

國立臺灣大學生物資源暨農學院森林環境暨資源學系



碩士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

五種精油成分對紙張防黴活性之協同效果

Synergistic Effects of the Five Components from Essential

Oils on Mold-resistance of Paper

張銀珏

Yin-Jue Chang

指導教授：張上鎮 博士

Advisor : Shang-Tzen Chang, Ph.D.

中華民國 106 年 2 月

February, 2017

## 謝誌



終於到了畢業的時刻，感謝當初恩師 張上鎮教授的首肯，讓我能在大學時進實驗室學習，研究所亦成為實驗室的一員。回顧這 3 年多來的研究所生活，我遇到過挫折，也一度想放棄，但在完成碩士論文的過程中，很感謝身邊能有老師和眾多學長姐的守護，在我最需要的時候伸出援手，讓我可以堅持到最後。

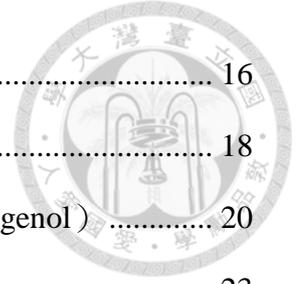
論文的初稿復蒙中興大學森林系王升陽特聘教授、本系所張惠婷教授、林業試驗所許富蘭研究員及本系所葉汀峰副教授等口試委員惠於斧正，並提供許多精銳寶貴的意見，使本論文臻於完善。此外，感謝林業試驗所徐健國老師提供試驗材料、場所及儀器，林業試驗所鄧永芳小姐指導儀器的使用，本系張惠婷教授提供試驗菌種，以及本系關秉宗教授於統計學上的指導。特別感謝林博士群雅學長、佩翎學姐、資正學長、育涵學長，有你們一路督促著我修改論文，我才能完成本論文，並得到很多寶貴的經驗。感謝實驗室林博士煥祐學長、黃博士雅倫學姐、程阿姨、Maggie、KK 學長、閔傑學長、盈如學姐、秉和學長、菟蓉學姐、怡秀學姐、思親學姐、念之學姐、宮民學長、榮文學長、楊珣學姐、嘉紘學姐、伯誠學長、世殷、Lily 學姐、敦禮、盈君、英誠、萬栓、葉恆和廷光等的幫忙。感謝阿焜、梁秀蓮小姐及曹師傅的鼓勵與支持。

最後更要感謝我的家人及好友們的關懷和包容，有你們一路幫我充電，我才能努力不懈的往前邁進，謹以此論文獻給所有支持或陪伴我的人。

# 目錄



表目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
摘要.....	XII
Abstract.....	XIV
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
一、紙質文物之保存.....	3
二、防黴活性試驗方法.....	3
(一) 紙錠擴散法 (Disc diffusion).....	4
(二) 固態稀釋法 (Agar dilution) 和液態稀釋法 (Broth dilution).....	4
(三) 纖維製品防黴性能檢驗法.....	4
三、紙張防黴之方法.....	5
(一) 物理性防治.....	5
1. 溫溼度調控.....	5
2. 微波 (Microwaves) 殺菌.....	6
3. $\gamma$ -射線 (Gamma radiation) 殺菌.....	7
4. 紫外光 (Ultraviolet radiation) 殺菌.....	8
(二) 化學性藥劑處理.....	9
1. 唑類化合物 (Azole).....	9
2. 奈米銀 (Silver nanoparticles).....	12
3. 二氧化鈦 (Titanium dioxide).....	14
4. 環氧乙烷 (Ethylene oxide).....	14
四、天然精油之防黴功效.....	15
(一) 芳香族化合物之防黴活性.....	16

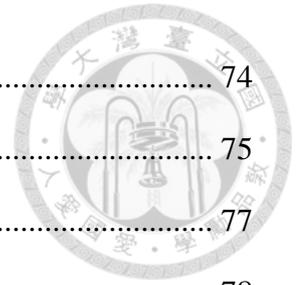


1. 香芹酚 (Carvacrol) .....	16
2. 百里酚 (Thymol) .....	18
3. 肉桂醛 ( <i>trans</i> -Cinnamaldehyde) 和丁香酚 (Eugenol) .....	20
4. 甲基丁香酚 (Methyl eugenol) .....	23
(二) 萜類化合物之防黴活性 .....	24
1. 桉樹醇 (1,8-Cineole) .....	24
2. 樟腦 (Camphor) 和香葉醇 (Geraniol) .....	24
3. 芳樟醇 (Linalool) .....	25
參、材料與方法 .....	28
一、試驗材料 .....	28
(一) 化合物 .....	28
(二) 試驗菌種 .....	28
(三) 培養基 .....	28
(四) 紙樣 .....	29
二、試驗方法 .....	29
(一) 瓊脂稀釋試驗 .....	29
(二) 紙張防黴試驗 .....	30
1. 直接接觸法 .....	30
2. 薰蒸法 .....	30
(三) 紙樣製備 .....	31
(四) 協同配方之留存性 .....	32
1. 紙張上協同配方的萃取 .....	32
2. 協同配方之留存率測定 .....	32
(五) 室內靜置試驗 .....	33
(六) 紙張性質分析 .....	33
1. 表面顏色測定 .....	33



2. 酸鹼值測定 .....	34
3. 耐摺力測定 .....	34
4. 抗張強度測定 .....	34
5. 破裂強度測定 .....	34
三、協同作用分析 .....	35
(一) 等效線圖法 (Isobologram analysis) .....	35
(二) 組合指數 (Combination index) .....	37
(三) 劑量分析 .....	37
四、統計分析 .....	37
肆、結果與討論 .....	38
一、單一成分之防黴活性 .....	38
二、混合配方之防黴活性 .....	43
(一) 各成分間之協同作用 .....	43
1. 各成分混合後抑制黴菌菌絲體生長的協同作用 .....	43
2. 各成分混合後抑制紙張上孢子萌發的協同作用 .....	47
3. 各混合配方於 3 種試驗之組合指數 .....	52
(二) 協同配方對使用劑量之影響 .....	54
1. 瓊脂稀釋試驗中協同配方之劑量變化 .....	54
2. 紙張直接接觸試驗中協同配方之劑量變化 .....	58
3. 紙張薰蒸試驗中協同配方之劑量變化 .....	60
(三) 協同配方抑制紙張常見黴菌之孢子萌發的效果 .....	63
三、協同配方毒殺紙張常見黴菌孢子之效果 .....	69
四、協同配方之留存率 .....	71
五、協同配方對紙張性質的影響 .....	73
(一) 濾紙經協同配方處理後的性質變化 .....	73
(二) 紙張接觸協同配方處理濾紙後的性質變化 .....	74

1. 宣紙接觸處理濾紙後的性質變化 .....	74
2. 道林紙接觸處理濾紙後的性質變化 .....	75
伍、結論 .....	77
陸、參考文獻 .....	78
柒、附錄 .....	88



## 表目錄



表 1 接菌濾紙經微波處理後培養 6 天之殺菌效果 .....	6
Table 1 Effects of disinfection on fungus-inoculated filter paper by microwave irradiation for 6-day incubation.....	6
表 2 濾紙經微波處理之白度和顏色變化 .....	7
Table 2 Effects of microwave irradiation on the brightness and color difference of filter paper .....	7
表 3 6 種噴霧處理於空氣之殺菌效果 .....	11
Table 3 Activities of 6 products as aerial disinfection.....	11
表 4 Thiabendazole 對 3 種紙張白度、纖維強度和氧化強度的影響.....	12
Table 4 Effects of thiabendazole on the brightness, level of oxidation and fiber strength of 3 types of papers.....	12
表 5 奈米銀對於不同來源之各種黴菌的最低抑制濃度和最低致死濃度 .....	13
Table 5 Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of silver nanoparticles against the microorganisms got from different origin ...	13
表 6 臺灣肖楠心材、樹皮和葉子精油以及心材精油主成分 Carvacrol 對 <i>Chaetomium globosum</i> 和 <i>Aspergillus niger</i> 的抑制效果 .....	17
Table 6 Inhibitory effects of essential oils from different parts of <i>Calocedrus macrolepis</i> var. <i>formosana</i> and the major component of heartwood essential oil (carvacrol) against <i>Chaetomium globosum</i> and <i>Aspergillus niger</i> .....	17
表 7 宣紙、道林紙浸漬肉桂醛型土肉桂葉子精油及 Cinnamaldehyde 後顏色和 pH 值的變化 .....	23
Table 7 Changes in color parameters and pH value of Xuan paper and wood-free paper dipped in leaf essential oil of <i>Cinnamomum osmophloeum</i> and cinnamaldehyde .....	23



表 8 白千層樹屬植物 (*Melaleuca ericifolia*、*M. leucadendron* 和 *M. armillaris*) 葉子精油的主成分與對抗黑麴黴菌 (*Aspergillus niger*) 的防黴活性..... 24

Table 8 Antimicrobial activity and major components of essential oils from leaves of *Melaleuca ericifolia*, *M. leucadendron* and *M. armillaris* against *Aspergillus niger* .... 24

表 9 2 種紙張曝露於 415 ppm Linalool 加速老化 21 天之紙張性質 ..... 27

Table 9 Properties of 2 types of papers exposed to 415 ppm linalool after 21-day accelerated ageing..... 27

表 10 最佳協同配方的混合重量 ..... 31

Table 10 Best synergistic formulations in weights ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )..... 31

表 11 紙張直接接觸和薰蒸試驗中 5 種化合物抑制 *Aspergillus niger* 孢子的最低抑制濃度 ..... 41

Table 11 Minimal inhibitory concentrations (MIC, mg/dish) of 5 compounds against spores of *Aspergillus niger* in the direct contact and fumigation methods..... 41

表 12 5 種化合物以不同比例二元混合於瓊脂稀釋試驗、紙張直接接觸試驗和紙張薰蒸試驗的組合指數 ..... 53

Table 12 Combination indices of two-combinations of 5 compounds under different mixing ratios in the agar dilution, direct contact and fumigation methods ..... 53

表 13 協同配方抑制紙張常見黴菌孢子萌發之效果 (紙張直接接觸試驗) ..... 65

Table 13 Inhibitory effects of synergistic formulations against common mold spores on paper using the direct contact method ..... 65

表 14 協同配方抑制紙張常見黴菌孢子萌發之效果 (紙張薰蒸試驗) ..... 68

Table 14 Inhibitory effects of synergistic formulations against common mold spores on paper using the fumigation method ..... 68

表 15 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低致死濃度 (紙張直接接觸試驗) ... 69

Table 15 Minimal fungicidal concentration (MFC) of 5 compounds against common mold spores on paper using the direct contact method..... 69

表 16 最佳協同配方毒殺紙張常見黴菌孢子之效果（紙張直接接觸試驗） .....	70
Table 16 Fungicidal effects of the best synergistic formulations against common mold spores on paper using the direct contact method.....	70
表 17 協同配方處理之濾紙於室內放置 1 天後化合物的留存率 .....	71
Table 17 Retention (%) of compounds on filter papers treated with synergistic formulations after indoor exposure for 1 day .....	71
表 18 濾紙經協同配方處理後的性質變化 .....	74
Table 18 Change in properties of filter papers treated with synergistic formulations....	74
表 19 宣紙接觸協同配方處理濾紙後並於室內放置 14 天後的性質變化 .....	75
Table 19 Change in properties of Xuan papers which was contacted with synergistic-formulation-treated filter papers after indoor exposure for 14 days .....	75
表 20 道林紙接觸協同配方處理濾紙室內放置 14 天後的性質變化 .....	76
Table 20 Change in properties of wood-free papers which was contacted with synergistic-formulation-treated filter papers after indoor exposure for 14 days .....	76



## 圖目錄



圖 1 紙錠擴散法之示意圖。 .....	4
Fig. 1 Schematic diagram of the disc diffusion method. ....	4
圖 2 經 Azole 類化合物、幾丁質合成酶抑制劑和抗微生物藥劑處理的濾紙和報紙 分別接種 <i>Penicillium chrysogenum</i> 、 <i>Aspergillus terreus</i> 、 <i>Stachybotys atra</i> 和 <i>Chaetomium elatum</i> 30 天後之 Ergosterol 生成量。 .....	10
Fig. 2 Ergosterol content of <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Stachybotys</i> <i>atra</i> and <i>Chaetomium elatum</i> on paper stripes Whatman and Giornale treated with butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, miconazole, econazole and 5-fluorouridine after 30-day incubation. ....	10
圖 3 植物精油中防黴成分之化學結構。 .....	16
Fig. 3 Chemical structures of anti-mold components in plant essential oils. ....	16
圖 4 Carvacrol 抗微生物活性的的假說示意圖。 .....	18
Fig. 4 Schematic diagram of the hypothesis for the anti-microbial action of carvacrol. ....	18
圖 5 穿透式顯微鏡下 <i>Aspergillus niger</i> 菌絲的變化。 .....	20
Fig. 5 Changes of the hyphae of <i>Aspergillus niger</i> viewed under transmission electron microscopy. ....	20
圖 6 植物葉子精油及其主成分在 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的使用濃度下抑制黴菌 <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> 和 <i>Chaetomium globosum</i> 生長的效果。 .....	21
Fig. 6 Inhibitory effects of essential oils from plant leaves and their major components (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) against <i>Aspergillus niger</i> and <i>Chaetomium globosum</i> . ....	21
圖 7 化合物薰蒸於發黴書籍之抗黴活性的評估裝置。 .....	26
Fig. 7 Test-chamber for evaluation the anti-mold activity of compound on moldy books in vapor phase. ....	26

圖 8 瓊脂稀釋試驗之示意圖。 .....	29
Fig. 8 Schematic diagram of the agar dilution method. ....	29
圖 9 紙張直接接觸法之示意圖。 .....	30
Fig. 9 Schematic diagram of the direct contact method. ....	30
圖 10 紙張薰蒸法之示意圖。 .....	31
Fig. 10 Schematic diagram of the fumigation method. ....	31
圖 11 等效線圖法之試驗設計圖。 .....	35
Fig. 11 Experiment design of the isobologram analysis. ....	35
圖 12 協同作用、加成作用和拮抗作用之等效線圖的示意圖。 .....	36
Fig. 12 Schematic diagram of isobologram of synergistic effect, additive effect and antagonistic effect. ....	36
圖 13 瓊脂稀釋試驗、紙張直接接觸試驗和紙張薰蒸試驗評估 5 種化合物之防黴 <i>Aspergillus niger</i> 活性。 .....	39
Fig. 13 Anti-mold activities of 5 compounds against <i>Aspergillus niger</i> evaluated by using 3 methods, agar dilution, direct contact and fumigation. ....	39
圖 14 5 種化合物二元混合後抑制 <i>Aspergillus niger</i> 菌絲體生長之等效線圖 (瓊脂稀釋試驗)。 .....	44
Fig. 14 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against mycelium of <i>Aspergillus niger</i> using the agar dilution method. ....	44
圖 15 5 種化合物的防黴機制。 .....	45
Fig. 15 Anti-mold mechanism of 5 compounds. ....	45
圖 16 5 種化合物二元混合後抑制 <i>Aspergillus niger</i> 孢子萌發之等效線圖 (紙張直接接觸試驗)。 .....	48
Fig. 16 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against spores of <i>Aspergillus niger</i> using the direct contact method. ....	48

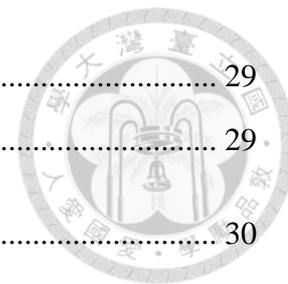


圖 17 5 種化合物二元混合後抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之等效線圖 (紙張薰蒸試驗)。

Fig. 17 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against spores of *Aspergillus niger* using the fumigation method.

圖 18 瓊脂稀釋試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 菌絲體生長的最低抑制劑量。

Fig. 18 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against mycelium of *Aspergillus niger* in the agar dilution method.

圖 19 協同配方 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1)；Car-Ger (3:1) 和 Ger-Thy (1:3)；Cin-Thy (1:3) 和 (1:1)；Eug-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 中各化合物抑制 *Aspergillus niger* 菌絲體生長之最低抑制劑量的變化 (瓊脂稀釋試驗)。

Fig. 19 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic formulations, including Car-Thy (1:3), (1:1) and (3:1); Car-Ger (3:1) and Ger-Thy (1:3); Cin-Thy(1:3) and (1:1); Eug-Thy (1:3), (1:1) and (3:1), against mycelium of *Aspergillus niger* using the agar dilution method.

圖 20 紙張直接接觸試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發的最低抑制劑量。

Fig. 20 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* in the direct contact method.

圖 21 協同配方中各化合物抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之最低抑制劑量的變化 (紙張直接接觸試驗)。

Fig. 21 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* using the direct contact method.

圖 22 紙張薰蒸試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發的最低抑制劑量。

Fig. 22 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* in the fumigation method.

