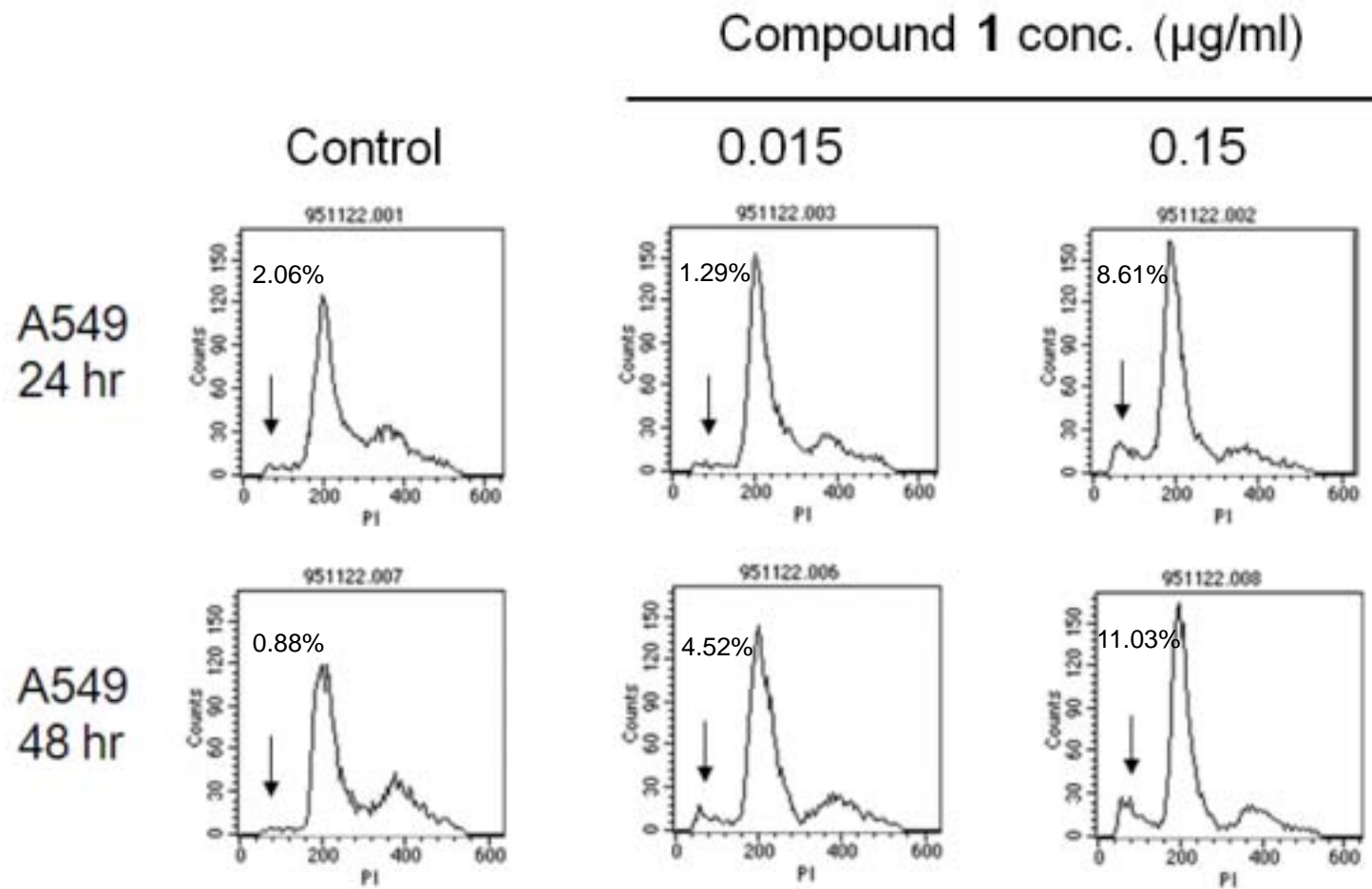
圖二十四、Compound **1** 加入 Huh 7 中反應 48 小時之 DAPI 染色圖。
Fig. 24. DAPI stain of Huh7 that added with compound **1** for 48 hours. Bar = 5 μm .

