



## 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

計畫名稱： 本土鏈黴菌抗氧化性代謝物 AMBL-029C-TS-003 之發酵生產及其化學結構分析

Production and structure elucidation of an antioxidant metabolite AMBL-029C-TS-003 from domestic *Streptomyces*

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： 89-2113-M-038-005-

執行期間： 自民國 89 年 08 月 01 日起至民國 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：許元勳（台北醫學大學醫學研究所）

計畫參與人員：邱之儀（台北醫學大學細胞及分子生物研究所）、林錦瑩（台北醫學大學醫學研究所）、李茂生（台北醫學大學醫學研究所）

執行單位：台北醫學大學醫學研究所

中華民國九十年十二月三十一日

## 一、中文摘要

屬於自由基 (Free radicals) 的活性氧屬 (Reactive oxygen species, ROS) 對組織的傷害是造成人類許多慢性疾病的主因。微生物由於繁殖快速，且其二次代謝產物的種類變化性高，在產品研發效率及後續量化生產中佔有極大優勢，因此本研究的主要目標即設定在由微生物的發酵產物中篩選具有開發潛力的天然抗氧化物質。針對此一目的，我們首先從本省土壤樣本中分離各種不同形態的放線菌，針對所分離的菌株，我們進行菌種批次培養，並配合活性檢測的方法進行抗氧化物質生產菌的篩選。針對本實驗目的，我們設計了：(1) 以疏水吸附性樹脂 Amberlite XAD-2 回收二次代謝物及處理檢測樣本；以及 (2) 以「過氧化脂質」和「硫丙二醯尿」生成量為主的抗氧化活性篩選方法；(3) 經此篩選程序，我們選獲了具有抗氧化物質高生產力的菌株，命名為 AMBL-029C；針對生產菌株的發酵回收處理液，以矽膠薄層色層分離純化後，並以高效能液相層析法 (High performance liquid chromatography; HPLC) 分析物質可得一初級純化物質，命名為 AMBL-029C-TS-003 (TS)；(4) 由酸鹼轉溶 (acid-base fractionation) 實驗得知，TS 屬於中低極性的強酸性物質，對溫度 (37°C-100°C) 及酸鹼度 (pH3.0-13.0) 均表現出高穩定性；(5) 在抗氧化機制探討方面，我們針對 DPPH 自由基的清除作用、金屬離子的螯合作用、超氧自由基的清除作用等不同抗氧化機制進行探討，來評估 TS 清除自由基的機制；然因 TS 之回收量仍不足且亦未至最後純化階段，其濃度表示方式無法使用摩耳濃度計算。(6) 在抗氧化活性評估方面，為了客觀評定此物質在 ROS 清除、細胞保護以及抗氧化相關活性的表現，我們選定以：(1) 大白鼠初代肝細胞模式 (Rat primary hepatocyte system)、(2) 氧化低密度脂蛋白系統 (Oxidized LDL system)、(3) 端粒酶活性系統 (Telomerase activity system) 及 (4) 前骨髓白血球 HL-60 程式化死亡系統 (HL-60 apoptosis system) 等四種實驗模式，進行 TS 對保護細胞抵抗氧化壓力 (oxidative stress)、防止 LDL 氧化及對特定癌細胞誘發程式化死亡，抑制端粒酶活性的能力進行評估。由實驗結果得知，在氧化低密度脂蛋白系統中，高濃度的 TS 表現出顯著抑制低密度脂蛋白氧化的能力，並較同濃度的  $\alpha$ -Toc 具有更強抑制低密度脂蛋白氧化的能力。在前骨髓白血球 HL-60 程式化死亡系統中，TS 會誘發 HL-60 的程式化死亡。在觀測抗氧化效果方面，以對 HL-60 細胞不呈細胞毒性的濃度觀察，得知 TS 在短時間內有保護細胞不受氧化壓力的能力，但在長時間後，對抗氧化壓力的效果不如  $\alpha$ -Toc 明顯。