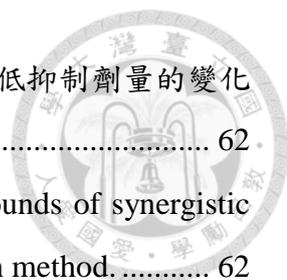


圖 23 協同配方中各化合物抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之最低抑制劑量的變化  
(紙張薰蒸試驗)。 ..... 62

Fig. 23 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic  
formulations against spores of *Aspergillus niger* using the fumigation method. .... 62

圖 24 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低抑制濃度 (紙張直接接觸試驗)。 . 64

Fig. 24 Minimal inhibitory concentration (MIC) of 5 compounds against common mold  
spores on paper using the direct contact method. .... 64

圖 25 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低抑制濃度 (紙張薰蒸試驗)。 ..... 66

Fig. 25 Minimal inhibitory concentration (MIC) of 5 compounds against common mold  
spores on paper using the fumigation method. .... 66



## 摘要

本研究中探討 5 種植物精油成分—香芹酚 (Carvacrol, Car)、肉桂醛 (Cinnamaldehyde, Cin)、丁香油酚 (Eugenol, Eug)、香葉醇 (Geraniol, Ger)、百里酚 (Thymol, Thy)，及其以 1:3、1:1 和 3:1 比例二元混合之配方抑制黑麴黴菌 (*Aspergillus niger*) 生長的活性。首先，利用 3 種防黴試驗 (瓊脂稀釋試驗、紙張直接接觸試驗和紙張薰蒸試驗) 分別評估各化合物的最低抑制濃度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)，再利用等效線圖法 (Isobologram analysis)、組合指數 (Combiantion index, CI) 和使用劑量分析，瞭解混合配方的協同作用強度，及混合使用後化合物的劑量變化，最終評估協同配方對紙張上常見黴菌—黑麴黴菌 (*A. niger*)、土麴菌 (*A. terreus*) 和青黴菌 (*Penicillium citrinum*) 孢子的抑制萌發和毒殺效果，以及最佳配方對紙張性質的影響。

由瓊脂稀釋試驗結果得知，5 種化合物中，Car 和 Thy 抑制 *A. niger* 菌絲體生長的效果最佳 (MIC = 200  $\mu\text{g/mL}$ )，且兩者混合得到的 3 種不同比例配方皆具協同作用 (CI = 0.7)，可較單獨使用減少 40~80% 的使用劑量。由紙張直接接觸和薰蒸試驗結果得知，5 種化合物中，Cin 和 Thy 在兩試驗抑制 *A. niger* 孢子萌發的效果皆最佳，於兩試驗的 MIC 分別為 100  $\mu\text{g/cm}^2$  和 40 mg/L，Car 則在薰蒸試驗中亦有最佳效果 (MIC = 40 mg/L)。直接接觸試驗中，Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理紙張抑制孢子萌發的協同作用強度最高 (CI = 0.7)；完全抑制孢子萌發所需的使用劑量 (Minimal inhibitory dose, MID) 則以 Cin-Ger (3:1) 處理的最低 (MID = 88  $\mu\text{g/cm}^2$ )。薰蒸試驗中，各協同配方的作用強度皆相當 (CI = 0.8)；使用劑量最低的則為 Car-Thy (1:3)、Car-Thy (1:1) 和 Car-Thy (3:1) (MID = 32 mg/L)。

進一步，由協同配方抑制和毒殺紙張上常見黴菌孢子的試驗結果，及其對紙張性質之影響結果得知，紙張分別經 Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理後，直接接觸 3 種常見黴菌孢子時，皆可有效地毒殺孢子，且僅些微降低處理濾紙的引張

和破裂強度，對其接觸的宣紙、道林紙更是無影響。綜合上述結果顯示，Cin-Ger (3:1) 為紙質文物保存中最優良的防黴配方，不僅使用劑量低，可殺死多種常見黴菌的孢子，更可避免影響紙質文物的性質。

【關鍵詞】協同作用、防黴活性、香芹酚、肉桂醛、丁香油酚、香葉醇、百里酚、精油

## Abstract



In this study, the anti-mold activities against *Aspergillus niger* of five components from plant essential oils, including carvacrol (Car), cinnamaldehyde (Cin), eugenol (Eug), geraniol (Ger) and thymol (Thy), and their binary combinations in three mixing ratio (1:3, 1:1, 3:1) were investigated. First of all, three methods, including agar dilution, direct contact and fumigation, were employed to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of each component, separately. Then, the isobologram analysis, combination index (CI) and dose reduction analysis were used to quantify the synergy and the variation in dose of each combination. The inhibitory and fungicidal effects of synergistic combinations against spores of common molds, *A. niger*, *A. terreus* and *Penicillium citrinum*, on paper were evaluated. Finally, the changes in properties of paper of the best formulations were also determined.

According to the result of agar dilution method, carvacrol and thymol not only presented the excellent activities (MIC = 200  $\mu\text{g/mL}$ ) to inhibit the growth of mycelium of *A. niger* among these components, but also showed synergistic effects while they combined in all three ratios. These combinations could reduce 40 to 80% dose than individual. From the results of both direct contact and fumigation methods, cinnamaldehyde and thymol have the excellent activities in both methods (MIC = 100  $\mu\text{g/cm}^2$ , 40 mg/L), and carvacrol only has the excellent activity in the fumigation method (MIC = 40 mg/L). From the results of direct contact method, the treatment of Cin-Eug (3:1) and Cin-Ger (3:1) of paper showed the strongest synergistic effect (CI = 0.7), while the CIs of the others were 0.8; the treatment of Cin-Ger (3:1) showed the lowest minimal inhibitory dose (MID = 88  $\mu\text{g/cm}^2$ ). From the results obtained from the fumigation method, the synergies of all synergistic formulations were equal (CI = 0.8), while the lowest MID were presented by Car-Thy (1:3), Car-Thy (1:1) and Car-Thy (3:1)

(MID = 32 mg/L).

According to the results of inhibitory and fungicidal effects of synergistic formulations against common mold spores on paper, the treatment of Cin-Eug (3:1) and Cin-Ger (3:1) for paper could kill the three mold spores. Although, the mechanical properties of filter papers might be slightly decreased by the treatment of Cin-Eug (3:1) and Cin-Ger (3:1), the properties of Xuan papers and wood-free papers would not change after contacted with treated papers. In conclusion, Cin-Ger (3:1) is a low dose formulation with fungicidal effect against common mold spores, and avoids affecting the properties of treated papers.

**【Key words】** Synergistic effect, Anti-mold activity, Carvacrol, Cinnamaldehyde, Eugenol, Geraniol, Thymol, Essential oil

# 壹、前言



紙張為纖維素所構成的有機材料，在人類的生活中扮演著不可或缺的角色，但其性質不但會受到原料和造紙過程等內在因子的影響，更會受到環境中光線、氧氣、溫溼度變化、空氣污染及微生物和昆蟲等外在因子的影響(Fabbri *et al.*, 1997)。臺灣地處熱帶及亞熱帶，黴菌對紙張的影響尤其嚴重，一旦黴菌開始入侵紙張，常會導致紙張產生黴腐、變色和褐斑 (Foxing) 等狀況 (夏滄琪等，2001)，嚴重破壞紙張的性能，使紙張保存不易，且其上所記載的資料更會因黴菌的污染而無法辨識。此狀況若發生於珍貴的典籍、書畫和歷史紀錄等紙質文物時，其損失不容小覷。

目前常見的防黴方法為控制環境的溫溼度，抑制黴菌之生長。然而，在逆境下，黴菌的孢子會進行外源性休眠 (Exogenous dormancy)，等待生長條件適宜時，便會再度快速且大量的繁殖 (Leong *et al.*, 2006)。因此，為達到更佳的防黴效果，多種防黴方法相繼發明，包含物理性防治和化學藥劑處理；然而，這些方法對於人體、環境或紙張多有衝擊。因此，以天然成分防治黴害的趨勢逐漸興起。近年來，許多研究指出植物精油具有良好的防黴活性 (古惠菁等，2007；許雅青等，2007；Fontenelle *et al.*, 2011；Guarda *et al.*, 2011；Rasooli *et al.*, 2006；Isao *et al.*, 1991；Khan *et al.*, 2010；López-Malo *et al.*, 2005；Shukla *et al.*, 2012；Spidhar *et al.*, 2003)，分離得到的防黴活性成分中，以香芹酚 (Carvacrol)、肉桂醛 (Cinnamaldehyde)、丁香油酚 (Eugenol)、香葉醇 (Geraniol) 和百里酚 (Thymol) 具有較佳的防黴活性；其中，研究已證實紙張分別經 Carvacrol 和 Cinnamaldehyde 處理後可增加紙張的防黴活性 (古惠菁等，2007；許雅青，2007)，其餘成分多以固態或液態稀釋試驗評估其防止食品發黴的效果，而應用於紙張防黴的相關研究仍較少，故本研究首先以瓊脂稀釋試驗和紙張直接接觸試驗，分別評估上述 5 種精油成分溶於瓊脂及處理於紙張的防黴效果。此外，Prakash 等人 (2015) 指出，利用植物精油易揮發之特性，作為食品採收後加工 (Post-harvest processing) 之防蟲防黴薰蒸劑，是

一快速、經濟上可行且低殘留的方法。因此，本研究除了評估上述精油成分處理於紙張直接接觸黴菌的防黴活性，亦利用紙張薰蒸試驗評估精油揮發後的防黴活性，期望能藉助化合物的揮發性，作為簡單且容易使用的紙張薰蒸防黴方法。

然而，根據 Vermeulen 等人 (2013) 的調查和歸納，煙麴黴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 面對化合物的威脅時，部分菌絲細胞會產生基因 (Gene) 突變，進而萌發出有抗藥性的分生孢子 (Conidiospores)。因此，有學者提出使用多種藥劑混合而成的複合藥劑，將可減緩黴菌產生抗藥性的機會和時間。藥劑的混合可產生 3 種類型的交互作用，分別是協同作用 (Synergistic effect)、加成作用 (Additive effect) 及拮抗作用 (Antagonistic effect)；其中，協同作用係指當 2 種 (或以上) 的化合物合併使用時，其效果將大於 2 化合物單獨使用的總和，可有效降低藥劑的使用劑量。根據 Wagner 和 Ulrich-Merzenich (2009) 的歸納整理，化合物間協同作用的成因可能為多靶效應 (Multi-target effect) 及藥物動力效應 (Pharmacokinetic effect)，其中，前者係指 2 化合物可攻擊多種標靶，且兩者攻擊的標靶不盡相同時，會形成如接力賽或生產線的方式，同時攻擊黴菌，而產生協同作用；後者則主要描述其一化合物本身不具有所需的活性，但能增加另一活性化合物之溶解度或吸收速率，進而提升活性化合物的生物可利用性，產生協同作用。前述 5 種防黴的精油成分皆可對細胞膜產生干擾，進而達到良好的抗微生物活性 (Cristani *et al.*, 2007; Devi *et al.*, 2010; Farag *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2008)。此外，Bang 等人 (2000) 的結果亦顯示，Cinnamaldehyde 具有抑制細胞壁合成酵素的活性，Ota 等人 (2003) 則指出 Geraniol 可增強細胞對於藥劑的吸收，Thymol 更具有在細胞膜和膜外的水性培養基之間移動的能力，可不斷的進出、攻擊不同位置的細胞膜 (Cristani *et al.*, 2007)。由此推測，5 種成分不同的抗微生物機制，可能使彼此間具有協同作用。因此，本試驗選用等效線圖法 (Isobologram analysis)，評估 5 種成分之防黴活性的交互作用，以尋得有效的防黴協同配方，降低黴菌產生抗藥性的可能，更可降低藥劑的使用劑量，增加天然植物精油開發為防黴藥劑之潛力。

## 貳、文獻回顧



### 一、紙質文物之保存

舉凡博物館內展示的書畫藝術品、圖書館裡存放的重要典籍和常見的文書用品，多以紙質材料製成，容易受人為或天然因素的影響而劣化，其中，常見的劣化包含紙面之褐斑和變色。褐斑主要起因於黴菌之生長，夏滄琪和張豐吉（2002）調查一般書籍、紙漿板、揭裱紙和多種宣紙等文物用紙，發現紙質材面之褐斑分離所得的黴菌以麴黴菌屬（*Aspergillus*）和青黴菌屬（*Penicillium*）所占比例最多，其餘則包含球毛殼菌（*Chaetomium globosum*）、綠木黴菌（*Trichoderma viride*）、鐮刀黴菌（*Fusarium solani*）、分枝孢子菌屬（*Cladosporium sp.*）、根黴屬（*Rhizopus sp.*）、莖點黴屬（*Phoma sp.*）、黃傘形黴屬（*Umbelopsis sp.*）、黑疆黴屬（*Metarhizium sp.*）和曲黴菌屬（*Eurotium sp.*）等。黴菌著生於紙張後，其代謝產物會大量累積，如：蘋果酸（Malic acid）和草酸（Oxalic acid），使紙張的酸度增加，加速纖維素的水解，導致紙張老化變黃，因此，如何防止紙張發黴是紙質材料保存的一項重大考驗（夏滄琪，2000）。

### 二、防黴活性試驗方法

黴菌在生物分類學上屬於真菌界（Kingdom Fungi）中的不完全菌門（Deuteromycota）和子囊菌門（Ascomycota），由相互交織的菌絲（Hyphae）形成菌絲體（Mycelium），並於其上形成孢子，藉由直接接觸或空氣間接傳播。一旦黴菌散佈到紙張、食物、木材等合適的生長基質，即開始大量繁殖，此狀況不僅會造成物體的腐壞，更會影響視覺感官、物品使用性以及環境衛生，嚴重污染時更可能使人體產生過敏等疾病。因此，尋找適合的防黴藥劑實有其必要，常見的防黴活性試驗方法詳述如下。



### (一) 紙錠擴散法 (Disc diffusion)

紙錠擴散法常用以評估試樣抑制孢子萌發之效果，各研究所使用的試驗條件會因菌種和培養條件有些微差異，此處條件參考自 Farag 等人 (2004) 的研究。試驗方法是將含有試樣之紙錠放置於已塗佈菌液的培養基中央(圖1)，培養21天後，紙張旁邊無黴菌生長的區域即稱為抑制圈 (Inhibition zones)，量測抑制圈之半徑可說明試樣之抗黴活性。

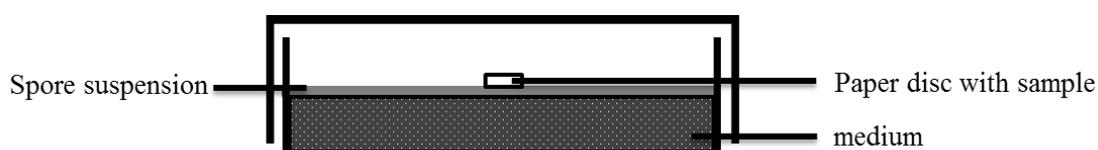


圖 1 紙錠擴散法之示意圖。

Fig. 1 Schematic diagram of disc diffusion method.

### (二) 固態稀釋法 (Agar dilution) 和液態稀釋法 (Broth dilution)

固態稀釋法和液態稀釋法由於試驗簡便且易於操作，常用於初步評估化合物的抑菌能力。以下試驗條件分別參考自 López-Malo 等人(2005)和 Shukla 等人(2012)的研究，首先，將試樣與固體或液體的培養基混勻後，再接種黴菌的菌塊或孢子懸浮液，培養7至14天後，量測試驗組與控制組的菌種生長直徑，並以控制組的直徑為分母計算防黴指數，以評估試樣的抑菌效果。當防黴指數達到100%所需的最低濃度即為最低抑制濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)

### (三) 纖維製品防黴性能檢驗法

纖維製品防黴性能檢驗法 (CNS2690) 可依照纖維製品之用途分為乾式和溼式檢驗法，其中，前者多用於室內裝飾用品，即將 5 cm × 5 cm 纖維製品置於直徑為 9 cm 的滅菌培養皿中，並於其上放置含有孢子懸浮液之軟片，再置入乾燥皿，以溫度  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  培養 28 天；後者對於試樣之抵抗性具有特別的要求，可用於室外



或泡水物品之防黴，其將 5 cm × 5 cm 纖維製品置於帶有固體培養基之滅菌培養皿（直徑為 9 cm）中，並均勻撒佈孢子懸浮液後，加蓋置於溫度  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  之生長箱培養 28 天。

### 三、紙張防黴之方法

紙張的發明是人類歷史的重要變革，不僅提供人們簡易的傳遞訊息方法，更促成紙質書的出現，增加文化的傳播和延續。然而，紙張置於潮溼溫暖的環境下容易受到黴菌的危害，使得紙張的保存受到一項重大的考驗。一般紙張防黴的方法可大致分為物理性防治和化學性藥劑處理，分別描述如下：

#### （一）物理性防治

##### 1. 溫溼度調控

水是黴菌生長所需的一項重要因子，當環境中的溼度達到其生長所需時，黴菌會開始大量滋生。因此，控制環境中的溼度使黴菌無法取得足以利用的水分，是一種常見的物理性防黴方法。Sequeira 等人（2012）從前人的文獻中歸納發現，當紙張保存在水活性（Water activity，在密閉空間中紙張的水蒸氣壓與相同溫度下純水之飽和蒸汽壓的比值）小於 0.6，且溫度低於  $20^\circ\text{C}$  的通風環境時，可以防止紙張發黴。

然而，水災過後的泡水文獻等溼度較高的紙製品，在進行溫溼度調控的防黴處理時，其調控的速度若過於緩慢，容易造成黴菌的滋生；但若乾燥速度過快，則會因紙張的異方性而導致文物變形損毀。因此，溫溼度調控的防黴方法較適用於紙張保存環境的長期穩定調控，而不適於需要立即性防黴處理的場合。



## 2. 微波 (Microwaves) 殺菌

微波為一波長介於 1 到 100 mm 之間的電磁波，其能量介於無線電波和紅外線之間，頻率約為 100 到 30000 MHz。當微波遇到具有極性的分子（如：水分子），會使極性分子吸收微波後產生旋轉和熱能（Bradshaw *et al.*, 1998）。藉此可利用微波加熱微生物體內的水分，使微生物迅速受熱、死去，達到滅菌、防黴的效果（Woo *et al.*, 2000）。

夏滄琪等人（2001）為瞭解紙張經微波處理之防黴效果，將紙質文物上 7 種常見的黴菌 *A. niger*、*A. flavus*、*P. citrinum*、*C. globosum*、*T. viride*、*Metarhizium sp.* 和 *Umbelopsis sp.* 接種於濾紙上，再將其分別以 2450 MHz 微波處理 0、1、3、5、10 及 15 min 後，置於培養基上培養 6 天，計算黴菌於濾紙上的生長面積，以評估微波處理對紙張的殺菌效果。結果如表 1 所示，接種 *Metarhizium sp.* 的濾紙經 1 min 微波處理後，即可達到殺菌效果；接種 *A. niger*、*C. globosum*、*T. viride*、*Umbelopsis sp.* 的濾紙經 3 min 微波處理後達到殺菌效果；而接種 *A. flavus* 和 *P. citrinum* 的濾紙則分別在 5 min 和 10 min 微波處理後，方可達到殺菌效果。

表 1 接菌濾紙經微波處理後培養 6 天之殺菌效果（夏滄琪等，2001）

Table 1 Effects of disinfection on fungus-inoculated filter paper by microwave irradiation for 6-day incubation

Fungal stain	Irradiation time (min)				
	0	1	3	5	10
<i>A. flavus</i>	5+ <sup>a</sup>	2+	1+	-	-
<i>A. niger</i>	5+	4+	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	4+	4+	1+	1+	-
<i>C. globosum</i>	4+	2+	-	-	-
<i>T. viride</i>	5+	4+	-	-	-
<i>Metarhizium sp.</i>	3+	-	-	-	-
<i>Umbelopsis sp.</i>	5+	1+	-	-	-

<sup>a</sup>: - = no growth; 1+ = 20% growth area; 2+ = 40% growth area; 3+ = 60% growth area; 4+ = 80% growth area; 5+ = 100% growth area.