(六) Compound 1 之細胞週期停滯階段

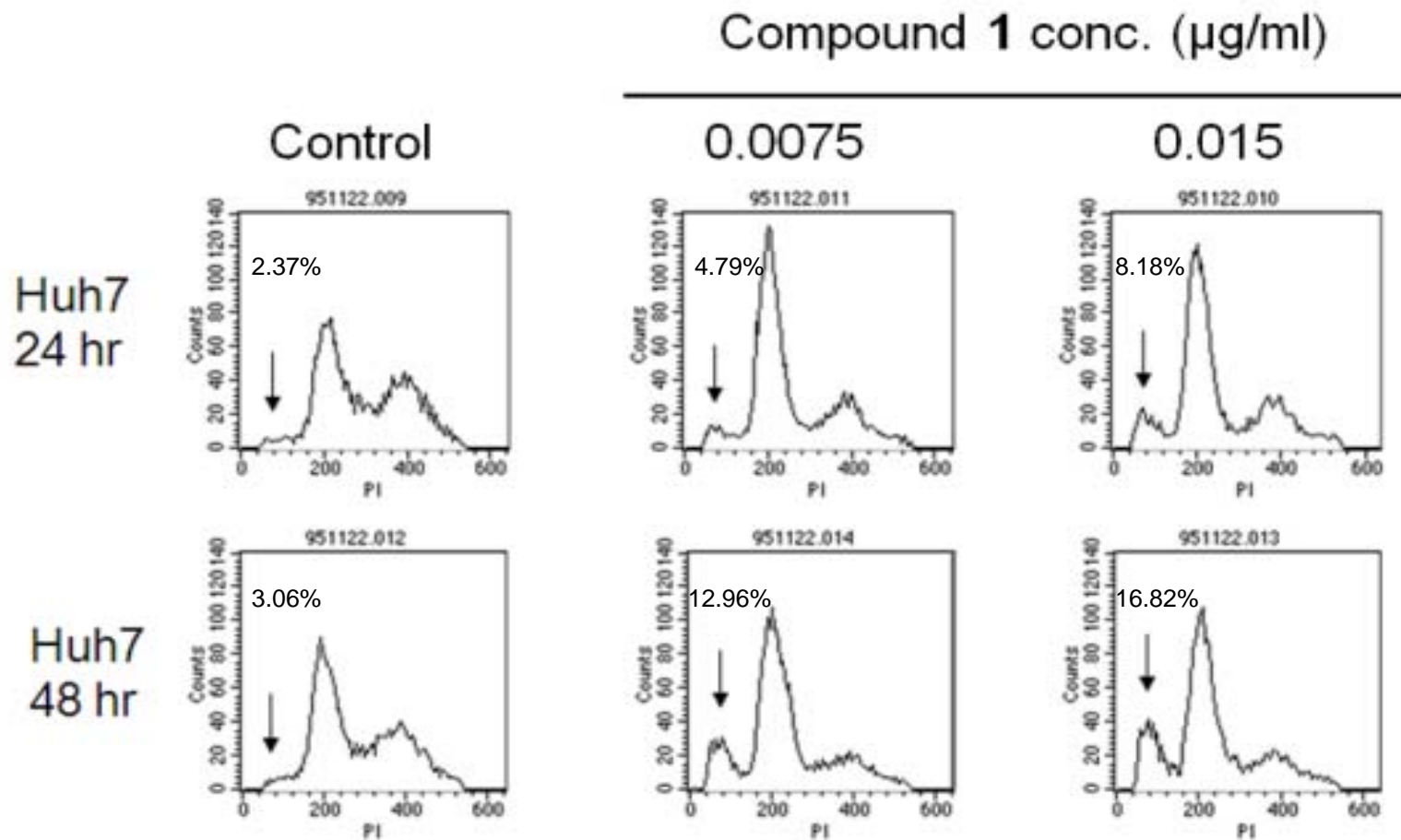
由圖二十五中可以看的出，與控制組相比 (sub G1: 2.06%，箭頭處)，Compound 1 濃度為 0.015 μ g/ml 時，加藥 24 小時後可能進行細胞凋亡之 A549 細胞會顯示於圖中 sub G1(箭頭處)，比例為 1.29%，這表示此處的細胞之細胞核內染色體並未被剪切；而濃度為 0.15 μ g/ml 時，sub G1 的比例明顯增加到 8.61%，表示已經有些細胞之染色體與藥物作用而被剪切成小於 2N 的片段，表示 Compound 1 有可能會使細胞走向細胞凋亡。而 48 小時越趨明顯，濃度 0.15 μ g/ml 之處理組其 sub G1 的比例已提高至 11.03%。

圖二十六則是 Huh7 的情形，同樣與控制組相比 (sub G1: 2.73%)，Compound 1 的濃度為 0.0075 μ g/ml，加藥 24 小時可以看出 sub G1 的量已有增高的趨勢，約 4.79%，而加入 0.015 μ g/ml 濃度時則提高為 8.18%，；而當加入後 48 小時，便與控制組差異較大，濃度 0.0075 μ g/ml 及 0.015 μ g/ml，已有 12.96%及 16.82% 的細胞染色體被剪切成小於 2N 的片段。

由於 Huh7 使用的 Compound 1 濃度幾乎是 A549 的十倍稀釋但效果仍然顯著，因此可以知道 Compound 1 對於 Huh7 的毒性較 A549 強。從細胞週期測試的結果更加可以推測 Compound 1 可能會誘導人類肺癌及肝癌細胞進行自發性細胞凋亡。



圖二十五、Compound 1 對 A549 反應 24 及 48 小時後之細胞週期測定。
 Fig. 25. The cell cycle of A549 that added to compound 1 for 24 and 48 hours.



