

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

總計畫名稱：高多酚類含量之原生種蔬菜的生物活性評估

子計畫一：數種高多酚含量原生種蔬菜的抗菌性功效評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN 9804

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

計畫主持人：陳淑芬

共同主持人：邱淑媛

計畫參與人員：



執行單位：保健營養系

中華民國九十九年二月二十四日

摘 要

使用亞洲蔬菜研究中心提供的香蓼、酸模、香椿、辣木(M-02)、辣木(M-28)等原生種蔬菜的水、甲醇萃出物評估抗菌性功效，真菌抑菌試驗結果：香椿的甲醇萃出物對四種真菌均有抑制作用，酸模及香椿的水萃出物對四種真菌均無抑制作用；其中以 *Aspergillus fumigatu* 對五種甲醇萃出物的感受性為最顯著，而酸模的甲醇萃出物對煙麴黴菌的最低抑制濃度最低。細菌抑菌試驗結果：酸模與辣木之水萃出物對於高菌株濃度、低菌株濃度皆有抑制環產生，香蓼之甲醇萃出物及香椿之水萃出物完全不具抗菌性，大腸桿菌對所有萃出物均不具感受性；以香椿之甲醇萃出物轉溶於 DMSO 之最低抑制濃度最低，辣木之水萃出物次之。

關鍵字：真菌感受性測試、細菌感受性測試、濾紙錠擴散法、最低抑菌濃度。



多酚類化合物普遍存在於自然界的植物體內，其生物活性更具有多樣性，包括：(1)有抗炎性作用、(2)與維生素 C 有協同的效果，增強維生素 C 的效用、(3)有抗動脈粥狀硬化作用的活性、(4)有抗菌、抗真菌的作用、(5)可促進腸內微生物合成葉酸、(6)有抗癌的作用等；亞洲蔬菜研究發展中心 (Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC) 提供 30 種基源穩定之原生種蔬菜，其中不乏有多酚類含量高、抗氧化能力強的物種，由於原生種蔬菜遺傳性質安定、性質同一，比起一般蔬菜更具研究價值。

近年來，由於廣效抗生素、激素、化療和免疫抑制劑的普遍應用，真菌感染的發病率日益增加，但目前臨床上應用的西藥抗真菌藥物，均存在著療效差、毒性大等缺點，尋找廣用、高效、低毒的抗真菌新物質已成為研究的熱點，特別是從植物中尋找抗真菌有效成分，已成為公認的重要研究方向。過去 20 年已相繼

發展出抗黴菌藥物感受性試驗的標準程式，提高了這類試驗的有效性以及再現性。在這些既有的基礎上，本研究擬利用真菌感受性試驗評估數種高酚含量蔬菜的抗真菌功效，期能篩選抗真菌有效成分，作為未來合成抗真菌藥物的基礎。

在開發中國家，細菌引起的疾病例如感染或食物中毒嚴重威脅人類的健康，真菌則會造成局部性的感染或引起致命的全身性感染；另一方面，由食品病原菌引起的食物中毒則嚴重威脅個體的生命安全，特別是在醫療資源有限的開發中國家情況更是嚴重。若能就地利用現有的材料改善食品安全，將顯著提高居民的生活品質。有鑑於此，本研究擬就這些蔬菜對食品病原菌之抗菌能力進行評估，測定其抗菌圖譜(spectrum)及最低抑制濃度(minimal inhibition concentration)，提供原生種蔬菜抗菌的基礎數據。



一、高多酚原生種蔬菜

1. 試驗樣品

本研究測定樣品為香蓼 (A2)、酸模 (A3)、香椿 (A4) 與辣木 (A5 與 A6) 之甲醇萃出物及酸模 (A9)、香椿 (A10) 與辣木 (A11 與 A12) 之水萃出物均由亞洲蔬菜研究發展中心楊瑞玉博士提供。萃出物之製備方式如下：秤取 2.0 g 乾燥樣品分別以 50 mL 甲醇 (甲醇萃出物) 或 50 mL 去離子水 (水萃出物) 均質，再以 27,000 \times g 於 10°C 離心 10 分鐘後收取上清液⁽¹⁾，保存於 -30°C 備用。

2. 濾紙錠製備

將萃出物吸附於 8mm 無菌濾紙錠上，於無菌操作台中風乾，待溶劑完全揮發後進行抑制環測定。每片濾紙錠中萃出物之乾重如表一所示。

二、真菌抑菌試驗

1. 菌株選擇

選用白色念珠菌 (*Candida albicans*)、新型隱球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、紅色毛癭菌 (*Trichophyton rubrum*) 及煙麴黴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 等常見的致病性真菌作為試驗菌株。

