



朝陽科技大學
生化科技研究所

碩士論文

黑殭菌素製備與分析研究探討

Preparation and Analysis of Destruxins from

Metarhizium anisopliae

指導教授：曾耀銘 博士

劉炳嵐 博士

研究生：許惠婷

中華民國 101 年 7 月 31 日



朝陽科技大學生化科技研究所

Graduate Institute of Biochemical Sciences and Technology

Chaoyang University of Technology

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

黑殭菌素製備與分析研究探討

Preparation and Analysis of Destruxins from

Metarhizium anisopliae

指導教授：曾耀銘 博士 (Dr. Yew-Min Tzeng)

劉炳嵐 博士 (Dr. Bing-Lan Liu)

研究生：許惠婷 (Hui-Ting Shu)

中華民國 101 年 7 月 31 日

July 31, 2012



摘要

黑殭菌屬(*Metarhizium*)是昆蟲病原真菌的一屬，常在世界各地農業害蟲及疾病媒介控制方案中，被作為化學殺蟲劑替代品。廣泛使用真菌的二次代謝產物包括黑殭菌作為生物殺蟲劑，已經增強其基本生物學的興趣。黑殭菌已被廣泛用於合成環狀六縮酚酸胜肽—稱為黑殭菌素，乃是由 α -羥基酸及五個胺基酸殘基組成。事實上，環縮酚酸胜肽加上天然環胜肽，合併成具有一個以上酯鍵連結為特色之天然產物大家族，這一類天然產物，因其表現出的多樣化生物活性而在科學界引起廣大興趣，包括抗癌、抗生素、抗真菌、免疫抑制劑或抗發炎活性，與其有趣的作用機制及引人注意的分子結構一致。本實驗中以5 L攪拌式發酵槽發酵培養黑殭菌，再以乙酸乙酯萃取出其成分，並且利用毛細管電泳分析與定量黑殭菌素，進一步以半製備型HPLC分離純化。實驗結果顯示，毛細管電泳分析條件為40 mM Sodium broate、pH 9.8、15 kV、215 nm、57 cm \times 50 μ m \times 37.5 μ m即有相當好的分析效果。而質譜方面，destruxin B分子量為593，經由ESI-MS正離子模式可得到m/s 594，ESI-MS/MS分析可得到分子量481之片段離子。

關鍵詞：黑殭菌、黑殭菌素、毛細管電泳



ABSTRACT

Metarhizium is a genus of entomopathogenic fungi used world-wide as alternatives to chemical insecticides in agricultural pest and disease-vector control programs. The wide utilization of *M. anisopliae* as bioinsecticide has increased interest in its basic biology, including its fungal secondary metabolites. *M. anisopliae* has been widely used for synthesis of cyclic hexadepsipeptides, known as destruxins (dtxs) which consist of an α -hydroxyl acid and five amino acid residues. Together with natural cyclic peptides, emerge as a broad family of natural products characterized by the occurrence of at least one ester linkage. The great interest that this class of natural products has elicited in the scientific community is explained by the diverse range of biological activities that they exhibit, including antitumoral, antibiotic, antifungi, immunosuppressant, or anti-inflammatory activities, coincidence with intriguing mechanisms of action and attractive molecular architectures. The destruxin used in this study were isolated and purified from submerged culture. Qualitative and quantitative analysis was performed on a capillary electrophoresis system. The optimum conditions were pH 9.8, 40 mM Sodium borate, 10% acetonitrile, at voltage 15 kV, and detected wavelength 214 nm. The ESI mass spectrum shows an abundant protonated molecule (dxt B), $[M+H]^+$ m/z 594, and the m/z 481 product ion was detected from MS^2 analysis of m/z 594 fragmentation.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, Destruxins, Capillary Electrophoresis



時間飛逝，二年的研究生生活即將結束，在朝陽的這段日子裡讓我成長了許多。承蒙曾耀銘博士和劉炳嵐博士兩位恩師的時時鼓勵及相助，耐心指導與細心簽正，讓我在求學階段獲益良多，指導我在做事上應有積極、細心的態度，方能使論文順利付梓，浩瀚施恩，僅誌卷首，由衷感謝。

感謝騰緯、紀珍、輝欽、婉君、雅婷、建德、偉健、士廷、宗豪、亞道等學長姐們在實驗上的教導並提供寶貴經驗，使實驗進行更加順利。謝謝同窗書涵、劬儒、昀儀、威銘、正亞、濬昌以及芷岑、孟哲、沛清、旻祈、百鳴、龍騰、朝瑞、楷敬、意宜、冠章、雅慰、軒育、俐初、庭羽、惟豪、婉凌、盛發、奕嘉、佳汶等實驗室的學弟妹們，你們就像家人一樣，你們的陪伴讓兩年的研究生生活變得絢麗多彩。最後要感謝我的父母與家人，有你們的鼓勵與支持才能讓我朝著自己的目標前進，求學路途無後顧之憂。另外還有很多曾經幫助過我的朋友，因為有大家的幫助，我才能有今天的成果。



摘要	I
ABSTRACT	II
致謝	III
總目錄	IV
圖目錄	VI
表目錄	VII
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 文獻回顧	3
1-2-1 黑殭菌素的介紹	3
第二章 毛細管電泳簡介與黑殭菌素之分析	33
2-1 毛細管電泳簡介與背景	33
2-1-1 毛細管電泳之簡介	33
2-1-2 毛細管電泳應用	35
2-2 電泳與電滲透流	36
2-3 毛細管電泳之各種分離模式	40
2-3-2 毛細管電泳對於蛋白質、胜肽之應用	44
2-3-3 毛細管電泳對於醣類之應用	44



2-3-4 毛細管電泳對於生物鹼、酚酸類化合物之應用	45
2-3-5 毛細管電泳對於維生素、有機酸之應用	45
2-4 黑殭菌素之毛細管電泳定量分析.....	47
2-4-1 材料與方法.....	47
2-4-2 菌種與菌種保存	48
2-5 結果與討論.....	50
第三章 黑殭菌素之分離純化.....	55
3-1 前言	55
3-2 材料與方法.....	56
3-2-1 發酵程序.....	56
3-2-2 萃取.....	56
3-2-3 儀器與設備.....	56
3-3 結果與討論.....	59
第四章 結論與展望.....	70
參考文獻.....	73
作者簡歷	87



圖 1-1 黑殭菌素 B (II)由十字花科葉片代謝的可能代謝途徑	14
圖 1-2 大蠟螟幼蟲與 DE (30)一起培養時可能的代謝途徑	16
圖 2-1 毛細管電泳原理.....	37
圖 2-2 毛細管區帶電泳和高效能液相層析的流動分佈	39
圖 2-3 CZE 機制分離圖	41
圖 2-4 MEKC 機制分離圖	43
圖 2-5 不同緩衝溶液濃度下分析黑殭菌素之層析圖譜	52
圖 2-6-1 不同 pH 值下分析黑殭菌素之層析圖譜	53
圖 2-6-2 不同 pH 值下分析黑殭菌素之層析圖譜	54
圖 3-1 半製備型 HPLC 層析圖譜圖 3-2 黑殭菌素 B 之檢量線.....	61
圖 3-2 黑殭菌素 B 之檢量線.....	62
圖 3-3 分離純化後 DB 在 CE 之層析圖譜.....	63
圖 3-4 黑殭菌素 E 之檢量線	64
圖 3-5 分離純化後 DE 在 CE 之層析圖譜	65
圖 3-6 黑殭菌素 B ESI-MS 圖譜.....	67
圖 3-7 黑殭菌素 B ESI-MS/MS 之特性圖譜.....	68
圖 3-8 黑殭菌素 B ESI-MS/MS 特性圖譜之解說圖.....	69



表 1-1 黑殭菌素的共通結構和已知的黑殭菌素	7
表 1-2 黑殭菌素定性和定量分析方法總結	12
表 1-3 黑殭菌之黑殭菌素致病性的指標	23
表 2-1 電滲流(Electroosmotic flow, EOF)之變因	38
表 3-1 毛細管電泳對於黑殭菌素之偵測極限及定量極限	66



第一章 緒論

1-1 前言

微生物的應用範圍相當廣泛，傳統上微生物在酒類釀造、食品醱酵和污水處理等方面都扮演重要角色。隨著科技發展的脚步，許多由微生物生產的產品也被一一開發，其中包含了醫藥品、農業用品、特用品和食品添加劑等等，因此微生物的發展對於人類來說是相當具有重要性的。

黑殭菌素(Destruxins)是由 α -羥基酸及五個胺基酸殘基組成。事實上是由環縮酚酸胜肽加上天然環胜肽，合併成具有一個以上酯鍵連結的特色之天然產物大家族。這一類天然產物，因其表現出的多樣化生物活性而在科學界引起廣大興趣，包括抗癌、抗生素、抗真菌、免疫抑制劑或抗發炎活性(Sarabia et al., 2004)，因此黑殭菌素為一具有發展潛力之生物活性物質。

黑殭菌素屬於環狀縮酚酸胜肽系列，應用方面如殺蟲、細胞毒性、抗病毒、免疫抑制劑及植物毒性等(Pedras et al., 2002; Sowjanya Sree et al., 2008)。黑殭菌素也誘發各種生物效應，對於哺乳動物白血病細胞與脾臟淋巴細胞也有毒性(Morel et al., 1983; Odier et al., 1992; Pedras et al., 2002; Skrobek and Butt, 2005)，並已證實對小鼠腫瘤具有體外抗增殖活性(Odier et



la., 1992)。黑殭菌素的特性已被從事相關研究的科學家所重視，因此如何以快速、方便及低污染的檢測方法來定性、定量黑殭菌素是本實驗的重點目標。



1-2 文獻回顧

1-2-1 黑殭菌素的介紹

黑殭菌屬(*Metarhizium*)是昆蟲病原真菌的一屬，常在世界各地農業害蟲及疾病媒介控制方案中，被作為化學殺蟲劑替代品。廣泛使用真菌的二次代謝產物包括黑殭菌作為生物殺蟲劑，已經增強其基本生物學的興趣。二次代謝產物的合成是個複雜的過程，往往牽涉到絲狀真菌的型態發育(Carollo et al., 2010)。黑殭菌已被廣泛用於合成環狀六縮酚酸胜肽—稱為黑殭菌素，乃是由 α -羥基酸及五個胺基酸殘基組成。事實上，環縮酚酸胜肽加上天然環胜肽，合併成具有一個以上酯鍵連結為特色之天然產物大家族，這一類天然產物，因其表現出的多樣化生物活性而在科學界引起廣大興趣，包括抗癌、抗生素、抗真菌、免疫抑制劑或抗發炎活性，與其有趣的作用機制及引人注意的分子結構一致(Sarabia et al., 2004)。

黑殭菌素是唯一在感染晚期時於昆蟲體內發現足量可致死的黴菌毒素(Dumas et al., 1996; Li and Holdom, 1994; Suzuki et al., 1971)，到目前為止，超過 39 種相關黑殭菌素從粉蝨座殼孢菌(*Aschersonia aleyrodis*) (Krasnoff and Gibson, 1996)、芸苔鏈格孢菌(*Alternaria brassica*) (Parada et al., 2007)、白殭菌貓分離株(*Beauveria feline*) (Lira et al., 2006; Vita-Marques et al.,



2008)、糞生真菌(*Nigrosabulum globosum*) (Che et al., 2001)、卵型孢霉(*Oospora destructor*) (Kodaira, 1962)及黑殭菌(*M. anisopliae*) (Hu et al., 2006; Liu et al., 2000; 2007; Rao et al., 2006; Suzuki et al., 1971)等培養物中被純化出來。因此，黑殭菌是一種有趣的有機體，可直接攻擊宿主，並能在體內及體外產生一系列具生物活性的代謝產物。環狀六縮酚酸胜肽如：黑殭菌素 A (DA) (**I**)、黑殭菌素 B (DB) (**II**)及黑殭菌素 E (DE) (**30**)具有相同骨架結構，其通式為： $-D-HA-L-Pro-L-Ile-L-MeVal-L-MeAla-\beta-Ala-$ ，其中 HA 是 D- α -羧基酸殘基。這些結構，在羧基酸殘基 R-團基上是不同的，似乎有重疊部份，但具有不同生物效應(Pedras et al., 2002)。這些化合物的一些重要特性已在其他文獻中被回顧及發現(Pedras et al., 2002; Vey et al., 2001)。

黑殭菌素已在之前一篇精彩的回顧文獻(Pedras et al., 2002)中討論過，作為一種天然產物的混合合成起源而延續研究。在本文中，將敘述黑殭菌素的化學特性及應用，且著重於黑殭菌素過去十年中嶄新以及更新的資訊，可作為快速研究這些昆蟲病原真菌代謝產物的捷徑。

化學組成

黑殭菌素是從昆蟲病原真菌的卵型孢霉(後來被重新命名為黑殭菌)純化出來的，大部分的黑殭菌素需要探討其生物活性及生物轉化。在執行結構檢索 SciFinder 學術資料庫，及藉關鍵字在 PubMed、Medline 及 Scopus



等資料庫檢索時顯示到目前為止，約有 39 種黑殭菌素已經被從真菌/細菌培養中純化出，或經由化學合成方式產生(表一)，並區分為 A、B、C、D、E 及 F 等六子群之為數眾多的黑殭菌素已經被確認並加以探討(Che et al., 2001; Morais et al., 2010; Pedras et al., 2002)。自上次回顧後(Pedras et al., 2002)，四種命名為 DB [Phe³, N-Me-Val⁵] DB (**21**) (Kim et al., 2002)、擬似 DC (**26**)、DE 氯醇[β-Me-Pro] (**37**) (Lira et al., 2006)及 DE 氯醇的位置異構物 (**38**) (Vázquez et al., 2005)的黑殭菌素，屬於新的黑殭菌素成員被發現。其中，DA(**1**)、DB(**11**)和 DE(**30**)通常是主要的，它們具有相同胺基酸序列，但在羧基殘基部份是不同的，並且都已被詳細研究。此外，源自海源性真菌角質海綿(*Ianthella sponge*)的類 homodestcardin 為黑殭菌素的類似物，根據 ¹H 及 ¹³C 的核磁共振光譜比對，與類 DB(**16**)相似，而被歸類為黑殭菌素家族的一員(Amagata et al., 2006)。

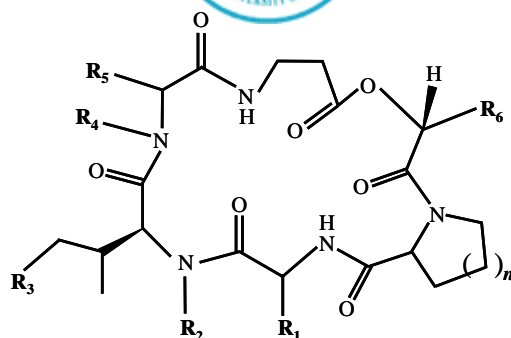
依化學特性而言，黑殭菌素是由α-羧基酸及五個胺基酸殘基組成的環狀六縮酚酸胜肽，已被分類成六子群(標記為 A~F)(表一)。個別的黑殭菌素在羧基部位是不同的，且與胺基酸殘基的 N-甲基化及 R 基團模式有關。依據結構規則，胺基酸殘基的構型為 S-型，而羧基上胺基酸殘基的構型則為 R-型(表一)。圓二光偏極光譜(CD)的研究指出，黑殭菌素的環狀胜肽具有第一型β-反轉構型(Peng et al., 2005)。結構與活性關係(構效關係)的研



究顯示，酯鍵的存在是生物活性所不可少的(Cavelier et al., 1997)。




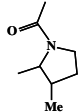
表 1-1 黑殭菌素的共通結構和已知的黑殭菌素



Compound	Destruxins	n	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Subgroup A								
1	DA	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CH=CH ₂
2	DA ₁	2	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CH=CH ₂
3	DA ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CH=CH ₂
4	DA ₃ *	0	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CH=CH ₂
5	DA ₄	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	Me	Me	Me	CH=CH ₂
6	DA ₅ *	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	Me	Me	Me	CH=CH ₂
7	DA ₄ chlorohydrin	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	Me	Me	Me	CHOHCH ₂ Cl
8	Desmethyl DA	1	CH(Me)CH ₂ Me	H	H	Me	Me	CH=CH ₂
9	Dihydro DA	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CH ₂ Me
10	Pseudo DA	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
Subgroup B								
11	DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
12	DB ₁	2	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
13	DB ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
14	Desmethyl DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
15	Desmethyl DB ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
16	Homo DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	Me	Me	Me	CHMe ₂
17	Proto DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	H	Me	CHMe ₂
18	Hydroxy DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMe ₂
19	Hydroxyhomo DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	Me	Me	Me	CHMe ₂
20	β -D-Glucopyranosyl-hydroxyl DB	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	
21	[Phe ³ , N-Me-Val ⁵]	1	CH ₂ Ph	Me	H	Me	CHMe ₂	CHMe ₂



	DB							
22	Pseudo DB	1	CH ₂ Ph	Me	H	Me	CH ₂ CHMe ₂	CHMe ₂
Subgroup C								
23	DC	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMeCH ₂ OH
24	DC ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CHMeCH ₂ OH
25	Desmethyl DC	1	CH(Me)CH ₂ Me	H	H	Me	Me	CHMeCH ₂ OH
26	Pseudo DC	1	CH ₂ Ph	Me	H	Me	CHMe ₂	CHMeCH ₂ OH
Subgroup D								
27	DD	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMeCOOH
28	DD ₁	2	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHMeCOOH
29	DD ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CHMeCOOH
Subgroup E								
30	DE	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	oxirane
31	DE ₁	2	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	oxirane
32	DE ₂	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	oxirane
33	DE chlorohydrin [#]	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHOHCH ₂ Cl
34	DE ₂ chlorohydrin	1	CHMe ₂	Me	H	Me	Me	CHOHCH ₂ Cl
35	DE diol	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHOHCH ₂ OH
36	DEd ₁	2	CH(Me)CH ₂ Me	H	H	Me	Me	CHOHCH ₂ OH
37	[β-Me-Pro] DE chlorohydrin [#]	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHOHCH ₂ Cl
38	Regioisomer of DE chlorohydrin	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHClCH ₂ OH
Subgroup F								
39	DF	1	CH(Me)CH ₂ Me	Me	H	Me	Me	CHOHMe

* in DA₃ (**4**) and DA₅ (**6**), the prolin residue is replaced by  and , respectively.

[#] the DE chlorohydrin (**33**) and [β-Me-Pro] DE chlorohydrin (**37**) share the same empirical formula. They are stereoisomer at R₆ (*c.f.* structure depicted in Vita-Marques et al., 2008).