關鍵詞： 自由基、抗氧化劑、放線菌、低密度脂蛋白氧化、初代肝細胞、程式化死亡、端粒酶。

## 二、英文摘要

The damages of human tissues caused by reactive oxygen species (ROS) are the most critical factors to many chronic diseases. Microbes are good sources in production of industrially useful secondary metabolites due to its predominance in mass production. Integrating the above-mentioned background, our study has focused in search of novel and target-specific nature antioxidants from microbial resources. For this purpose, we firstly collected a number of domestic soil samples from different areas, and resulted in isolating various strains of actinomycetes. Small-scale

fermentation was carried out followed by antioxidant screening using lipid auto-oxidation and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) as the detection methods. Six experimental stages were designed in our procedure, those are: (1) metabolite recovery and tested sample preparation: the metabolites were recovered by Amberlite XAD-2 absorption; (2) antioxidant detection and strain selection: samples were quantitatively analyzed by the inhibition effects on formation of lipid peroxides (primary oxidants) and TBARS (secondary oxidants) to screen the strains able to produce antioxidants. According to the established screening methods, we chose out a strain of actinomycetes, designed as AMBL-029C; (3) antioxidant purification: the fermentation broth was recovered by a series of separation techniques including a successive TLC purification. The resulting primary purified compound [temporarily designed as AMBL-029C-TS-003 (TS)] was further analyzed by HPLC to monitor its purity; (4) physical-chemical characteristics: judging from the acid-base fractionation experiments, and the pH and temperature stability tests, the compound was deduced to be a acidic compound with the properties of low polarity and highly pH and temperature stable; (5) mechanism of the antioxidant: in comparison with some other known antioxidants, TS was subjected to investigate its antioxidant mechanism, together with BHT,  $\alpha$ -tocopherol. The research items included: 1. Scavenging of  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH); 2. Chelating of metal ions; 3. Scavenging of superoxide anion. (6) Evaluation of the antioxidant activity in clinical uses: four experimental models were selected to evaluate the antioxidant activities of TS. These models included: (1) Rat primary hepatocyte system: to evaluate the protective ability of tested antioxidants toward cells against oxidative stress; (2) LDL oxidation system: to evaluate the ability of tested antioxidants in preventing LDL from oxidation; (3) HL-60 cells apoptosis system: to evaluate the ability of tested antioxidants in inducing and/or preventing HL-60 cells from apoptosis; (4) Telomerase inhibition system: to evaluate the ability of tested antioxidants in inhibiting telomerase activity. The results indicated that the high dose (5mM) of TS exhibited more potent activity than  $\alpha$ -Toc in preventing LDL from being oxidized. However, TS in a low dose (1mM), didn't show any effect against LDL oxidation. In addition, TS could induce apoptosis of HL-60 cells. Nevertheless, as to the antioxidant activity, TS could also protect cells against oxidative stress within a relatively short duration time when compared to  $\alpha$ -Toc. In the remaining experiments, TS didn't show any activity in the protection of rat primary hepatocyte cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, and in the inhibition of telomerase.

Keywords: free radicals, antioxidants, actinomycetes, LDL oxidation, primary hepatocytes, apoptosis, telomerase.

### 三、緣由與目的

本研究之主要目的乃在探討本研究室自本土性鏈黴菌之發酵培養液中，所長期偵測追蹤之抗氧化活性代謝物 AMBL-029C-TS-003 (TS)；針對此一物質之大量發酵生產、回收純化、及其化學結構進行評估，並擬針對其所表現對 (1) 大白鼠初代肝細胞；(2) 氧化低密度脂蛋白；(3) 端粒酶活性；以及 (4) 前骨髓白血球 HL-60 程式化死亡等四種生物活性之實驗模式，具備保護細胞抵抗氧化壓力、防止 LDL 氧化、對特定癌細胞誘發程式化死亡，以及抑制端粒酶活性之能力進行確認。為了達成此一目的，針對此一物質生產菌株之標的物之大量製備和提純需進行研究規畫，以供應實驗所需，此外針對本物質相關衍生物之製備及其分子構造確認亦在所規劃之研究項目中。本報告即是針對 TS 物質之大量發酵生產回收、化學分離純化、物質特性、以及其生物活性評估測試之研究結果做一綜合性說明。

### 四、結果與討論

#### (一) 菌種發酵培養及醱酵培養液之前處理

接菌於含 10ml YMD 液態培養基的 20ml L 型試管中，於 30°C、迴轉半徑 99rpm 的往復式恆溫振盪培養箱中培養 96 小時，接著從 10 ml 的種菌中取 1ml 菌液，轉接到含 60ml modified streptomycetes 液態培養基的口瓶中，在同條件的往復式恆溫振盪培養箱中連續培養 192 小時，培養過程中並加入玻璃珠以避免菌絲纏繞。回收萃取時先將發酵菌液離心(8,500rpm、15 分鐘)，菌液上清液先與 20g 的 Amberlite XAD-2 均勻混合，使 Amberlite XAD-2 完全發揮吸附物質的能力，再用漏斗過濾，將 Amberlite XAD-2 部份以兩倍水洗淨之後，再以含 0.05N 鹽酸的甲醇沖提出來，接著收集甲醇沖提液，經 pH 調整為中性及減壓濃縮乾燥後，以甲醇溶離出可溶部份，調整至固定體積即可作為抗氧化活性初步篩選樣本。