2. 生長培養基的選擇與配製

使用 Yeast morphology agar (YM)、Sabouraud's glucose medium (SA) 及 Czapek-Dox medium (CzA)，分別製成平板培養基及培養液，作為接種上述試驗菌株的培養基。

3. 真菌感受性測試—濾紙錠擴散法

取 100 μL 生長至指數期 (log phase) 的菌液，分別塗抹於 YM、SA 或 CzA 平板培養基，再將滴加有 100 μL 不同濃度的蔬菜萃出物之無菌圓型濾紙片貼於已塗抹菌液的培養基表面，置於最適溫度 (25°C) 培養箱中培養，分別於 24 小時、48 小時及 72 小時觀察並測量形成的抑制環大小，判斷待測樣品的抑菌能力，每一實驗組至少做三重複。

4. 最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentrations, MICs) 測定

選用上述試驗結果中對四種真菌具有抑制作用的原生種蔬菜萃出物，參考 NCCLS 方法⁽²⁾ 於 96 孔微量培養盤中進行，將上述產生抑制環之原生種蔬菜萃出物進行 2 倍系列稀釋成不同濃度，加入定量已生長至指數期的真菌並培養，其中白色念珠菌及新型隱球酵母以目視法 (V) 檢視⁽³⁾ 混濁度，紅色毛癭菌及煙麴黴菌以倒立顯微鏡檢視生長情形，判讀 24 小時最低抑菌濃度，每一實驗組二重複。

三、細菌抑菌試驗

1. 細菌感受性測試—濾紙錠擴散法

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、沙門氏菌(*Salmonella enterocitica*)、蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)，保存於-80°C 含 30%甘油之 nutrient broth (1.05443, Merck) 中。使用前於 nutrient agar 上畫線培養，再挑取單一菌落懸浮於 nutrient broth 中，於 37°C 培養 4~8 小時，以無菌生理食鹽水緩衝溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)適當稀釋至 1×10^7 cfu/plate 與 1×10^4 cfu/plate 後，塗抹於 Nutrient agar 上。將濾紙錠貼附於平板上，於 37°C 培養 24 小時，測量抑制環之半徑(mm)。

2. 最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentrations, MICs) 測定

依照 Andrews⁽⁴⁾ 所描述的方法，於 96 孔微量培養盤中進行，但使用 Mueller Hinton broth (275730, Difco) 取代 Iso-Sensitest broth 為測試培養基。將甲醇萃出物於室溫下減壓濃縮去除溶劑後，轉溶於相同體積 DMSO 中，以 0.22 μ L 濾膜 (Millexj GV, Millipore, Ireland) 除菌過濾。水溶性樣品以 0.22 μ L 濾膜 (Millex GS, Millipore, Ireland) 除菌過濾。於 96 孔微量培養盤之第 1 欄 (無菌控制組) 與第 2 欄 (對照組) 置入 75 μ L 無菌水，第 3~12 欄分別置入以無菌水 2 倍系列稀釋之樣品 75 μ L。於第 1 欄中加入 75 μ L Mueller Hinton broth。取事先於 37°C 培養於 nutrient broth 中 6~12 小時之待測菌液，以 Mueller-Hinton broth 稀釋至 1×10^5 cfu/mL 後，於第 2~12 欄中每孔中加入 75 μ L 菌液與待測樣品混合均勻，置於 37°C 培養 18~20 小時後，觀察菌液混濁度。肉眼判定無顯著生長之最高稀釋倍數所含之萃出物濃度，定義為最低抑菌濃度。

結 果

一、真菌抑菌試驗

1. 真菌感受性試驗

濾紙錠擴散試驗結果如表二，各種原生種蔬菜萃出物對四種病原性真菌的抑制作用分別是：香椿的甲醇萃出物對 *Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、

Trichophyton rubrum 及 *Aspergillus fumigatus* 均有抑制作用，酸模與辣木(M-02)的甲醇萃出物對 *Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans* 及 *Aspergillus fumigatus* 有抑制作用，香蓼及辣木(M-28)的甲醇萃出物只對 *Aspergillus fumigatus* 有抑制作用；其他各種水萃出物中僅辣木 (M-02)與辣木(M-28)的水萃出物對 *Trichophyton rubrum* 有抑制作用，酸模及香椿的水萃出物則對四種真菌皆無抑制作用。