從結構上來看，黑殭菌素與棒束孢素(isaridins)及玫紅毒素(roseotoxins)相似，都具有不尋常的胺基酸：如 N-甲基纈氨酸(methylvaline)、N-甲基異亮氨酸(methylisoleucine)、羥基亮氨酸(hydroxyleucine, HyLeu)、 β -丙氨酸(β -alanine)及 α -甲基脯氨酸(α -methylproline, α -MePro)。這些胜肽具有與黑殭菌素極為相似的胺基酸的特性，唯一實質上不同之處是在 α -羥基酸的支鏈位置。這些胜肽的序列比對明白顯示， β -胺基酸殘基的完整保留性 [(β -胺基酸殘基— β G (β -甘氨酸、也與 β -丙氨酸或 3-氨基丙酸有關)。在 R-2 位置上，大部分脯氨酸是保留的，雖然脯氨酸的相似物 3-甲基脯氨酸、4-甲基脯氨酸以及哌啶甲酸也會出現。在 R-3 位置上，是由疏水殘基所佔住，在玫紅毒素及黑殭菌素中是纈氨酸或異亮氨酸，但擬似黑殭菌素和棒束孢素則在這位置含有苯丙氨酸。有趣的是，擬似 DB(22)的序列與棒束孢素 C1、C2、D 和 E 非常相似，尤其擬似 DB(22)跟棒束孢素 C1 的序列是完全相同的(當棒束孢素 C1 具有 N-甲基亮氨酸時)。擬似 DB(22)的序列藉二維核磁共振光譜和快速原子撞擊質譜法推導而得(Sabareesh et al., 2007)。玫紅毒素 B 的結構與黑殭菌素不同，因而大大減低對哺乳動物的毒性，同時顯然不抑制昆蟲的攝食，因此玫紅毒素 B 可作為有效的胃毒劑。



分析方法與代謝產物

黑殭菌的代謝產物對於動物和微生物是有毒的，其宿主範圍廣泛，包括昆蟲、真菌、細菌和病毒(*c.f.* Carollo et al., 2010 and references cited therein)。這些代謝產物大多是從菌絲體或發酵液萃取分離，有少部分二次代謝產物資訊是黑殭菌孢子特有的(Krasnoff et al. 2007; Moon et al. 2008)。

事實上，黑殭菌素是由黑殭菌在發酵過程中所產生最普遍的二次代謝產物，他們是迄今研究最詳盡的昆蟲病原真菌毒素。除黑殭菌素外，黑殭菌還產生很多的二次代謝產物包括：12-羥基卵假散囊菌素(Kuboki et al., 1999)、羥基真菌生物鹼(Uchida et al., 2005)、鐮刀菌毒素和(8Z)-鐮刀菌毒素的7-去甲基類似物(Krasnoff et al., 2006)、細胞鬆弛素 C 和 D (Aldridge and Turner, 1969)、煙曲霉酸(Espada and Dreyfuss, 1997)、杆孢漆斑菌素(Kondo et al., 1980)、苦馬豆素(Patrick et al., 1993; Tameler et al., 1998)、酪氨酸甜菜鹼(Carolla et al., 2010)、viridoxin (Gupta et al., 1993)、絲氨酸環素 A 和 B (Krasnoff et al., 2007)，以及 ATP 合成酶抑制劑 aurovertin (Azumi et al., 2008) 等。

高效液相色層分析程序與質譜儀耦合技術(LC-MS)的發展，使得複合天然黑殭菌素可快速進行特性探討。一些依據質譜技術的定性與定量方法已被檢視，並被用來分析環狀胜肽和縮酚酸胜肽(表二)。由 Ngoka and Gross



(1999)提出的環狀胜肽離子阱逐步定序法，仍是經典的方法，解決了環狀分子在質子化作用/解離過程中，非特異性解環的問題(Jegorov et al., 2006)。實際上，有幾種方法已經發展到可用來偵測和識別從不同黑殭菌品系產生的黑殭菌素(Chen et al., 1999; Hsiao and Ko, 2001; Hu et al., 2006; Jegorov et al., 1998; Liu et al., 2004a, 2004b; Loutelier et al., 1996; Potterat et al., 2000; Seger et al., 2004; Wang et al., 2004)。



表 1-2 黑殭菌素定性和定量分析方法總結

Method	Detector	Desturxins*	Reference
CE	UV	<i>1, 11, 14, 30</i>	Liu et al., 2004a
HPLC	UV	<i>1, 11</i>	Chen et al., 1999; Feng et al., 2004; Hu et al., 2006; Liu et al., 2004b
LC/MS	ESI-TOF-MS	<i>1, 9, 11, 13, 14, 27, 30, 33, 35</i>	Potterat et al., 2000
LC/MS	MALDI-TOF-MS ESI-MS	<i>1, 3, 11, 13, 14, 17, 27, 30, 32, 35</i>	Butt et al., 2009
LC/MS	PDA-ELSD-MS	<i>21</i>	Morais et al., 2010
LC/MS	PDA-MS(ESI)	<i>1, 11, 14, 30</i>	Hsiao and Ko, 2001; Seger et al., 2004; 2006
LC/MS	UV-MS(APCI)	<i>36</i>	Jegorov et al., 1998
LC/MS	UV-MS(ESI)	<i>21</i>	Kim et a., 2002
LC/MS	UV-MS(ESI)	<i>1, 11, 30, 35</i>	Wang et al., 2004
LC/MS	UV-MS(FAB)	<i>1, 3, 11, 13, 27, 30, 35</i>	Loutelier et al., 1996
CD	Spectropolarimeter	<i>1, 11, 14, 23</i>	Peng et al., 2005

* the destruxins denoted the compound numbers in Table 1-1.

APCI: Atmospheric pressure chemical ionization

CD: Circular dichroism

CE: Capillary electrophoresis

ELSD: Evaporative light scattering detector

ESI-TOF: Electrospray ionisation time-of-flight

FAB: Fast atom bombardment

PDA: Photodiode array



DB(*II*)是主要的植物性毒素，導致與植物遭受甘藍黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)感染時所造成的組織損傷相似，因而表現出部份毒害。在黑點抗性品種(白芥菜)進行同位素實驗(^{14}C)發現，在抗甘藍黑斑病菌的植物中，DB(*II*)的解毒作用是個牽涉連續羥化與糖化作用的二步驟(圖一)(Pedras et al., 2001; 2003; Pedras, 2004)。推斷的代謝途徑顯示，DB(*II*)被羥化為羥基DB(*40*)，並被糖化成 β -D-葡萄糖羥基DB(*41*)。 β -D-葡萄糖羥基DB(*41*)進一步代謝成丙二醯衍生物(6'-O-丙二酰) β -D-吡喃葡萄糖苷羥基DB(*42*)。雖然羥化和糖基化反應在具抗性和敏感的物種中都會進行，羥化反應是敏感物種的速率決定步驟，然而糖基化則是抗性物種的速率決定步驟。因此，該DB(*II*)水解酶基因編碼的特性檢測，對於在植物對抗甘藍黑斑病菌的基因工程中，就具有潛在的重要性(Pedras et al. 2001)。由Pedras (2004)進行的葉片和細胞培養實驗顯示，羥基DB(*40*)毒性是遠低於DB(*II*)的，而 β -D-葡萄糖羥基DB(*42*)則一點毒性都沒有。

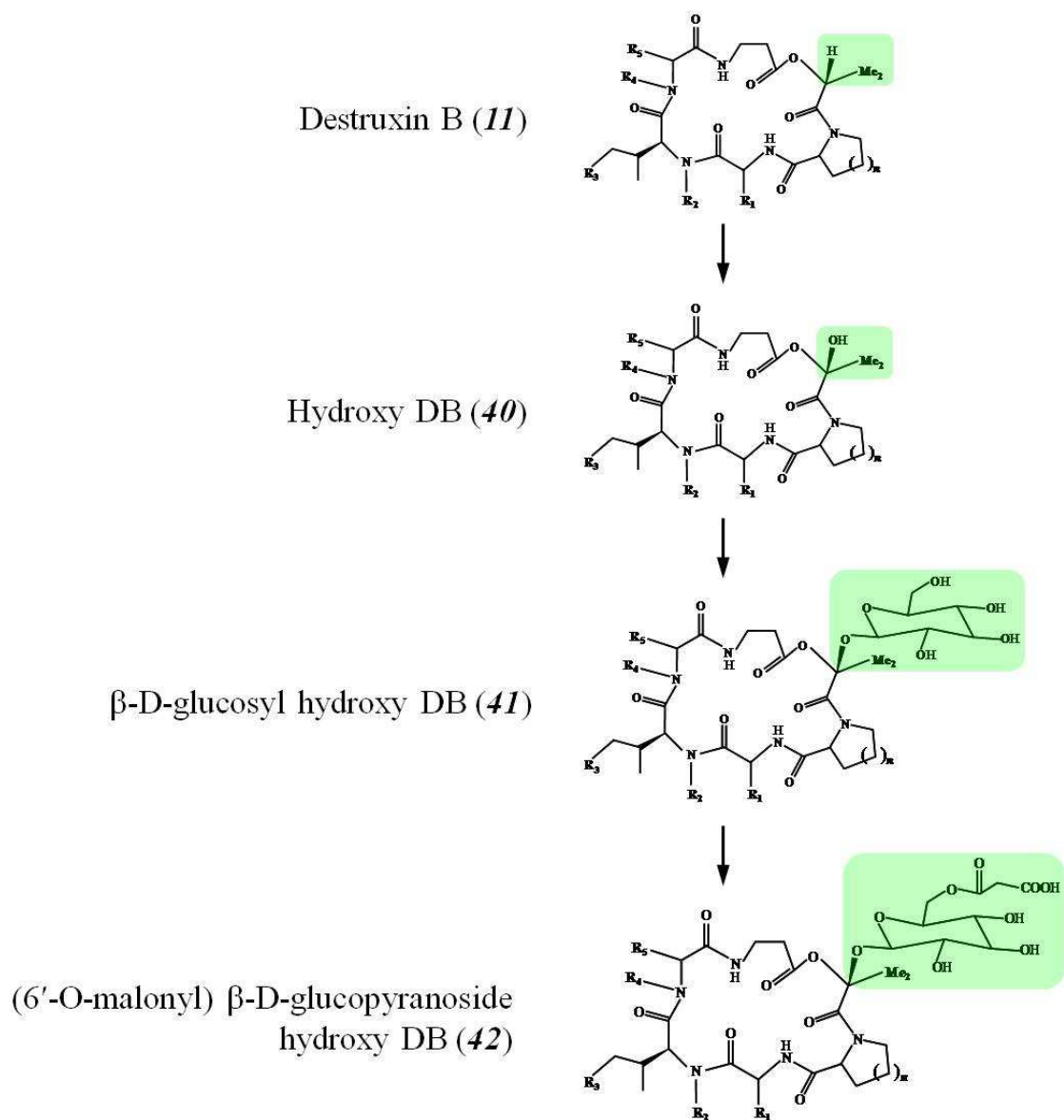


圖 1-1 黑殭菌素 B(*11*)由十字花科葉片代謝的可能代謝途徑



DE(30)的血液淋巴萃取物質譜儀分析顯示，與在大蠟螟(*Galleria mellonella*)幼蟲培養十分鐘後，即可偵測到代謝產物。在大蠟螟幼蟲體中，DE(30)的解毒步驟在幼蟲感染毒素後立即開始，當幼蟲發生強直性癱瘓，若在此濃度仍未死亡時，經過 24 小時後，即可恢復其活力。DE 二醇(35)已被確定並顯示，比起 DE(30)或 DA(1)，在相同濃度下，具有極低的活性。DE 二醇(35)具有修飾水解環氧化物的功能(Hubert et al., 1999)。DA(1)的解毒作用，在體內最初是被轉換為 DE(30)及其固有的代謝產物，如 DE 二醇(35)和 DEdioP(43)，但是並沒有觀測到 DE(30)的穀胱甘肽衍生物(DESg)(46)。在質量/電荷比為 713 的陰離子是 DE(30)的半胱氨酸衍生物(DESCys)(45)，可能由 DESg (46)產生的二代產品。圖二總結在大蠟螟幼蟲體中可能的 DE(30)代謝步驟(Hubert et al., 1999)。



黑殭菌素的製造

有兩種方法可生成黑殭菌素：化學合成或昆蟲病原真菌生物合成。由於從天然來源分離黑殭菌素是很費力的(Hu et al., 2006; Rao et al., 2006; Seger et al., 2004)，因此有人利用化學合成法提供做為生物活性物質的研究(Ast et al., 2001)，以線性胜肽鏈耦合完整的氨基酸和羧基酸分子環化合成環狀胜肽(Lemmens-Gruber et al., 2009; Pedras et al., 2002)。使用典型的合成策略製備 cyclodepsipeptides 須利用完整的羧基酸和氨基酸片段來環合耦合線性或聚合，這種方法的重點為環化的位置和耦合的順序，而 cyclodepsipeptides 的合成，環化位置的選擇是最重要的關鍵。因此，已經確立 N-甲基氨基酸殘基是難以加入標準胜肽耦合方法(Ward et al., 2001; Pedras et al., 2002)。先前已有良好的討論，合成 DA(*I*)，DB(*II*)，DE(*30*)和其他黑殭菌素家族的合成方法已被開發出來(Ast et al., 2001; Pedras et al., 2002; Ward et al., 1997; Yoshida et al., 2010)。

在黑殭菌中，黑殭菌素的合成機制仍是未解的謎團。在黑殭菌中，其二級代謝產物形成的嚴密調控，控制能到什麼程度，代表透過動物拮抗劑選擇壓力與化學防衛系統演化。然而，在黑殭菌素合成過程中，多功能非核糖體胜肽合成酶(PES)的參與曾被提及，但仍未經確認(Bailey et al., 1996)。稱作有條件非必要之染色體(Conditionally dispensable chromosome,



CDC)的”額外”染色體，已在植物致病性真菌中被發現，其中往往含有毒力因子的基因編碼，表示真菌個體的子集合可能不只具有染色體的最小補體。此外，CDC 上已經被證實具有致病相關基因(例如：*pr1 A*、*ste 1*、*try 1*以及 *chy 1*)。在突變株中，發現失去製造黑殭菌素 CDC 能力，顯示黑殭菌的毒素合成酶基因也是位於染色體 CDC 上(Wang et al., 2003)。然而，黑殭菌素在細胞和亞細胞層面的製造過程仍知之甚少。大部分黑殭菌素和其類似物已經被從昆蟲病原真菌黑殭菌培養品中分離出來。DB(*11*)、去甲基 DB (*14*)及類 DB (*16*)曾被報導，是從植物致病源甘藍黑斑病菌(*A. brassicae*)所產生的。由狗牙根(*Cynodon dactylon*)的植物致病源—狗牙根春季死斑菌(*Ophiosphaerella herpotricha*)所產生的 DA4 (*5*)、DA5 (*6*)、DB (*11*)及類 DB (*16*)，則可在昆蟲病原座殼孢菌(*Aschersonia* sp)的培養品中發現。而糞生真菌 *Nigrosabulum globosum* 菌株已知可產生擬似 DA(*10*)以及擬似 DB (*22*) (Butt et al., 2009)。海源性真菌 *Pseudoceratina purpurea* 菌株已被證實可製造黑殭菌素環縮酚酸胜肽，包括 DA (*1*)、DB (*11*)、DB2 (*13*)、去甲基 DB (*14*)、DE 氣醇 (*33*)以及 DE2 氣醇 (*34*) (Boot et al., 2007)。

一般來說，黑殭菌在體外產生的黑殭菌素與真菌對宿主致病力成正比，也就是說，雖然也有這種趨勢的例外存在，但經測試可在體外產生較多黑殭菌素的菌株，往往對昆蟲表現出更大的毒性(Amiri-Besheli et al., 2000;



Kershaw et al., 1999; Samuels et al., 1988)。被最密集研究的黑殭菌的毒力，是與由 PES 編碼的黑殭菌素分泌能力有關的研究。將不同菌株和特定的病原放在一起，造成有選擇性的不利條件，而驅使基因去活化，因此不同菌株具有不同的黑殭菌素製造模式(Wang et al., 2009b)。如上所述，黑殭菌素由幾種分類不同的真菌所製造，並且被認為是與甘藍黑斑病菌及黑殭菌造成各自植物和無脊椎動物宿主的疾病進程有關(Che et al., 2001; Kershaw et al., 1999; Krasnoff et al., 2006; Pal et al., 2007; Pedras et al., 2002)。黑殭菌素量變數據還顯示，黑殭菌素產生的數量和類型取決於真菌菌株和昆蟲宿主，而這些化合物在宿主死後不久就會被分解。黑殭菌素數量在宿主死亡後 72 小時內顯著減少，尤其是 DB (11)及 DE (30)，顯示其本質的不穩定性及宿主酵素可能參與黑殭菌素的解毒作用，而與宿主、土壤類型或生物區系無關(Skrobek et al., 2008)。

事實上，透過誘發方式增加從真菌培養品的二級代謝物產量，開闢了一個新的研究領域，也保證了過去十年中，能在發酵工業中具有重要的經濟效益。有一些參數一如誘導劑濃度和選擇性、誘導劑暴露時間、培養品時期、品系、生長調控、營養成份、細胞壁材料的品質及大幅提高產物累積等已被報導(Namdeo, 2007)。其中一些參數(如營養、培養條件等)在黑殭菌懸浮培養品內，對於其黑殭菌素產量有突出效果。在這些章節中，黑殭



菌引起特別的注意，它是最著名昆蟲病原真菌之一，已知被用來當生物殺蟲劑使用。從黑殭菌的培養菌絲中純化的二級代謝產物也具有抗腫瘤活性 (Ghanbary et al., 2009; Hussain et al., 2011; Kanga et al., 2010; Maniania et al., 2002; Sowjanya Sree et al., 2008; Tavassoli et al., 2011)。作為這種生物技術的潛力，研發黑殭菌在生物反應槽的培養步驟，在這些目的上，已具有顯著興趣 (Kobayashi et al., 2004; Yoshimoto and Imoto, 2002)。

(一)液態培養

真菌液態培養液黏度隨時間增加而增加，這可能是因為一個或多個因素，包括生物反應器內細胞濃度的增加、生長形態的變化或細胞產生改變培養液流變特性的物質。這種黏度增加在操作過程中不可避免的，為一個不良現象 (Tang et al., 2007)，因會造成供給氧氣的困難，需提供足夠的攪拌才可去除二氧化碳。在後續的部分，我們將提供已用於培養黑殭菌生產最大化黑殭菌素策略概述。最初的研究注重於碳源和氮源濃度對發酵過程的影響，例如使用回應曲面法 (RSM) 來優化搖瓶培養黑殭菌之培養基成分，如麥芽糖、蛋白胨、 β -丙氨酸和葡萄糖來生產 DA (*I*) 和 DB (*II*)。其中，預測 DA (*I*) 和 DB (*II*)，產量分別得到 18.5 和 232 mg/L。此外，利用 RSM 優化培養基配合無擋板的攪拌式生物反應器 (STR) 生產 DB (*II*)，產量為 DA (*I*) (49 mg/L) 和 DB (*II*) (268 mg/L) (Liu et al., 2000)。麥芽糖是一種合適用於



生產 DA(*I*)和 DB (*II*)的碳源，雖然細胞沒有良好生長。Wang et al. (2009a)指出，高度氮源供給會影響黑殭菌素生產路徑，一級代謝產物往往涉及到二級代謝產物，如氨基酸。特定的非核糖 PES 代謝產物可以作為前驅物和/或刺激誘導，這與許多植物病原真菌的致病性基因家族相關(表 1-3) (Bailey et al., 1996; Gao et al., 2011)。

黑殭菌素的生產也反映在培養上菌絲球的顆粒大小，例如，Feng et al. (2004)發現，在搖瓶，最好DB (*II*)產量為(336 mg/L)，觀察菌絲球平均顆粒大小為1.9 mm;在5 L STR，顆粒直徑平均為2.1 mm;在20公升氣舉式生物反應器(ALR)，DB (*II*)產率可達到514 mg/L，而菌絲球大小為1.8 mm。作者認為，黑殭菌F061最合適的大小真菌菌絲球顆粒是直徑約2.0 mm。此外，培養的pH值也是生物程序上一個重要的參數，影響了一系列監管過程中真菌的參數，並已報告會影響二級代謝產物的生產。針對培養基初始pH值的影響進行了研究發現，初始pH值會影響黑殭菌所生產的黑殭菌素。搖瓶培養中，當初始pH值低於5，DB(*II*)產量是很低的。然而，最初培養基pH值在9時，DB (*II*)則有最大的產量。在5 L STR栽培，pH 9達到最高產量，分別為DA (*I*)(71.0 mg/L)和DB (*II*) (310.6 mg/L)。產量為pH 2培養下的三倍。在20 L ALR(氣泡管柱模式)條件下培養，6目網孔導流筒與無導流筒培養最高產量分別為350和550 mg / L的DB (*II*)。觀察生產黑殭菌素的pH值和培養基之



間呈現負相關性(Wang et al., 2004)。另一方面，通氣量將大大影響黑殭菌素的生產，通氣量1.5 vvm (volume gas per volume broth per minute)和控制pH值在6氣舉模式培養，DB (*II*)獲得一個最高產量，將近700 mg/L (Liu et al., 2007)。



表 1-3 黑殭菌之黑殭菌素致病性的指標

Target host	Destruxins	References
<i>Agrotis segetum</i> & <i>Pieris brassicae</i>	1* , 30 , hpy-6 DE	Thomsen and Eilenberg, 2000
<i>Artemia salina</i> & <i>Daphnia magna</i>	1	Favilla et al., 2006
<i>Bemisia tabaci</i>	1, 11	Hu et al., 2009
<i>Brassica juncea</i> & <i>Brassica napus</i>	11	Pedras and Biesenthal, 2000
<i>Coptotermes curvignathus</i>	mixture	Hoe et al., 2009
<i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera)	1, 11, 30, 35	Wang et al., 2004
<i>Drosophila melanogaster</i>	1	Pal et al., 2007
Leukemic cell HL60	1, 11, 30	Skrobek and Butt, 2005
<i>Phyllocnistis citrella</i>	mixture	Ghanbary et al., 2009; Shari et al., 2010
<i>Salmonella typhimurium</i>	11, 27, 30	Kouvelis et al., 2011
<i>Spodoptera frugiperda</i>	1, 11, 30	Skrobek and Butt, 2005
<i>Spodoptera litura</i>	1, 11	Rizwan-ul-Haq et al., 2009; Sowjanya Sree et al., 2010

* the destruxins denoted the compound numbers in Table 1-1.