#### (二) 抗氧化活性初步篩選

當菌種發酵培養液經上述之處理程序製作成可供抗氧化活性初步篩選之樣本時，接著會對這些樣本利用油脂自動氧化 (Lipid auto-oxidation) 及硫丙二醯尿酸系統 (TBA system) 為是否含有抗氧化活性物質之用的初步篩選方法。經以上兩種抗氧化活性初步篩選方法，我們實驗室由近 200 株的土壤放線菌中，篩選出一株可符合我們所設定篩選條件之抗氧化物質高產量菌株，並將其命名為 AMBL-029C。接下來便針對 AMBL-029C 菌株進行其菌種發酵培養、抗氧化物質純化及特性分析，並針對所得之天然抗氧化物質以大白鼠初代肝細胞、氧化低密度脂蛋白、抑制端粒酶活性及前骨髓白血球 HL-60 程式化死亡等四種實驗模式，進行抗氧化活性評估。針對菌種篩選可依下列之篩選方法進行。

##### 1. 油脂自動氧化系統 (Lipid auto-oxidation system)

取亞麻油酸 (Linoleic acid) 60  $\mu$ g 與 DMSO 20  $\mu$ g 加入測試樣本 50 $\mu$ l，靜置 10min 後加入 0.5% ammonia persulfate 20 $\mu$ l，混合均勻置於 37°C 振盪反應 18 小時，加入 2.5ml 含 10% BHT 和 10% 醋酸的異丙醇 (Isopropanol) 停止反應，接著於亞麻油酸的反應混合物中加入 143% 的碘化鉀 70 $\mu$ l 使其與過氧化物作用，觀察其波長 490nm 吸光值的變化。

## 2. 硫丙二醯尿系統 (Thiobarbituric acid system)

取亞麻油酸 (Linoleic acid) 20  $\mu$ g 與 Tween 80 20  $\mu$ g 加入測試樣本 50 $\mu$ l, 靜置 10min 後加入 0.5% ammonia persulfate 20 $\mu$ l, 混和均勻置於 37°C 振盪反應 18 小時後, 加入 10 $\mu$ l 10mg/ml BHT 停止反應, 接著於亞麻油酸的混和反應物中加入 12% TCA 1.5ml 調整 pH 值後, 再加入 1.2% TBA 1ml 均勻混和後置入 100°C 水浴鍋中反應 10 分鐘, 再將反應液迅速冷卻至 4°C, 於 3500rpm、4°C 離心 15 分鐘, 取離心後上清液觀察其吸光值的變化。

### (三) AMBL-029C 所生產的抗氧化活性物質 TS 的分離純化

#### 1. 發酵菌液的前處理

針對抗氧化物質的純化分離, 我們以 5 公升三角發酵培養搖瓶, 添加 2 公升 NB 液態培養基, 在迴轉數 75r.p.m.、30°C 下, 進行 8 天往復振盪發酵培養。如此共累積了 18 升發酵菌液。接著我們將發酵菌液以乙酸乙酯 (ethyl acetate, EtOAc) 萃取過後, 取得 EtOAc 萃取層, 於 37°C 減壓濃縮條件下, 去除有機溶劑得到乾涸的粗萃取物, 溶於 5ml EtOAc 中。

#### 2. 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography; TLC):

使用矽膠玻璃平板, 取 5ml 試樣畫線於距平板下緣 1 公分處當原點, 展開溶劑為 Toluene:EtOAc = 2:8(v/v), 展開距離為 6 公分, 於室溫下放置 18 小時待溶劑揮發後, 在 UV 燈 254nm 與 365nm 波長下檢測; 結合油脂自動氧化系統與硫丙二醯尿系統之測試結果, 將偵測出有抗氧化活性之區域刮下, 用甲醇萃取, 將萃取液再一次以薄層色層分析法展開, 展開溶劑為 100% EtOAc, 重複以上步驟, 得到一初步分離萃取液。【TLC: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; Merck】。