此外，為了更深入評估微波處理對紙張性質的影響，夏滄琪等人（2001）分別量測微波處理後紙張之白度 (Brightness) 和 CIE LAB 色差值，結果如表 2 所示。隨著微波處理時間的增加，白度並無明顯的改變，但色差值 ( $\Delta E^*$ ) 卻逐漸增加，其中，又以代表黃色的  $b^*$  明顯增加；作者更指出當微波處理達 15 min 時，紙面已有明顯灼燒痕。由此可知，微波處理雖可以於短時間內快速殺死紙張上之黴菌，但若長時間使用會使紙張暴露在燃燒的危險下，並改變紙張顏色，因此使用於紙質文物的防黴時，需更加謹慎。

表 2 濾紙經微波處理之白度和顏色變化 (夏滄琪等, 2001)

Table 2 Effects of microwave irradiation on the brightness and color difference of filter paper

Irradiation time (min)	Brightness (% GE)	CIE LAB			$\Delta E^*$
		$L^*$	$a^*$	$b^*$	
0	94.5	98.20	-5.45	7.06	-
1	94.4	98.32	-5.37	7.17	0.18
3	94.7	98.44	-5.37	7.47	0.48
5	94.7	98.48	-5.39	7.55	0.57
10	93.2	98.15	-5.35	7.77	0.72

### 3. $\gamma$ -射線 (Gamma radiation) 殺菌

$\gamma$ -射線為 1990 年由法國科學家 Paul Ulrich Villard 自含鐳的氯化鋇陰極射線中發現。 $\gamma$ -射線乃是由放射性元素 (如：鈷六十) 釋出，其波長短、能量高且穿透力強，生物體經照射後會自體內產生自由基破壞 C-C 結構，促使 DNA 分子受損及細胞死亡，可作為一良好的滅菌、殺蟲方法。

蘇裕昌等人 (1999a) 為探討  $\gamma$ -射線對文化用紙的防黴效果，以 0.0、1.0、2.5、10.0 和 25.0 Mrad  $\gamma$ -射線照射濾紙，然後置於培養基上培養 3 周，再觀察紙張上是否有菌落生成。結果顯示，未經  $\gamma$ -射線照射的濾紙，約在培養 2-3 天後即有菌絲生成；經 1.0 Mrad  $\gamma$ -射線照射的濾紙，則有約 10% 的面積受黴菌感染；但經超過 2.5



Mrad  $\gamma$ -射線照射的濾紙，則完全無菌絲生長。因此蘇裕昌等人 (1999a) 推論，紙張經 2.5 Mrad  $\gamma$ -射線照射後即可完全殺死紙張上的黴菌，達到防黴效果。此外，蘇裕昌等人(1999b)亦量測  $\gamma$ -射線對濾紙之紙張性質的影響，結果顯示，在 2.5 Mrad 處理時，濾紙之抗張和撕裂強度約減少 20-25%，耐摺強度約減少 15%，破裂強度則僅有些微降低；在高能量(25 Mrad)處理時，其耐摺強度明顯降低，約減少 80%，其餘抗張、撕裂和破裂強度分別減少 35、70 和 55%。因此，使用  $\gamma$ -射線的紙張防黴方法時，需注意  $\gamma$ -射線能量的拿捏，避免所使用的  $\gamma$ -射線能量過高，導致紙張力學強度顯著降低。

#### 4. 紫外光 (Ultraviolet radiation) 殺菌

紫外光為一波長介於 10 到 400 nm 的電磁波。當生物體受紫外光照射時，會使其 DNA 上相鄰的胸腺嘧啶 (Thymine) 核苷酸間產生二倍體，進而抑制 DNA 的正常複製和轉錄，使生物體死亡 (Paulus, 2004)。Barnard 和 Morgan (1903) 研究指出，波長約在 226 到 328 nm 可獲得良好的滅細菌 (*Bacillus coli*、*B. prodigiosus*、*B. subtilis*、*B. tuberculosis*、*Micrococcus tetragenus* 和 *Staphylococcus aureus*) 效果。

1980 年，美國的佛吉尼亞州圖書館 (Library of Virginia) 發現，當紫外光照射書籍時，可減緩書籍上黴菌的生長速度，但會使得紙張黃化和酸化，影響書籍的保存 (Nyberg, 1987)。因此，紫外線照射的防黴方法至今仍較少使用。

綜合上述，物理性的防黴方法主要是利用溫溼度的調控和電磁波的照射，以達到良好的防黴效果，其優點在於不需添加任何化學藥劑於紙張或空氣中，可避免化學藥劑的殘留對人體的危害和紙張的破壞。然而，以電磁波處理紙張時，紙張的外觀、物理和化學性質皆會受不同程度的影響，較不適用於長時間持續性的防黴處理。



## (二) 化學性藥劑處理

化學性防黴方法主要是在紙張或其所處環境中，添加適量的化學藥劑，以毒殺紙張或環境中的黴菌孢子，而達到防黴效果。依照所使用的藥劑處理方式之不同，可分為直接接觸性藥劑和薰蒸性藥劑，其中前者包括唑類化合物 (Azole)、奈米銀 (Silver nanoparticles) 和二氧化鈦 (Titanium dioxide)，主要是以藥劑處理於紙張的表面，達到防止黴菌的生長；後者則為環氧乙烷 (Ethylene oxide)，由於此種藥劑的揮發性較高，透過薰蒸方式散佈於空氣中，不僅可毒殺紙張表面的黴菌，更可降低空氣中黴菌孢子的數量。以下將分別介紹上述藥劑之處理方式。

### 1. 唑類化合物 (Azole)

唑類化合物為一 5 環化合物，環上具有 1 個或數個 N 原子，可依照環上的 N 原子數，將其分類為咪唑 (Imidazole) 和三唑 (Triadazole) 等。自 1944 年 Azole 類化合物第一次被發現具有抗真菌活性後，1958 年即成為市售的抗真菌藥劑，至今仍廣泛地被使用於治療由黴菌感染所引起的疾病 (Perez-Rivera *et al.*, 2009)。其抗真菌活性主要是透過抑制真菌中麥角固醇 (Ergosterol) 的生合成，進而改變真菌細胞膜固醇的組成，終止細胞的生長 (Paulus, 2004)。

Fabbri 等人 (1997) 研究 Azole 類化合物 Miconazole 和 Econazole、幾丁質合成酶抑制劑 (Chitin synthase inhibitors) 5-Fluorouridine，以及抗微生物藥劑 Butylated hydroxyanisole 和 Butylated hydroxytoluene 處理於 Whatman 濾紙 (100% 纖維素) 和 Giornale 報紙 (25% 針葉樹化學紙漿、75% 針闊葉混合機械紙漿) 上的防黴效果。結果如圖 2 所示，縱軸為紙張經處理後培養 30 天的 Ergosterol 含量，其含量愈高表示 Ergosterol 的生合成未受抑制，藥劑的防黴效果低。結果顯示，藥劑的防黴活性會因紙質的不同和黴菌種類而有所差異，其中，3 類藥劑中以 Azole 類化合物 Miconazole 和 Econazole 的防黴效果最佳。

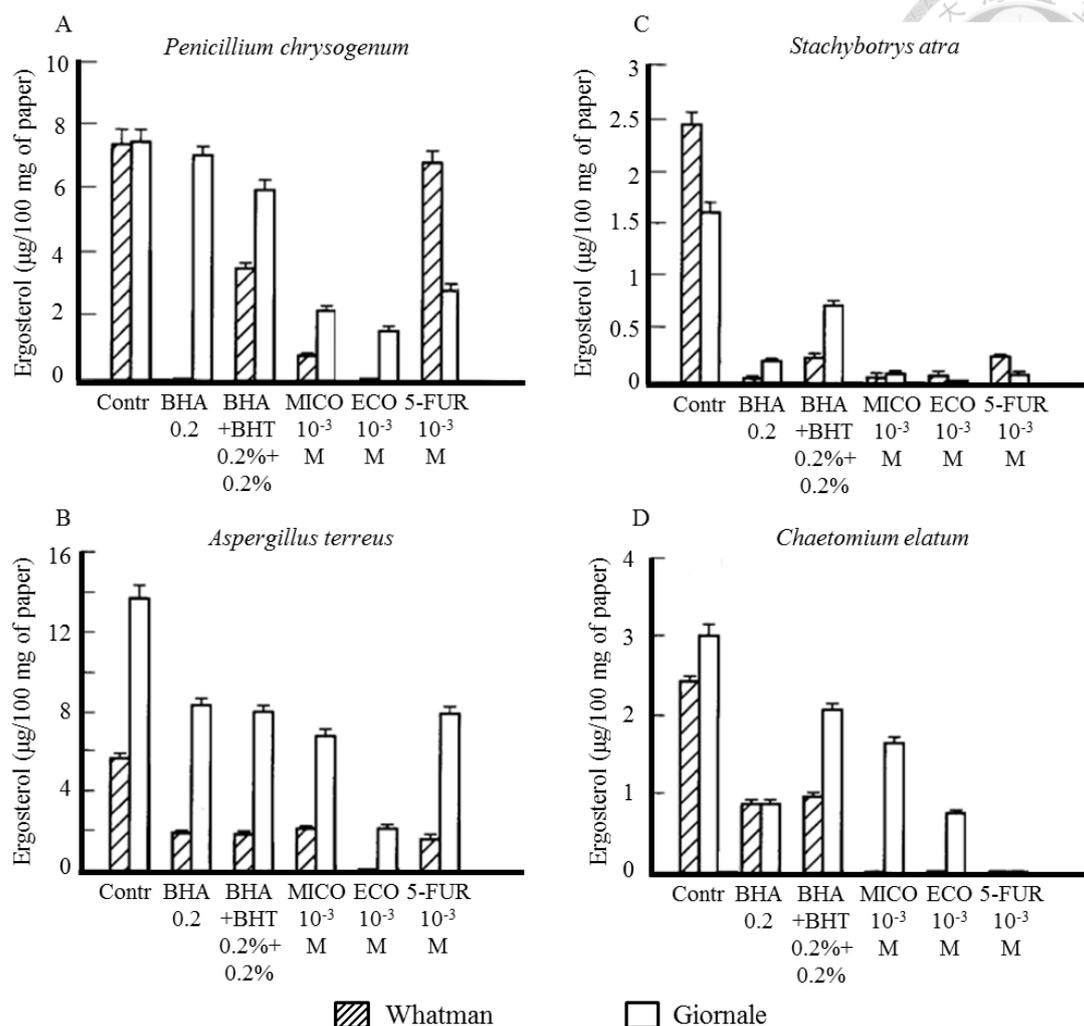


圖 2 經 Azole 類化合物、幾丁質合成酶抑制劑和抗微生物藥劑處理的濾紙和報紙分別接種 *Penicillium chrysogenum* (A)、*Aspergillus terreus* (B)、*Stachybotrys atra* (C) 和 *Chaetomium elatum* (D) 30 天後之 Ergosterol 生成量。

Fig. 2 Ergosterol content of *Penicillium chrysogenum* (A), *Aspergillus terreus* (B), *Stachybotrys atra* (C) and *Chaetomium elatum* (D) on paper stripes Whatman and Giornale treated with butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), miconazole (MICO), econazole (ECO) and 5-fluorouridine (5-FUR) incubated for 30 days. (Fabbri *et al.*, 1997)

此外，為了找出可針對受污染的文獻周邊進行殺菌防黴處理，且低副作用的噴霧藥劑，Rakotonirainy 等人（1999）以 Azole 類化合物 Thiabendazole 噴霧處理於紙張上，結果如表 3 所示，以 10% Thiabendazole (150 mL/30 m<sup>3</sup>) 處理 24 hr 後，空氣中的孢子濃度會降低至 36.0 CFU/m<sup>3</sup>；處理至 48 hr 後，空氣中的孢子濃度會更降低至 15.5 CFU/m<sup>3</sup>，顯示 Thiabendazole 的薰蒸處理具有良好的殺菌防黴效果。

表 3 6 種噴霧處理於空氣之殺菌效果

Table 3 Activities of 6 products as aerial disinfection (Rakotonirainy *et al.*, 1999)

Product	Aerosolizes quantity (mL/30 m <sup>3</sup> )	CFU/m <sup>3</sup>		
		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub> 24 h	t <sub>2</sub> 48 h
Imazalil 10%	120	++++	78	119
	200	++++	58	63
Econazole 5%	120	++++	76	68
	200	++++	69	28
Orthophenylphenol 15%	200	++++	41	47
Thiabendazole 10%	100	++++	555	333
	150	++++	36	16
Thiabendazole 10% / Orthophenylphenol 15%	150/200	++++	41	27
Thiabendazole 10% / Imazalil 10%	150/200	++++	25	5
Vitalub QC 50 <sup>®</sup> 13%	300	++++	33	39

<sup>a</sup>: +++++ = quantity of spores after the artificial contamination (not numbered).

Rakotonirainy 等人（1999）亦評估 Thiabendazole 對 3 種常見紙張—純棉紙漿（Cotton linter paper）、報紙（Newsprint）和美編紙（Edition paper）的影響，結果如表 4 所示。經加速老化處理後，Thiabendazole 會降低紙張白度，但其下降幅度小於 5%；而其氧化程度和纖維強度皆無明顯變化。由此可知，Thiabendazole 具有良好的防黴活性，且其經加速老化後對於紙張的性質僅些微影響。然而，Giavini 和 Menegola（2010）的研究結果顯示，懷孕的動物曝露在 Azole 類化合物的環境下，可能誘發胎兒面部、骨骼和肢體缺陷的狀況，懷孕婦女須避免使用。

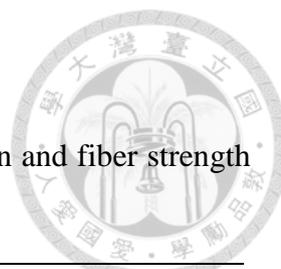


表 4 Thiabendazole 對 3 種紙張白度、氧化強度和纖維強度的影響

Table 4 Effects of thiabendazole on the brightness, level of oxidation and fiber strength of 3 types of papers (Rakotonirainy *et al.*, 1999)

Measurement	Cotton linter paper			Newsprint			Edition paper		
	Control <sup>a</sup>	Aged <sup>b</sup>	TA <sup>c</sup>	Control	Aged	TA	Control	Aged	TA
Brightness	89.0	73.6	70.7	63.0	43.5	43.1	86.0	64.7	62.3
Copper number	0.2	0.5	0.3	2.1	2.2	2.2	0.4	0.8	0.8
Zerospan	22.7	22.0	22.4	18.4	20.2	19.5	30.7	25.6	23.2

<sup>a</sup>: Control = untreated paper and unexposed to accelerated aging. <sup>b</sup>: Aged = untreated and aged paper. <sup>c</sup>: TA = treated and aged paper.

## 2. 奈米銀 (Silver nanoparticles)

奈米銀為大小介於 1 到 100 nm 的銀粒子，具有良好的抗微生物活性 (Kim *et al.*, 2007)，其活性來自於銀粒子會抑制 DNA 的複製、干擾細胞膜的電位和功能，進而影響細胞內的呼吸作用 (Gutarowska *et al.*, 2012)。

Gutarowska 等人 (2012) 為瞭解奈米銀對於博物館內檔案的防黴效果，自波蘭的國家檔案庫、圖書館和博物館等 6 處採集黴菌，並與美國典型培養物保存中心 (American type culture collection, ATCC) 提供的菌種，一同進行奈米銀的防黴活性試驗，結果如表 5 所示。不同菌種對於奈米銀的敏感度不同，所需的 MIC 和最低致死濃度 (Minimum fungicidal concentration, MFC) 會有所差異，其中，奈米銀對於 *A. niger*、*A. versicolor*、*P. carneum*、*P. crustosum*、*P. chrysogenum*、*P. radicola* 和 *Rhizopus nigricans* 的防黴活性較低，MIC 和 MFC 較高 (45 ppm)。此外，奈米銀對於不同地點所採集之同一菌種，也會有不同的防黴活性，如 ATCC 提供的 *A. niger* 之 MIC 和 MFC 皆僅為 25 ppm，與自紡織博物館採集所得之 *A. niger* 的 MIC 和 MBC 為 45 ppm，相差甚大。綜合來說，濃度 45 ppm 的奈米銀即可完全殺死試驗的菌種。然而，Gutarowska 等人 (2012) 亦提到，奈米銀雖然可以有效地殺死黴菌，但對於哺乳動物仍具有細胞毒性，也可能干擾生態平衡。因此，在任何場所使用前皆須經過評估，並找出適當的使用濃度。



表 5 奈米銀對於不同來源之各種黴菌的最低抑制濃度和最低致死濃度

Table 5 Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of silver nanoparticels against the microorganisms got from different origin (Gutarowska *et al.*, 2012)

Microorganisms	Origin	MIC (ppm)	MFC (ppm)
<i>Alternaria alternata</i>	NM <sup>a</sup>	22.5	22.5
<i>Aspergillus versicolor</i>	L	45.0	45.0
	MAE	45.0	45.0
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC	22.5	22.5
	CMT	45.0	45.0
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	CMT	22.5	22.5
<i>Cladosporium herbarum</i>	L	22.5	22.5
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	NM	22.5	22.5
<i>Mucor racemosus</i>	MAE	11.3	22.5
<i>Penicillium digitatum</i>	NM	22.5	45.0
<i>Penicillium carneum</i>	L	45.0	45.0
<i>Penicillium crustosum</i>	L	45.0	45.0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC	45.0	45.0
<i>Penicillium radicola</i>	CMT	45.0	45.0
<i>Rhizopus nigricans</i>	NA	45.0	45.0
	MIT	45.0	45.0

<sup>a</sup>: CMT = Central Museum of Textiles; L = Library; MAE = Museum of Archeology and Ethnography; MIT = Museum of Independence Tradition; NA = National Archives; NM = National Museum.