此外，在任何研究發展中往往涉及培養基的添加劑試驗，增加生產二級代謝產物的調控。Rao et al. (2006)發現，在 5 L STR 和 20 L ALR 培養下添加 0.015% 甲萘醌(維生素 K3)，分別增加了 DE (30)原本產率的 15 倍和 2 倍。DE (30)合成須通過 DT-黃遞酶(DT-diaphorase)的兩個電子還原作用，從甲萘醌作用在培養黑殭菌的過程可能歸因於刺激。黑殭菌培養基中添加 90-215 cyclopeptolide 和含 cyclopeptolide 的天然哌啶酸可提高 DA (I)，DB (II)和 DE (30)產率 1.3 倍至 12.5 倍(Espada and Dreyfuss, 1997)。值得注意的是，操縱策略將是培養的一個重大課題。

(二)固態發酵(SSF)

許多的研究已證明液態培養中產生二級代謝產物的繁殖期生理，與 SSF 下培養生理學有幾個相似之處，因此高效生產過程策略必須調整。研究顯示，高產率的特殊菌株適用於液態培養，不能依賴 SSF 培養(Liu and Tzeng, 1999)。此外，SSF 還有一些重要的參數必須進行最適化，如：初始含水率、培養基濃度、培養基性質和通氣量等(Shah and Butt, 2005)。這表明在 SSF 有一定特殊性的生理需要更深入的了解，並許諾要創造知識，這將是高產過程開發和控制策略的基礎，於是研究 SSF 生產高產率的方法。

早期 SSF 生產黑殭菌素的報告中證實了水分含量為一項基本參數的重要性，初始含水率取決於固體培養基的保水能力。在 SSF 穀物系統中，最



低值在 65% 左右，例如在水稻/麩皮/果殼中，DA (*I*) 和 DB (*II*) 最好的產量分別為 2.9 mg/kg 的基質和 227 mg/kg 的基質，培養 14 天後水含量為 71%，水活性(*aw*) 為 0.921 (Liu and Tzeng, 1999)。本研究得出的結論是 SSF 培養產生黑殭菌素時，最初的 *aw* 值介於 0.921 到 0.950，或初始含水量從 54% 至 71% 不等。最佳培養基的含水量或 *aw* 都因個別情況而不同，由於在脫附固體培養基的性質有所差異。

另一方面，區域形成與種系有關，且受營養條件影響。區域生理的差異起因於轉錄層次，而非遺傳物質損失。吸引人的推測：區域具有故障的轉錄調控機制和/或受體，無法對應因受體結構或組成改變而引起的表皮信號(Shah and Butt, 2005)。Wang et al. (2005) 發現，與野生形菌株相比較，黑殭菌的無菌培養品中，有廣泛的基因向下調控的現象，同時，區域處於強氧化壓力下。總而言之，真菌區域化與老化在轉錄量變數據上具有類似的變化。此外，因產孢能力的喪失、退化性培養可能造成細胞結構重組，並且套用其他信號傳導路徑以適應生理改變。當體內酵素和二級代謝指數有重大變化時，區域位置的培養品會影響品系對目標生物體啟動及維持發病機制；成功的發病機制需有表皮降解酶合成與二級代謝產物，如黑殭菌素。因此，干擾這些複合物的合成可阻止成功的發病機制(Ryan et al., 2002)。黑殭菌的區域比其親株培養製造更少的 DA(*I*)、DB(*II*) 及 DE(30)，而不受菌



株種類影響。這可能取決於多個信號，其中之一可能與菌絲能否利用某些營養素能力的差異有關(Shah and Butt, 2005)。

應用

黑殭菌素屬於環狀縮酚酸胜肽一系列應用之一，如殺蟲、細胞毒性、抗病毒、免疫抑制劑及植物毒性等。憑藉其結構，黑殭菌素展現廣泛的生物和殺蟲的活性(Pedras et al., 2002; Sowjanya Sree et al., 2008)。黑殭菌素也透過對鱗翅目昆蟲和人類細胞株某些蛋白質磷酸化，而導致傳訊變化(Dumas et al., 1996)。斜紋夜蛾幼蟲經黑殭菌素處理 9 天後，幾種抗氧化酵素(過氧化氫酶、過氧化物酶、抗壞血酸氧化酶、超氧化物歧化酶)的狀態、及脂質過氧化和脂氧合酶的表現量產生顯著變化。顯示幼蟲暴露於黑殭菌素中，可引起氧化壓力(Sowjanya Sree and Padmaja, 2008)。黑殭菌素對體外昆蟲漿細胞形態和細胞骨架變化的影響曾有報導，這些變化對昆蟲細胞免疫反應(如封裝和吞噬功能)所造成的不利影響，也曾被報導過會阻礙 DNA、RNA 及蛋白質的合成(Sowjanya Sree and Padmaja, 2008; Vey et al., 2002; Vilcinskis et al., 1997)。Pal et al. (2007)發現 DA (*I*)藉由針對昆蟲的先天免疫信號路徑、介導特定抗菌胜肽的向下調控(AMPs，特別是天蠶素、埃及斑蚊抗菌蛋白、腹果蠅抗菌胜肽及家蠅抗菌胜肽)。此外，DB (*II*)也可作為對斜紋夜蛾(FAB)的有效殺蟲劑，半數效應濃度(EC₅₀)為 0.17 mg/mL



(Rizwan-ul-Haq et al., 2009; Sowjanya Sree and Padmaja, 2008)。對草地夜蛾 (Skrobek and Butt, 2005)和煙草天蛾(Hinaje et al., 2002)有鈣離子通道活化的調節功能。DB (*11*)和去甲基黑殭菌素 B (DMDB) (*14*)對甘藍型油菜植物也具有植物毒性(Pedras et al., 2000; Pedras and Biesenthal, 2000)。在本節中，有關黑殭菌素應用的詳細內容將著重於液泡型氫離子 ATP 酶的抑制、生物防治特性及各種功能。

生物防治劑

真菌是自然界中最常見的昆蟲病原體，因此，使用活真菌以控制昆蟲族群已經成為醫療和農藝有趣的主題(Aguilar et al., 2005; Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2006)。最近的研究已經確認，引起瘧疾的蚊子容易受白殭菌和黑殭菌感染，進而降低由瘧蚊引起的瘧疾傳染。黑殭菌已經應用於商業用途，用來控制白蟻(Hoe et al., 2009; Hussain et al., 2011; Wang and Powell, 2004)、蝗蟲、薊馬(Hunter et al., 2001; Maniania et al., 2002)、煙粉蝨、紅蜘蛛、蟎蟲卵(Shi and Feng, 2004; Tounou et al., 2003)、果蠅(Elliot et al., 2002)和蚊子(Alves et al., 2002)；更多其他例子請參考文獻 Pedras et al. (2002)。

Thomsen 和 Eilenberg (2000)使用 DA (*1*)、DE (*30*)和合成類似物 hpy-6 DE 對地老虎和甘藍菜青蟲幼蟲進行處理，生物測定結果顯示：甘藍菜青蟲



比地老虎青蟲更容易受黑殭菌素影響。DE (30)似乎最能對抗甘藍菜青蟲，其次是合成的類似物 hpy-6 DE，而 DA (I)是最不具活性的。純黑殭菌素對於甘藍菜青蟲的毒性、提供進一步黑殭菌素作為這種昆蟲控制劑的研究基礎，黑殭菌素對地老虎青蟲幼蟲僅有微弱影響，同時，觀察到的幼蟲死亡率似乎是因黑殭菌素的拒食作用造成的飢餓的結果，而不是直接毒性造成的。在 DA (I)、DB (II)及 DE (30)在爪哇擬青黴對斜紋夜蛾的致病性中也有相似的效應(Hu et al., 2007)。黑殭菌素的抑制作用半抑制濃度(ECIS₅₀)來判定的，也就是在 50%的細胞反應抑制時的濃度。透過秋行軍蟲(*S. frugiperda*)細胞阻抗譜的探討指出，只需化學結構略有變化，就可引起顯著的抑制效果。DB (II)最具抑制效果，但 DB2 (I3)或 DC (23)的抑制效用明顯地降低。DA(I)具有降低抑制的效果，而在結構上形成 DE (30)時，會抵銷其抑制作用(Male et al., 2009)。黑殭菌素是加速感染昆蟲死亡的重要致病因素(Dumas et al., 1994; Kershaw et al., 1999)，事實上，綠殭菌菌株所產生更大量的黑殭菌素是更致命的(Schrank and Vainstein, 2010; Sowjanya Sree et al., 2008)。黑殭菌素與鐮刀菌毒素和白殭菌素相關，這兩種黴菌毒素具有殺蟲、植物毒性和抗菌活性，像他們一樣，其生物活性是與其離子載體特性有關的(Pedras et al., 2002; Hinaje et al., 2002)，那是與陽離子形成複合物的能力，而由複合離子誘導選擇性的膜通透性。分子動力學計算顯示：DA (I)的離子載體特性



透過操控與鈣形成配位複合物，其中二價陽離子被束縛在由二個 DA (*I*) 分子間的三明治中心，已被證實和顯示具有不同的生物效應(Hinaje et al., 2002)。

DB (*II*)與茶皂素的研究顯示：他們管控蘇力菌的亞種(B.t.k.)對抗甜菜夜蛾(Rizwan-ul-Haq et al., 2009)和雲杉蚜蟲(Brousseau et al., 1998)的增效協同效應，類似的協同效應也可在合成殺蟲劑對抗銅金龜子看到。這種機制藉著殺蟲壓力減弱銅金龜子幼蟲的免疫系統，有利於幼蟲感染黑殭菌(Hiromori and Nishigaki, 2001)。然而，昆蟲中腸的刷狀緣膜被認為是與殺蟲蛋白產生交互作用的最初現場。因此，看來一方面確定正確的靶蛋白抑制劑結合位置是絕對必要的，而另一方面也發現抑制劑關鍵結構元素。

Favilla et al. (2006)建立二種無脊椎動物模式(豐年蝦和水蚤)評估 DA (*I*) 的生態毒理學的關聯性。一般來說，大型蚤的敏感性比豐年蝦高得多。DA (*I*) 毒素對大型蚤的半致死劑量(LC₅₀)被發現為 0.27 μM (暴露 36 小時的測定值)。顯然，這二種無脊椎動物對於測驗的代謝產物是非常敏感的。因此，可利用無脊椎動物生物測定法來測定黑殭菌素的毒力，和其他代謝產物的一般毒性初步評估。科羅拉多馬鈴薯甲蟲細胞株(含胚卵的衍生物)對於黑殭菌素毒素也很敏感(Charpentier et al., 2002)。當對果蠅注射非致死劑量的 DA (*I*)時，昆蟲因敗血症產生的死亡率會增加。受感染的昆蟲通常會找溫度比



較高的地方以增加體溫，從而抑制感染微生物的發展(Elliot et al., 2002)。因此，黑殭菌素的作用可減低宿主的活動性，也會損害間隔的防禦機制。使用 cDNA 和 PCR 檢驗 DA (*I*)對成年果蠅基因表現的影響，數據顯示，抗菌肽基因有明顯比例的向下調控現象。此步驟透過免疫缺乏症(IMD)路徑成份的異位活化來挽救，這是二個負責抗菌肽誘導的信號傳遞路徑之一，這些數據顯示 DA (*I*)對昆蟲的體液免疫反應造成特定的抑制現象(Pal et al., 2007)。然而，作為產生黑殭菌素真菌宿主的昆蟲和植物可藉酵素方式對黑殭菌素進行解毒。不同黑殭菌素的新陳代謝與羥基酸殘基的存在一致(Pedras et al., 2002)。昆蟲所使用避免因黑殭菌素誘發細胞死亡的解毒路徑的知識，可能會導致作為選擇性生物控制劑的解毒酵素抑制劑之發展。

其他生物效應

蝗蟲(東亞飛蝗)可有效解除黑殭菌素毒性(reviewed in Pedras et al., 2002)，蝗蟲可高度抵抗這種類毒素對宿主昆蟲引起的強直性癱瘓，接著因打開鈣通道而引起膜的去極化，造成的無力症狀，可能引發多種細胞反應(Hinaje et al., 2002; Vey et al., 2002)。黑殭菌宿主大蠟螟也可以對黑殭菌素進行生物性轉化，藉黑殭菌素起始物質的特殊結構，能夠產生不同於飛蝗的解毒產物(Kershaw et al., 1999; Moon et al., 2008)。大部分可感染病殺死大蠟螟及其他昆蟲的常見黑殭菌菌株可製造黑殭菌素，如果黑殭菌素能由分子



遺傳學方法確認為綠殭菌的致病因素，黑殭菌素製造和宿主易感性/病原毒力間的強相關性可顯示大蠟螟和黑殭菌之間進行的演化軍備競賽，黑殭菌素易感宿主的解毒機制並不足以使作為病原的真菌失去能力。此外，因直翅目感染菌株的體外黑殭菌素檢測方式無法準確測定體內產量，這些關聯性顯示，黑殭菌素可能不會在直翅目受黑殭菌介導的病變過程中扮演重要角色(Rohlf and Churchill, 2011)。

除殺蟲效用外，黑殭菌素也誘發各種生物效應，黑殭菌素對哺乳動物白血病細胞與脾臟淋巴細胞也有毒性(Morel et al., 1983; Odier et al., 1992; Pedras et al., 2002; Skrobek and Butt, 2005)，並已證實對小鼠腫瘤具有體外抗增殖活性。黑殭菌素的抗腫瘤效應經在白血病細胞 P388 研究顯示，DE(30)比 DA(I)和 DB(II)具有更好的抗增殖活性。DA (I)、DB (II)和 DE (30)抑制 50%細胞增殖所需的最低濃度(IC₅₀)分別為 11.7、9.4 和 0.33 μg/mL (Odier et al., 1992)。

此外，DB (II)、類 DB (16)和 DE2 氣醇 (34)顯示具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原作用的抗病毒特性(Chen et al., 1997; Sun et al., 1994; Yeh et al., 1996)；DA4 氣醇(7)被發現可作為紅血球細胞生成素(EPO)，調控未成熟紅血球細胞增殖和分化的主要激素)基因表達的誘導劑(Cai et al., 1998)。Kobayashi et al. (2004)顯示 DE (30)可降低細胞週期蛋白 D1 mRNA 的轉譯、



導致不需黏附且表現 V-Ki-ras 的 pMAM-ras-REF 細胞生長受抑制。DE (30) 似乎可誘導細胞週期蛋白 D1 mRNA 的不穩定性，或比起黏附生長細胞，對於不需黏附生長細胞具有較佳抑制細胞週期蛋白 D1 基因能力。因此，DE (30) 對於過度表現細胞週期蛋白 D1 的腫瘤細胞可能是一個抗癌試劑的候選對象。

抑制 β -澱粉樣蛋白(A β)產生和加強其降解作用被提及是治療阿茲海默症的主要策略。Itoh et al. (2009)觀察到 DE (30)可以減少 A β 產生，而不影響與 A β 產生有關的 BACE (β -澱粉樣蛋白裂解酶或 β -分泌酶)及 PS/ β -分泌酶活性，顯示 DE (30)不會抑制 Notch 傳訊。另外，DE (30)藉減少 BACE1 和 β APP (β -澱粉樣蛋白前驅物)共存現象來減少 A β ；共存現象減少可能由可降低 β APP 進行 β -裂解的 BACE1、在 BACE1 次細胞定位的明顯變化來誘發的。作者推論 DE(30)是一種新的 A β -減少步驟，可能比分泌酶抑制劑有較少副作用(Itoh et al., 2009)。



第二章 毛細管電泳簡介與黑殭菌素之分析

2-1 毛細管電泳簡介與背景

2-1-1 毛細管電泳之簡介

毛細管電泳技術(Capillary Electrophoresis ; CE)又稱高效毛細管電泳(HPCE)或毛細管分離法(CESM)，電泳被定義為荷電物質(離子)在電場中受吸引或排斥而引起的差速運動。電泳作為一種技術出現已有近百年的歷史，但真正被視為生物化學中一種重要的技術是由 1937 年 Tiselius 首先提出。而 1967 年 Hjerten 最先提出在直徑為 3 mm 的毛細管中做自由溶液的區帶電泳(Capillary Zone Electro-phoresis, CZE)。但他沒有完全克服傳統電泳的弊端。現在所說的毛細管電泳技術(CE)是由 Jorgenson 和 Lukacs 在 1981 年首先提出，他們使用了 75 mm 的毛細管柱，用熒光檢測器對多種組分實現了分離。1984 年 Terabe 將膠束引入毛細管電泳，開創了毛細管電泳的重要分支：微胞電動層析法(MEKC)。1987 年 Hjerten 等把傳統的等電聚焦過程轉移到毛細管內進行。同年，Cohen 發表了毛細管凝膠電泳的工作。近年來，將液相色譜的固定相引入毛細管電泳中，又發展了電色譜，擴大了電泳的應用範圍。