圖二十六、Compound 1 對 Huh7 反應 24 及 48 小時後之細胞週期測定。
 Fig. 26. The cell cycle of Huh 7 that added to compound 1 for 24 and 48 hours.

七、內生真菌 038 活性物質之結構式鑑定

(一) 全光譜分析

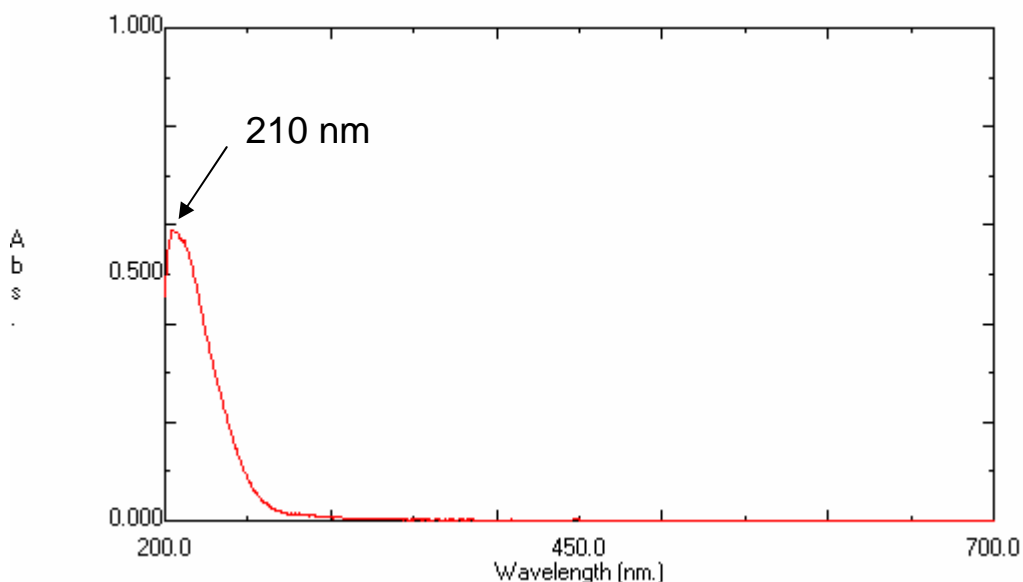
圖二十七是 Compound 1 之全光譜掃描結果，發現在 210 nm 處有最大吸光值，因為在 250-260 nm 沒有發現吸光值，排除了含有類似苯環及異元環結構式的推測，而可能有雙鍵及羰基的存在。

(二) IR 吸收光譜分析

由圖二十八顯示橫軸是官能基被吸收光的波數 ($\text{cm}^{-1} = 1/\lambda$)，縱軸是波數的強度 (%)，發現在 Compound 1 上含有 OH 基及-CO 基的波數存在。