#### 3. 以高壓液相層析儀 (High pressure liquid chromatography, HPLC) 進行純化分析

經上述方法純化後之初級純化物, 以 HPLC 進行其純度分析: 條件為: 管柱 Lichrosorb RP-18(25cmx 4mm, Merck), 移動速率為 1ml/min, 溫度維持 25°C。A. 移動相 Methanol。B. 移動相 acetonitrile。C. 移動相 acetonitrile+0.05% TFA。以下的實驗, 我們採用 AMBL-029C 之發酵菌液經 EtOAc 萃取、兩次 TLC 分離, 再以減壓濃縮至乾涸後之初級純化物做為以下實驗之測試樣本, 並將其暫時命名為 AMBL-029C-TS-003 (TS)。AMBL-029C 之菌種發酵液經過乙酸乙酯萃取後, 再經矽膠薄層色層層析法進行物質的純化分離。所分離出之抗氧化物質經 HPLC 測定其純度。由所分析之 HPLC 圖譜之結果顯示, 經過上述分離純化法所分離出來的物質 TS 仍非高度純化物。目前所知 TS 為強酸性物質, 其對溫度及酸鹼度具高度之穩定性

### (四) TS 之抗氧化機制評估

#### 1. 油脂自動氧化系統

結果顯示 TS 具有顯著抑制脂質過氧化物生成的能力 (1mg/ml, 94.9 $\pm$ 4.12%)。

#### 2. 硫丙二醯尿生成系統

由 TS 抑制 TBARS 生成活性之結果 (1mg/ml, 86.49 $\pm$ 4.02%) 顯示, TS 具有與 BHT、 $\alpha$ -Toc 同樣, 顯著抑制 TBARS 生成的能力。

#### 3. 清除 $\alpha$ , $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) 自由基能力之測定

由結果可知 TS 在濃度為 1mg/ml 時，其清除 DPPH 之活性為 49.4±7.12%。顯示其對 DPPH 自由基的活性有中等程度的清除能力。

#### 4. 螯合鐵離子能力測定

由結果顯示，當測試物 TS 的重量百分比濃度設定 4.9±0.3% 時，與 500 μM BHT (6.1±0.5%)、1mM α-Toc (-12.4±0.3%) 一樣對鐵離子螯合的能力幾乎接近於零，表示 TS 在進行抗氧化的能力中，並不包括螯合亞鐵離子的能力。

#### 5. 清除超氧陰離子能力的測定

從結果顯示，TS 與 BHT、α-Toc 一樣具有清除超氧陰離子的能力，其清除超氧陰離子的能力為相較於 BHT (500 μM, 74.8±3.29%) 和 α-Toc (1mM, 82.1±1.03%)，TS 可被判定為 (1mg/ml, 43.1±7.33%) 具有中等清除超氧陰離子的能力。

### (五) 抗氧化活性評估試驗

#### 1. 以大白鼠初代肝細胞為模式(Rat primary hepatocyte system)測定氧化壓力的影響

##### (1) TS 對大白鼠初代肝細胞生存力的影響

於正常培養狀態下，添加不同濃度的 TS 於大白鼠初代肝細胞中培養 24 小時後，藉由其 LDH leakage 變化的情形，以得知對細胞之生存力是否有影響。經實驗結果顯示，添加 TS 培養 24 小時，對大白鼠初代肝細胞 LDH leakage 變化並沒有差異性，表示本物質對大白鼠初代肝細胞的細胞生存力並沒有影響。

##### (2) TS 對大白鼠初代肝細胞遭受氧化壓力之保護效果

於正常培養狀態下，添加 TS 於大白鼠初代肝細胞中培養 24 小時後，再添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去誘發氧化壓力使細胞遭受氧化傷害，藉由其 LDH leakage 變化的情形，以得知 TS 是否對細胞遭受氧化壓力之時有保護效果。經由實驗結果得知，添加 TS 的實驗組在氧化劑 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘發氧化壓力 30 分鐘及 60 分鐘的系統中，對細胞的氧化傷害並沒有保護效果，其 LDH leakage 的百分比數值和對照組沒有顯著差異。

##### (3) 以低密度脂蛋白氧化系統 (LDL oxidation system) 為模式之抗氧化實驗

本實驗以銅離子誘發人類低密度脂蛋白過氧化反應，以 TBARS 的生成量來測試 LDL 的氧化程度。由結果顯示，TS 在高劑量濃度 (5mg/ml) 之下，對 LDL 氧化有明顯抑制作用，然而在低劑量濃度 (1mg/ml) 則未見其表現。