當電泳從凝膠板上移到毛細管中以後，發生了奇蹟般的變化：分析靈



敏度提高到能檢測一個鹼基的變化，分離效率達百萬理論塔片數；分析片段能大能小，小到分辨單個核苷酸的序列，大到分離 Mb DNA；分析時間由原來的以小時計算縮減到以分、秒計算。CE 可以說是經典電泳技術與現代微柱分離技術完美結合的產物，它使分析科學得以從 μL 水平進入 nL 水平，並使單細胞分析，乃至單分子分析成為可能。長期困擾我們的生物大分子如蛋白質的分離分析也因此有了新的轉機。

毛細管電泳技術是一類以毛細管為分離通道，以高壓直流電場為驅動力，根據樣品中各組分之間遷移速度和分配行為上的差異而實現分離的一類液相分離技術，迅速發展於 80 年代中後期。它實際上包含電泳技術和色譜技術及其交叉內容，是分析科學中繼高效液相色譜之後的又一重大進展，近幾年來分析化學中發展最為迅速的領域之一。

毛細管電泳技術的基本原理是根據在電場作用下離子遷移的速度不同而對組分進行分離和分析，以兩個電解槽和與之相連的內徑為 $20\sim 100\ \mu\text{m}$ 的毛細管為工具，毛細管電泳所用的石英毛細管柱，在 $\text{pH} > 3$ 的情況下，其內表面帶負電，和緩衝液接觸時形成雙電層，在高壓電場的作用下，形成雙電層一側的緩衝液由於帶正電荷而向負極方向移動形成電滲流。同時，在緩衝液中，帶電粒子在電場的作用下，以不同的速度向其所帶電荷極性相反方向移動，形成電泳，電泳流速度即電泳淌度。在高壓電場的作用



用下，根據在緩衝液中各組分之間遷移速度和分配行為上的差異，帶正電荷的分子、中性分子和帶負電荷的分子依次流出，帶電粒子在毛細管緩衝液中的遷移速度等於電泳淌度和電滲流的矢量和，各種粒子由於所帶電荷多少、質量、體積以及形狀不同等因素引起遷移速度不同而實現分離；在毛細管靠負極的一端開一個視窗，可用各種檢測器。目前已有多種靈敏度很高的檢測器為毛細管電泳提供質量保證，如紫外檢測器(UV)、激光誘導熒光檢測器(LIF)、能提供三維圖譜的二極管陣列檢測器(DAD)以及電化學檢測器(ECD)。由於毛細管的管徑細小、散熱快，即使是高的電場和溫度，都不會向常規凝膠電泳那樣使膠體變性，影響分辨率。

2-1-2 毛細管電泳應用

電泳是被定義為電荷物質在電場中因受正、負電的吸引或排斥而引起的差速運動。在 1967 年時 Hjerten 發表利用內徑為 1~3 mm 的石英管，同時以甲基纖維素(methylcellulose)修飾石英管內壁，防止產生電滲透(electroosmosis)，且在施加高電壓下，進行區帶電泳的實驗，並將此技術成功地應用在無機離子、蛋白質與核酸的分離上。目前毛細管電泳技術已成熟，搭配各種高靈敏度之偵測器，形成不同的分離模式，如：毛細管區帶電泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)、微胞電動力層析法(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)、毛細管等電聚焦電泳(Capillary

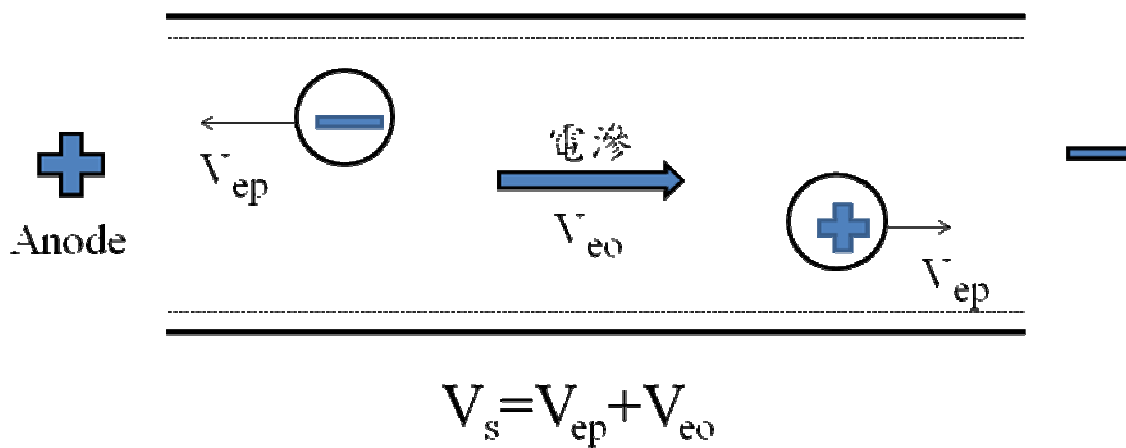


Isoelectric Focusing, CIEF)、毛細管填膠電泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)等。此技術應用於藥物、環境汙染物和生化分析上，具簡便、分離效率高與溶劑消耗量低等諸多優點之分析方法(石, 2001)。

2-2 電泳與電滲透流

毛細管電泳源自於傳統電泳，其原理是利用溶液中帶電荷粒子在外加電場作用下，負電荷粒子受到正極吸引，正電荷粒子受到負極吸引，分別往正負極移動，且不同的電荷密度造成移動速度不同，而使得分析物質在毛細管內被分離，由圖 2-1 即可清楚了解(何,1993)。

分析物在毛細管電泳內的移動是由兩種不同因素所造成，一種是分析物在水溶液中解離成帶電粒子後受到電場作用所產生的移動速度，稱為電泳(Electrophoresis)，另一種則為緩衝溶液本身由於受到管壁電荷作用及外加電壓的影響，而產生一電滲透流(Electroosmotic flow, EOF)現象。這兩種作用力相加後所得的靜移動速度為分析物分離的要素。而影響電滲流的因素有電場強度、緩衝溶液 pH 值、緩衝溶液濃度等(表 2-1)。電滲流之特性為具有獨特的平面流型特性，由於液體的流動沿毛細管均勻分布，不會在毛細管內形成壓力差。由圖 2-2 可得知 CZE 與 HPLC 波峰之差異，主要因動力所造成的波峰擴散現象，使訊號更明顯。



s : sample

ep : electrophoresis

eo : electroosmotic flow

圖 2-1 毛細管電泳原理

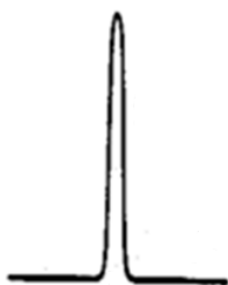
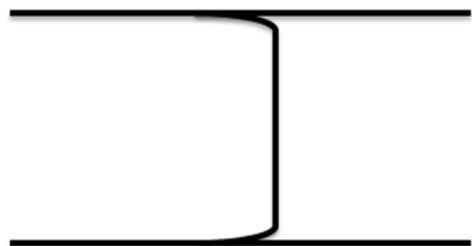


表 2-1 電滲流(Electroosmotic flow, EOF)之變因(陳,2008)

變數	結果	說明
電場強度	電滲流成比例變化	<ul style="list-style-type: none"> ○ 場強降低可能引起分離效率和分離度下降 ○ 場強增加可能引起焦耳熱
緩衝溶液之pH值	低pH，EOF降低 高pH，EOF增加	<ul style="list-style-type: none"> ○ 改變EOF最方便有用的方法 ○ 可能改變溶質的電荷結構
緩衝溶液濃度(離子強度)	增加離子強度，Zeta電位下降，EOF下降	<ul style="list-style-type: none"> ○ 高離子強度產生大電流和焦耳熱 ○ 低離子強度吸附成問題 ○ 如果與樣品電導不同將引起峰變形 ○ 降低離子強度將限制樣品堆積的效果
溫度	改變黏度，每°C變化2~3%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 由儀器控溫，一般改變溫度是有用的方法
有機改變劑	改變Zeta電位和黏度，EOF一般下降	<ul style="list-style-type: none"> ○ 變化複雜，其效果通過實驗確定 ○ 可能調節選擇性
表面活性劑	透過疏水或離子相互作用吸附於毛細管壁表面	<ul style="list-style-type: none"> ○ 陰離子表面活性劑可增加EOF ○ 陰離子表面活性劑可降低EOF或使之反向
親水高聚物	透過疏水相互作用吸附於毛細管壁	<ul style="list-style-type: none"> ○ 通過覆蓋表面電荷和降低EOF
共價鍵合	化學鍵合於毛細管壁	<ul style="list-style-type: none"> ○ 多種可能的改性(親水的或帶電的) ○ 穩定性常常有問題



EOF



Laminar flow

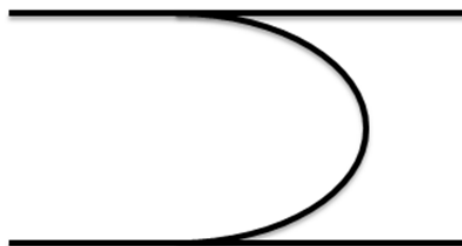


圖 2-2 毛細管區帶電泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)和高效能液相層析(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)的流動分佈 (李,2002)



2-3 毛細管電泳之各種分離模式

1. 毛細管區帶電泳法(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)

毛細管區帶電泳為一種最簡便的方法，僅須將毛細管柱內填充緩衝溶液後，再施加高電壓，根據樣品物質之電荷/質量比質差異以不同速率在毛細管區帶中進行遷移分離，比值越大，跑得越快。且正、負離子及無帶電荷物質皆會向負電極移動，所以 CZE 可同時偵測正電荷、負電荷與中性物質(圖 2-2)。因此緩衝溶液的 pH 值為造成分離的主要因素，以及緩衝溶液的濃度液會影響(傅, 2005)。由於技術的成熟，此方法常運用在於胺基酸分析、蛋白質純度分析及陰、陽離子的分析方面(李, 2002)。

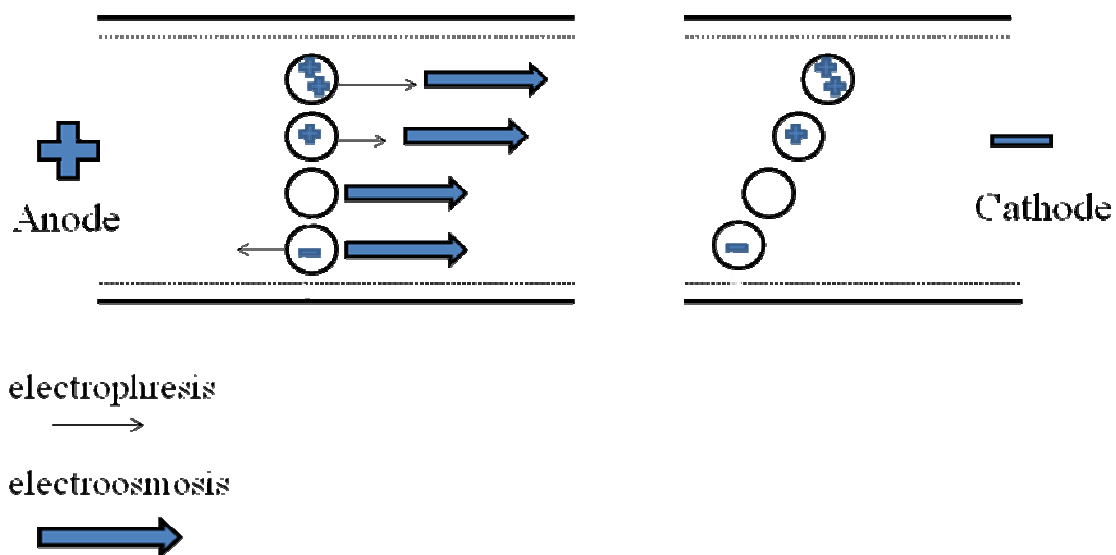


圖 2-3 CZE 機制分離圖



2.毛細管填膠電泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)

毛細管內先填充膠體(例如 polyacrylamide 或 cellulose)，此時膠體會在毛細管內形成分子篩，樣品依分子量大小以及電荷密度的差異而有不同的遷移性(黃, 2002)。通常應用於生物學上大分子物質的分離，如:蛋白質、核酸。

3.毛細管等電聚焦電泳(Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)

CIEF 是依據分析物等電點(isoelectric point)的不同，其在各 pH 值梯度溶液中，藉著移動係數不同而將分析物分離。但此方法需要注意需將電滲流值減至最低，待聚焦(focusing)後，使用氣體將壓力以等電聚膠方式將樣品推進，以達到分離的效果(黃, 2002)。

4.微胞電動力毛細管層析(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC)

毛細管電泳層析能同時分離中性及帶電溶質的電泳技術為微胞電動力毛細管層析。乃因在緩衝溶液中添加適量的界面活性劑，當界面活性劑濃度大於微胞之臨界濃度時，則會形成微胞均勻分布於緩衝溶液中，稱之為假靜相。而 MEKC 的分離機制是基於微胞與中性分子間的相互作用而分離(圖 2-4)(黃, 2002)。

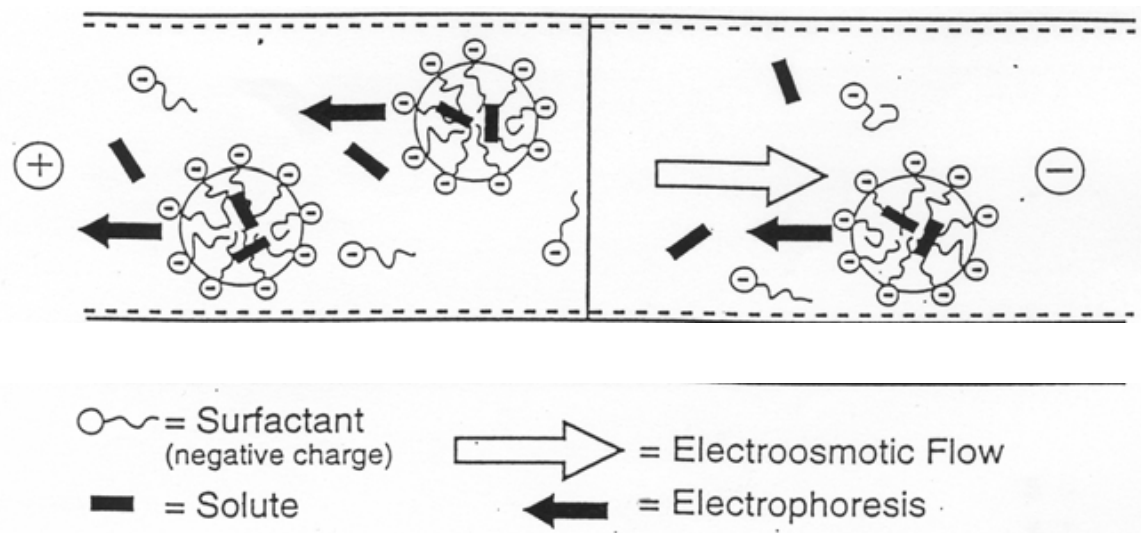


圖 2-4 MEKC 機制分離圖(黃, 2002)



2-3-2 毛細管電泳對於蛋白質、胜肽之應用

蛋白質以及胜肽為食物組成中不可或缺的物质，而通過對蛋白質的測定，可以評估食品的價值，也可做為鑑定食品的依據。毛細管電泳技術比其他色譜技術更適合蛋白質分析，因為它有著非凡的分離效率和很低的分析成本。毛細管電泳技術比其他色譜技術更適合蛋白質分析，因為它有著非凡的分離效率和很低的分析成本。毛細管電泳應用於食品中蛋白質的分析已經有很多文獻報導，Luguera 採用毛細管凝膠電泳測定了葡萄酒在生產過程中蛋白質的變化，用以研究提高葡萄酒的質量；Recio 用毛細管電泳研究了牛奶在高溫處理過程中蛋白質的變化狀況及耐熱蛋白酶所產生的多胜肽；Kanning 用毛細管電泳研究了母乳、牛乳、山羊乳中蛋白和多胜肽的構成，發現根據電泳圖的特徵可以判斷乳的種類和是否摻假；也有文獻報導用毛細管電泳分析穀物中的高分子量麥谷蛋白。採用毛細管凝膠電泳測定了葡萄酒在生產過程中蛋白質的變化，用以研究提高葡萄酒的質量；在胜肽方面毛細管電泳研究了牛奶在高溫處理過程中蛋白質的變化狀況及耐熱蛋白酶所產生的胜肽(黃，2010)。

2-3-3 毛細管電泳對於醣類之應用

天然產物中的糖類種類繁多、結構複雜，常與蛋白、脂肪形成複合物



。單糖的 pK_a 值一般大於11，故需選用強鹼性的緩衝液，使糖基上的羥基去質子而帶負電荷，直接進行電泳分離，用紫外光(195 nm)進行檢測，也可以選用硼酸鹽緩衝液，硼酸鹽與糖基結合形成帶負電荷的化合物以進行電泳分離，多糖一般利用酸解或酶解的方法將其轉化為寡糖後進行分析。在糖胺聚糖(GAG)類糖基的聚糖部分有透明質酸、硫酸軟骨素、硫酸角質素和肝素等，一般都含有重複的二糖體，而且可用裂解酶降解成醣醛酸化酸性寡糖，這些寡糖既帶電荷又有紫外光吸收(232 nm)，因此很適合用CE進行分析(黃，2010)。

2-3-4 毛細管電泳對於生物鹼、酚酸類化合物之應用

生物鹼為含氮的有機化合物，呈鹼性，低pH的環境下帶正電荷，所以生物鹼能用毛細管電泳在 $pH < 7$ 的緩衝溶液中得到分離分析。對於酚酸類化合物，在高pH下，不但酚酸上的羧基能離解，在電場的作用下實現分離。(黃，2010)

2-3-5 毛細管電泳對於維生素、有機酸之應用

維生素的測定方法很多，毛細管電泳在 Vit C、Vit B₁、Vit B₂、Vit B₆、Vit B₁₂、乳清酸、泛酸等維生素的分析方面速度快，方法簡單目前的文獻指出能夠用毛細管電泳分析之有機酸:檸檬酸、蘋果酸、酒石酸、琥珀酸、草酸、醋酸、乳酸等等。毛細管電泳同時檢測了啤酒中的檸檬酸、蘋果酸、醋酸、



乳酸、琥珀酸、丙酮酸等幾種有機酸；還有酒中的氯離子和乳酸進行了分析(黃，2010)。



2-4 黑殭菌素之毛細管電泳定量分析

黑殭菌素有30餘種的衍生物，本研究以自行發酵之黑殭菌發酵液中的黑殭菌素進行定性、定量分析，而黑殭菌素結構與極性皆極相似，如用高效能液相層析法，分離時間長且溶劑耗費量大，因此採用毛細管電泳層析法，以取代高效能液相層析法，能有效分離及減少溶劑的使用量。而本實驗引用黃玄舜學長所建立的建立毛細管電泳層析法之分析條件為藍本加以改良，並建立實驗室所擁有黑殭菌素之檢量線(黃, 2001)。

2-4-1 材料與方法

緩衝溶液之配製

本實驗所使用之緩衝溶液是由 Sodium borate 與 ACN 所配製而成，取適量 Sodium borate 配製成不同濃度組合之溶液，待溶解後利用 1 N 氫氧化鈉與鹽酸調至所需 pH 值，最後將此緩衝液以 0.22 μm 孔徑濾膜過濾以備使用。