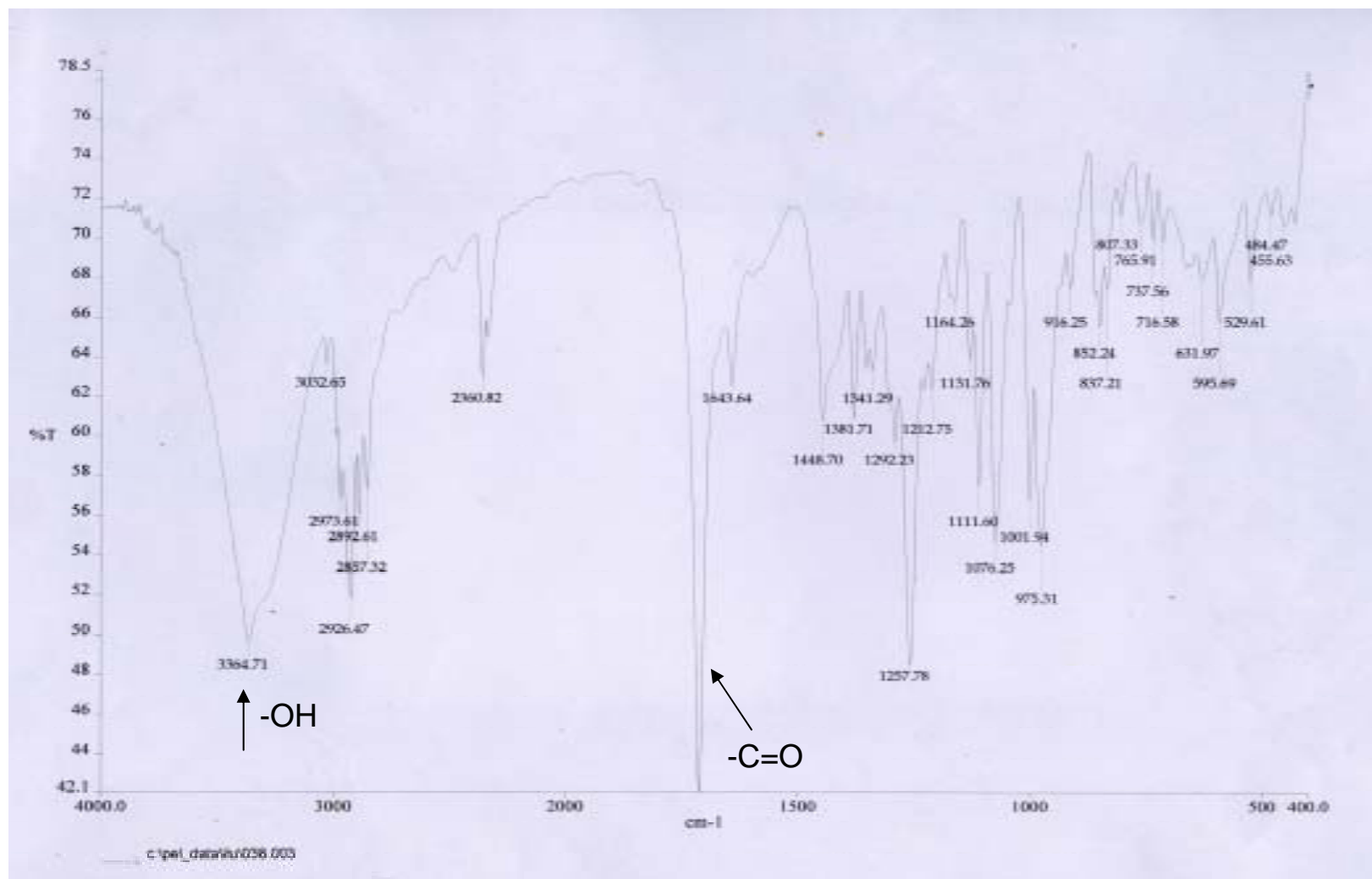
(三) NMR- ^1H 譜

由圖二十九顯示化學位移 δ 5.81 及 7.45 各有雙鍵結構的存在。由於與 Conio.#038 同屬的 *Coniothyrium minitans* 中已經得知有 Macrosphelide A 這種抗真菌化合物的存在 (McQilken *et al.*, 2003)，在文獻中也提到其結構式 (附圖六) 也是不具苯環，而含有 OH 基、羰基及雙鍵的存在，未來可經過更進一步的分析來判斷其結構式。