#### 2. 以端粒酶活性抑制為模式測定癌細胞端粒酶活性

在端粒酶活性抑制模式中，我們以 1mg/ml、200 μg/ml、40 μg/ml 之 TS 測試對癌細胞端粒酶活性的抑制能力；由結果顯示，1mg/ml、200 μg/ml、40 μg/ml 之 TS 皆無法有效抑制端粒酶活性。

#### 3. 以前骨髓白血球 HL-60 程式化死亡為模式測定氧化壓力對細胞的影響及程式化死亡的誘導

##### (1) 確定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對 HL-60 細胞誘導程式化死亡的能力

在 HL-60 細胞培養液中，投入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同培養，誘導 HL-60 細胞進程式化死亡。由結果顯示，HL-60 細胞在投入 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的情況下產生 DNA 斷片化的現象。HL-60 細胞培養液在投入 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養，在培養 3 個小時

內即可看到明顯 DNA 斷片化現象，且在實驗進行的 7 個小時之內可顯著看出隨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理時間延長，DNA 斷片化程度增加的情形，由此顯示 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的確會誘發 HL-60 細胞的程式化死亡。

#### (2) TS 誘導 HL-60 細胞程式化死亡的能力

添加 TS 於 HL-60 細胞中，在 7 個小時內，藉由 DNA 斷片化的情形，以得知 TS 具有誘發 HL-60 細胞程式化死亡的能力。由實驗結果得知，添加 200 μg/ml TS 的實驗組細胞培養 7 小時的情況下，在第 3 個小時之後，實驗組細胞皆出現 DNA 斷片化的現象，且 DNA 斷片化程度有明顯隨時間增加的趨勢，顯示細胞皆被誘發了程式化死亡。

#### 4. HL-60 細胞遭受氧化壓力之下 TS 對 HL-60 細胞保護效果之實驗

添加 100 μg/ml 的 TS 於 HL-60 細胞中培養 1 小時之後，再添加 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去誘發細胞程式化死亡，藉由 trypan blue 染色及 DNA 斷片化的情形，以探討此物質是否對細胞遭受氧化壓力有保護效果。由實驗結果得知，50 μg/ml TS 對 HL-60 細胞並不具有保護效果。在遭受 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化壓力之下，在細胞培養液中投入 50 μg/ml TS 的實驗組細胞在 1 小時之內，細胞生存率有明顯下降趨勢。此外亦可由 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘發的 DNA 斷片化程度得知此一結果。

### 五、計畫成果自評

有關本微生物抗氧化活性代謝物 AMBL-029C-TS-003 抑制 LDL 之活性強度，依照我們目前所執行的進度為：此微生物代謝天然物屬中低極性物質，可溶解於 chloroform/methanol (2:1) 溶劑中 (溶劑量不超過待測總量的 1%)；從 <sup>1</sup>H-和 <sup>13</sup>C-NMR 有機光譜的初步解析結果得知此物質之化學構造中含有類似 BHT 結構之 *tert*-butyl 官能基團，而從其分子式和質量分析的分析結果觀之，屬新型分子結構抗氧化劑的可能性居多，惟仍須進一步確認。

在活性檢測方面，針對同菌種的數個抗氧化活性代謝成分，進行以過渡金屬銅離子誘導 LDL 過氧化之抗氧化劑保護實驗，所得結果仍以編號 AMBL-029C-TS-003 的物質相對於 probucol 及 α-tocopherol (10-200 μM level) 具有較佳保護 LDL 過氧化之效果。從 LDL 過氧化誘發系統所得待測上清液之 232 nm O.D. 值比較結果顯示，相對於空白對照組所換算之抑制百分比，本 AMBL-029C-TS-003 物質的抗氧化強度 (LC<sub>50</sub>) 約為 probucol 的 1.5 倍，亦約為 α-tocopherol 的 9 倍。Probucol 是目前臨床唯一使用在降血脂的抗氧化劑，在本試驗中其保護 LDL 過氧化的效果比 α-tocopherol 更顯著，但因此藥易造成心律不整等副作用，因此如何結合微生物發酵技術以及有機化學分析技術以量化生產更有效的天然抗氧化劑，應是未來防治粥狀動脈硬化之必然發展趨勢。本實驗中我們設定在篩選此類型抑制 LDL 過氧化物過程中的幾個檢測方法為：