儀器

本實驗使用設備為自動毛細管電泳儀 P/A CE MDQ Capillary



Electrophoresis system (Beckman Instrument, Inc. Palo Alto, CA., U.S.A), 而實驗分離所用的毛細管柱為 Beckman 所生產的熔融石英毛細管，毛細管外包覆一層聚醯亞胺，管柱內徑 50 μm ，外徑 375 μm ，長度為 57 cm。

藥品

Acetonitrile(ECHO, Miaoli, Taiwin)

Sodium borate(SIGMA, St.Louis, USA)

Sodium hydroxide(SHOWA, Tokyo, Japan)

Hydrochloric acid(Scharlau, Barcelona, Spain)

2-4-2 菌種與菌種保存

本實驗使用本土菌株 F061，由台灣省農業藥物毒物試驗所提供，於南投水稻田之水稻水象鼻蟲上採集得到。

菌種取得後以平面培養方式大量培養，14 天後利用無菌水將孢子洗下，至入冷凍小管中，於 -80°C 冰箱冷凍保存。

前培養

為活化菌株與縮短延滯期，故將黑殭菌孢子懸浮液接種於 500 mL 含有 3% CD broth 及 0.75% bacto peptone 之 200 mL 培養基的有溝槽三角錐型瓶中，置於 28°C 、200 rpm 震盪培養箱中培養 4 天。



發酵培養

發酵系統

5 L 攪拌式發酵槽(BTF-A5L，頂生公司，台中，台灣)

偵測系統：酸鹼電極(Inpro3030/225, Mettler Toledo, Switzerland)；溫度計；

溶氧電極(Ingold, Switzerland)；消泡電極

發酵流程

最初發酵體積為 3 公升，培養基內含 2.51% maltose, 0.75% bacto peptone, 0.02% β -alanine 及 0.43% glucose，配製後置入滅菌釜以高溫高壓(121°C、1.2 atm)進行滅菌 20 分鐘。滅菌後迅速通入過濾空氣維持槽內正壓以免汙染，以浮子流量計控制通氣量，空器出口以冷凝管冷凝蒸氣減少水分蒸發。設定參數：轉速為 150 rpm、溫度為 28°C、通氣量為 0.3 vvm、酸鹼值為 pH 9 之最適生長條件，所有參數到達穩定時，將前培養 4 天之黑殭菌液以 10% 接菌量接種於發酵槽體內，為避免發酵期間起泡，發酵過程中以消泡劑來進行消泡，而酸鹼值則用 1 N NaOH 及 1 N HCl 來控制。

通氣量的計算

$$\text{vvm} = \text{通氣量(LPM)} / \text{發酵槽工作體積}$$



2-5 結果與討論

緩衝液的選擇

本實驗主要是為了分析性質相近之黑殭菌素，黑殭菌素為一種環狀肽物質，由五個胺基酸和一個 α -醇酸所組成，目前以 DB 產量最高，其次為 DC、DE、DMDB 與 DA，五種黑殭菌素超過總產量的 80%，所以以毛細管電泳分析黑殭菌素時，首先將目標設定在分析這幾種黑殭菌素，並做為指標分析物。

本實驗所選用緩衝溶液為 Sodium borate 水溶液，當樣品物質之電荷/質量比質差異以不同速率在毛細管區帶中進行遷移分離，比值越大，跑得越快。正、負離子及無帶電荷物質皆會向負電極移動，所以 CZE 可同時偵測正電荷、負電荷與中性物質。因此緩衝溶液的 pH 值為造成分離的主要因素，以及緩衝溶液的濃度亦會影響，而緩衝溶液濃度效應亦是離子強度效應，離子強度的增加，降低管柱的有效表電荷，並造成毛細管內壁電雙層被壓縮，使表面電位降低而降低電滲流 EOF 的速度，使溶質的移動速度減少所以分析物遷移時間較長，離子強度增強會降低電滲流導致遷移時間延長，亦將 Sodium borate 濃度由 40 至 50 mM (圖 2-5)，結果發現 40 mM 有最佳解析度。



pH 值的影響

毛細管壁矽醇基氫離子會隨著 pH 值的增加而解離，在 pH 2.8 以上會開始解離，隨著管壁氫離子解離使管壁負電荷增加，最後促使電滲流提高，而 pH 值能改變兩性分析物的帶電性，並影響分析物在電場中的遷移率，造成選擇性的改變，所以改變 pH 值對毛細管區帶電泳而言是相當重要的，因此調整 pH 值由 9.24 至 9.8 (圖 2-6)，而實驗發現，當 pH 值逐漸升高，解析度則越佳，pH 值至 9.8 時已有相當好的解析度，所以選擇此 pH 值做為分析的條件。

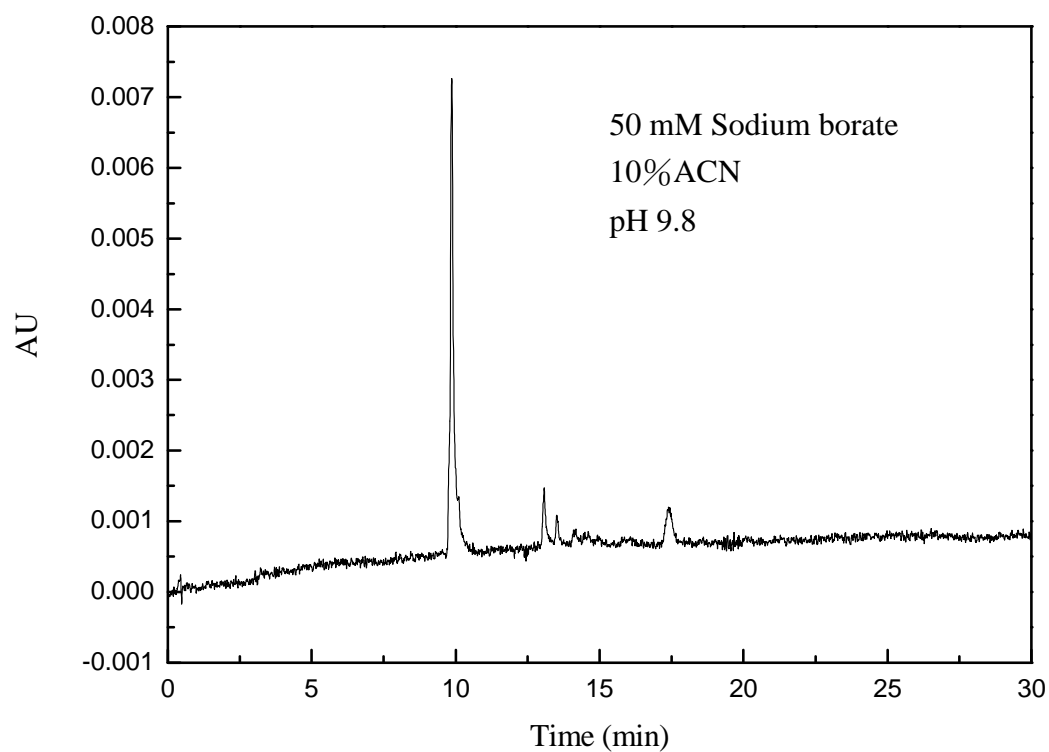
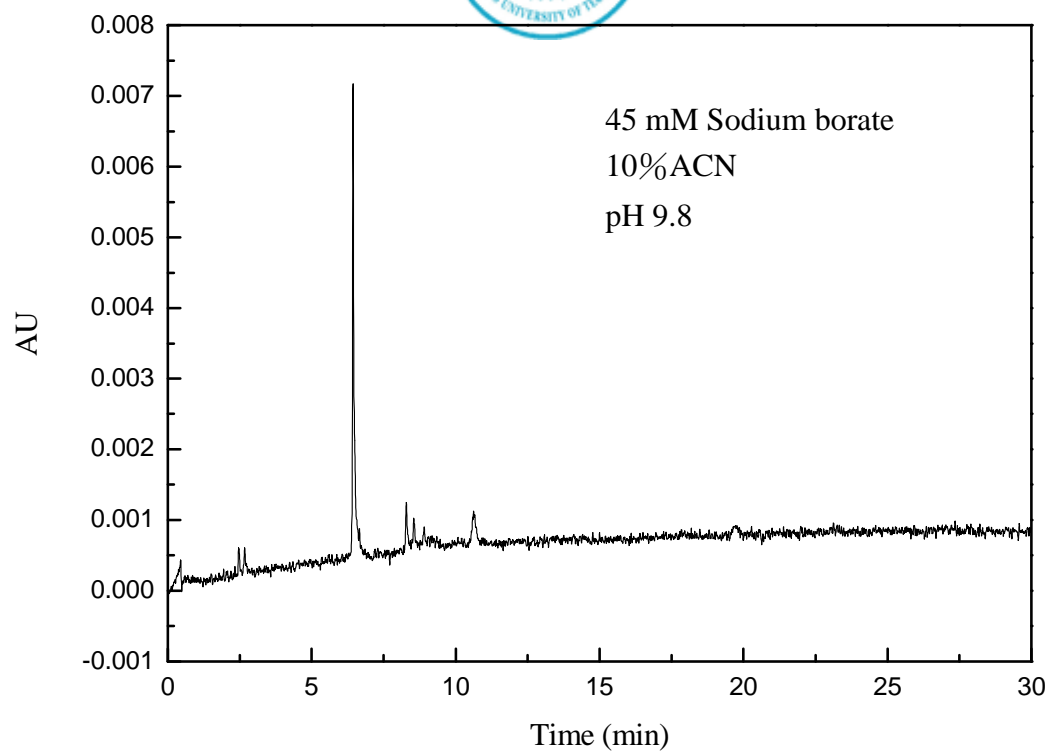


圖 2-5 不同緩衝溶液濃度下分析黑殭菌素之層析圖譜

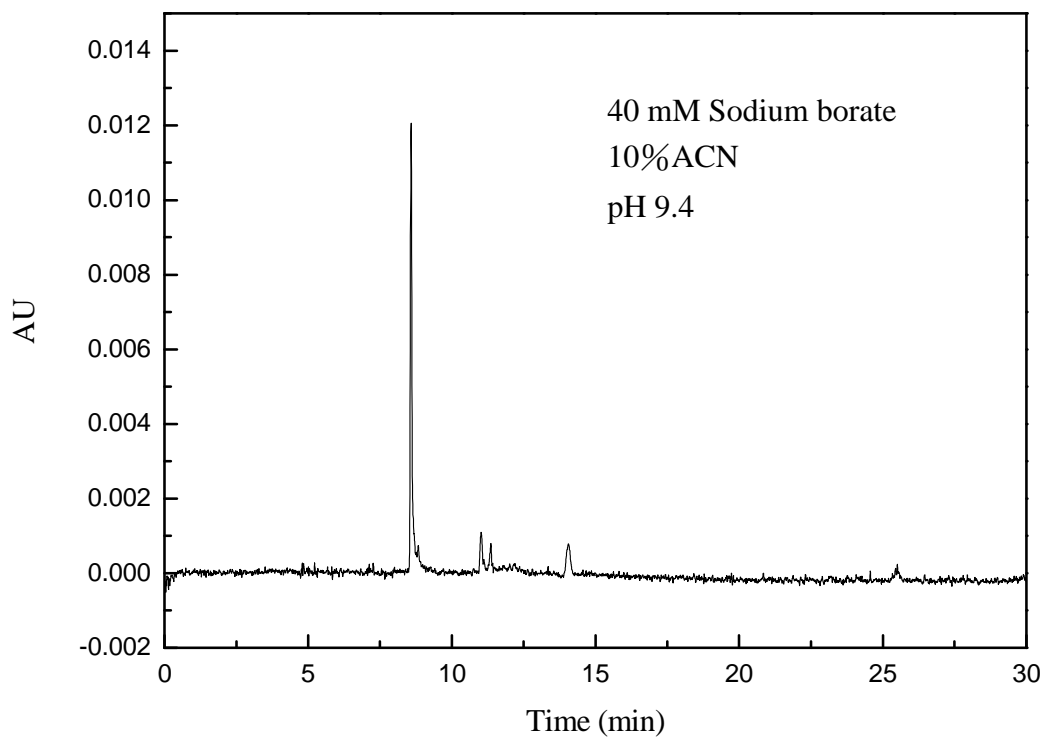
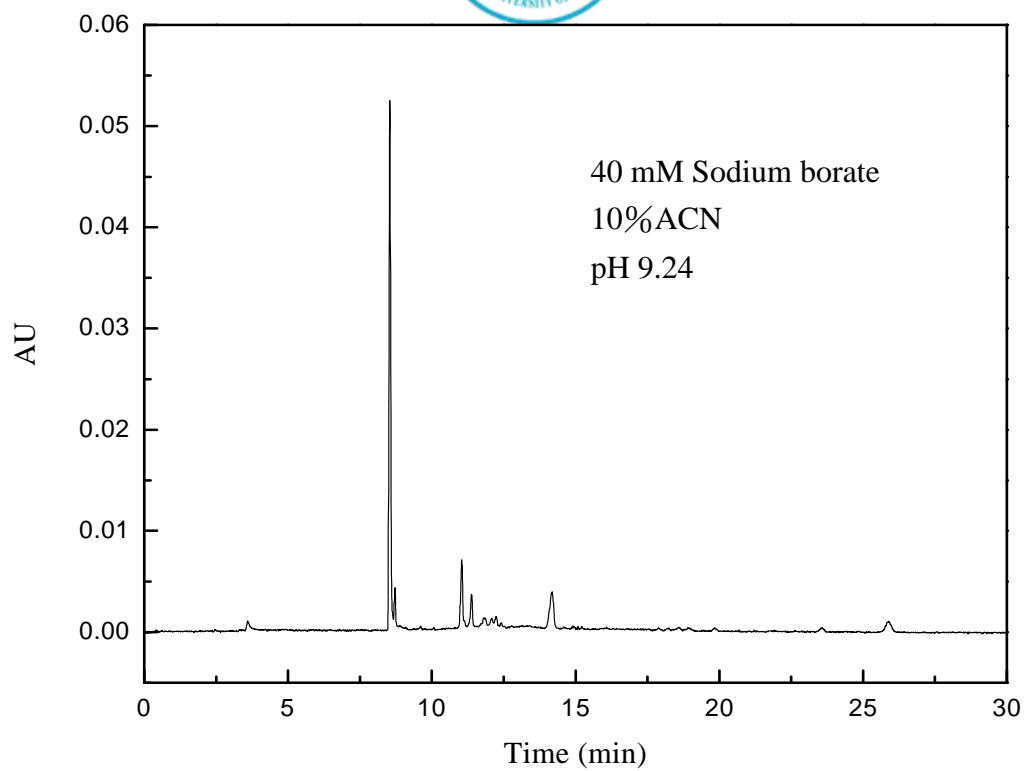


圖 2-6-1 不同 pH 值下分析黑殭菌素之層析圖譜

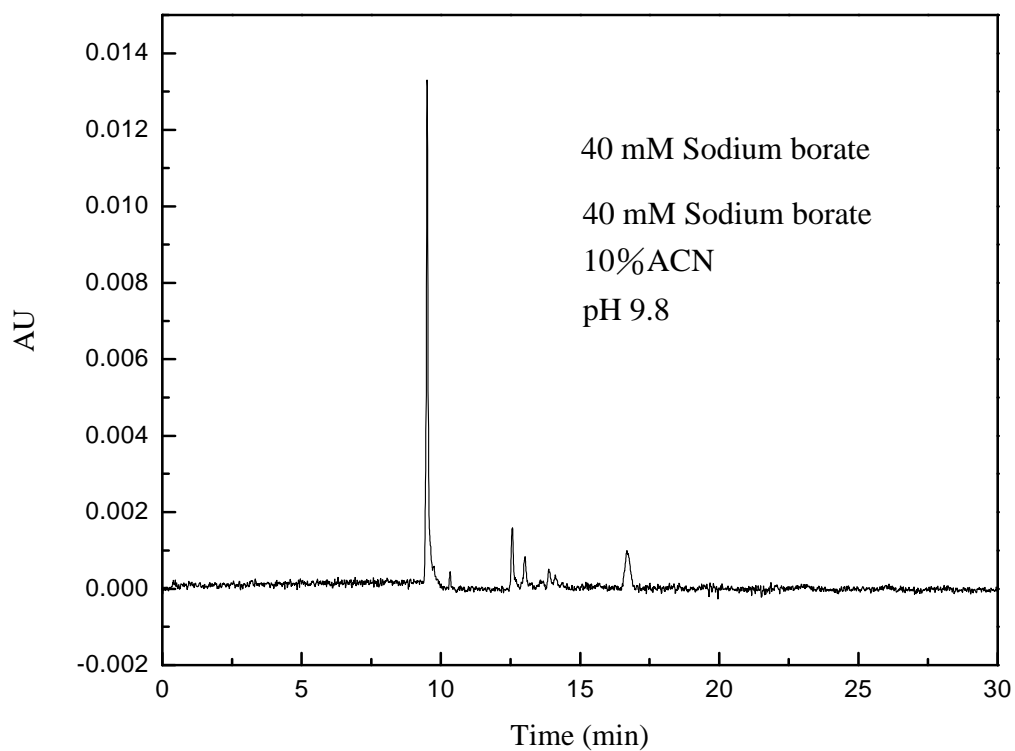
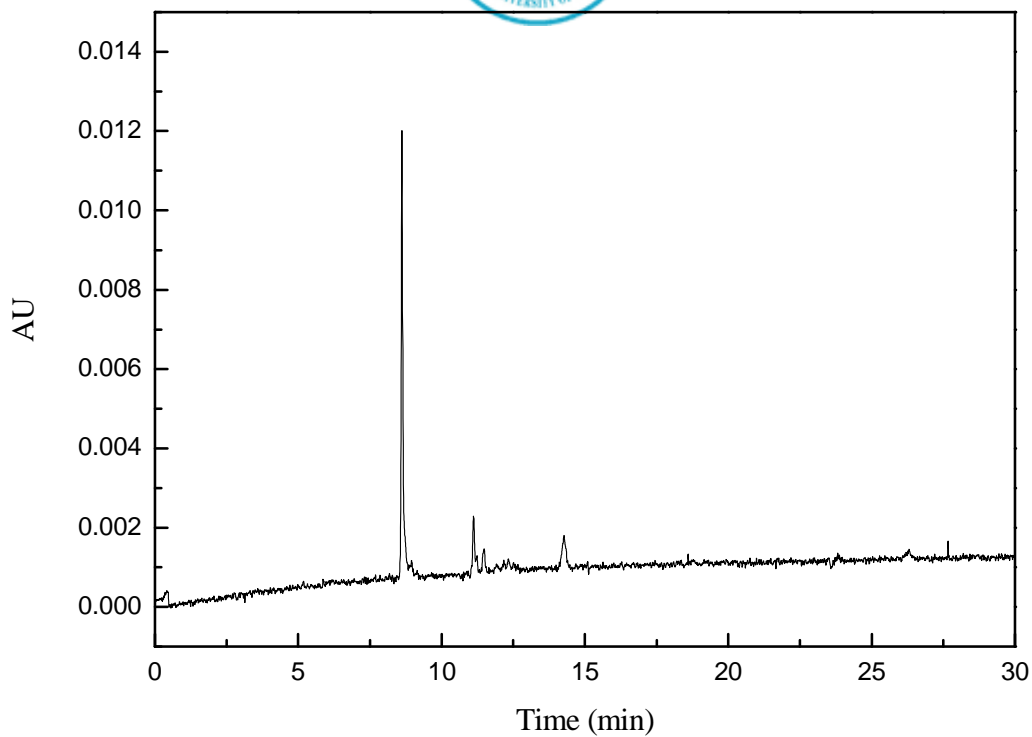