2. 最低抑制濃度 (MIC) 測定

反應結果如表三所示，以酸模的甲醇萃出物對 *Aspergillus fumigatus* 抑制濃度最低，其它甲醇萃出物對真菌的抑制濃度大多介於 2.75 ~ 3.50 mg/ml 之間；另外僅辣木的水萃出物對 *Trichophyton rubrum* 具有抑制作用，但需要較高的濃度。

二、細菌抑菌試驗

1. 細菌感受性測試

各種試驗菌株之抑制環半徑示如表四與表五。就萃出物而言，香蓼之甲醇萃出物及香椿之水萃出物完全不具抗菌性。就測試菌株而言，在高菌株濃度 (1.0×10^7 cfu/plate) 下僅有酸模與辣木之水萃出物有抑制環產生，但在低菌株濃度 (1.0×10^4 cfu/plate) 時，酸模及香椿之甲醇萃出物，以及辣木之水萃出物對金黃色葡萄球菌具有抑制性，酸模之甲醇及水萃出物對沙門氏菌具有抑制性，而除了香椿水萃出物及香蓼之外的其他萃出物，均對蘇力菌具有抑制能力。大腸桿菌對所有萃出物均不具感受性。

2. 最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentrations, MICs) 測定

將感受性測試反應中具有抑制環之萃出物以水進行 2 倍系列稀釋，測定最低抑菌濃度(MIC)，結果如表六所示，以香椿之甲醇萃出物轉溶於 DMSO 之 MIC 最小，辣木之水萃出物次之。

結 論

香椿的甲醇萃出物對四種真菌都有抑制作用，以 *Aspergillus fumigatus* 對 5 種甲醇萃出物的感受性最顯著，酸模及香椿的水萃出物則對四種真菌均無抑制作用；此外，酸模的甲醇萃出物對 *Aspergillus fumigatus* 的最低抑制濃度最低。

酸模與辣木之水萃出物對於高、低細菌濃度皆有抑制環產生，香蓼之甲醇萃出物及香椿之水萃出物完全不具抗菌性，大腸桿菌對所有萃出物均不具感受性；以香椿之甲醇萃出物轉溶於 DMSO 之最低抑制濃度最低。

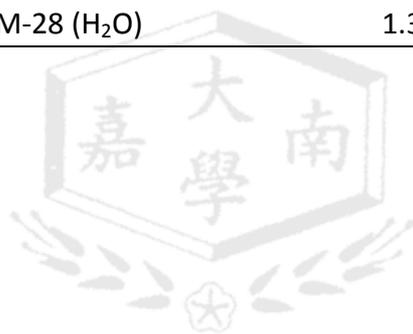
參考文獻

- (1) Yang RY, Tsou, SCS Lee TC, Wu WJ, Hanson PM, Kuo G, Engle LM and Lai PY. 2006. Distribution of 127 edible plant species for antioxidant activities by two assays. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 2395–2403.
- (2) National Committee of Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; M27 approved standard. 1997. Wayne, Pennsylvania NCCLS.
- (3) Pfaller MA, Messer SA and Coffmann S. 1995. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J. Clin. Microbiol.*, 33(5): 1094-1097.
- (4) Jennifer M. Andrews. 2001. Determination of minimal inhibitory concentrations. *J Antimicrobial. Chemotherapy*, 48(Suppl S1): 5-16.

表一 濾紙錠吸附之萃出物重量

Table 1. Dry matter contents of samples per paper disk

Code	Content	Dry matter (mg/disk)
A2	香蓼 (MeOH)	1.43±0.06
A3	酸模 (MeOH)	1.37±0.06
A4	香椿 (MeOH)	1.40±0.00
A5	辣木 M-02 (MeOH)	1.40±0.10
A6	辣木 M-28 (MeOH)	1.27±0.12
A9	酸模 (H ₂ O)	1.87±0.06
A10	香椿 (H ₂ O)	1.33±0.06
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)	1.33±0.06
A12	辣木 M-28 (H ₂ O)	1.37±0.12



表二 四種真菌對各種原生種蔬菜之水、甲醇萃出物的感受性試驗

Table 2. Susceptibility of four fungi in water and ethanol extracts of indigenous vegetables

編號	萃出物	抑制環半徑 (mm)			
		CA	CN	TR	AF
A2	香蓼 (MeOH)	—	—	—	3.0
A3	酸模 (MeOH)	1.0	1.5	—	13.0
A4	香椿 (MeOH)	2.0	2.0-2.5	1.0-2.0	10.0
A5	辣木 M-02 (MeOH)	1.0	1.5	—	7.0-8.0
A6	辣木 M-28 (MeOH)	—	—	—	7.0-9.0
A9	酸模 (H ₂ O)	—	—	—	—
A10	香椿 (H ₂ O)	—	—	—	—
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)	—	—	8.0-10.0	—
A12	辣木 M-28 (H ₂ O)	—	—	8.0-11.0	—

CA: *Candida albicans*; CN: *Cryptococcus neoformans*; TR: *Trichophyton rubrum*; AF: *Aspergillus fumigatus*.