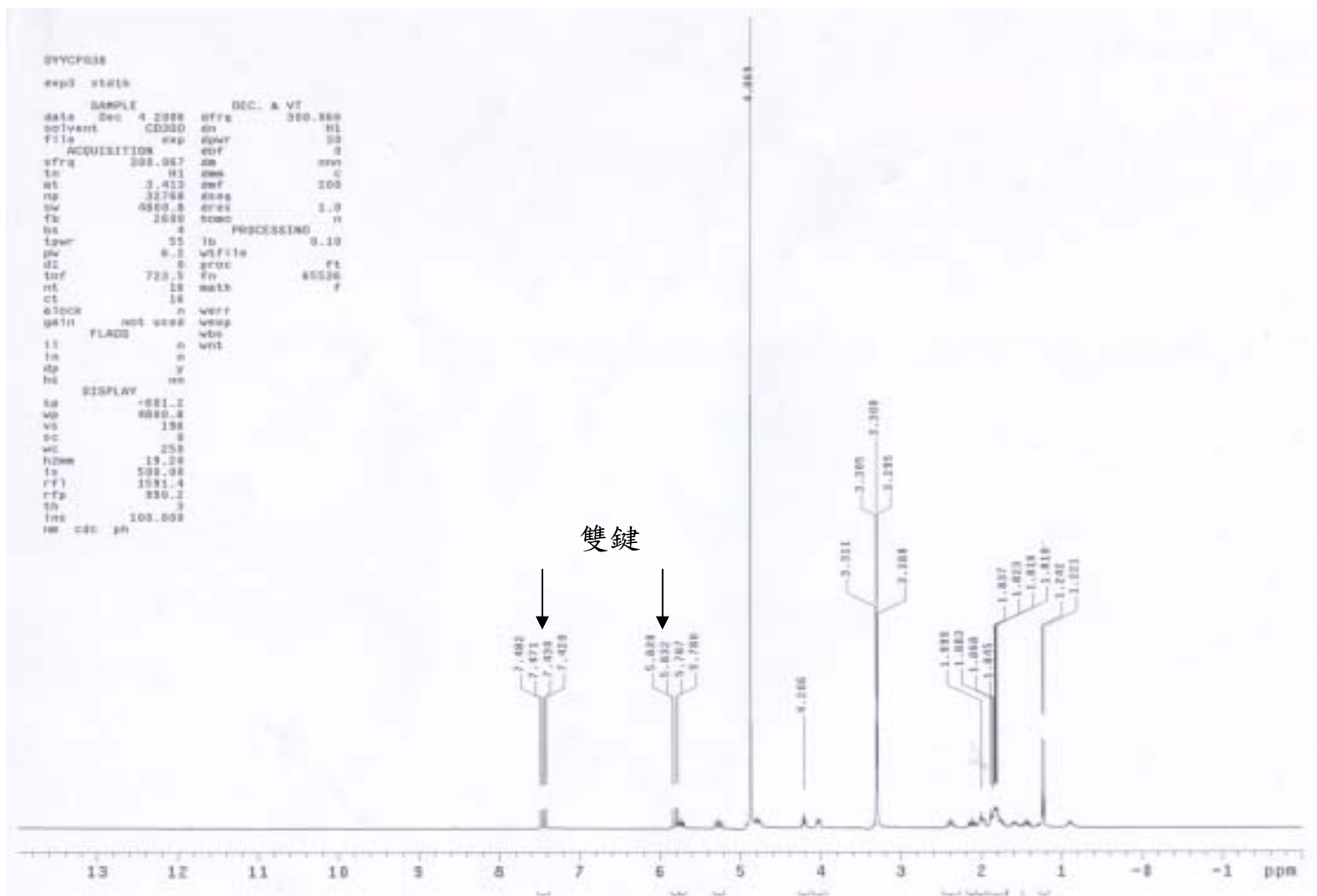


圖二十七、Compound 1 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig. 27. UV-visible spectrum of Compound 1.



圖二十八、Compound 1 之 IR 光譜圖。
Fig. 28. IR spectrum of Compound 1.



圖二十九、Compound 1 之 ¹H-NMR 光譜圖。
 Fig.29. ¹H-NMR spectrum of Compound 1.

伍、結論

本實驗從內生真菌 *Coniothyrium sp.* 及 *Eupenicillium brefeldianum* 藉由培養了解其二次代謝物質中包含具有抑制病原細菌與真菌之活性，再經細胞毒性測試發現這些物質雖然對正常細胞具傷害性，但對人類癌症細胞其毒殺性更強。而從 *Coniothyrium sp.* 分離所得到的代謝化合物發現對於人類肝癌及肺癌細胞皆具抑制效果，其中又以對肝癌細胞的傷害更大。由流式細胞儀及免疫染色方法也得知可能會誘導肝癌細胞走向細胞凋亡途徑，表示此化合物可以使人類肝癌細胞產生一連串自發性的死亡，在利用藥物治療癌症的過程此為重要的現象，具有發展成抗癌藥物之可能性。未來可針對此化合物進行內生真菌培養基組成份之探討，達到產量提高之效應；對於抑制癌症細胞方面可以針對更多種癌症細胞做一系列毒性程度的探討，也可利用分生技術找出其誘導細胞凋亡的原因及途徑為何，而對正常細胞安全性之問題也必須加以評估。內生真菌 *Coniothyrium sp.* 之固態培養方面未來可利用 HPLC 分離純化具有抑菌效果的活性物質，分析其結構式，將來可以朝向研發新抗生素的方向作探討。

陸、參考文獻

- 文才藝，吳元華，田秀玲。2004。植物內生真菌研究進展及其存在問題。生態學雜誌。23，86–91。
- 任安芝，高玉葆。2001，植物內生真菌-一類應用前景廣闊的資源微生物。微生物學通報。28，90–93。
- 李飛，李春杰。2006。內生真菌對禾草類植物抗旱性的影響。草葉科學。23，57–62。
- 宋朝霞，邢苗，曾憲錄。2000。細胞鬆弛素 B 對多頭絨泡菌有絲分裂的影響。遺傳學報。1，83–89。
- 邱德有，黃美娟，方曉華等。1994。一種雲南紅豆杉內生真菌的分離。真菌學報。37，417–424。
- 柯勇。1992。*Botryosphaeria dothidea* 引起的梨輪紋病。植保會刊 34：342。
- 馬天有，董兆麟。1999。植物分離產紫杉醇的內生真菌的研究。西北大學學報。29，47–49。
- 袁國芳。1997。新生物技術在真菌分類鑑定之應用。食品工業 微生物分類鑑定專輯。
- 曾松榮，王海坤，徐成東。2001。抗癌藥用植物內生真菌的潛在應用價值。韶關學院學報。22，123–126。
- 張玲琪，孫曉鵬，樓家鳳。1997，對鳶尾新鮮根狀莖發酵生香的微生物研究。雲南大學學報。19，362–365。
- 黃勝忠，蔡奇助，許謙信。2001。利用 PCR 選殖菊花 rDNA 之內轉錄間隔區。台中區農業改良場研究彙報。71，57–68。
- Agee C, Hill N, 1994. Ergovaline variability in *Acremonium*-infected tall fescue due to environment and plant genotype. *Crop Sci.* 34, 221 – 226.
- Carrol GC. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In Fokkema N.J. and van den Heuvel J. eds. *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press 205 – 222.
- Chen G, Lin Y, Wen L, Vrijmoed LLP, Gareth-Jones EB, 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron.* 59, 4907 – 4909.