### 3. 二氧化鈦 (Titanium dioxide)

二氧化鈦，俗稱鈦白粉，自 20 世紀開始主要作為藝術品、紡織品、玻璃、牙膏和食物等的白度劑和色素 (Markowska-Szczupak *et al.*, 2011)。近年來，由於二氧化鈦為良好的光催化劑 (Photocatalyst)，可以將光的能量轉化為化學能量，用於消除空氣中的硫化物污染，達到淨化空氣的功效；此外，二氧化鈦經低於 385 nm 的 UV 照射後，更可產生氫氧自由基和超氧自由基，使有機分子裂解、礦化，達到殺死微生物的效果，因此學者們日益重視二氧化鈦的抗菌活性。

Afsharpour 等人 (2011) 的研究中，以二氧化鈦奈米複合材料 (TiO<sub>2</sub> nanocomposites) 塗佈於紙張上，評估經處理後紙張對於黴菌 (*A. niger*、*Penicillium* sp.) 的抑制活性。結果顯示，經二氧化鈦處理後，紙張上 *A. niger* 之生長量明顯低於未處理紙張。此外，Afsharpour 和 Hadadi (2014) 亦將二氧化鈦奈米複合材料塗裝於玻璃箱子內外，並將紙張放入，試驗結果發現此處理不僅可抑制 *A. flavus* 生長於紙張上，更可避免紙張受環境污染和光線影響而老化。因此，此方法可應用於紙質文物展示的防黴和保護。

### 4. 環氧乙烷 (Ethylene oxide)

環氧乙烷在常溫下為透明無色、易燃的氣體，是一種常見的殺菌劑。其殺菌活性主要是來自於其對細胞內組成物 (如：核酸和蛋白質) 產生強大的烷基化反應 (Alkylation reaction)，使組成物變質，影響細胞的正常代謝。

由於其對於昆蟲和微生物皆具有良好的抑制效果，且在室溫下可以氣體型態存在，利用擴散、滲透入紙張中，因此，以往在法國等地的圖書館和博物館內，若有文獻受到黴菌的污染時，會立即將受污染的文獻移至環氧乙烷滅菌室進行殺菌處理 (Rakotonirainy *et al.*, 1999)。

然而，Ballard 和 Baer (1986) 的研究結果指出，環氧乙烷對人體具有基因毒性、神經毒性、生殖毒性、致癌和突變等危害。滅菌過程需於密閉環境中進行，且滅菌完成後須以 6 次的空氣循環洗滌滅菌物，確保滅菌物的環氧乙烷釋出量低



於 1 ppm (Hearne and Shrager, 2004)。因此，歐盟於 2008 年正式將環氧乙烷列為禁用的化學藥品 (EC, 2008)。除此之外，環氧乙烷雖可快速且有效的達到滅菌效果，但 Craig (1986) 的報告指出，以環氧乙烷滅菌處理過的紙張會更容易受黴菌的污染，其可能原因為環氧乙烷會破壞紙張原先的菌群平衡。因此，經環氧乙烷處理後的紙張，須更謹慎地放置於溫溼度調控完善的儲存環境中。

綜合上述，化學性的紙張防黴方法主要是將紙張經過藥劑的接觸或薰蒸，達到防黴效果，其優點在於處理上所需設備較簡易，但使用上對人體、環境及紙張仍多有疑慮。因此，目前長期施用的防黴方法仍以溫溼度調控為主，並經由審慎評估藥劑的使用濃度，以及使用者和環境的安全性，輔以使用化學性防黴方法。

#### 四、天然精油之防黴功效

植物是大自然中最傑出的生化科學家，為了適應各種不同的環境，植物合成出許多具有生物活性的二次代謝物，其中，利用水蒸餾 (Hydrodistillation)、蒸氣蒸餾 (Steam distillation)、乾餾 (Dry distillation) 等物理程序自植物體分離得到的物質稱為精油 (ISO 9235:2013)，大多具有揮發性或特殊香味。精油主要由酚類化合物 (Phenolic compounds)、萜類化合物 (Terpenoids) 和脂肪酸 (Fatty acids) 所組成，其中酚類化合物通常含有 C6-C3 骨架；萜類化合物則以異戊間二烯 (Isoprene) 為基本構成單元，並可根據其化合物骨架中碳數多寡，分為單萜類 (Monoterpenoids)、倍半萜類 (Sesquiterpenoids)、二萜類 (Diterpenoids)、三萜類 (Triterpenoids)、四萜類 (Tetraterpenoids) 及多萜類 (Polyterpenoids) 等。Cowan (1999) 研究發現，精油的脂溶性在抗微生物活性上扮演著重要的角色，可使微生物的細胞膜受損。因此，許多學者試圖從植物精油中找尋新的防黴成分，以下將依照化學結構的不同，分別介紹植物精油中可能的防黴成分 (圖 3)。

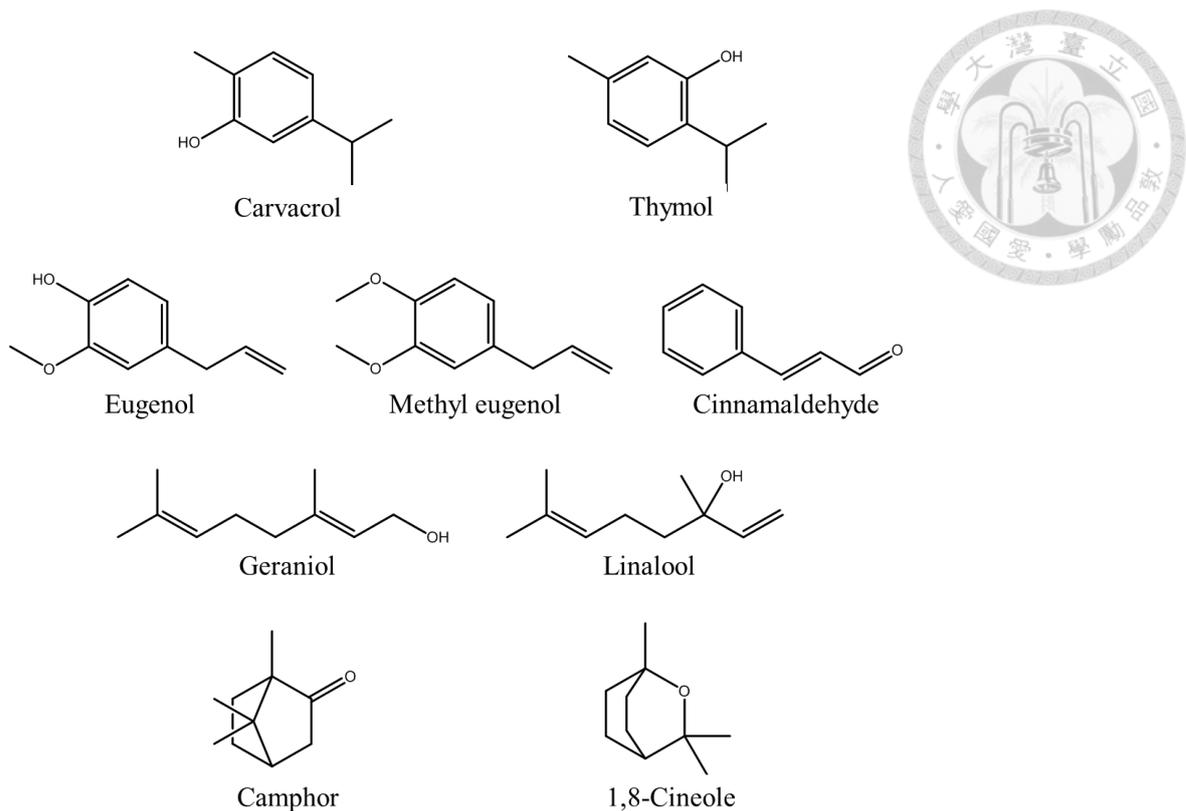


圖 3 植物精油中防黴成分之化學結構。

Fig. 3 Chemical structures of anti-mold components in plant essential oils.

### (一) 芳香族化合物之防黴活性

#### 1. 香芹酚 (Carvacrol)

古惠菁等人 (2007) 參照 CNS2690 纖維製品防黴性能檢驗法，評估紙張經臺灣肖楠 (*Calocedrus macrolepis* var. *formosana*) 心材、樹皮和葉子精油處理後抑制黴菌 (*C. globosum* 和 *A. niger*) 的效果，結果如表 6 所示，3 種部位中，心材精油的防黴活性最佳，當使用濃度為  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  時，可完全抑制 *C. globosum* 的生長；當使用濃度提高為  $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  時，則可完全抑制 *A. niger* 的生長。古惠菁等人 (2007) 進一步分離純化，得到其活性成分 Carvacrol，當使用濃度為 100 和  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  可分別完全抑制 *C. globosum* 和 *A. niger* 的生長。

表 6 臺灣肖楠心材、樹皮和葉子精油以及心材精油主成分 Carvacrol 對 *Chaetomium globosum* 和 *Aspergillus niger* 的抑制效果 (古惠菁等, 2007)

Table 6 Inhibitory effects of essential oils from different parts of *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* and the major component of heartwood essential oil (carvacrol) against *Chaetomium globosum* and *Aspergillus niger*

Strain	Specimen	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )				
		50	75	100	200	400
<i>C. globosum</i>	Heartwood EO <sup>a</sup>	15	100	100	100	- <sup>b</sup>
	Bark EO	0	0	0	0	-
	Leaf EO	0	0	0	0	-
	Carvacrol	0	-	100	-	-
<i>A. niger</i>	Heartwood EO	0	-	0	88.7	100
	Bark EO	0	-	0	0	0
	Leaf EO	0	-	0	0	0
	Carvacrol	5	-	15	97.8	0

<sup>a</sup>: EO = essential oil. <sup>b</sup>: - = not determined.

Ultee 等人 (2002) 研究亦發現, Carvacrol 具有良好的抗細菌 *B. cereus* 活性, 其活性主要來自於 Carvacrol 進入細胞後, 會造成細胞膜的膨潤 (Swelling) 和膜電位 (Membrane potential) 的降低, 使細胞無足夠的質子動力勢 (Proton motive force) 合成 ATP, 最終死亡。此外, Ultee 等人 (2002) 亦發現, Carvacrol 的氫氧基 (Hydroxyl group) 在改變細胞的膜電位上扮演重要的角色, 因此推測, Carvacrol 進入細胞後, 可在細胞內解離、釋出氫離子, 並與鉀離子 (Potassium ion,  $\text{K}^+$ ) 等陽離子結合後離開細胞, 影響膜內外之陽離子濃度 (圖 4)。

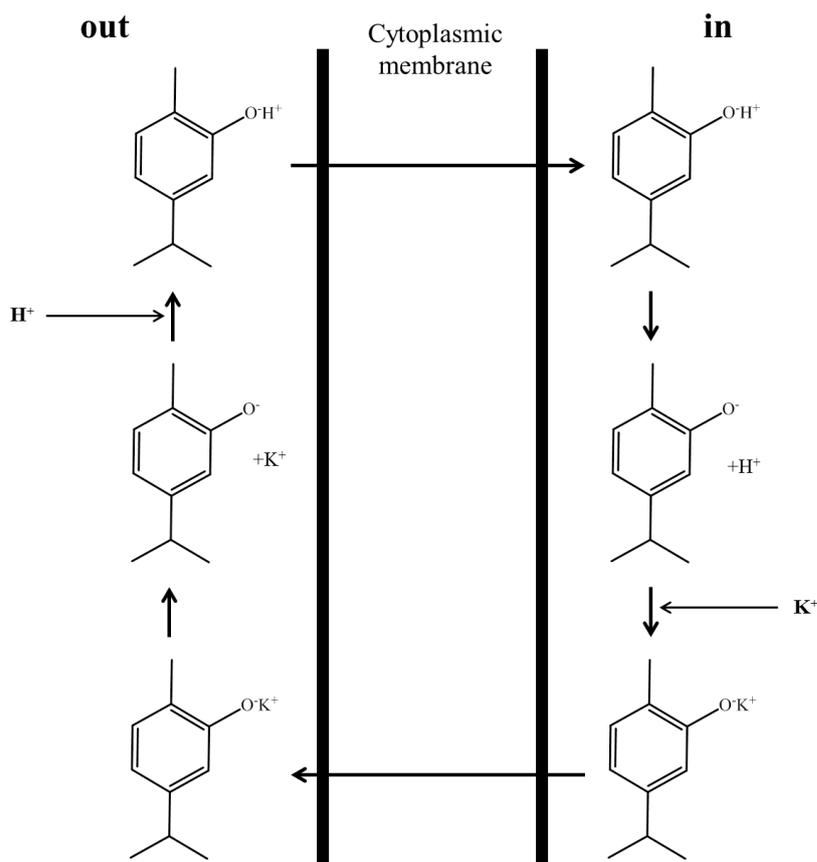


圖 4 Carvacrol 抗微生物活性的的假說示意圖。

Fig. 4 Schematic diagram of the hypothesis for the anti-microbial action of carvacrol. (Ultee *et al.*, 2002)

## 2. 百里酚 (Thymol)

精油最早的使用可追溯至古埃及時代，人們於木乃伊的製造過程中添加 Thymol。Thymol 為一種常見的單萜烯酚類化合物 (Monoterpene phenol)，可改變細胞的通透性、菌絲的形態，從而影響黴菌的生長。18 世紀時，英國即以 Thymol 作為圖書館的滅菌薰蒸劑，其滅菌裝置稱為百里酚室 (Thymol chamber)。Craig (1986) 的研究發現，接種多種黴菌 (*C. globosum*、*Aureobasidium pullulans*、*P. cyclopium* 和 *A. versicolor*) 的濾紙置於  $20 \text{ g/m}^3$  的 Thymol chamber 中，以  $37^\circ\text{C}$  培養 3 天後，濾紙上無黴菌的生長，但將其移出 Thymol chamber 後，再以室溫培養 3 天，濾紙上卻出現黴菌的生長。因此，Craig (1986) 推論在此處理濃度下，Thymol 僅殺死部分的黴菌孢子，而未達到完全的滅菌效果。

Rasooli 等人(2006)利用紙錠擴散法評估 2 種含有 Thymol 的百里香屬(*Thymus*) 植物 *T. eriocalyx* 和 *T. x-porlock* 精油對 *A. niger* 的防黴活性，結果顯示，在使用濃度 250 ppm 下，*T. eriocalyx* 精油的抑制圈直徑為 90 mm，*T. x-porlock* 的抑制圈直徑則為 8 mm。進一步分析其成分差異，發現防黴活性較佳的 *T. eriocalyx* 精油中含有 16% Thymol，而防黴活性較低的 *T. x-porlock* 則僅含有 8% Thymol，因此，Rasooli 等人(2006)推測精油內 Thymol 含量的差異會影響精油的防黴活性。

Rasooli 等人(2006)為了更深入瞭解 *T. eriocalyx* 和 *T. x-porlock* 精油之防黴活性機制，將 2 種精油在固定濃度和體積下與 *A. niger* 的孢子懸浮液振動培養 3 天後，取其菌絲體製成切片，以穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscopy, TEM)觀察。圖 5A 為在控制組下 *A. niger* 的菌絲體(放大倍率為 10,000)；圖 5B 為經過 *T. eriocalyx* 精油 125 ppm 處理後的 *A. niger* 菌絲體(放大倍率為 25,000)，可以發現菌絲體內的細胞產生幾項改變，如：細胞質的缺乏、細胞核膜的褶皺、細胞壁的增厚；此外也發現受損的細胞會相互靠近，共同使用同一細胞壁，因此 Rasooli 等人(2006)推測藉此改變，或許可使黴菌獲得更好的存活機會；圖 5C 是以 250 ppm *T. x-porlock* 精油處理後 *A. niger* 菌絲體的狀況(放大倍率為 25,000)，圖中的細胞同樣地缺乏細胞質，細胞核則聚集成團且核膜崩解，細胞壁失去了原本的完整性，細胞產生褶皺之現象。綜合上述結果，Rasooli 等人(2006)推測此 2 種精油會改變黴菌菌絲的型態，並崩壞細胞膜和粒線體，因此具有良好的防黴活性。