圖 2-6-2 不同 pH 值下分析黑殭菌素之層析圖譜



第三章 黑殭菌素之分離純化

3-1 前言

黑殭菌的二次代謝產物為黑殭菌素，目前發表於世界期刊文獻中包含天然及合成之結構類似物有三十餘種，其中含量較多者為黑殭菌素 A、B、C、D、E 五種。蟲生真菌代謝物黑殭菌素的產量少且不易分離，混合在發酵液產物中，其組成分複雜，造成分離上的困難。如何大量製備純化黑殭菌素將是重要的研究課題。而在生物活性物質的分離純化技術方面，必須考量其經濟效益，如時間、儀器設備等。

黑殭菌所產生之系列黑殭菌素的應用，在國內外不斷的致力其研究，技術與成果已有相當大的突破。為了能支持後續發展，黑殭菌素的分離與純化是相當重要的。此試驗利用乙酸乙酯萃取後，以半製備型高效能液相層析儀層析，可得到黑殭菌素 DA、DB、DC、DE 及 2 種未知黑殭菌素等六種物質，此方式純化黑殭菌素不但簡化繁雜的純化過程並有效提高回收率。



3-2 材料與方法

3-2-1 發酵程序

菌種培養及發酵

菌種培養及發酵同節所 2-3 述

3-2-2 萃取

利用 1 N HCl 與 1 N NaOH 將黑殭菌發酵液調至 pH 4 後過濾離心，取得上清液，以乙酸乙酯與發酵液 2:5 的比例利用超音波洗淨裝置混合 60 分鐘後，再以分液漏斗進行液-液萃取，上層為有機層，下層為水層，將有機層取出並減壓濃縮機濃縮至乾，以少量 ACN 回溶，置於 4°C 冰箱保存備用。

3-2-3 儀器與設備

儀器

超音波洗淨裝置規格如下

Ultrasonic cleaners : 5510R-DTH (Branso, CT, USA)



Input : 117 V, 50~60 Hz, 495 W, 4.2 A

Output : 135 W, 42 kHz \pm 6%

Tank capacity : 9.5 L

半製備型 HPLC 操作條件

Pump : Hitachi Pump L-7100

Detector : Hitachi UV Detector L-7400

Wavelength : 215 nm

Column : Merck Purospher STAR PR-18e (250 \times 10 nm, 5 μ m)

Mobile phase : Acetonitrile (ECHO, Miaoli, Taiwan) ; H₂O

Gradient : 0 min (0% ACN, 100% H₂O) ; 30 min (40% ACN, 60% H₂O) ;

45 min (50% ACN, 50% H₂O)

Inject volume : 100 μ L

毛細管電泳分析

毛細管電泳藥品及儀器同 2-3 節

實驗方法

將濃縮後之有機層稀釋 100 倍，依上述條件利用高效能液相層析儀加



以分離並收集，分離收集之系列黑殭菌素利用減壓濃縮機進行濃縮，再以冷凍乾燥機將水分完全去除，得到系列黑殭菌素之成品，最後利用 ESI-MS 進一步鑑定，並利用毛細管電泳做出系列黑殭菌素之檢量線。

黑殭菌素檢量線製作

利用 HPLC 純化出的黑殭菌素以減壓濃縮機乾燥成固態後，以先前毛細管電泳條件之緩衝溶液配製成 1 mg/mL 濃度，將此濃度稀釋成 500、250、125、62.5、31.3 $\mu\text{g/mL}$ ，分別利用毛細管電泳分析後，可得到各波峰積分面積，將此樣品濃度與積分面積以 Origin® 軟體製作出檢量線並算出直線方程式，後續若需檢測各黑殭菌素含量，只需將積分面積代入各黑殭菌素檢量線之公式即可。



3-3 結果與討論

黑殭菌所產生之系列黑殭菌素的應用，在國內外不斷的致力其研究，技術與成果已有相當大的突破。為了能支持後續發展，黑殭菌素的分離與純化是相當重要的。首先將液態培養之培養液及菌絲以 8000 rpm、10 分鐘高速離心後，利用乙酸乙酯與培養液 2:5 比例萃取，取出有機層，並利用減壓濃縮機將其濃縮，得到含高濃度之黑殭菌素萃取液。

經濃縮後之萃取液利用 HPLC 小量分離後可由層析圖譜得到許多被分離的波峰，尤其是 34 分鐘左右的成分含量最高，確定系列黑殭菌素之所在位置及分離時間後，開始進行大量製備的工作。由於分離管柱大小、萃取液濃度之因素，因此注射量的控制相當重要，以各成份之波峰能明顯分離為最佳。

半製備型 HPLC 純化步驟所使用注射量為約 100 μL ，而本次試驗收集其中主要的 6 種黑殭菌素，由左至右分別順序為 DE、DA、DC、DB、unknown 1 及 unknown 2 (圖 3-1)。將收集得到後之系列黑殭菌素分別減壓濃縮至 10 mL，再以冷凍乾燥機乾燥。利用毛細管電泳製作黑殭菌素 B 檢量線(圖 3-2)。由圖 3-3 圖譜推算，DB 純度為 99%。圖 3-4 為 DE 之檢量線，純度為 98% (圖 3-5)。而表 3-1 為毛細管電泳對於黑殭菌素之偵測極限及定量極



限。

純化之黑殭菌素 B 以正離子模式 ESI-MS 鑑定分析(圖 3-6)，可看到在質荷比 594 的位置上有一強度相當高的波峰，再利用 ESI-MS/MS 加以分析(圖 3-7)，可得到特性圖譜，其分子量 481 之片段離子(圖 3-8)。因此推斷此純物質為黑殭菌素 B。

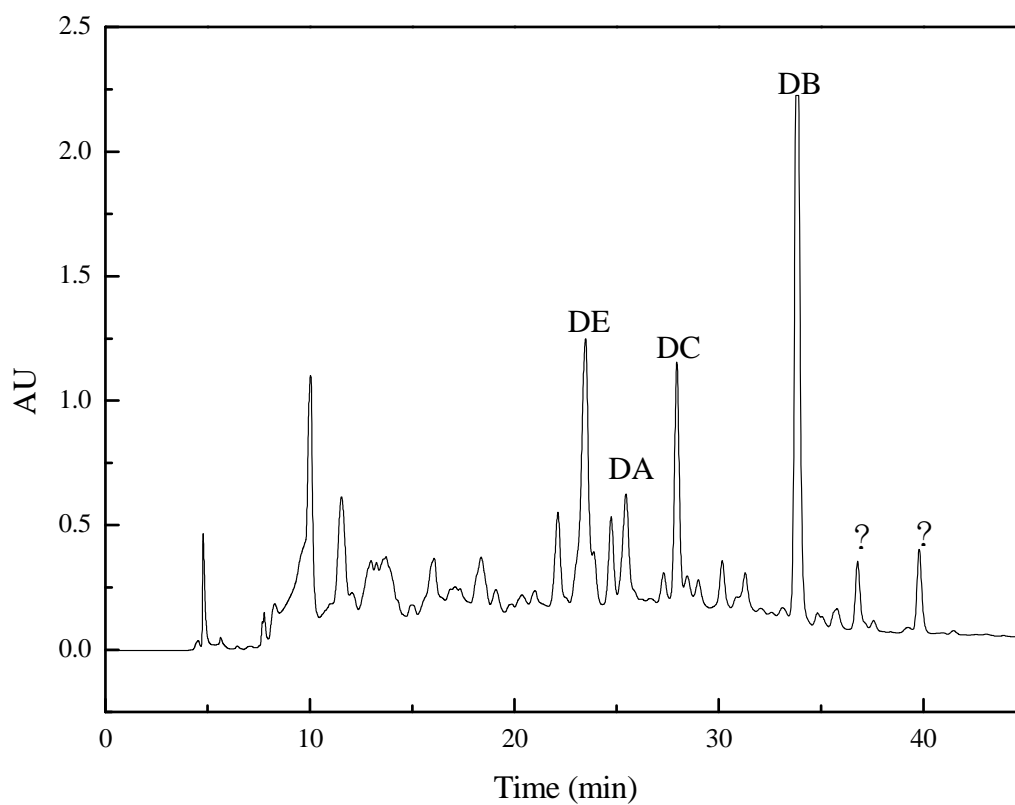


圖 3-1 半製備型 HPLC 層析圖譜

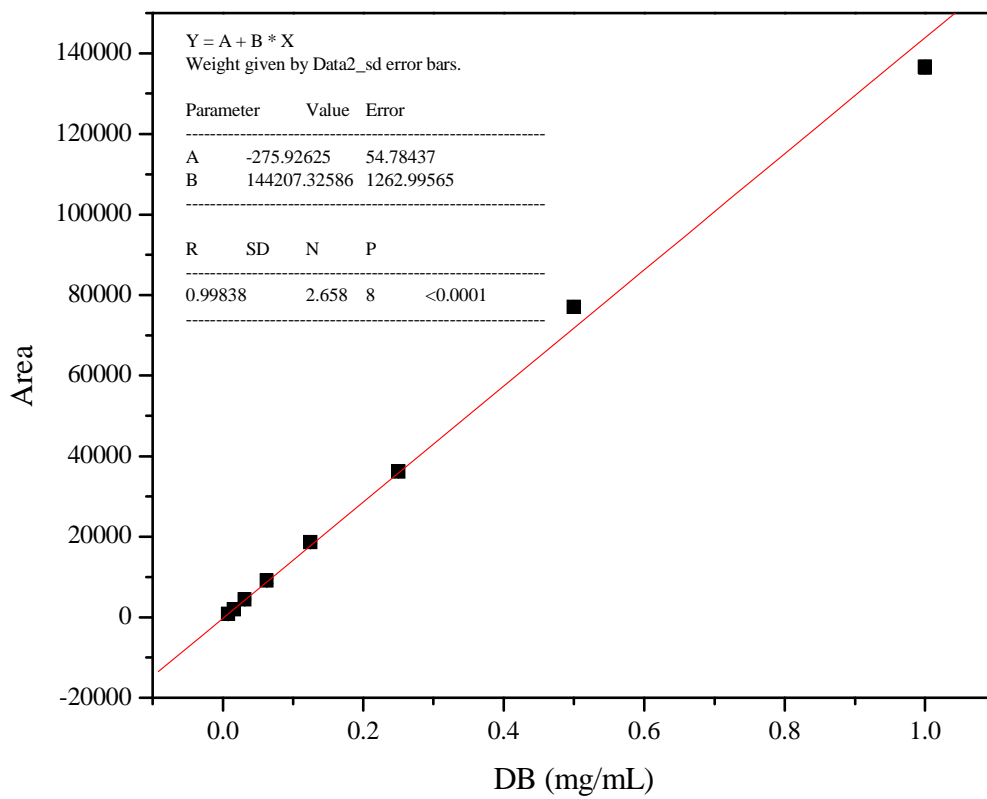


圖 3-2 黑殭菌素 B 之檢量線

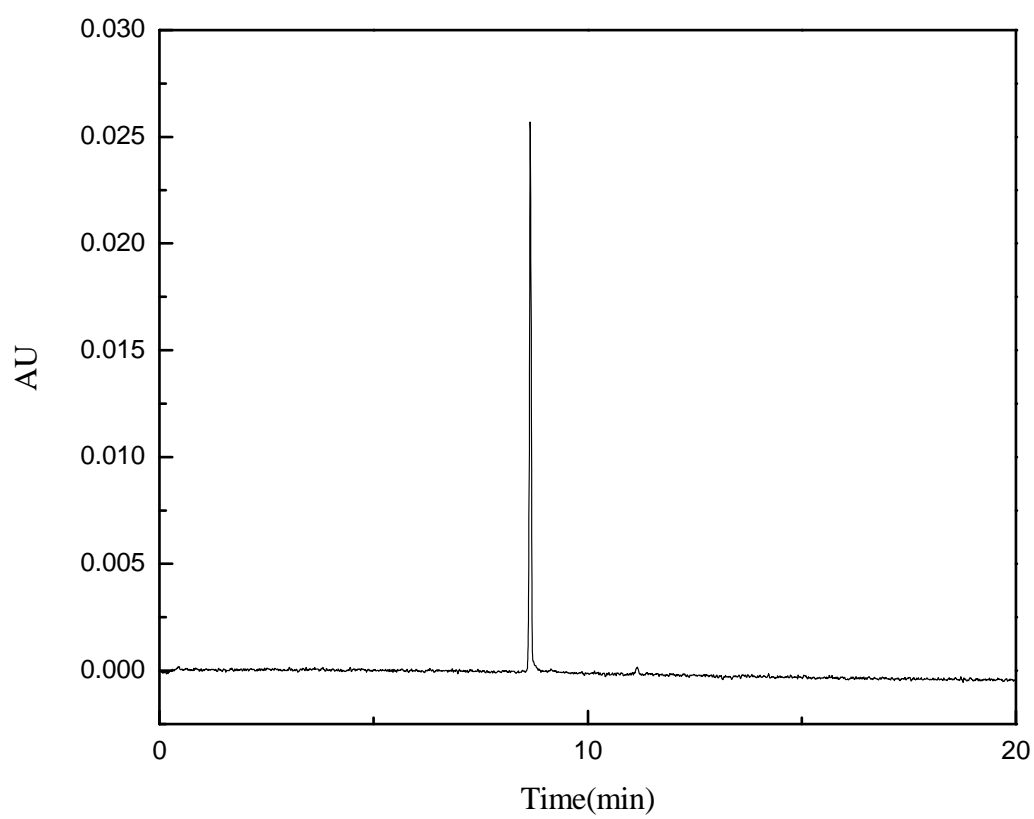


圖 3-3 分離純化後 DB 在 CE 之層析圖譜

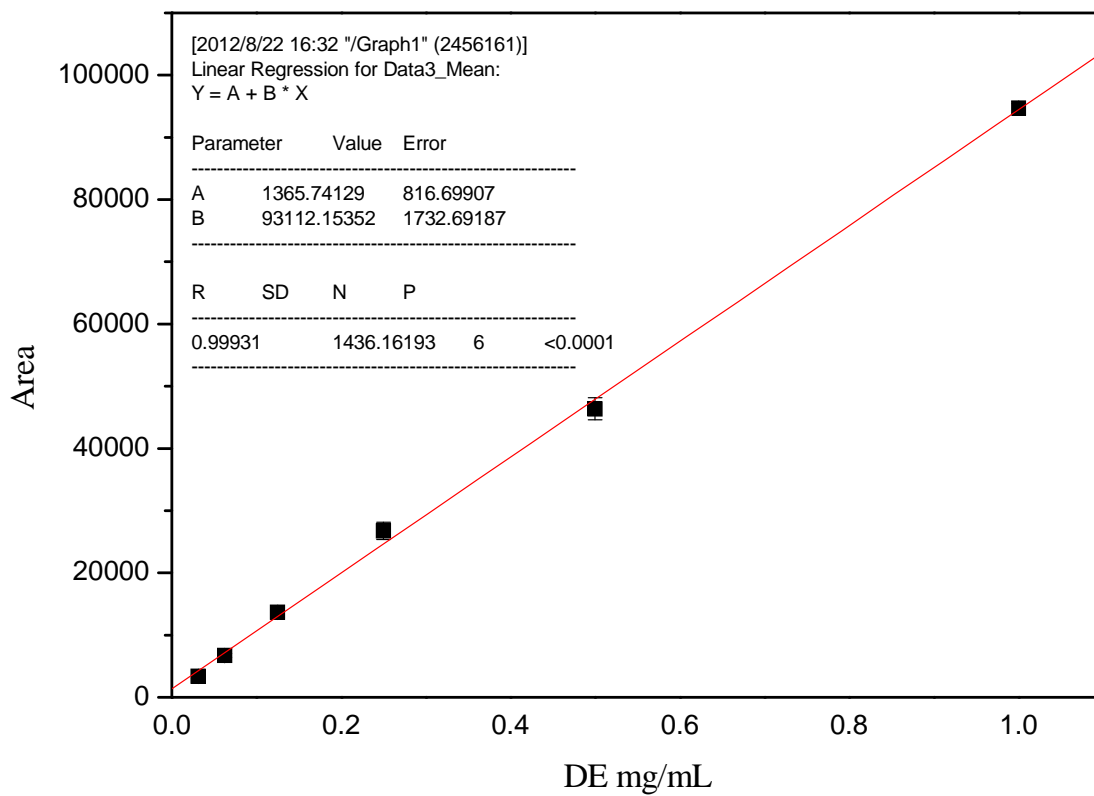


圖 3-4 黑殭菌素 E 之檢量線

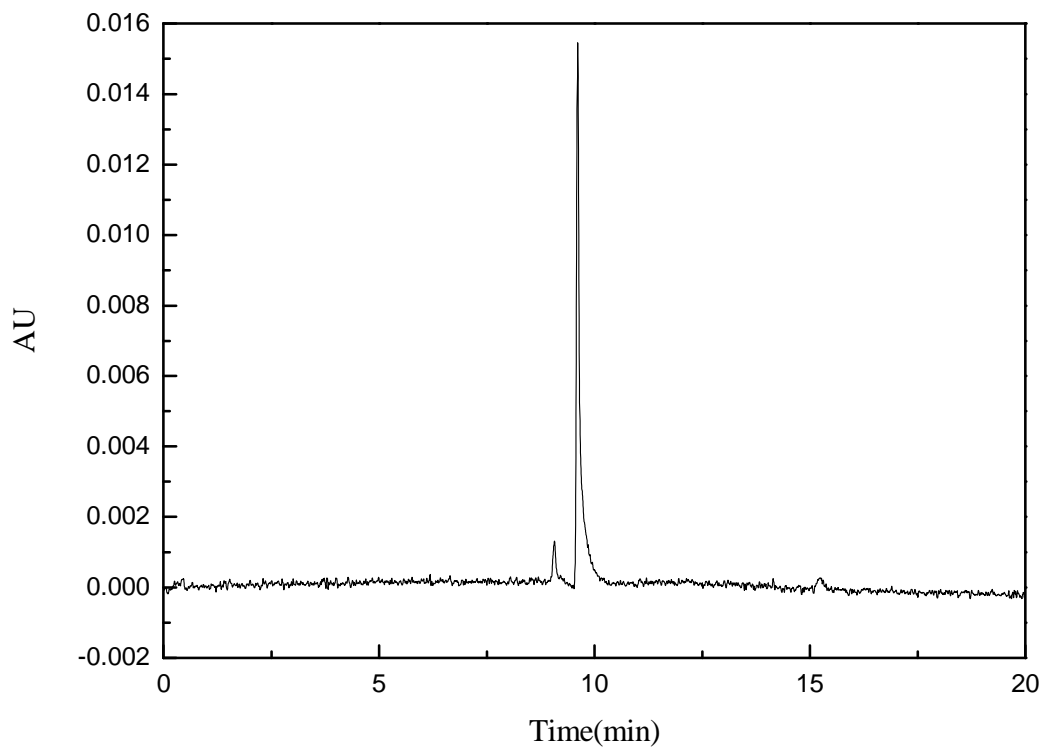


圖 3-5

分離純化後 DE 在 CE 之層析圖譜



表 3-1 毛細管電泳對於黑殭菌素之偵測極限及定量極限

樣品	檢量線方程式	檢量線線性 濃度範圍 (mg/mL)	偵測極限 (mg/mL)	定量極限 (mg/mL)
DB	$y=-275.93+54.78x$	$1-3.1\times 10^{-2}$	1.8×10^{-2}	6.0×10^{-2}
DE	$y=1365.74+816.70x$	$1-3.1\times 10^{-2}$	3.0×10^{-3}	1.0×10^{-2}