- Chen Y. J, 2001. Studies on antimicrobial substances of the fungus THL. M.S. thesis, Tunghai University, Taichung, Taiwan (in Chinese with English abstract).
- Clay K, 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses; their potential as biocontrol agents. *Mycol. Res.* 92, 1 – 12.
- Dai JR, Carte' B, Sidebottom P, Sek AL, Ng S, Huang Y, Butler M, 2001. Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. *J. Nat. Prod.* 64, 125 – 126.
- Furusawa M, Hashimoto T, Noma Y, Asakawa Y, 2005. Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene by biotransformation. *Chem. Pharm. Bull.* 53, 1515 – 1514.
- Gunatilaka AAL., 2006. Natural products from plant-associated micro-organisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* 60, 509 – 526.
- Harri E, Loeffler W, Sigg HP, Tamm H, 1963. Über die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* DODGE. *Helv. Chim. Acta.* 46, 1235–1243.
- Haldar S, Chintalli J, Croce CM, 1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cell. *Cancer Res.* 56, 1253 – 1255.
- Hensens OD, Ondeyka JG, Dombrowski AW, Ostlind DA, Zink DL, 1999. Isolation and structure of Nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Lett.* 40, 5455 – 5458.
- Hofmann H, Choi SM, Wilsmann-Theis D, Horre R, de Hoog GS, Bieber T, 2005. Invasive chromoblastomycosis and sinusitis due to *Phialophora verrucosa* in a child from northern Africa. *Mycoses.* 48, 456 – 461.
- Horn WS, Simmonds MSJ, Schwartz RE, Blaney WM, 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron.* 51, 3969 – 3978.

Kimura Y, Kusano M, Koshino H, Uzawa J, Fujioka S, Tani K, 1996. Penigequinolones A and B, pollen growth-inhibitors produced by *Penicillium* sp. No. 410. *Tetrahedron Letters*. 37, 4961 – 4964.

Kuldau GA, Yates IE, 2000. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In *Microbial Endophytes* (Bacon, C. W., White, J. F., eds), 85 – 117. Mareel Dekker. New York.

Lewis FJ, 1924. An endotrophic fungus in the Coniferae. *Nature*. 114, 860.

Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, Strobel GA, 2001. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*. 54, 463 – 468.

Li JY, Strobel GA, 2001. Jesterone and hydroxyl-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochem*. 57, 261 – 265.

Li Y, Song YC, Liu JY, Ma YM, Tan RX, 2005. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World J. Microbiol. Biotech*. 28, 553 – 558.

Lin SW, 2005. Studies on antimicrobial substance of endemic endophytic fungi. M.S. thesis, Tunghai University, Taichang, Taiwan (in Chinese with English abstract).

McCloud TG, Burns MP, Majadly FD, Muschik GM, Miller DA, Poole KK, Roach JM, Ross JT, Leberz WB, 1995. Production of brefeldin-A. *J Ind Microbiol*. 15, 5 – 9.

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

Ondeyka JG, Helms GL, Hensens OD, Goetz MA, Zink DL, Tsipouras A, Shoop WL, Slayton L, Dombrowski AW, Polishook JD, Ostlind DA, Tsou NN, Ball RG, Singh SB, 1997. Nodulisporic Acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. 119, 8809 – 8816.

Robertshaw H, Higgins E, 2004. Cutaneous infection with *Alternaria tenuissima* in an immunocompromised patient. *Br J Dermatol.* 153, 1047 – 1049.

Schmeda-Hirschmann G, Hormazabal E, Astudillo L, Rodriguez J, Theoduloz C, 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotech.* 21, 27 – 32.

Song YC, Huang WY, Sun C, Wang FW, Tan RX, 2005. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-R001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasmineoides*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 506 – 509.

Stierle AA, Stierle DB, Bugni T, 2001. Sequoiatones C-F, constituents of the redwood endophyte *Asperfillus parasiticus*. *J. Nat. Prod.* 64, 1350 – 1353.

Stierle A, Strobel G, Stierle D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science.* 260, 214 – 216.

Stierle DB, Stierle AA, Bugni T, 2003. Sequoiamonascins A-D: Novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte. *J. Org. Chem.* 68, 4966 – 4969.

Strobel GA, Miller RV, Miller CM, Condrón MM, Teplow DB, Hess WM, 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungi *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiol.* 145, 1919 – 1926.

Strobel G, Yang XS, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM, 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol.* 142, 435 – 440.

Turbyville T J, Kithsiri-Wijeratne EM, Liu MX, Burns AM, Seliga CJ, Luevano LA, David CL, Faeth SH, Whitesell L, Leslie-Gunatilaka AA, 2006. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the sonoran desert. *J. Nat. Prod.* 69, 178 –

184.