Xu 等人(2008)的研究結果亦發現，Thymol 抑制 *Escherichia coli* 和 *Salmonella typhi* 時，會影響細胞膜內外之陽離子濃度，使細胞無足夠的質子動力勢合成 ATP，最終導致細胞死亡。此與其同分異構物(Isomer) Carvacrol 的抗微生物機制相同，Cristani 等人(2007)的研究結果發現，Thymol 能夠在細胞膜和水性的膜外培養基中移動，對細胞膜造成嚴重的損傷，Carvacrol 則不具有此移動能力。然而，Isbell (1997)的研究結果發現，Thymol 可能會使紙張黃化，但並未提出數據說明，因此，Thymol 是否會造成紙張黃化仍有待後續研究確認。

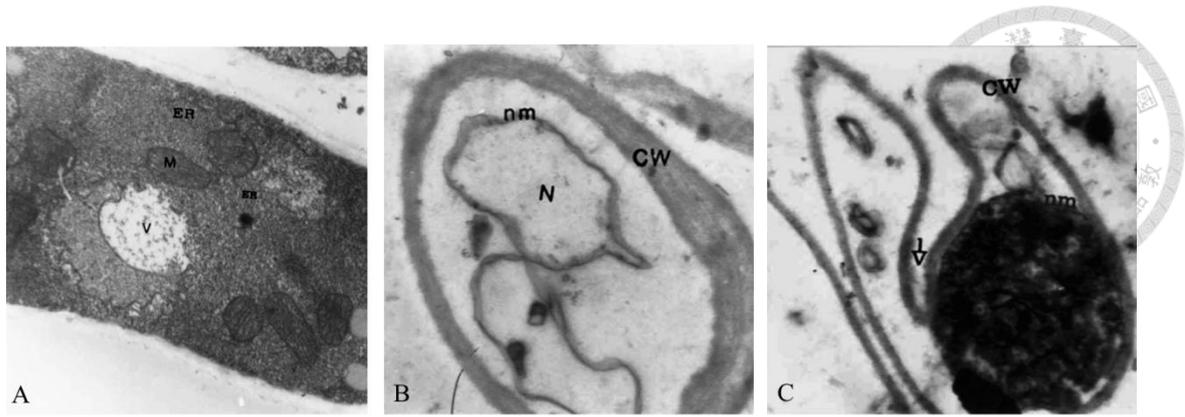


圖 5 穿透式顯微鏡下 *Aspergillus niger* 菌絲的變化。(A)控制組(放大倍率為 10,000)；(B)經 *Thymus eriocalyx* 精油 125 ppm 處理(放大倍率為 25,000)；(C)經 *T. x-porlock* 精油 250 ppm 處理(放大倍率為 25,000)，箭頭所指的為細胞的褶皺。

Fig. 5 Changes of the hyphae of *Aspergillus niger* viewed under transmission electron microscopy. (A) Control (10,000x); (B) *A. niger* exposed to 125 ppm of essential oil from *Thymus eriocalyx* (25,000x); (C) *A. niger* exposed to 250 ppm of essential oil from *T. x-porlock* (25,000x), showing folding of the cell (arrow). CW: cell wall; ER: endoplasmic reticulum; M: mitochondrion; N: nucleus; nm: nuclear membrane; V: vacuole. (Rasooli *et al.*, 2006)

### 3. 肉桂醛 (*trans*-Cinnamaldehyde) 和丁香酚 (Eugenol)

許雅青 (2007) 為尋得一具有良好紙張防黴活性之精油，將濾紙分別經 5 種化學品系的土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum*) 葉子精油 (肉桂醛型、肉桂醛-肉桂乙酸酯型、伽羅木醇型、樟腦型和混合型)、錫蘭肉桂 (*C. zeylanicum*)、山肉桂 (*C. insularimontanum*)、陰香 (*C. burmani*)、過山香 (*Clausena excavata*)，以及上述各精油之主要成分 *trans*-Cinnamaldehyde、Cinnamyl acetate、Linalool、Camphor、Eugenol、1,8-Cineole、Safrole、Terpinolene、Borneol、Bornyl acetate、3-Phenylpropionaldehyde 處理，並以 Thymol 做為正對照組，接種黴菌 *A. niger* 和 *C. globosum*，培養 14 天後評估其上黴菌生長之面積。結果如圖 6A 所示，肉桂醛型土肉桂和肉桂醛-肉桂乙酸酯型土肉桂葉子精油處理的濾紙防黴效果最佳，使用



濃度為  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  時，可完全抑制黴菌的生長；上述精油主要成分中以 *trans*-Cinnamaldehyde 的效果最佳，可與肉桂醛型土肉桂葉子精油之效果相當，次之則為 Eugenol (圖 6B)。

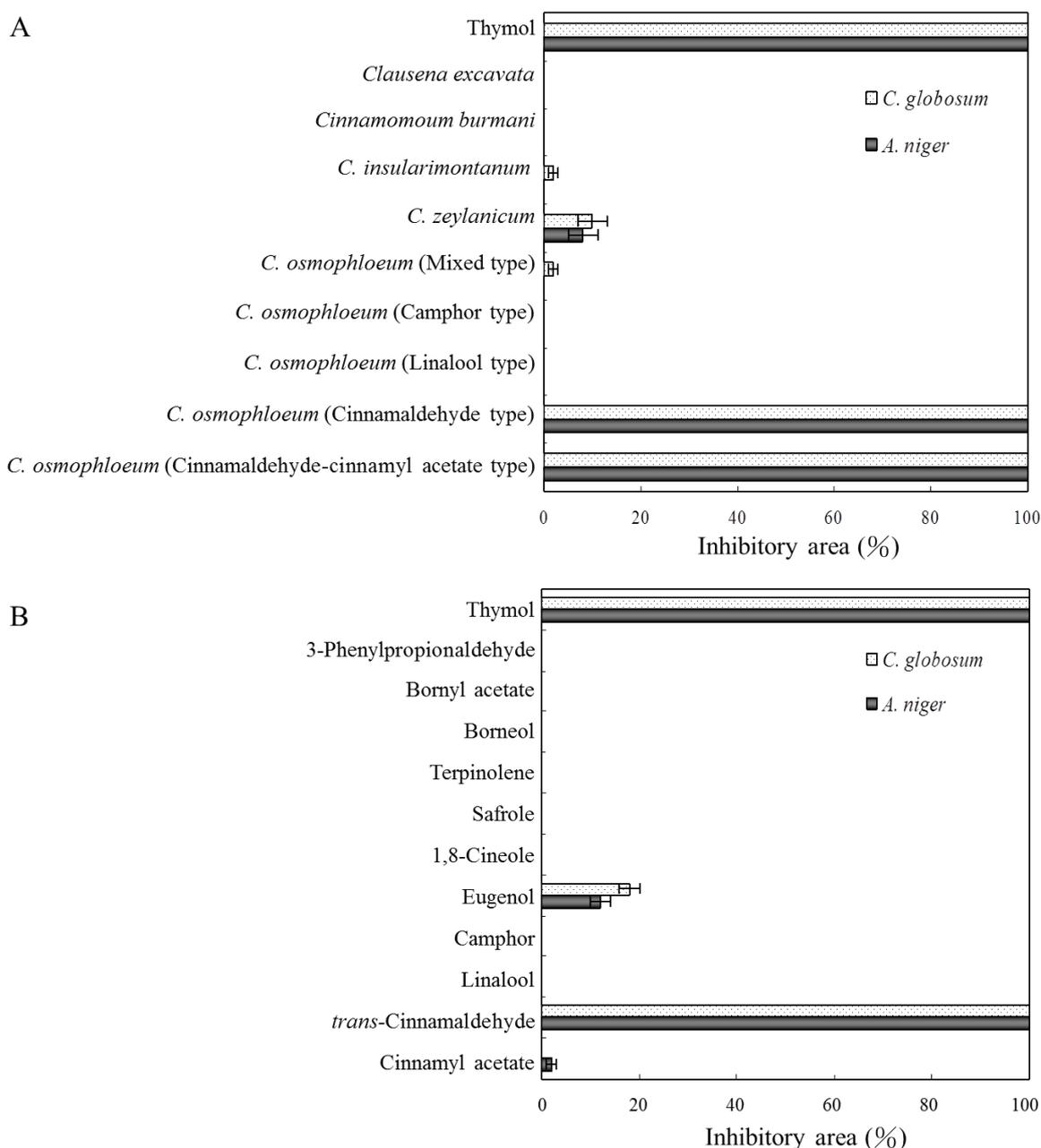


圖 6 植物葉子精油 (A) 及其主成分 (B) 在  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的使用濃度下抑制黴菌 *Aspergillus niger* 和 *Chaetomium globosum* 生長的效果。(許雅青，2007)

Fig. 6 Inhibitory effects of essential oils from plant leaves and their major components ( $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) against *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*.



Cinnamaldehyde 為廣泛使用於食品工業之抗黴藥劑，具有細胞膜毒性，能瓦解部分細胞膜的完整性，造成大量代謝產物和酵素滲漏，最終導致細胞死亡 (Becerril *et al.*, 2007; Cristani *et al.*, 2007; Gill and Holley, 2004)。此外，Bang 等人 (2000) 的研究結果亦顯示，Cinnamaldehyde 具有抑制細胞壁生合成酵素  $\beta$ -(1,3)-glucan synthase 和 chitin synthase 1 的活性。Devi 等人 (2010; 2013) 的研究結果則顯示，Eugenol 可增加細胞膜的穿透性，並於膜上穿孔，改變細胞膜的穩固性。因此，此 2 種精油成分皆具有良好的抗微生物活性。

許雅青 (2007) 進一步評估具有最佳防黴活性之肉桂醛型土肉桂葉子精油和其主成分 Cinnamaldehyde 對紙張性質的影響。作者將宣紙和道林紙經 2% 藥劑浸漬處理後，測量其 CIE LAB 色差值和 pH 值之變化，結果如表 7 所示。宣紙分別經肉桂醛型土肉桂葉子精油及 Cinnamaldehyde 浸漬處理後，其色差值皆僅為 0.8，肉眼無法區別其顏色變化；Cinnamaldehyde 處理後，其 pH 值下降 0.3，但仍維持紙張的鹼性。道林紙經肉桂醛型土肉桂葉子精油及 Cinnamaldehyde 浸漬處理後，其黃色指數 (Yellowness index, YI) 皆上升，得知處理後紙張顏色有偏黃的趨勢，但其色差值小於 3，為肉眼無法區別之色差；而肉桂醛型土肉桂葉子精油及 Cinnamaldehyde 處理後之紙張，其 pH 值皆下降 0.1，但仍同樣維持紙張的鹼性，不會造成紙張酸化劣解。



表 7 宣紙、道林紙浸漬肉桂醛型土肉桂葉子精油及 Cinnamaldehyhyde 後顏色和 pH 值的變化 (許雅青, 2007)

Table 7 Changes in color parameters and pH value of Xuan paper and wood-free paper dipped in leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* and cinnamaldehyde

Specimens	Treatment	CIE LAB						pH value
		<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	YI	BR(%)	$\Delta E^*$	
Xuan paper	Untreated	92.5	-1.0	3.2	12.6	100.0	-	9.3 ± 0.1
	Control (Ethanol)	92.4	-0.8	2.7	11.9	99.9	0.6	9.4 ± 0.1
	2% Cinnamaldehyde	92.9	-1.2	2.9	11.9	101.1	0.8	9.0 ± 0.1
	2% <i>C. osmophloeum</i> leaf oil	92.9	-1.2	2.9	11.9	101.1	0.8	9.4 ± 0.0
Wood-free paper	Untreated	95.2	0.1	2.8	12.6	100.0	-	9.7 ± 0.0
	Control (Ethanol)	95.0	0.2	2.9	12.8	99.5	0.3	9.7 ± 0.0
	2% Cinnamaldehyde	95.1	-0.1	3.8	14.1	99.8	1.0	9.6 ± 0.0
	2% <i>C. osmophloeum</i> leaf oil	95.0	-0.1	4.0	14.5	99.6	1.2	9.7 ± 0.1

#### 4. 甲基丁香酚 (Methyl eugenol)

Farag 等人 (2004) 利用紙錠擴散法評估 3 種白千層樹屬 (*Melaleuca*) 植物 *M. armillaris*、*M. ericifolia* 和 *M. leucadendron* 葉子精油對 *A. niger* 的防黴活性。結果顯示，相較於 *M. leucadendron* 和 *M. armillaris* 葉子精油，*M. ericifolia* 葉子精油具有較良好的防黴活性。為了更深入瞭解精油的防黴活性與精油成分間的關係，Farag 等人 (2004) 進一步以 GC-MS 分析 3 種白千層植物葉子精油的組成分 (表 8)，結果顯示防黴活性最好的 *M. ericifolia* 精油之主成分為 Methyl eugenol (96.9%)。根據 Farag 等人 (1998) 的研究結果指出，當苯環上具有氫氧基時，化合物可能具有抗微生物的活性，因此推測 *M. ericifolia* 的防黴活性成分可能為 Methyl eugenol。此外，Farag 等人 (2004) 亦發現同樣含有 1,8-Cineole 的 *M. leucadendron* 和 *M. armillaris*，含有 64.3% 的 *M. leucadendron* 之防黴活性較僅含 33.9% 的 *M. armillaris* 良好，因此推測 1,8-Cineole 也可能是精油的防黴活性成分；1,8-Cineole 的防黴活性於 Shukla 等人 (2012) 的研究結果得到證實，詳述於萜類化合物之防黴活性。



表 8 白千層樹屬植物 (*Melaleuca ericifolia*、*M. leucadendron* 和 *M. armillaris*) 葉子精油的主成分與對抗黑麴黴菌 (*Aspergillus niger*) 的防黴活性

Table 8 Antimicrobial activity and major components of essential oils from leaves of *Melaleuca ericifolia*, *M. leucadendron* and *M. armillaris* against *Aspergillus niger* (Farag *et al.*, 2004)

Species	Inhibition zone (cm)	Major components
<i>M. ericifolia</i>	18.3	Methyl eugenol (96.9%)
<i>M. leucadendron</i>	14.7	1,8-Cineole (64.3%)
<i>M. armillaris</i>	11.7	1,8-Cineole (33.9%), Terpinen-4-ol (18.8%)

## (二) 萜類化合物之防黴活性

### 1. 桉樹醇 (1,8-Cineole)

為了瞭解以 1,8-Cineole 為主成分 (約占 65%) 之紅千層屬 (*Callistemon lanceolatus*) 葉子精油的防黴活性, Shukla 等人(2012)以固態稀釋法(Agar dilution)和液態稀釋法 (Broth dilution) 評估其對 *A. flavus* 的抑制效果。結果顯示 *C. lanceolatus* 葉子精油的 MIC 為 0.682 mg/mL, 精油主成分 1,8-Cineole 的 MIC 為 1.285 mg/mL, 表示 *C. lanceolatus* 葉子精油和 1,8-Cineole 之防黴效果皆良好, 但 1,8-Cineole 的防黴效果僅為精油的一半, 因此 Shukla 等人(2012)推測 *C. lanceolatus* 葉子精油的防黴活性可能是來自其各成分間的交互作用。

### 2. 樟腦 (Camphor) 和香葉醇 (Geraniol)

Jantan 等人 (2003) 透過液態稀釋法研究 9 種薑科 (Zingiberaceae) 植物塊莖 (Rhizome) 精油之防黴活性, 結果顯示 9 種薑科植物中, 以 *Boesenbergia pandurata* 塊莖精油對 *A. niger* 和 *A. fumigatus* 的抑制效果最好, 其 MIC 為 1.25 mg/mL。以 GC-MS 進一步分析其精油的組成分, 發現其主要成分為 Camphor (32.1%), 次要成分為 Geraniol (16.2%) 和 1,8-Cineole (13.9%), 根據前人研究結果指出, Cineole、



Citral、Geraniol、Linalool、Camphor 和 Menthol 對部分酵母菌和絲狀真菌具有抑制活性，因此 Jantan 等人 (2003) 推測 *B. pandurata* 塊莖精油的防黴活性主要是來自於 Camphor、Geraniol 和 1,8-Cineole。

Bard 等人 (1988) 的研究結果亦證實，具有氫氧基的 Geraniol 可促使鉀離子離開細胞，並降低細胞膜的相轉變溫度 (Phase-transition temperature)。Prashar 等人 (2003) 進一步證實 Geraniol 可改變 *Saccharomyces cerevisiae* 的細胞膜組成，增加飽和脂肪酸的比例，此可能影響細胞膜的流動性，進而影響細胞於不同環境下的存活能力。Ota 等人 (2003) 的研究結果亦顯示，此流動性的增加可促進細胞吸收藥劑，進而和其他藥物產生協同作用。因此，上述 *B. pandurata* 塊莖精油的防黴活性亦可能來自於各成分的協同作用。

### 3. 芳樟醇 (Linalool)

Rakotonirainy 和 Lavédrine (2005) 為找出精油中具有抑制紙張黴菌的活性成分，首先以紙錠擴散法作為初步篩選試驗。結果顯示，植物精油中常見成分 Linalool 對於 *A. niger*、*A. fumigatus*、*A. repens*、*C. herbarum*、*P. frequentans*、*T. viride*、*C. globosum*、*Paecilomyces variotii* 和 *Stachybotrys atra* 具有良好的抑制效果。因此，Rakotonirainy 和 Lavédrine (2005) 進一步將 Linalool 用於書籍的抗黴菌試驗，試驗裝置如圖 7 所示，取一接種黴菌的紙片夾入書籍中，再將書籍置入密閉的玻璃箱內，取定量的 Linalool 置於培養皿中揮發散佈於密閉空間內，觀察 21 天後黴菌在書籍上的生長狀況。結果顯示，Linalool 的使用濃度為 295 和 415 ppm 時，皆可預防書籍上黴菌的生長，確保書籍不會受到黴菌的入侵。然而，將書籍中的黴菌紙片取出，置於培養基中培養 3 到 5 天後，發現黴菌仍具有繁殖和生長的能力，因此，Rakotonirainy 和 Lavédrine (2005) 推測在此使用濃度下，揮發的 Linalool 並不會完全毒殺黴菌，但可有效抑制黴菌的繁殖。



圖 7 化合物薰蒸於發黴書籍之抗黴活性的評估裝置。

Fig. 7 Test-chamber for evaluation the anti-mold activity of compound on moldy books in vapor phase. (Rakotonirainy and Lavédrine, 2005)

此外，Rakotonirainy 和 Lavédrine (2005) 亦評估 Linalool 對於紙張性質的影響，將棉紙和報紙曝露於 415 ppm Linalool，量測其曝露前後之紙張性質變化，結果如表 9 所示。紙張曝露於 Linalool 第 0 天和第 21 天，與未處理紙張相比，其白度和纖維素的聚合度並無明顯的改變；但曝露 21 天後，其 pH 值明顯降低。因此，Rakotonirainy 和 Lavédrine (2005) 認為，Linalool 雖可有效的預防黴菌於紙張上的滋生，但要作為一良好的紙張防黴方法，仍需進一步調整其使用濃度和使用方法，以避免 Linalool 降低紙張的 pH 值。



表 9 2 種紙張曝露於 415 ppm Linalool 加速老化 21 天之紙張性質

Table 9 Properties of 2 types of papers exposed to 415 ppm linalool after 21-day accelerated ageing (Rakotonirainy and Lavédrine, 2005)

Treatment	Days	Measurement <sup>a</sup>	Paper 1 <sup>b</sup>	Paper 2 <sup>c</sup>
Control	0	Ib	82.4	61.0
		pH	6.39 ± 0.03	5.87 ± 0.02
		DPv	1.47 ± 0.01	- <sup>d</sup>
	21	Ib	78.6	46.3
		pH	6.24 ± 0.03	5.37 ± 0.03
		DPv	1.34 ± 0.00	-
Exposed to linalool (415 ppm)	0	Ib	82.0	59.1
		pH	6.29 ± 0.03	6.25 ± 0.01
		DPv	1.47 ± 0.00	-
	21	Ib	77.8	43.9
		pH	6.48 ± 0.01	4.98 ± 0.01
		DPv	1.29 ± 0.00	-

<sup>a</sup>: Ib = ISO brightness; DPv = mean viscometric degree of polymerization.