DB #20 RT: 0.39 AV: 1 NL: 1.45E4
T: + c ESI Full ms [200.00-700.00]

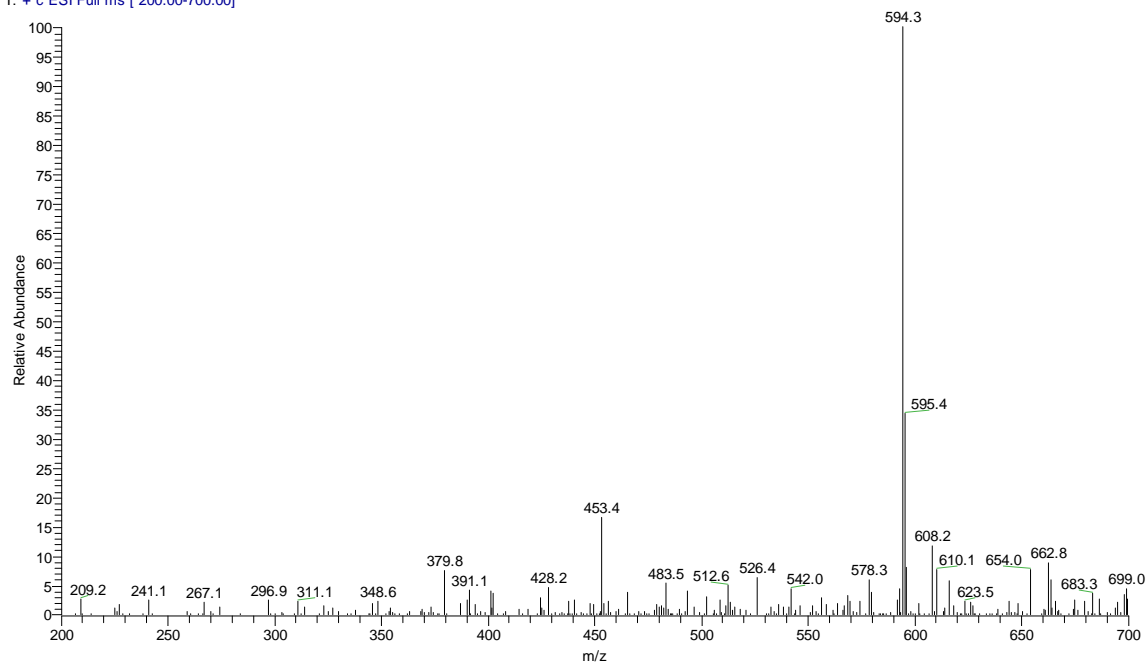


圖 3-6 黑殭菌素 B ESI-MS 圖譜



B_120316133325 #20 RT: 0.42 AV: 1 NL: 1.16E5
T: + c ESI Full ms2 594.00@30.00 [200.00-700.00]

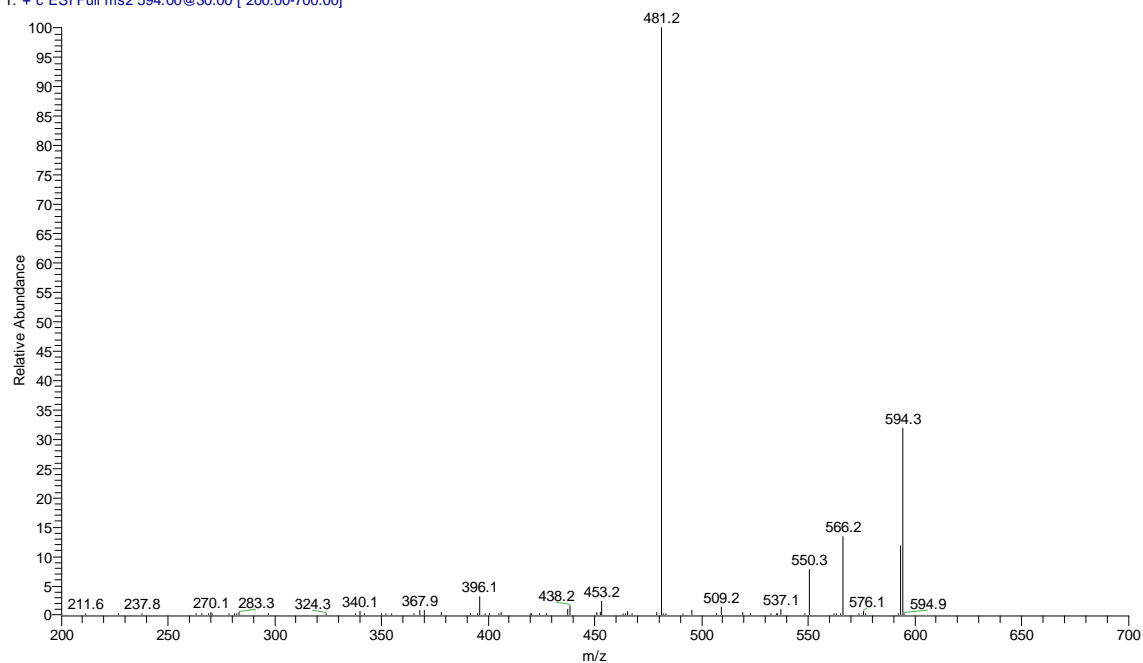


圖 3-7 黑殭菌素 B ESI-MS/MS 之特性圖譜

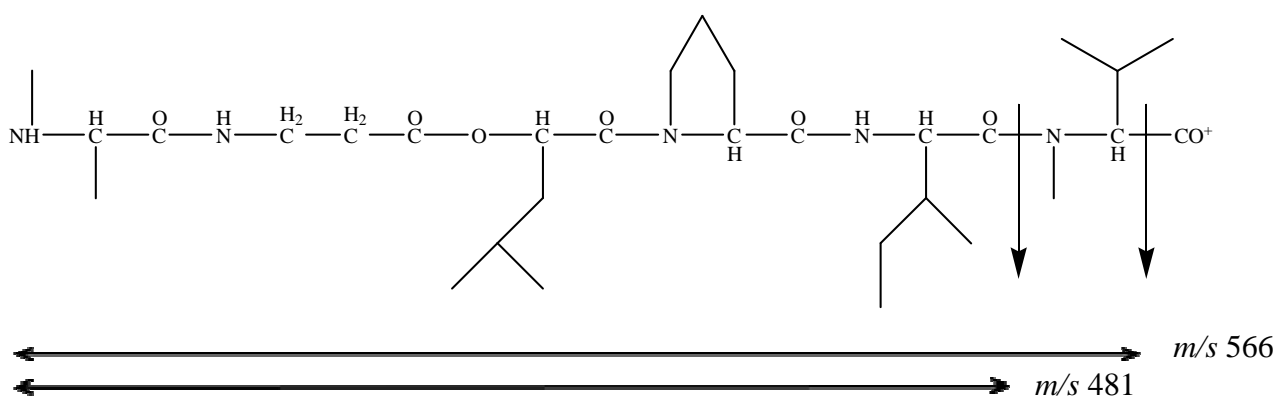
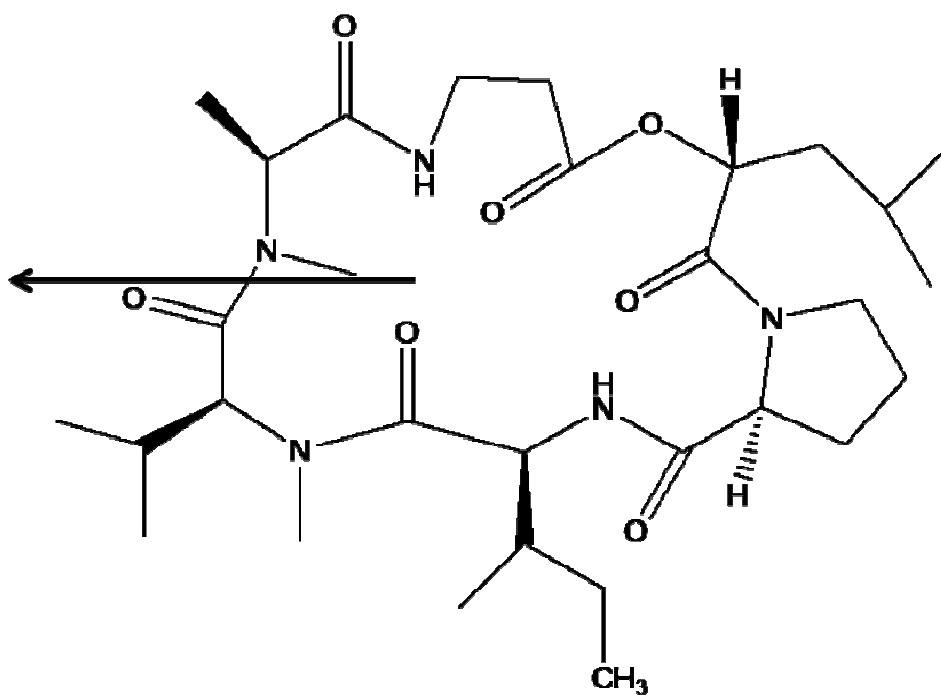


圖 3-8 黑殭菌素 B ESI-MS/MS 特性圖譜之解說圖



第四章 結論與展望

黑殭菌的代謝產物對於動物和微生物是有毒的，範圍廣泛，包括昆蟲、真菌、細菌和病毒(*c.f.* Carollo et al., 2010 and references cited therein)。到目前為止，約有 39 種黑殭菌素已經被從真菌培養中純化出，或經由化學合成方式產生(Che et al., 2001; Morais et al., 2010; Pedras et al., 2002)，其中最著名的 DB(*II*)可以說是蟲生真菌，二級代謝產物研究中表現出多種生物活性，包括抗生素、抗腫瘤或殺蟲活性，其中特別重要的是 DB(*II*)對 B 型肝炎病毒活性(Hussain et al., 2011; Kanga et al., 2010; Maniania et al., 2002; Sowjanya Sree et al., 2008; Tavassoli et al., 2011; Ghanbary et al., 2009)。在分離和合成新的黑殭菌素相關研究仍在進行中。四種黑殭菌素，其名稱分別為[Phe³, N-Me-Val⁵] DB(*2I*)、類 DC(*26*)、[β-Me-Pro] DE 氣醇(*37*)和 DE 氣醇(*38*)的結構異構物，是新的黑殭菌素成員。最近，利用固相肽合成法用於 DE(*30*)的全合成法也已經被發表。高效液相色層分析法合併質譜儀方式(LC-MS)可使黑殭菌素、代謝產物及其相關類似物被快速定性和定量，我們重新檢視生長於固態和液態培養基上黑殭菌菌株所產生的黑殭菌素，並描述上數幾種黑殭菌素生產的進展，特別著重於 DA(*I*)、DB(*II*)及 DE(*30*)這幾個最普遍的標的。也列入幾種新的培養、品種改良和生物反應槽設計的



技術。最顯著的黑殭菌素進展是關於殺蟲、細胞毒性、抗病毒、免疫抑制和植物毒性的研究(Morel et al., 1983; Odier et al., 1992; Pedras et al., 2002; Skrobek and Butt, 2005)，黑殭菌素的顯著特徵是對於細胞功能的多樣性，其中有關於內吞作用、細胞間運輸、細胞質酸鹼度恆定、骨吸收，以及腫瘤轉移。DB(11)和 DE(30)顯示具有操控液泡型 ATP 酶(V-ATPase)的抑制特性，因此顯示：抑制這種泵浦可消除骨吸收，因而使破骨細胞的選擇性抑制劑可作為治療骨質疏鬆症的新穎和有用的試劑。了解液泡型 ATP 酶如何運作，因此可能為罹患骨質疏鬆或癌症等病的患者利益、供作發展新藥的基礎(Beutler and McKee, 2003)。此外，黑殭菌素是加速感染昆蟲死亡的重要致病因素，尤其是 DA(1)、DB(11)和 DE(30)因此可被視為生物防治法的優良候選對象。

毛細管電泳層析中，緩衝溶液濃度效應亦是離子強度效應，離子強度的增加，降低管柱的有效表電荷，並造成毛細管內壁電雙層被壓縮，使表面電位降低而降低電滲流 EOF 的速度，使溶質的移動速度減少所以分析物遷移時間較長，離子強度增強會降低電滲流導致遷移時間延長，結果發現 40 mM Sodium broate 有最佳解析度。而 pH 值能改變兩性分析物的帶電性，並影響分析物在電場中的遷移率，造成選擇性的改變，所以改變 pH 值對毛細管區帶電泳而言是相當重要的，本實驗結果選擇 pH 9.8 做為最佳分析的



條件。與先前學長的條件相比，此方法之緩衝溶液配製過程中不需使用 SDS，且分析方面亦可於十五分鐘內完成，不僅安全且更可省去許多不必要的時間。

質譜層析儀初步實驗結果顯示，DB 分子量為 593，經由 ESI-MS/MS 正離子模式分析可得到分子量 481 之片段離子。目前已發現 39 種黑殭菌素，但無一健全的圖譜資料庫，希望未來能利用 ESI-MS/MS 建立較完全的黑殭菌素特性圖譜。另外由於支鏈官能基的不同每種黑殭菌素都擁有著不同的生物活性，所以研究每種黑殭菌素的功能為未來研究的重點。



參考文獻

1. 石瑩潔，「毛細管電層析之研究與牛奶中色素之分析」，碩士論文，中原大學，桃園（2001）。
2. 李英信，「以毛細管區帶電泳法分析食品中之單糖、雙糖以及醣醇」，碩士論文，國立台灣大學食品科技研究所，台北(2002)。
3. 何雅修，「利用微胞電動力毛細管層析(MEKC)分離共軛膽汁酸之研究」，碩士論文，成功大學化學學系，台南(1993)。
4. 林聖文，「以饋料批次氣舉式發酵系統生產黑殭菌素之探討」，碩士論文，國立東華大學生物技術研究所，花蓮(2001)。
5. 陳俊斌，「台灣杉與原生種土肉桂葉中類黃酮醣苷萃取分離純化與分析」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中(2007)。
6. 黃玄舜，「黑殭菌素分離純化與毛細管電泳分析方法之探討」，碩士論文，國立東華大學生物技術研究所，花蓮(2002)。
7. 黃偉健，「台灣原生種土肉桂葉中類黃酮醣苷分離純化製程之研究探討」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中(2010)。
8. 傅明棟，「類黃酮素以液相層析與毛細管電泳之定量分析及取代基影響機制之研究」，碩士論文，靜宜大學應用化學研究所，台中(2003)。
9. 鄒嘉恆，「黑殭菌素 E 之發酵製備與回收純化」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中(2005)。
10. Aguilar R, Jedlicka AE, Mintz M, Mahairaki V, Scott AL, Dimopoulos G. Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:709-719.
11. Aldridge DC, Turner WB. Structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae*. *J Chem Soc C* 1969;6:923-928.
12. Alves SB, Alves LF, Lopes RB, Pereira RM, Viera SA. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). *J Applied Entomol* 2002;126: 504-509.
13. Amagata T, Morinaka BI, Amagata A, Tenney K, Valeriotte FA, Lobkovsky E, Clardy J, Crews P. A chemical study of three novel cyclic depsipeptides produced by a sponge-derived fungus. *J Nat Prod* 2006;69: 1560-1565.
14. Amiri-Besheli B, Khambay B, Cameron S, Deadman ML, Butt TM. Inter-



- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp. and its significance to pathogenesis. *Mycol Res* 2000;104:447-452.
15. Ast T, Barron E, Kinne L, Schmidt M, Germeroth L, Simmons K, Wenschuh H. Synthesis and biological evaluation of destruxin A and related analogs. *J Pept Res* 2001;58:1-58:11.
 16. Azumi M, Ishidoh K, Kinoshita H, Nihira T, Ihara F, Fujita T. Aurovertins F-H from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Nat Prod* 2008;71:278-280.
 17. Bailey AM, Kershaw MJ, Hunt BA, Paterson IC, Charnley AK, Reynolds SE, Clarkson JM. Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 1996;173:195-197.
 18. Bandani AR, Amiri B, Butt TM, Gordon-Weeks R. Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1510:367-377.
 19. Beutler JA, McKee TC. Novel marine and microbial natural product inhibitors of vacuolar ATPase. *Curr Med Chem* 2003;10:787-796.
 20. Liu BL, Tzeng YM. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 2001.
 21. Blanford S, Chan, BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Crews P. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 2005;308:1638-1641.
 22. Body JJ. Calcitonin for the long-term prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone* 2002;30:75S-79S.
 23. Boot CM, Amagata T, Tenney K, Compton JE, Pietraszkiewicz H, Valeriote FA, Crews P. Four classes of structurally unusual peptides from two marine-derived fungi: structures and bioactivities. *Tetrahedron* 2007; 63:9903-9914.
 24. Brousseau C, Charpentier G, Belloncik S. Effects of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metarhizium anisopliae* mycotoxins) combinations on *Spruce budworm* (Lepidoptera: Tortricidae). *J Invertebr Pathol* 1998; 72:262-268.
 25. Butt TM, El Hadj NB, Skrobek A, Ravensberg WJ, Wang C, Lange CM, Vey A, Shah UK, Dudley E. Mass spectrometry as a tool for the selective



- profiling of destruxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum*. Rapid Commun Mass Spectrom 2009;23:1426-1434.
26. Cai P, Smith D, Katz B, Pearce C, Venables D, Houck D. Destruxin-A₄ chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OSF68576: isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin. J Nat Prod 1998;61:290-293.
 27. Carollo CA, Calil ALA, Schiave LA., Guaratini T, Roberts DW, Lopes N, Braga GUL. Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. Fungal Biol 2010;114:473-480.
 28. Cavelier F, Jacquier R, Mercadier JL, Verducci J, Traris M, Vey A. Destruxin analogs: variations of the alpha-hydroxy acid side chain. J Pept Res 1997;50:94-101.
 29. Charpentier G, Tian L, Cossette J, Léry X, Belloncik S. Characterization of cell lines developed from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa Decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). In Vitro Cell Dev Biol 2002;38:73-78.
 30. Che Y, Swenson DC, Gloer JB, Koster B, Malloch D. Pseudodestruxins A and B: New cyclic depsipeptides from the Coprophilous fungus *Nigrosabulum globosum*. J Nat Prod 2001;64:555-558.
 31. Chen HC, Chou CK, Sun CM, Yeh SF. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. Antiviral Res 1997;34:137-144.
 32. Chen JW, Liu BL, Tzeng YM. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. J Chromatogr A 1999;830:115-125.
 33. de Vita-Marques AM, Lira SP, Berlinck RGS, Selegim MHR, Sponchiado SRP, Tauk-Tornisielo SM. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. Quim Nova 2008;31:1099-1103.
 34. Dumas C, Matha V, Quiot JM, Vey A. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. Comp Biochem Physiol 1996;114C:213-219.
 35. Dumas C, Robert P, Pais M, Vey A, Quiot JM. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol 1994;108:195-203.
 36. Espada A, Dreyfuss MM. Effect of the cyclopeptolide 90-215 on the



- production of destruxins and helvolic acid by *Metarhizium anisopliae*. J Ind Microbiol Biotechnol 1997;19:7-11.
37. Favilla M, Macchia L, Gallo A, Altomare C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. Food Chem Toxicol 2006;44:1922-1931.
 38. Feng KC, Rou TM, Liu BL, Tzeng YM, Chang YN. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. Enzyme Microb Technol 2004;34:22-25.
 39. Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G, Peng G, Luo Z, Huang W, Wang B, Fang W, Wang S, Zhong Y, Ma LJ, Leger RJS, Zhao GP, Pei Y, Feng MG, Xia Y, Wang C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genet 2011;7:1-18.
 40. Ghanbary MAT, Asgharzadeh A, Hadizadeh AR, Sharif MM. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. Am J Agri Biol Sci 2009;4: 152-155.
 41. Gupta S, Krasnoff SB, Renwick JAA, Roberts DW, Steiner JR, Clardy J. Viridoxins A and B: novel toxins from the fungus *Metarhizium flavoviride*. J Org Chem 1993;58:1062-1067.
 42. Hinaje M, Ford M, Banting L, Arkle S, Khambay B. An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A. Arch Biochem Biophys 2002;405:73-77.
 43. Hinton A, Bond S, Forgac M. V-ATPase functions in normal and disease processes. Pflugers Arch 2009;457:589-598.
 44. Hiromori H, Nishigaki J. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. Appl Entomol Zool 2001;36:231-6.
 45. Hjerten S. Free zone electrophoresis. Chromatogr Rev 1967;122-219 .
 46. Hoe PK, Bong CFJ, Jugah K, Rajan A. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Am J Agric Biol Sci 2009;4:289-297.
 47. Hsiao YM, Ko JL. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method.