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

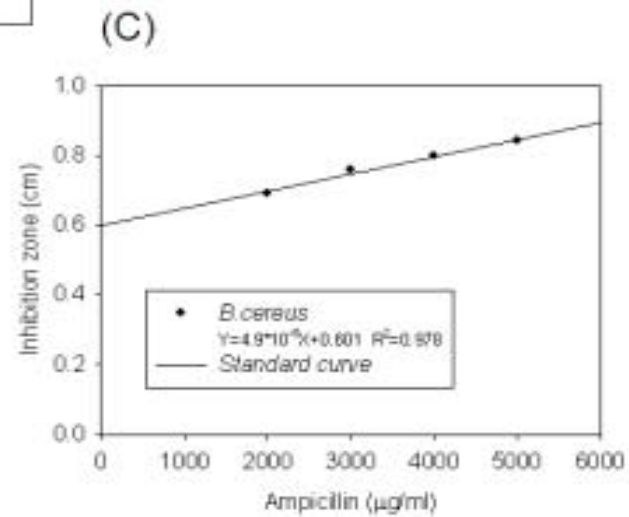
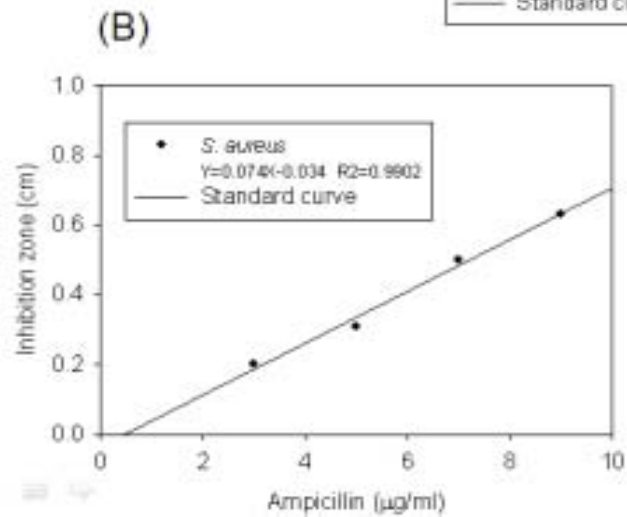
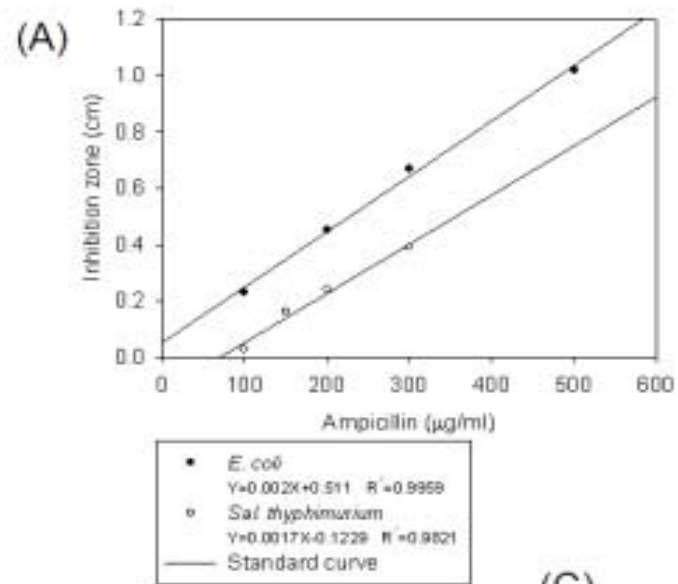
Wang J, Huang Y, Fang M, 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34, 51 – 57.

Weber D, Sterner O, Anke T, Gorzalczancy S, Martino V, Acevedo C, 2004. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibio.* 57, 559 – 563.