<sup>b</sup>: Paper 1 = paper made from cotton linters and softwood chemical pulp.

<sup>c</sup>: Paper 2 = newsprint. <sup>d</sup>: - = not determined.

綜合上述研究結果，可以發現多種植物精油具有良好的防黴活性，其中，活性較佳的成分包含 Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol，但僅部分研究評估上述 5 種精油成分處理於紙張直接接觸孢子的防黴活性，仍較少研究針對精油成分之揮發性，評估其應用於紙張防黴之活性。此外，精油成分間常具有複雜的交互作用，若能利用此交互作用提升化合物的防黴活性成分，必能減少紙張受黴菌污染的損失。因此，本研究將評估植物精油中 5 種常見的防黴成分於紙張防黴上之應用，並評估其彼此間的交互作用，期能尋得對紙張、人體和環境低衝擊的天然防黴複合藥劑。

## 參、材料與方法



### 一、試驗材料

#### (一) 化合物

本研究所選用之化合物分別富含於香薄荷屬植物 *Satureja khuzistanica* 精油 (80~93% Carvacrol, Farsam *et al.*, 2004)、肉桂醛型土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum* cinnamaldehyde type) 葉精油 (68~95% Cinnamaldehyde, 葉信甫等, 2014)、丁香 (*Syzygium aromaticum*) 葉精油 (82% Eugenol, Srivastava *et al.*, 2005)、丁香羅勒 (*Ocimum gratissimum*) 植物精油 (84~89% Geraniol, Charles and Simon, 1992) 和檸檬香蜂草 (*Monarda citriodora*) 植物精油 (82% Thymol, Pathania *et al.*, 2013)。但由於上述植物多不易大量取得，且分離純化化合物所需的耗時較長；因此，為便於後續試驗，化合物皆自廠商購入，其供應廠商分別為 Carvacrol (Sigma, USA)、Cinnamaldehyde (Acros, Belgium)、Geraniol (Acros, Belgium)、Eugenol (Acros, Belgium) 和 Thymol (Acros, Belgium)，純度皆高於 99%。此外，為利於協同試驗結果之說明，化合物名稱以 Car、Cin、Eug、Ger 和 Thy 縮寫表示。

#### (二) 試驗菌種

採用中華民國國家標準 (CNS2690) 所規定之黑麴黴 (*Aspergillus niger*, BCRC 32073)、土麴黴 (*A. terreus*, BCRC 32877)、桔青黴 (*Penicillium citrinum*, BCRC 32850)。將菌種接種於培養基上，置於 28°C 的培養箱中培養 14 天。

#### (三) 培養基

本研究使用的培養基為馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, Merck, USA)，以蒸餾水調製為 39 g/L 濃度。



#### (四) 紙樣

本研究選用實驗用定性濾紙(Adventec, No.1)、常見的傳統藝術用紙—宣紙(臺灣長春棉紙廠製造, 基重:  $32.5 \text{ g/m}^2$ ), 及用量極大的文化用紙—道林紙(永豐餘製造, 基重:  $80.0 \text{ g/m}^2$ ), 進行試驗。

## 二、試驗方法

### (一) 瓊脂稀釋試驗

參考 Chang 等人(1999)之試驗方法, 將試樣以乙醇(Shimakyu, Japan, 99.5%) 配製至所需濃度後, 取  $60 \mu\text{L}$  加入  $6 \text{ mL}$  的滅菌培養基中混合均勻, 使試樣於培養基之最終濃度分別為  $800$ 、 $700$ 、 $600$ 、 $500$ 、 $400$ 、 $300$ 、 $100$  及  $50 \mu\text{g/mL}$ 。待培養基凝固後, 再將試驗菌種接種於培養基上(圖 8), 於  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相對溼度 70% 的生長箱內培養, 待對照組的菌絲長滿培養皿後, 評估試驗組達到 100% 抑制效果時所需的最低濃度, 即為最低抑制濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)。單次試驗樣本數為 4, 並至少重複試驗 3 次, 以確保 MIC 之再現性。

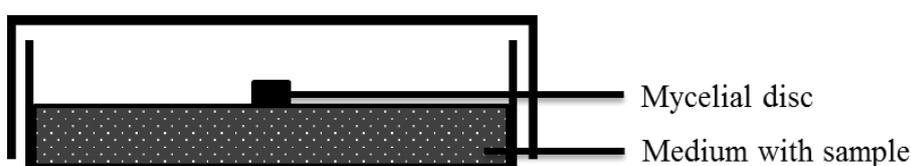


圖 8 瓊脂稀釋試驗之示意圖。

Fig. 8 Schematic diagram of the agar dilution method.



## (二) 紙張防黴試驗

### 1. 直接接觸法

參考 CNS2690 之試驗方法，取 15 mL 滅菌培養基注入培養皿中，另將 12.5、7.5、5、3.75、2.5 和 1.25 mg 之試樣以 400  $\mu$ L 乙醇溶解後，加入方形濾紙（5 cm  $\times$  5 cm）上，使試樣於紙張上的最終濃度分別為 500、400、300、200、150、100 及 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>，並待溶劑揮發後置於已凝固之培養基中央（圖 9），再於濾紙上加入 500  $\mu$ L 孢子懸浮液，置入 25  $\pm$  2 $^{\circ}$ C、相對溼度 70% 的生長箱培養 14 天後，觀察試驗組黴菌的生長狀況，達 100% 抑制之最低濃度即為 MIC。試驗後將無黴菌生長之方形濾紙取出，置入含有 15 mL 滅菌培養基之培養皿中，於生長箱中再培養 7 天，觀察濾紙上黴菌的生長狀況，以評估試樣殺死孢子的能力。單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次，以確保 MIC 和毒殺孢子活性之再現性。

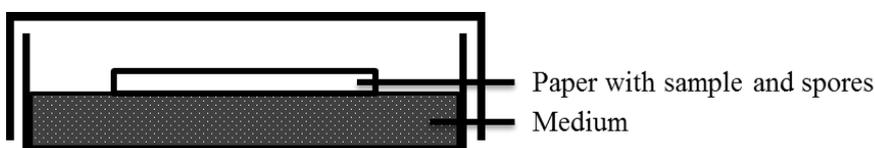


圖 9 紙張直接接觸法之示意圖。

Fig. 9 Schematic diagram of the direct contact method.

### 2. 薰蒸法

為瞭解試樣薰蒸於紙張上對黴菌的抑制效果，本試驗參考 CNS2690 和 Lopez 等人（2005）之試驗方法並稍做修改。取 15 mL 滅菌培養基注入培養皿中，待其凝固後將方形濾紙（5 cm  $\times$  5 cm）置於其中央，並於濾紙上加入 500  $\mu$ L 孢子懸浮液，另將 12.5、10、7.5、5、3.75、2.5 和 1.25 mg 之試樣以 400  $\mu$ L 乙醇溶解後，加入預置於培養皿上蓋的圓形濾紙（直徑 9 cm）上，待溶劑揮發後，將培養皿蓋上，倒置如圖 10 所示，使試樣於培養皿中的濃度達到每公升（L）空氣中有 200、160、120、80、60、40 和 20 mg，並於 25  $\pm$  2 $^{\circ}$ C、相對溼度 70% 的生長箱培養 14

天後，觀察試驗組之方形濾紙上黴菌的生長狀況，評估其 MIC 濃度。試驗後將無黴菌生長之方形濾紙取出，置入含有 15 mL 滅菌培養基之培養皿中，於生長箱中再培養 7 天，觀察其上黴菌的生長狀況，以評估試樣殺死孢子的能力。單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次，以確保 MIC 和毒殺孢子活性之再現性。

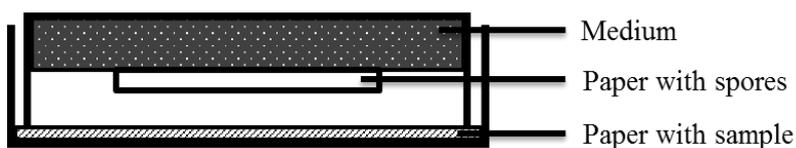


圖 10 紙張薰蒸法之示意圖。

Fig. 10 Schematic diagram of the fumigation method.

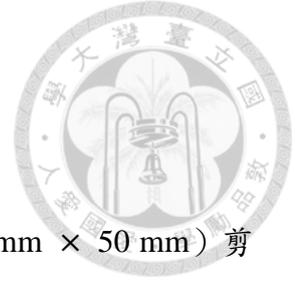
### (三) 紙樣製備

將協同配方 (Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1)) 依表 10 所示之重量溶於 12 mL 乙醚 (Shimakyu, Japan, 99.5%)，然後加入濾紙 (190 mm × 275 mm) 上，並於常溫常壓乾燥後，置入 23°C、相對溼度 50% 的環境中調溼 24 hr，測定紙張之性質變化。另將協同配方依表 1 所示之重量溶於 400  $\mu$ L 甲醇 (Aencore, Australia, 99.9%)，然後加入濾紙 (50 mm × 50 mm) 上，並於常溫常壓乾燥後，分析協同配方於濾紙的留存率。

表 10 最佳協同配方的混合重量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

Table 10 Best synergistic formulations in weights ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

Formulation	Dilution percentage (%)	Compound			
		Car	Cin	Eug	Ger
Car-Cin 1:3	80	30.0	60.0	-	-
Cin-Eug 3:1	70	-	52.5	52.5	-
Cin-Ger 3:1	70	-	52.5	-	35



#### (四) 協同配方之留存性

##### 1. 紙張上協同配方的萃取

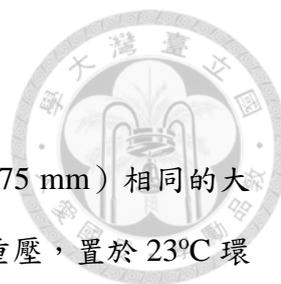
為瞭解協同配方於紙張的留存狀況，將製備好的紙樣（50 mm × 50 mm）剪成邊長 1~2 mm 的碎片，加入 1.5 mL 乙酸乙酯（ECHO, Taiwan, 99.8%），以超音波振盪（Ultrasonic bath）萃取，振盪 5 min 後，靜置 5 min，再取出萃取液，重複萃取 5 次，其萃取率為  $93 \pm 6\%$ 。

##### 2. 協同配方之留存率測定

取 1  $\mu$ L 萃取液注射入 7890A GC System (Agilent, USA) 氣相層析火焰離子偵測器 (Gas chromatographic separation with flame ionization detector, GC-FID) 定量分析，其注射口溫度為 250°C，載送氣體氮氣的流速為 11 mL/min，分流比 10:1，分離管柱為 DB-wax (Methyl dodecanoate)，管徑 30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m；管柱的起始溫度 50°C，持溫 1 min 後，以 10 °C/min 升溫至 180°C，再以 30 °C/min 升溫至 250°C，持溫 5 min。檢測器為火燄離子偵測器，其溫度為 260°C，氣體流速分別為：空氣 400 mL/min、氫氣 30 mL/min 和輔助氣體氮氣 25 mL/min。藉由比對標準品和萃取液的滯留時間，判斷萃取液的成分，並以不同濃度之標準品和吸收面積的關係製作各化合物的檢量線，然後將萃取成分的吸收面積帶入檢量線計算，得到每張紙樣上各化合物的重量，再依下列公式計算留存率：

$$\text{留存率 (\%)} = \frac{W_1}{W_0} \times 100$$

其中， $W_0$  和  $W_1$  分別為協同配方處理之濾紙靜置前及置於室內環境 1 天後化合物的重量。



## (五) 室內靜置試驗

將宣紙和道林紙裁切為與協同配方處理濾紙 (190 mm × 275 mm) 相同的大小，再分別夾住處理濾紙，然後放入夾鏈袋中，以 2 kg 的書籍重壓，置於 23°C 環境 14 天後，再置入 23°C、相對溼度 50% 的環境中調溼 24 hr，分析宣紙和道林紙之性質變化。

## (六) 紙張性質分析

### 1. 表面顏色測定

紙樣表面顏色採用 X-rite SP64 可攜式球形分光儀測量，以 D<sub>65</sub> 為光源，觀測角 10°，測試孔徑為 4 mm。測試時將紙樣直接置於測視窗上，讀取儀器上 X、Y、Z 三刺激值 (Tristimulus values)，並依 1976 年國際照明委員會 (CIE) 制定的 CIE L\*a\*b\* 色彩體系，以 L\*、a\* 和 b\* 色彩參數描述紙樣之顏色，其中，L\* 表示紙樣之明暗程度，完全白的物體視為 100；a\* 之正值愈大表示紙樣愈偏向紅色，負值愈大表示顏色愈偏向綠色；b\* 之正值越大表示顏色越偏向黃色，負值越大表示顏色越偏向藍色。不同處理條件之紙樣各取 3 張，每張測定 5 點，共 15 個測點平均，作為測定值，並以下述公式計算處理之紙樣與對照組之色差值 (Color difference,  $\Delta E^*$ )、明度保留率 (Brightness retention, BR) 及黃色指數 (Yellowness index, YI)，來表示處理造成紙樣之顏色變化：

$$\Delta E^* = \left[ (\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2}$$

$$BR (\%) = (Y_t / Y_0) \times 100$$

$$YI = 100 (1.28X - 1.06Z) / Y。$$

其中 Y<sub>t</sub> 為處理組之 Y 值，Y<sub>0</sub> 為對照組之 Y 值



## 2. 酸鹼值測定

依美國紙漿工業技術協會制定的標準 (TAPPI T 529) 紙張表面酸鹼度試驗法 (Surface pH measurement of paper), 選用 InLab Surfacer 電極 (Mettler Toledo) 測定。將紙樣裁切為 50 mm × 50 mm 的大小後, 置於玻璃培養皿中, 並於其上滴加 pH 為 6.2~7.2 的二次蒸餾水 1 mL, 靜置 10 min 後使用 pH 值測定儀 (Radiometer analytical PHM210 pH meter) 測定紙張之 pH 值。不同處理條件之紙樣各取 5 張測定。

## 3. 耐摺力測定

依據中華民國國家標準 (CNS 10378) 紙及紙板耐摺強度試驗法, 將紙樣裁切為 15 mm × 110 mm 的大小, 以 MIT 試驗機 (KRK MT folding tester), 荷重 0.5 kg 下, 測定其耐摺力 (Folding endurance)。試驗重複數為 12。

## 4. 抗張強度測定

依據中華民國國家標準 (CNS 12607) 紙及紙板抗張性質試驗法, 將紙樣裁切為 15 mm × 220 mm 的大小, 以恆速伸長式抗張強度試驗機 (Gotech AI-3000) 測定其抗張強度 (Tensile strength)。試驗重複數為 10~12。

## 5. 破裂強度測定

依據中華民國國家標準 (CNS 1353) 紙及紙板低破裂強度試驗法, 將紙樣裁切為 80 mm × 150 mm 的大小, 以破裂強度試驗機 (Regmed MTA2000) 測定紙樣正反兩面的破裂強度 (Burst strength)。試驗重複數為 18。



### 三、協同作用分析

#### (一) 等效線圖法 (Isobologram analysis)

根據 Berenbaum (1978) 提出的等效線圖法，等效線 (Isobole) 即是連接圖中相同活性的各點，藉此判斷 2 化合物間的交互作用。化合物混合的濃度如圖 11 所示，x、y 軸各別為 2 化合物 (以下以 A、B 表示) 的最終使用濃度，其中  $(A_0, 0)$  和  $(0, B_0)$  分別代表化合物 A 和 B 單獨使用下的 MIC 值，兩者以 3 種比例混合後，其濃度分別為  $(\frac{1}{4}A_0, \frac{3}{4}B_0)$ 、 $(\frac{2}{4}A_0, \frac{2}{4}B_0)$  和  $(\frac{3}{4}A_0, \frac{1}{4}B_0)$  (後續分別以 1:3、1:1 和 3:1 表示此 3 種比例)，再將各配方稀釋為 80、70、60、40、20% 和未稀釋的組別 (100%) 一同進行防黴試驗。

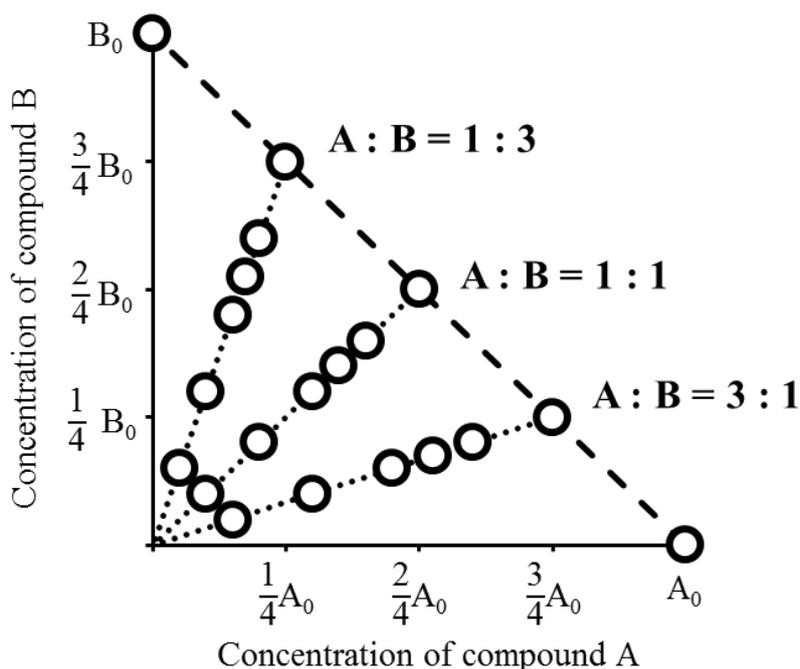


圖 11 等效線圖法之試驗設計圖。2 化合物之 MIC 濃度以 3 種比例(1:3、1:1 和 3:1) 混合，並稀釋為 100、80、70、60、40 和 20% 進行防黴試驗。

Fig. 11 Experiment design of the isobologram analysis. The MIC values of two compounds were mixed into 3 ratios (1:3, 1:1, and 3:1), and then diluted into 2 proportions (100, 80, 70, 60, 40 and 20%) to test their anti-mold activity.