表三 原生種蔬菜水、甲醇萃出物對四種真菌的 24 小時最低抑菌濃度

Table 3. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of water and ethanol extracts of indigenous vegetables in fungi

編號	萃出物	最低抑菌濃度 (MIC) (mg/ml)			
		CA	CN	TR	AF
A2	香蓼 (MeOH)				
A23	酸模 (MeOH)	2.75±0.25	2.75±0.25		1.38±0.13
A4	香椿 (MeOH)	3.50±0	3.50±0	3.50±0	
A5	辣木 M-02 (MeOH)	3.50±0.25	3.50±0.25		
A6	辣木 M-28 (MeOH)				
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)			6.65±0.3	

CA: *Candida albican*; CN: *Cryptococcus neoformans*; TR: *Trichophyton rubrum*; AF: *Aspergillus fumigates*.



表四 原生種蔬菜水、甲醇萃出物在營養洋菜平板上對高菌數 (1×10^7 cfu/plate) 細菌之抑制環半徑

Table 4. Susceptibility of bacteria in 1×10^7 cfu/plate in water and ethanol extracts of indigenous vegetables

編號	萃出物	抑制環半徑 (mm)			
		SA	EC	Sal	BT
A2	香蓼 (MeOH)	—	—	—	—
A3	酸模 (MeOH)	—	—	—	—
A4	香椿 (MeOH)	—	—	—	—
A5	辣木 M-02 (MeOH)	—	—	—	—
A6	辣木 M-28 (MeOH)	—	—	—	—
A9	酸模 (H ₂ O)	—	—	—	1.0
A10	香椿 (H ₂ O)	—	—	—	—
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)	—	—	—	5.0
A12	辣木 M-28 (H ₂ O)	—	—	—	3.0

SA: *Staphylococcus aureus*; EC: *Escherichia coli*; Sal: *Salmonella enterocilitica*; BT: *Bacillus thuringiensis*.

表五 原生種蔬菜水、甲醇萃出物在營養洋菜平板上對低菌數 (1×10^4 cfu/plate) 細菌之抑制環半徑

Table 5. Susceptibility of bacteria in 1×10^4 cfu/plate in water and ethanol extracts of indigenous vegetables

編號	萃出物	抑制環半徑 (mm)			
		SA	EC	Sal	BT
A2	香蓼 (MeOH)	—	—	—	—
A3	酸模 (MeOH)	0.5	—	2.0	2.0
A4	香椿 (MeOH)	1.5	—	—	2.0
A5	辣木 M-02 (MeOH)	—	—	—	1.0
A6	辣木 M-28 (MeOH)	—	—	—	1.5
A9	酸模 (H ₂ O)	—	—	2.0	1.5
A10	香椿 (H ₂ O)	—	—	—	—
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)	6.0	—	—	7.0
A12	辣木 M-28 (H ₂ O)	3.0	—	—	6.0

SA: *Staphylococcus aureus*; EC: *Escherichia coli*; Sal: *Salmonella enterocilitica*; BT: *Bacillus thuringiensis*.

表六 原生種蔬菜水、甲醇萃出物對感受性細菌之最低抑制濃度

Table 6. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of water and ethanol extracts of indigenous vegetables in susceptible bacteria

編號	萃出物	最低抑菌濃度 (MIC) (mg/ml)		
		SA	Sal	BT
A3	酸模 (MeOH)	1.37±0.1	1.37±0.1	1.37±0.1
A4	香椿 (MeOH)	0.44±0		0.22±0
A5	辣木 M-02 (MeOH)			1.75±0.12
A6	辣木 M-28 (MeOH)			1.59±0.14
A9	酸模 (H ₂ O)		3.46±0.05	1.73±0.03
A11	辣木 M-02 (H ₂ O)	0.83±0.04		0.83±0.04
A12	辣木 M-28 (H ₂ O)	1.71±0.14		1.71±0.14

SA: *Staphylococcus aureus*; Sal: *Salmonella enterocilitica*; BT: *Bacillus thuringiensis*.