- Toxicon 2001;39:837-841.
48. Hu QB, Ren SX, An XC, Qian MH. Insecticidal activity influence of destruxins on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura*. J Appl Entomol 2007;131:262-268.
 49. Hu QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. Toxicon 2006;48:491-498.
 50. Hua QB, An XC, Jin FL, Freed S, Ren SX. Toxicities of destruxins against *Bemisia tabaci* and its natural enemy, *Serangium japonicum*. Toxicon 2009;53:115-121.
 51. Hubert M, Cherton JC, Vey A, Lange C. Metabolites of A and E destruxins in *Galleria mellonella* larvae using negative-ion fast-atom bombardment mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1999;13:179-184.
 52. Hunter DM, Milner RJ, Spurgin PA. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Bull Entomol Res 2001;91:93-99.
 53. Huss M, Sasse F, Kunze B, Jansen R, Steinmetz H, Ingenhorst G, Zeeck A, Wieczorek H. Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors. BMC Biochem 2005;6:13.
 54. Huss M, Wieczorek H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. J Exp Biol 2009;212:341-346.
 55. Hussain A, Ahmed S, Shahid M. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* for controlling subterranean termites. Neotrop Entomol 2011;40:244-250.
 56. Itoh N, Okochi M, Tagami S, Nishitomi K, Nakayama T, Yanagida K, Fukumori A, Jiang J, Kohji Mori, Hosono M, Kikuchi J, Nakano Y, Takinami Y, Dohi K, Nishigaki A, Takemoto H, Minagawa K, Katoh T, Willem M, Haass C, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Hasegawa H, Nishimura M, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M. Destruxin E decreases beta-amyloid generation by reducing colocalization of beta-amyloid-cleaving enzyme 1 and beta-amyloid protein precursor. Neurodegenerative Dis 2009;6:230-239.
 57. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev 2003;29:541-549.



58. Jegorov A, Hajduch M, Sulc M, Havlicek V. Nonribosomal cyclic peptides: specific markers of fungal infections. *J Mass Spectrom* 2006;41:563-576.
59. Jegorov A, Havlicek V, Sedmera P. Rapid screening of destruxins by liquid chromatography/mass spectrometry *J Mass Spectrom* 1998;33:274-280.
60. Kanga LH, Adamczyk J, Patt J, Gracia C, Cascino J. Development of a user-friendly delivery method for the fungus *Metarhizium anisopliae* to control the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *Exp Appl Acarol* 2010;52:327-342.
61. Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J Invertebr Pathol* 1999;74:213-223.
62. Kim HS, Jung MH, Ahn S, Lee CW, Kim SN, Ok JH. Structure elucidation of a new cyclic hexadepsipeptide from *Beauveria feline*. *J Antibiot* 2002; 55:598-601.
63. Kobayashi T, Ikeno S, Hosokawa N, Uehara Y, Hori M, Tsuchiya K. Destruxin E, a cyclodepsipeptide antibiotic, reduces cyclin D1 levels and inhibits anchorage-independent growth of v-Ki-ras-expressed pMAM-ras-REF cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:587-590.
64. Kodaira Y. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. *Agric Biol Chem* 1962;26:36-42.
65. Kondo S, Meguriya N, Mogi H, Aota T, Miura K, Fujii T. K-582, a new peptide antibiotic. *J Antibiot* 1980;33:533-542.
66. Kouvelis VN, Wang C, Skrobek A, Pappas KM, Typas MA, Butt TM. Assessing the cytotoxic and mutagenic effects of secondary metabolites produced by several fungal biological control agents with the Ames assay and the VITOTOXR[®] test. *Mutat Res* 2011;722:1-6.
67. Krasnoff SB, Gibson DM. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *J Nat Prod* 1996;59:485-489.
68. Krasnoff SB, Keresztes I, Gillilan RE, Szebenyi DME, Donzelli BGG, Churchill ACL, Gibson DM. Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J Nat Prod* 2007;70:1919-1924.
69. Krasnoff SB, Sommers CH, Moon Y-S, Donzelli BGG, Vandenberg JD, Churchill ACL, Gibson DM. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *J Agric Food Chem* 2006;54:7083-7088.
70. Kuboki H, Tsuchida T, Wakazono K, Isshiki K, Kumagai H, Yoshioka T. Mer-f3, 12-hydroxyovalicin, produced by *Metarhizium* sp. f3. *J Antibiot* 1999;52:590-593.



71. Lemmens-Gruber R, Kamyar MR, Dornetshuber R. Cyclodepsipeptides - potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Curr Med Chem* 2009;16:1122-1137.
72. Li DP, Holdom DG. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Invertebr Pathol* 1994;63:209-211.
73. Lira SP, Vita-Marques AM, Selegim MHR, Bugni TS, LaBarbera DV, Sette LD, Sponchiado SRP, Ireland CM, Berlinck RGS. New destruxins from the marine-derived fungus *Beauveria feline*. *J Antibiot* 2006;59:553-563.
74. Liu BL, Chen JW, Tzeng YM. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Prog* 2000;16:993-999.
75. Liu BL, Rou TM, Rao YK, Tzeng YM. Effect of pH and aeration rate on the production of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Int J Appl Sci Eng* 2007;5:17-26.
76. Liu BL, Tzeng YM. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett* 1999;21:657-661.
77. Liu CM, Huang SS, Tzeng YM. Analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by capillary electrophoresis. *J Chromatogr Sci* 2004a;42:1404-1408.
78. Liu CM, Huang SS, Tzeng YM. Purification and quantitative analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2004b;27:1013-1025.
79. Loutelier C, Cherton JC, Lange C, Traris M, Vey A. Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae*: Direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. *J Chromatogr A* 1996;738:181-189.
80. Male KB, Tzeng YM, Montes J, Liu BL, Lia WC, Kamena A, Luong JH. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: inhibition vs chemical structure. *Analyst* 2009;134:1447-1452.
81. Maniania NK, Ekesi S, Löhr B, Mangi F. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia* 2002;155:229-235.



82. Moon YS, Donzelli BGG, Krasnoff SB, McLane H, Griggs MH, Cook P, Vandenberg JD, Gibson DM, Churchill ACL. Agrobacterium-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:4366-4380.
83. Morais RP, Lira SP, Selegim MHR, Berlinck RGS. A method for destruxin analysis by HPLC-PDA-ELSD-MS. *J Braz Chem Soc* 2010;21:2262-2271.
84. Morel E, Pais M, Turpin M, Guyour M. Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells. *Biomed Pharmacother* 1983;37:184-185.
85. Murata T, Takase K, Yamato I, Igarashi K, Kakinuma Y. Purification and reconstitution of Na⁺-translocating vacuolar ATPase from *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 1997;272:24885-24890.
86. Murata T, Yamato I, Kakinuma Y, Leslie AGW, Walker JE. Structure of the rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* 2005;308:654-659.
87. Muroi M, Shiragami N, Takatsuki A. Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁺-translocating ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1358-1365.
88. Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, Sawae Y, Suda K, Sasaki T, Takahashi N, Wachi M, Nagai K, Woo JT. Destruxins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. *Bone* 2003;33:443-455.
89. Namdeo A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Phcog Rev* 2007;1: 69-79.
90. Ngoka LC, Gross ML. Multistep tandem mass spectrometry for sequencing cyclic peptides in an ion-trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999;10:732-746.
91. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:94-103.
92. Odier F, Vey A, Bureau JP. *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. *Biol Cell* 1992;74:267-271.
93. Pal S, St Leger RJ, Wu LP. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 2007;282:8969-8977.
94. Parada RY, Oka K, Yamagishi D, Kodama M, Otani H. Destruxin B produced by *Alternaria brassicae* does not induce accessibility of host



- plants to fungal invasion. *Physiol Mol Plant Pathol* 2007;71:48-54.
95. Patrick M, Adlard MW, Keshavarz T. Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett* 1993;15:997-1000.
 96. Pedras MSC, Biesenthal CJ, Zaharia IL. Comparison of the phytotoxic activity of the phytotoxin destruxin B and four natural analogs. *Plant Sci* 2000;156:185-192.
 97. Pedras MSC, Biesenthal CJ. Vital staining of plant cell suspension cultures: evaluation of the phytotoxic activity of the phytotoxins phomalide and destruxin B. *Plant Cell Rep* 2000;19:1135-1138.
 98. Pedras MSC, Montaut S, Zaharia IL, Gai Y, Ward DE. Transformation of the host-selective toxin destruxin B by wild crucifers: probing a detoxification pathway. *Phytochemistry* 2003;64:957-963.
 99. Pedras MSC, Zaharia IL, Gai Y, Zhou Y, Ward DE. In planta sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: Avoiding cell death and overcoming the fungal invader. *PNAS* 2001;98:747-752.
 100. Pedras MSC, Zaharia IL, Ward DE. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 2002;59:579-596.
 101. Pedras MSC. Prospects for controlling plant fungal diseases - Alternatives based on chemical ecology and biotechnology. *Can J Chem* 2004;82:1329-1335.
 102. Peng KC, Huang HS, Tzeng YM, Liu SY. Circular dichroism analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae*. *J Biochem Biophys Methods* 2005;62:41-50.
 103. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JMG, García-García A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35:707-713.
 104. Potterat O, Wagner K, Haag H. Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptide in a crude extract of fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Chromatogr A* 2000;872:85-90.
 105. Rao YK, Tsou CH, Tzeng YM. Antioxidants enhanced production of destruxin E from cultivation of *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:519-524.
 106. Rizwan-ul-Haq M, Hu QB, Hu MY, Zhong G, Weng Q. Study of destruxin B and tea saponin, their interaction and synergism activities with *Bacillus*



- thuringiensis kurstaki* against *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Entomol Zool* 2009;44:419-428.
107. Rohlf M, Churchill ACL. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genet Biol* 2011;48:23-34.
 108. Ruiz-Sanchez E, Lange AB, Orchard I. Effects of the mycotoxin destruxin A on *Locusta migratoria* visceral muscles. *Toxicon* 2010a;56:1043-1051.
 109. Ruiz-Sanchez E, Orchard I, Lange AB. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). *Toxicon* 2010b;55:1162-1170.
 110. Ryan MJ, Bridge PD, Smith D, Jeffries P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *J Appl Microbiol* 2002; 93:163-168.
 111. Sabareesh V, Ranganayaki RS, Raghothama S, Bopanna MP, Balaram H, Srinivasan MC, Balaram P. Identification and characterization of a library of microheterogeneous cyclohexadepsipeptides from the fungus *Isaria*. *J Nat Prod* 2007;70:715-729.
 112. Samuels, RI, Charnley AK, Reynolds SE. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia* 1988;104:51-58.
 113. Sarabia F, Chammaa S, Sánchez-Ruiz A, Martín-Ortiz L, and López-Herrera FJ. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Curr Med Chem* 2004;11:1309-1332.
 114. Sasazawa Y, Futamura Y, Tashiro E, Imoto M. Vacuolar H⁺-ATPase inhibitors overcome Bcl-xL-mediated chemoresistance through restoration of a caspase-independent apoptotic pathway. *Cancer Sci* 2009;100: 1460-1467.
 115. Saurin AJ, Hamlett J, Clague MJ, Pennington SR. Inhibition of mitogen-induced DNA synthesis by bafilomycin A₁ in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J* 1996;313:65-70.
 116. Scholte EJ, Knols BG, Takken W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol* 2006; 91:43-49.
 117. Schrank A, Vainstein MH. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 2010;56: 1267-1274.
 118. Seger C, Eberhart K, Sturm S, Strasser H, Stuppner H. Apolar



- chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography high yield strategy for structurally closely related analytes—Destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case study. *J Chromatogr A* 2006;1117:67-73.
119. Seger C, Sturm S, Stuppner H, Butt TM, Strasser H. Combination of a new sample preparation strategy with an accelerated high-performance liquid chromatography assay with photodiode array and mass spectrometric detection for the determination of destruxins from *Metarhizium anisopliae* culture broth. *J Chromatogr A* 2004;1061:35-43.
 120. Shah FA, Butt TM. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 2005;250:201-207.
 121. Sharif MM, Hadizadeh AR, Ghanbary MAT. Evaluating toxicity of extracted destruxin from *Metarhizium anisopliae* against Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*. *Am J Environ Sci* 2010;6:379-382.
 122. Shi WB, Feng MG. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnaharinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biol Control* 2004;30:165-173.
 123. Skrobek A, Butt TM. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 2005;251:23-28.
 124. Skrobek A, Shah FA, Butt TM. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* 2008;53:361-373.
 125. Sorensen MG, Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Karsdal MA. Diphyllin, a novel and naturally potent V-ATPase inhibitor, abrogates acidification of the osteoclastic resorption lacunae and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2007;22:1640-1648.
 126. Sowjanya Sree K, Padmaja V. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *J Appl Entomol* 2008;132: 68-78.
 127. Sowjanya Sree K, Sachdev B, Padmaja V, Bhatnagar RK. Electron spin resonance spectroscopic studies of free radical generation and tissue specific catalase gene expression in *Spodoptera litura* (Fab.) larvae treated with the mycotoxin, destruxin. *Pestic Biochem Physiol* 2010;97:168-176.
 128. Sowjanya Sree K., Padmaja V, Murthy LNY. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales),



- against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. Pest Manag Sci 2008;64:119-125.
129. Sun CM, Chen HC, Yeh SF. Suppressive effects of metabolites from *Alternaria brassicaea* on the hepatitis B surface antigen. Planta Med 1994; 60:87-88.
 130. Suzuki A, Kawakami K, Tamura S. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarhizium anisopliae*. Agric Biol Chem 1971;35:1641-1643.
 131. Tamer C, Ullah M, Adlard MW, Keshavarz T. Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. FEMS Microbiol Lett 1998;168:17-23.
 132. Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS. Submerged culture of mushrooms in bioreactors- Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. Food Technol Biotechnol 2007;45:221-229.
 133. Tavassoli M, Allymehr M, Pourseyed SH, Ownag A, Bernousi I, Mardani K, Ghorbanzadegan M, Shokrpour S. Field bioassay of *Metarhizium anisopliae* strains to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Vet Parasitol 2011;178:374-378.
 134. Thomsen L, Eilenberg J. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. Environ Entomol 2000;29:1041-1047.
 135. Togashi K, Kataoka T, Nagai K. Characterization of a series of vacuolar type H⁺-ATPase inhibitors on CTL-mediated cytotoxicity. Immunol Lett 1997;55:139-144.
 136. Tounou K, Agboka K, Poehling H, Raupach K, Langewald J, Zimmermann G, Orgemeister C. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* (deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of the green leafhopper *Empoasca decipiens* (homoptera: Cicadellidae) and potential side effects on the egg parasitoid *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae). Biocontrol Sci Technol 2003;13:715-728.
 137. Tsunoo A, Kamijo M. Non-cyclic AMP-dependent, positive inotropic cyclodepsipeptides with negative chronotropy. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290:1006-1012.
 138. Uchida R, Imasato R, Yamaguchi Y, Masuma R, Shiomi K, Tomoda H, Omura S. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungierins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. J Antibiot 2005;58:804-809.



139. Vázquez MJ, Albarrá MI, Espada A, Rivera-Sagredo A, Díez M, Hueso-Rodríguez JA. A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biodivers* 2005;2: 123-130.
140. Vey A, Hoagland R, Butt T.M. *In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan (eds). CAB International: Wallingford, UK, 2001, 311-345.
141. Vey A, Matha V, Dumas C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *J Invertebr Pathol* 2002;80:177-187.
142. Vilcinskis A, Matha V, Göetz P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *J Insect Physiol* 1997;43:475-783.
143. Vita-Marques AM, Lira SP, Berlinck RGS, Selegim MHR, Sponchiado SRP, Tauk-Tornisielo SM, Barata M, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Souza AO, Galetti FCS, Silva CL, Silva M, Pimenta EF, Thiemann O, Passarini MRZ, Sette LD. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *Quim Nova* 2008;31:1099-1103.
144. Wang C, Butt TM, St Leger RJ. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology* 2005;15:3223-3226.
145. Wang C, Powell JE. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biol Control* 2004;30:523-529.
146. Wang C, Skrobek A, Butt TM. Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;226:373-378.
147. Wang C, Skrobek A, Butt TM. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 2004;85:168-174.
148. Wang H, Hutwimmer S, Strasser H, Burgstaller W. Destruxin production of *Metarhizium anisopliae* under carbon and nitrogen exhaustion. *J Basic Microbiol* 2009a;49:404-411.
149. Wang S, Leclerque A, Pava-Ripoll M, Fang W, St. Leger RJ. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Eukaryot Cell* 2009b;8:888-898.



150. Ward DE, Gai Y, Lazny R, Pedras MSC. Probing host-selective phytotoxicity: Synthesis of destruxin B and several natural analogues. *J Org Chem* 2001;66:7832-7840.
151. Ward DE, Lazny R, Pedras MSC. Synthesis of the host-selective phytotoxin destruxin B. Avoiding diketopiperazine formation from an N-methyl amino acid dipeptide by use of the Boc-hydrazide derivative. *Tetrahedron Lett* 1997;38:339-342.
152. Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, Teruya T, Nagai K. Pharmacological topics of bone metabolism: Antiresorptive microbial compounds that inhibit osteoclast differentiation, function, and survival. *J Pharmacol Sci* 2008; 106:547-554.
153. Yeh SF, Wei P, Ongt GT, Chiou AJ, Chuang CC, Chiou SH, Wu SH. Study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229:65-72.
154. Yoshida M, Takeuchi H, Ishida Y, Yashiroda Y, Yoshida M, Takagi M, Shin-ya K, Doi T. Synthesis, structure determination, and biological evaluation of destruxin E. *Org Lett* 2010;12:3792-3795.
155. Yoshimoto Y, Imoto M. Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H⁺-ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. *Exp Cell Res* 2002;279:118-127.