經防黴試驗後，將化合物單獨和混合使用的 MIC 濃度標示於圖上，如圖 12 所示。其中， $(A_0,0)$  和  $(0,B_0)$  的連線稱為加成線 (Additive line)，可用以判斷化合物的交互作用狀況，當 2 化合物混合後具協同作用，混合的 MIC 濃度將位於線的下方 (圖 12A)；當 2 化合物具加成作用，不互相影響，MIC 濃度會位於加成線的下方 (圖 12A)；當 2 化合物具拮抗作用時，其 MIC 濃度會高於加成線 (圖 12C)。

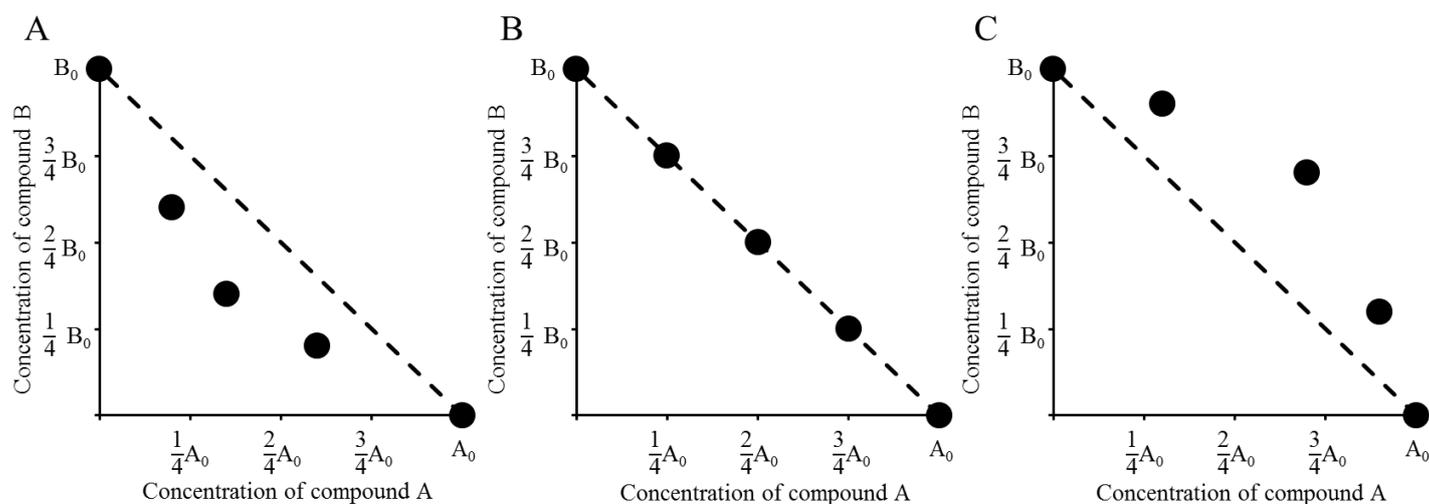


圖 12 協同作用 (A)、加成作用 (B) 和拮抗作用 (C) 之等效線圖的示意圖。

Fig. 12 Schematic diagram of isobologram of synergistic effect (A), additive effect (B) and antagonistic effect (C).



## (二) 組合指數 (Combination index)

為量化各混合配方之協同作用強度，根據 Chou 和 Talalay (1984) 的組合指數 (CI)，將防黴試驗得到之混合配方的 MIC 濃度，以下列公式計算各混和配方之 CI 值，CI 值愈低則表示協同作用愈強。

$$\text{Combination index (CI)} = \text{CI}_A + \text{CI}_B = \frac{A_1}{A_0} + \frac{B_1}{B_0}$$

其中， $A_1$  和  $B_1$  分別為 A 和 B 混合後，達到 MIC 時的濃度； $A_0$  和  $B_0$  則為 A 和 B 單獨使用下，達到 MIC 時的濃度。

## (三) 劑量分析

為瞭解各協同配方達到防黴效果所需要之使用量多寡，及比較混合前後各化合物使用量的變化，本研究將各協同配方之 MIC 濃度換算為化合物於每單位培養基、濾紙或空間中的劑量 (Dosage)，並將化合物的劑量相加，以得到各協同配方於每試驗單位所需的總劑量，即為最低抑制劑量 (Minimal inhibitory dosage, MID)，當 MID 愈低表示協同配方達到完全抑制所需要的劑量愈低。

## 四、統計分析

本研究中之統計分析是利用 R 統計軟體 (Version 3.0.2)，進行 ANOVA 分析，並以 Scheffe 統計方法檢驗不同處理的紙張是否具顯著差異，分析的信賴區間為 95%。

## 肆、結果與討論



### 一、單一成分之防黴活性

本研究利用 3 種試驗方法（瓊脂稀釋、紙張直接接觸和紙張薰蒸）評估 5 種常見精油成分（Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol）對黑麴黴(*Aspergillus niger*)的防黴能力，並評估精油成分混合使用是否具有協同效果，以提升其防黴能力。瓊脂稀釋試驗為評估化合物防黴活性最常見的方法，可初步瞭解化合物對 *A. niger* 菌絲體的抑制效果；當化合物抑制黴菌生長所需的最低濃度（Minimal inhibitory concentration, MIC）越低，表示其防黴活性越佳。本研究之試驗結果如圖 13A 所示，5 種化合物中，Carvacrol 和 Thymol 的防黴活性最佳（MIC = 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），其次活性由高到低依序為 Geraniol（MIC = 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、Eugenol（MIC = 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及 Cinnamaldehyde（MIC = 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

紙張直接接觸試驗是將紙張經 5 種化合物處理後，評估其抑制 *A. niger* 孢子萌發的活性，以瞭解化合物應用於紙張之防黴效果，結果如圖 13B 所示。其中，Cinnamaldehyde 和 Thymol 之活性最佳（MIC = 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ），其次活性由高到低依序為 Carvacrol（MIC = 150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）、Geraniol（MIC = 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）及 Eugenol（MIC = 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）。

同時，為瞭解 5 種化合物薰蒸於紙張的防黴效果，本研究於培養皿的蓋子上放入含有化合物的濾紙，藉此評估化合物揮發後抑制 *A. niger* 孢子萌發之效果。試驗結果如圖 13C 所示，Carvacrol、Cinnamaldehyde 和 Thymol 具有最佳的防黴活性（MIC = 40  $\text{mg}/\text{L}$ ），其次為 Geraniol（MIC = 80  $\text{mg}/\text{L}$ ），Eugenol（MIC = 120  $\text{mg}/\text{L}$ ）的活性最差。

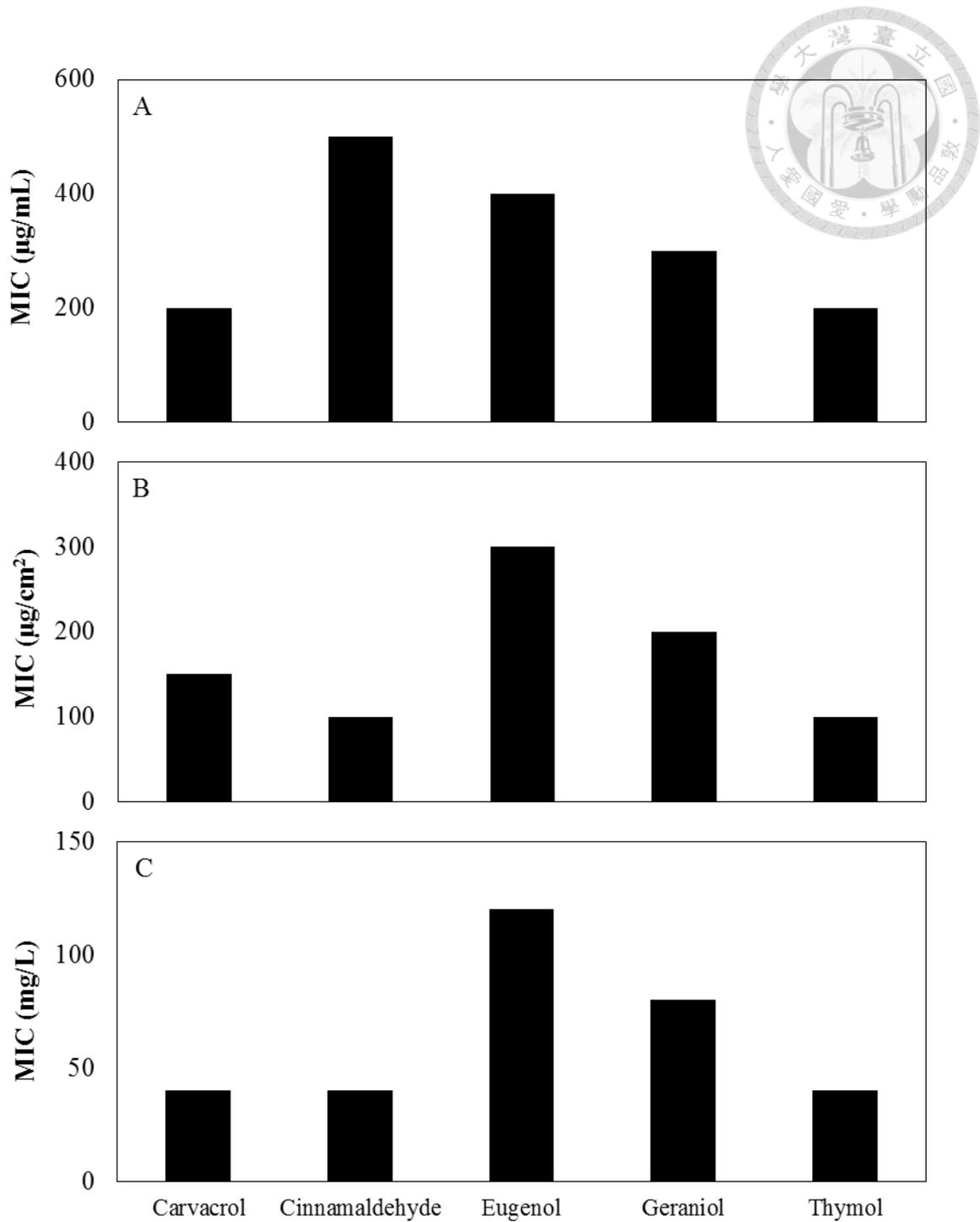


圖 13 瓊脂稀釋試驗 (A)、紙張直接接觸試驗 (B) 和紙張薰蒸試驗 (C) 評估 5 種化合物抑制 *Aspergillus niger* 之防黴活性 (單次試驗樣本數為 4, 並至少重複試驗 3 次)。

Fig. 13 Anti-mold activities of 5 compounds against *Aspergillus niger* evaluated by using 3 methods, agar dilution (A), direct contact (B) and fumigation (C). The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.



由本研究結果得知，瓊脂稀釋試驗中 Carvacrol 和 Thymol 具有最佳防黴活性，Cinnamaldehyde 則最差；但於紙張試驗中，無論是直接接觸或薰蒸，Cinnamaldehyde 的活性皆與 Carvacrol、Thymol 相當。Jahangeer 等人（2005）的研究結果顯示，當 *A. niger* 以纖維素為唯一營養來源時，可誘導產生大量的纖維素酶（Cellulase）；但以葡萄糖（Glucose）為唯一營養來源時，僅能偵測到極少量的 Cellulase。瓊脂稀釋試驗中，主要提供 *A. niger* 生長的營養來源為葡萄糖，但在紙張試驗中，營養來源則為纖維素，*A. niger* 須藉由纖維素酶將紙張降解為葡萄糖後才可利用（Ashadi *et al.*, 1996）。由此可知，*A. niger* 會依照不同的養分來源改變所產生的酵素。此外，Neri 等人（2006）指出試驗方法中，以菌塊和孢子懸浮液接種培養基所評估的防黴機制並不相同。瓊脂稀釋試驗中以菌塊接種於瓊脂，主要用於評估試樣抑制菌絲體生長的能力；而紙張試驗中則以孢子懸浮液接種於紙張，評估試樣抑制孢子萌發的活性。由此推測，兩試驗的差異主要是提供 *A. niger* 生長的養分來源及評估的抑制機制之不同。Cinnamaldehyde 可能具有抑制 *A. niger* 產生纖維素酶的活性，使其無法消化纖維素，亦或較具抑制孢子萌發之效果，因而在紙張試驗中具有良好的防黴活性。

除此之外，Eugenol 在瓊脂稀釋試驗中雖具防黴活性，但在紙張試驗中，無論是直接接觸或薰蒸法，其防黴活性皆明顯低於其它化合物。Neri 等人（2006）的研究中，將黴菌分別以孢子懸浮液和菌塊接種於培養基，並評估 Eugenol 對於 2 者的抑制效果，結果顯示，Eugenol 抑制菌絲體生長的活性較抑制孢子萌發佳。由此推測，本研究中 Eugenol 於瓊脂稀釋試驗的活性主要來自於抑制菌絲體的效果，而於紙張試驗中抑制孢子萌發之效果較差。

進一步比較 5 種化合物分別在紙張直接接觸和薰蒸試驗的使用量，本研究將兩試驗方法之化合物濃度（ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $\text{mg}/\text{L}$ ）皆換算為每個培養皿中含有的試樣重（ $\text{mg}/\text{dish}$ ），結果如表 11 所示。Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol 直接接觸孢子的 MIC 濃度分別為 3.75、2.50、7.50、5.00 和 2.50  $\text{mg}/\text{dish}$ ；薰蒸於孢子的 MIC 濃度則為 2.50、2.50、7.50、5.00 和 2.50  $\text{mg}/\text{dish}$ 。其中，

Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol 直接接觸的濃度皆和薰蒸相當，而 Carvacrol 的 MIC 濃度則以直接接觸法較高。由此得知，如以薰蒸處理紙張，並不會影響化合物的使用量，Carvacrol 甚至在氣態 (Vapor state) 之抑制效果較凝態 (Condensed state) 佳，顯示薰蒸處理時可降低其使用量。因此，此 5 種化合物除了可作為防黴紙之用，亦具有薰蒸防黴之功效。此外，參考 Parchem fine & specialty Chemicals 的資料，25°C 時，Carvacrol (0.0296 mm/Hg) 和 Cinnamaldehyde (0.0265 mm/Hg) 的飽和蒸氣壓最高，另 3 種化合物的飽和蒸氣壓則明顯較低，由高到低依序為 Thymol (0.0160 mm/Hg)、Geraniol (0.0130 mm/Hg) 和 Eugenol (0.0104 mm/Hg)。相較於化合物薰蒸的防黴活性，Carvacrol、Cinnamaldehyde 和 Thymol 的防黴活性最佳，然而 Thymol 的飽和蒸氣壓明顯低於 Carvacrol 和 Cinnamaldehyde。由此推測，化合物薰蒸的防黴活性和其飽和蒸氣壓並無直接關係。

表 11 紙張直接接觸和薰蒸試驗中 5 種化合物抑制 *Aspergillus niger* 孢子的最低抑制濃度

Table 11 Minimal inhibitory concentrations (MIC, mg/dish) of 5 compounds against spores of *Aspergillus niger* in the direct contact and fumigation methods

Compounds	Method	
	Direct contact	Fumigation
Carvacrol	3.75 [150] <sup>a</sup>	2.50 (40) <sup>b</sup>
Cinnamaldehyde	2.50 [100]	2.50 (40)
Eugenol	7.50 [300]	7.50 (120)
Geraniol	5.00 [200]	5.00 (80)
Thymol	2.50 [100]	2.50 (40)

<sup>a</sup>: the concentrations in [ ] are expressed as  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

<sup>b</sup>: the concentrations in ( ) are expressed as mg/L.