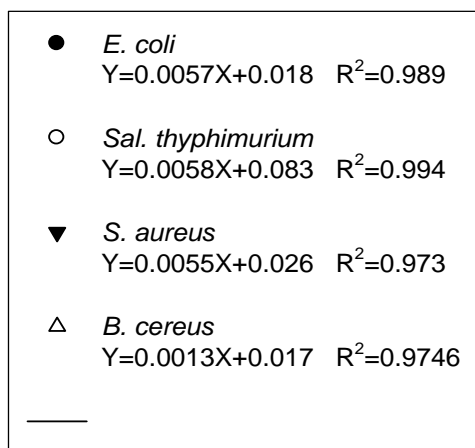
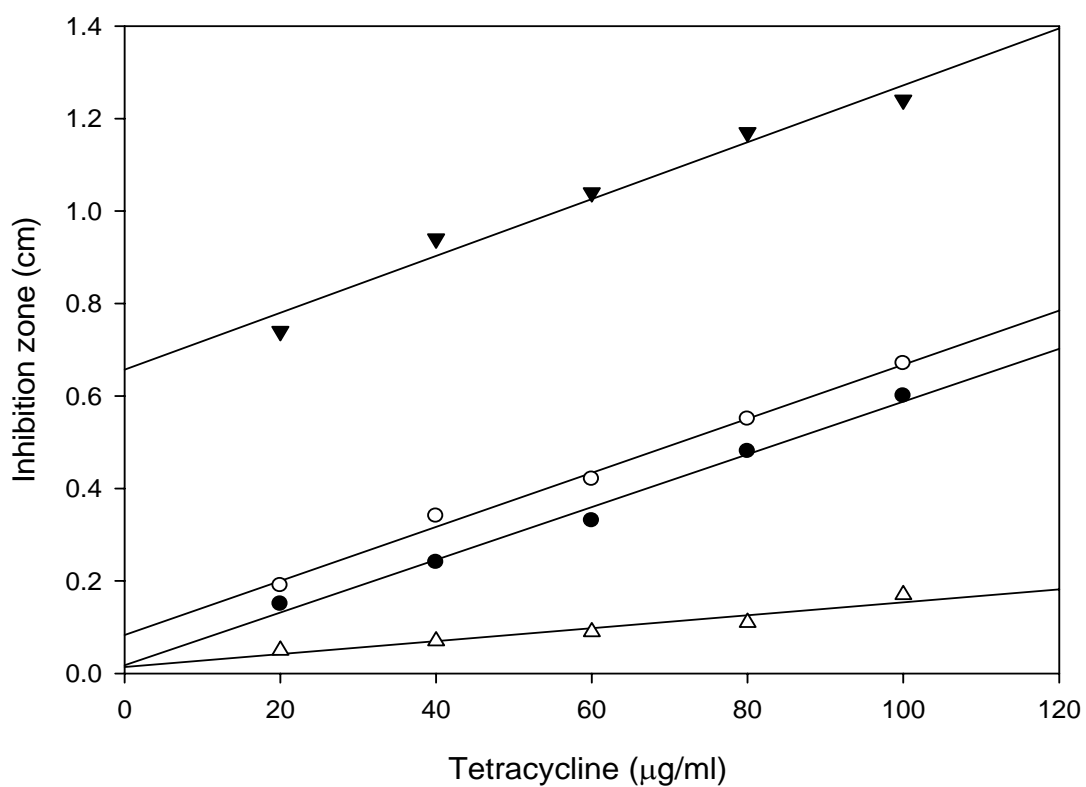
Weber RWS, Stenger E, Meffert A, Hahn M, 2004. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? *Mycol. Res.* 108, 662 – 671.

附錄一、實驗儀器

- 一、單門式高壓滅菌釜 (YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD. Model : YMT)。
- 二、pH meter (EUTECH instruments, Cyberscan 510, Singapore)。
- 三、恆溫培養箱
 - (一) 低溫恆溫培養箱 (KS, R.O.C)。
 - (二) 恆溫培養箱 (Sanyo, Janpen)。
- 四、離心機
 - (一) 低溫離心機 (Hettich, Japen)。
 - (二) 高速冷凍離心機 (Hettich, Model : MIKRO 22R, Germany)。
 - (三) 桌上型微中量高速離心機 (Hettich, Germany)。
- 五、顯微鏡
 - (一) 位像差光學顯微鏡 (Olympus BH-2, Japen)。
- 六、超過濾裝置
 - (一) 50 ml 和 10 ml 超過濾裝置 (Amicon®, Model : 8200, U.S.A.)。
 - (二) 3,000 和 500 M.W.超過濾膜 (Millipore, U.S.A.)。
- 七、無菌濾紙圓片 (Wescor, U.S.A.)。
- 八、打孔器 (Taiwan)。
- 九、FestPrep® Instrument (BIO 101, U.S.A.)。
- 十、分光光度計 (Beckman, U.S.A.)。
- 十一、聚合酶連鎖反應器 (GeneAmp, U.S.A.)。
- 十二、小型水平電泳設備 (Bio-Rad, U.S.A.)。
- 十三、紫外燈箱 & 照相設備 (Vilber Lourmat, France)。
- 十四、烘箱 (Risen, Taiwan)。
- 十五、均質機 (Osterizer, U.S.A.)。
- 十六、數字式超音波洗淨機 (Power sonic405, Korea)。
- 十七、減壓濃縮裝置 (RE111, Buchi, Switzerland)。
- 十八、冷凍乾燥旋轉濃縮機 (VV2000, Heidolph, Germany)。
- 十九、HPLC (High performance liquid chromatography)
 - (一) L-6200A Intelligent Pump (Hitachi, Japan)。
 - (二) L-4200 UV-Vis Detector (Hitachi, Japan)。
 - (三) D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi, Japan)。
 - (四) 分析型管柱
Hypersil HS C18 5u 250×4.6 mm (Thermo, U.S.A.)。
 - (五) 半製備型管柱
Hypersil HS C18 8u 250×10 mm (Thermo, U.S.A.)。



附錄二、不同濃度的 Ampicillin 對四種病原性細菌之抑菌環大小。(A) *E. coli* and *Sal. Thyphimurium* (B) *S. aureus* (C) *B. cereus*.



附錄三、不同濃度的 Tetracycline 對四種病原性細菌之抑菌環大小。