一、選擇等倍稀釋莫爾濃度之樣品，於 Lipofilm gel 進行電泳分析以初步分析 LDL 上蛋白所帶電荷之改變，因而間接檢測樣品保護 LDL 過氧化之活性強度；本實驗分 sample、blank、negative control 及 positive control (隨樣品溶解度之不同，可選用 probucol、BHT or BHA、α-tocopherol or trolox 等做為活性強度對照物。

二、在以金屬銅離子誘導 LDL 過氧化的實驗中，可利用 LDL 上脂質過氧化所產

生 TBARS 的量來評估樣品保護 LDL 過氧化之活性強度；實驗結果以 MDA nmol/mg protein 表示之。LDL 的 protein 量以 Bio-Rad 方法測定並以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品。

三、利用 macrophage 會針對氧化型 LDL (ox-LDL) 進行消化吞噬作用 (phagocytosis)，因而形成泡沫細胞 (foam cell)；我們採用 macrophage 的 primary culture 或 cell lines 利用螢光染色法觀測相對於 normal cell 的 foam cell 量以間接計算出樣品抑制 LDL 過氧化的 IC<sub>50</sub> 值。本年度計畫之執行大體仍能依照預定目標完成，對所欲探索的標的物質亦已確立了回收萃取和分離純化及分析流程；然而由於本天然物之回收量有限，對此一微生物代謝物之分子結構目前仍無法掌握較清楚之輪廓，希望未來在天然物之量化生產、回收製備、分子構造確定、以及所欲發展之後續動物性實驗生物活性評估等研究工作能順利開展，有所突破。本計畫在有限之人力物力條件下，雖獲致階段性成果，然後續仍需結合相關研究專才以協力完成。本研究之相關報告已分別發表於國內外各學術會議及期刊，可參查所附之參考文獻。

#### 六、參考文獻

1. 許元勳 (1999)：微生物來源天然抗氧化劑之篩選研究 (上)，生物產業 Bioindustry，第十卷，第一期，pp. 12-18。
2. 許元勳 (1999)：微生物來源天然抗氧化劑之篩選研究(下)，生物產業 Bioindustry，第十卷，第二期，pp. 33-40。
3. 許元勳、徐泰浩 (2000)：以水產加工副產品為原料利用微生物發酵轉換技術生產天然抗氧化劑之篩選研究，生物產業 Bioindustry，第十一卷，第四期，pp. 51-57。
4. 許元勳、陳延順 (2001)：轉錄因子 NF- $\kappa$ B 活化抑制劑之篩選研究，生物產業 Bioindustry，第十二卷，第四期，pp. 227-233。
5. Lin C. -Y.; Y. -S. Chen and Y. -H. Hsu (2000). "Characterization of the natural antioxidants produced by *Streptomyces* sp. AMBL-019C". The 34<sup>th</sup> Annual meeting of the Chinese Society of Microbiology, Taipei, Taiwan, P. 49.
6. Lee M. -S.; C. -E. Chou and Y. -H. Hsu (2001). "Rapid detection of pathogens in sepsis and EOU". The 35<sup>th</sup> Annual meeting of the Chinese Society of Microbiology, Taipei, Taiwan, P. 62.
7. Chen Y. -S.; K. -W. Liao and Y. -H. Hsu (2001). "Screening of microbial metabolites with NF- $\kappa$ B inhibitory activity". The 35<sup>th</sup> Annual meeting of the Chinese Society of Microbiology, Taipei, Taiwan, P. 68.
8. Lee J. -Y.; Y. -C. Hsu, S. -F. Liao and Y. -H. Hsu (2001). "Characterization of the antioxidants AMBL-019C-TS produced by the soil-borne isolate of *Streptomyces macrosporeus*". The 35<sup>th</sup> Annual meeting of the Chinese Society of Microbiology, Taipei, Taiwan, P. 73.



9. **Hsu Y. -H.**; Y. -S. Chen, S. -F. Liao and C. -Y. Lin (2001). "LAB (lactic acid bacteria) metabolites with cytotoxic and antioxidant activity to mammalian cell lines". 1<sup>st</sup> Asian Conference on Lactic Acid Bacteria for Industrial Application and New Technology, The Korean Society for Applied Microbiology & Japan Society for Lactic Acid Bacteria, Suwon, Korea, P. 65.