綜合上述結果得知，5 種化合物中 Thymol 無論是於瓊脂稀釋、紙張直接接觸或紙張薰蒸試驗時，皆具最佳的防黴效果；Carvacrol 則在瓊脂稀釋試驗和紙張薰蒸試驗具最佳防黴效果；Cinnamaldehyde 於瓊脂稀釋試驗之防黴活性雖然為五者中最低，但在紙張直接接觸和薰蒸試驗中，卻展現最佳的防黴效果。



## 二、混合配方之防黴活性

### (一) 各成分間之協同作用

為探究 5 種化合物(Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol) 之間是否具有協同作用,本研究將 5 種化合物依序兩兩混合成共 10 種組合(Car-Cin、Car-Eug、Car-Ger、Car-Thy、Cin-Eug、Cin-Ger、Cin-Thy、Eug-Ger、Eug-Thy 及 Ger-Thy),各組合又分成 3 種混合比例(1:1、1:3 及 3:1),即共 30 種混合配方。將各混合配方稀釋成 80、70、60、40 和 20%後,分別進行 3 種防黴試驗(瓊脂稀釋、紙張直接接觸和紙張薰蒸),再利用等效線圖(Isobologram)評估各成分間是否具有協同作用,並評估混合配方之 MIC 濃度,利用組合指數(Combination index, CI) 量化各混合配方之協同作用強度。

#### 1. 各成分混合後抑制黴菌菌絲體生長的協同作用

各組合於瓊脂稀釋試驗之等效線圖如圖 14 所示, X、Y 軸分別為各化合物的濃度,其中,縱軸依序為 Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol;橫軸則為 Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol 和 Geraniol。當圖中的加成線(Additive line) 下方有圓點時,表示此組合具有協同作用, Car-Cin (圖 14A) 以 3:1 比例混合之配方具有協同作用; Car-Eug (圖 14B) 的 3 種混合比例皆無協同作用; Car-Ger (圖 14C) 和 Car-Thy (圖 14D) 的 3 種混合比例皆具協同作用。 Cin-Eug (圖 14E) 和 Cin-Ger (圖 14F) 的 3 種混合比例皆無協同作用; Cin-Thy (圖 14G) 混合比例 1:3 和 1:1 之配方具協同作用。 Eug-Ger (圖 14H) 混合比例 1:3 之配方具協同作用; Eug-Thy (圖 14I) 的 3 種比例混合皆具協同作用。 Ger-Thy (圖 14J) 混合比例 1:3 之配方具協同作用,混合比例 1:1 之配方則無協同作用和加成作用(可能具拮抗作用)。

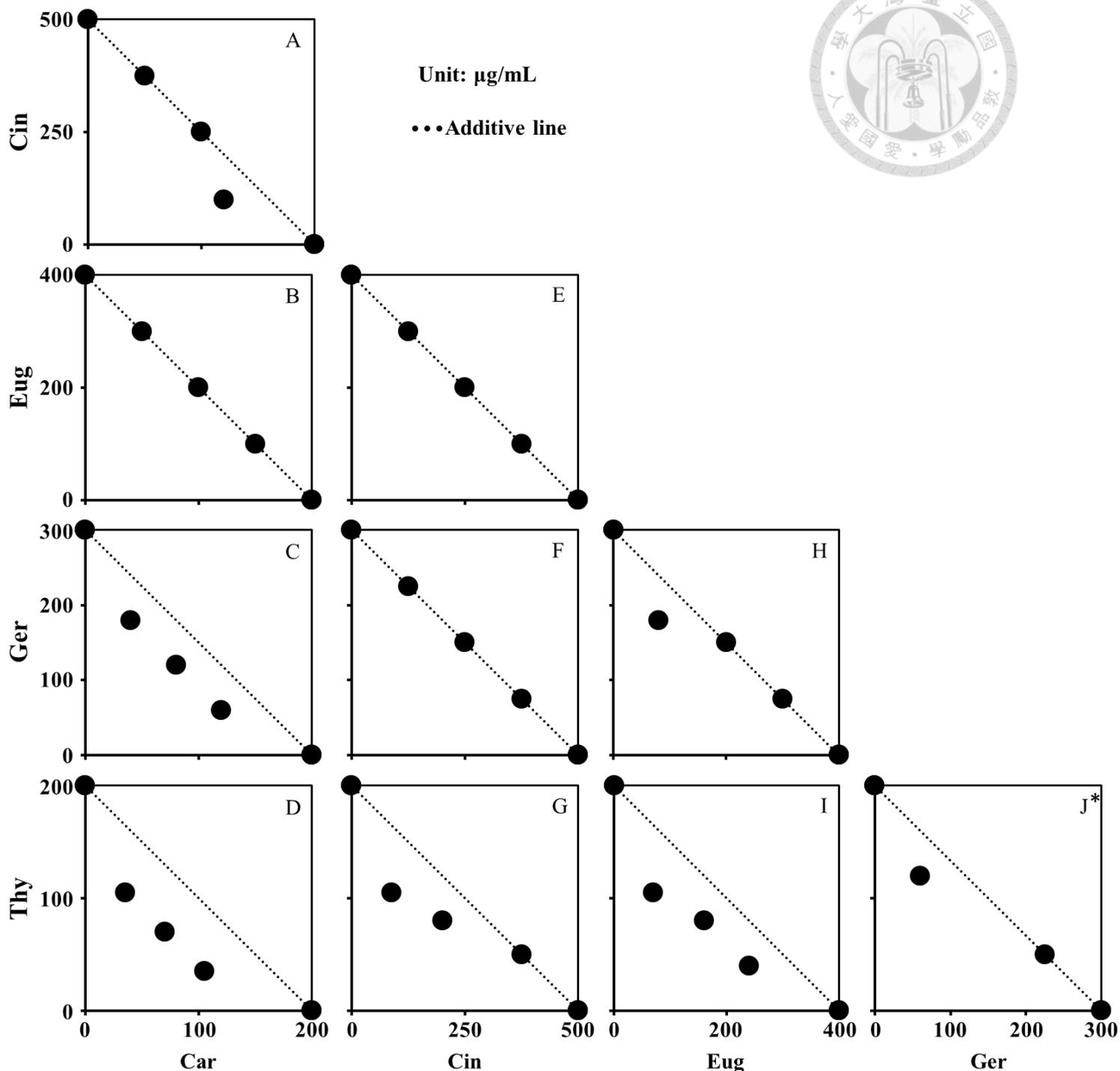


圖 14 5 種化合物二元混合後抑制 *Aspergillus niger* 菌絲體生長之等效線圖 (瓊脂稀釋試驗)。

Fig. 14 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against mycelium of *Aspergillus niger* using the agar dilution method. Car: carvacrol; Cin: cinnamaldehyde; Eug: eugenol; Ger: geraniol; Thy: thymol. \*: the formulation of geraniol and thymol in the ratio 1:1 might have an antagonistic effect.

根據前人的研究，5 種化合物的防黴機制歸納如圖 15 所示，5 種化合物皆會干擾細胞膜的功能，增強細胞膜的通透性 (Permeability) (Cristani *et al.*, 2007; Devi *et al.*, 2010; Farag *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2008); Thy 更能夠不斷的進出細胞膜，增強其干擾 (Cristani *et al.*, 2007); Cin 則能同時抑制細胞壁的合成酵素，阻礙細胞生長 (Bang *et al.*, 2000)。由此可知，Cin 和 Thy 皆能攻擊多種標靶，且和其他化合物攻擊的標靶不全然相同；因此推測，兩者與其他化合物混合使用時，可能具有多靶效應，會產生協同作用 (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009)。此外，Ger 可改變細胞膜的組成，使細胞吸收更多活性成分 (Ota *et al.*, 2003)；因此推測，Ger 和其他化合物混合使用時，可能具有藥物動力效應，亦產生協同作用。

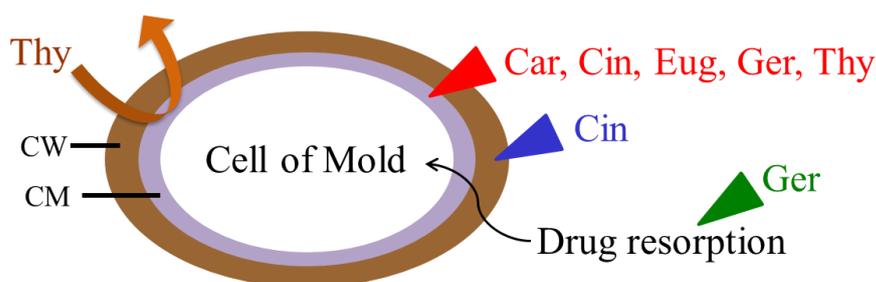


圖 15 5 種化合物的防黴機制。CW：細胞壁；CM：細胞膜。

Fig. 15 Anti-mold mechanism of 5 compounds. CW: cell wall; CM: cell membrane

然而，瓊脂稀釋試驗結果並不如預期，Cin 或 Thy 與其他化合物混合時，僅 Car-Cin、Cin-Thy 具協同作用；Ger 則和 Car、Eug 或 Thy 混合時都具有協同作用，僅和 Cin 混合時不具協同作用。根據 Musiol 等人 (2014) 的研究結果指出，化合物有多種攻擊標靶時，意味著複雜性的增加；攻擊標靶可區分為選擇性 (Selectivity) 和特異性 (Specificity)，分別指的是化合物可能的及特定的攻擊標靶，要預測化合物之間是否具有協同作用時，須全盤瞭解 2 化合物與各可能標靶的特異性交互作用。由於傳統的藥物設計主要專注於化合物的選擇性，而忽略化合物的特異性，因此，當設計混合使用的藥物時，化合物實際的交互作用多不如預期。因此，直到今日，化合物之間的協同作用仍無法透過預測，須利用實驗加以評估。



此外，由上述結果得知，Car-Ger (圖 14C)、Car-Thy (圖 14D) 和 Eug-Thy (圖 14I) 以 3 種比例混合時，皆具協同作用；然而，Cin-Thy 僅在 1:3 和 1:1 的比例下具協同作用 (圖 14G)；Car-Cin (圖 14A)、Eug-Ger (圖 14H) 和 Ger-Thy (圖 14J) 僅分別在 3:1、1:3 和 1:3 的比例下才具有協同作用，由此結果顯示，化合物之協同作用會隨各成分的比例不同而改變。當 Carvacrol 在混合配方所占的比例較高時，Car-Cin 的防黴活性方具協同作用 (圖 14A)；Eug-Ger (圖 14H) 和 Ger-Thy (圖 14J) 則分別以 Geraniol 或 Thymol 之比例較高時才具協同作用。Matan 等人 (2006) 的結果亦發現，當肉桂精油和丁香精油混合時，肉桂精油比例較高的配方對 *A. flavus* 的抑制效果較佳。此外，(+)-Limonene 和 1,8-Cineole 混合後，抑制細菌 (*Staphylococcus aureus*) 生長的效果亦隨混合比例的不同而改變，其中，當 1,8-Cineole 所占的比例高於 50% 時，方具有協同作用 (Van Vuuren and Viljoen, 2007)。然而，不同混合比例影響化合物之交互作用的原因仍未知，有待未來研究。

Car-Thy 和 Eug-Thy 抑制黴菌 *A. niger* 的活性均有協同作用。García-García 等人 (2011) 的研究結果顯示，此 2 種組合抑制細菌 (*Listeria innocua*) 生長的效果亦有協同作用。Zhou 等人 (2007) 的研究結果則證實，Car-Thy 具抑制細菌 (*Salmonella typhimurium*) 生長的協同作用。上述 3 種微生物 (*A. niger*、*L. innocua* 及 *S. typhimurium*) 同為食源性食品致病菌 (Foodborne pathogens)，人體受到感染後會引起食物中毒和敗血症，嚴重危害性命安全。因此，若能將 Carvacrol 和 Thymol 的混合配方應用於食品保存上，則可望減少食物受微生物感染的機會。此外，Car-Cin 和 Cin-Thy 之組合除了於本研究中證實具抗黴菌 *A. niger* 的協同作用外，亦有抑制細菌 *S. typhimurium* 的協同作用 (Zhou *et al.*, 2007)。

## 2. 各成分混合後抑制紙張上孢子萌發的協同作用

為尋得天然的方式防止文物發黴，植物精油的應用逐漸受到重視（古惠菁等，2007；許雅青等，2007；Gatenby and Townley, 2003; Rakotonirainy and Lavédrine, 2005; Stupar *et al.*, 2014)；然而，根據瞭解，尚無研究將精油成分間的協同作用應用於紙張防黴。因此，本研究將紙張經 5 種化合物混合的各組合處理後，評估其防黴活性的協同作用。結果如圖 16 所示，Carvacrol 和另 4 種化合物混合後皆具協同作用，其中，Car-Cin（圖 16A）以 1:3 比例混合之配方具協同作用；Car-Eug（圖 16B）之 3 種比例混合配方皆具協同作用；Car-Ger（圖 16C）和 Car-Thy（圖 16D）以 1:1 和 3:1 比例混合之配方皆具協同作用。Cin-Eug（圖 16E）和 Cin-Ger（圖 16F）以混合比例 3:1 之配方具協同作用。Cin-Thy（圖 16G）、Eug-Ger（圖 16H）、Eug-Thy（圖 16I）和 Ger-Thy（圖 16J）以 3 種比例混合的配方皆無協同作用。

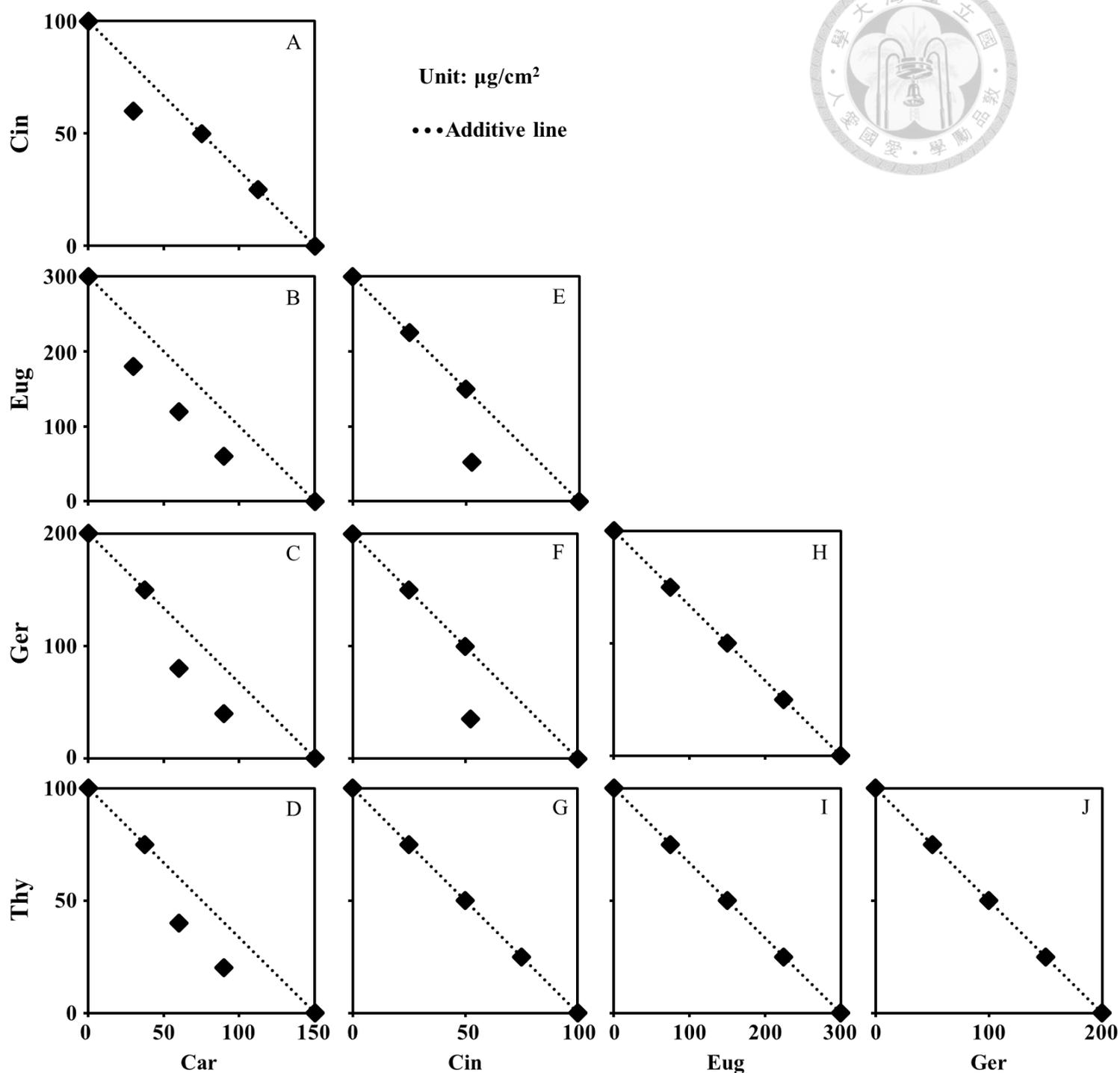


圖 16 5 種化合物二元混合後抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之等效線圖 (紙張直接接觸試驗)。

Fig. 16 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against spores of *Aspergillus niger* using the direct contact method. Car: carvacrol; Cin: cinnamaldehyde; Eug: eugenol; Ger: geraniol; Thy: thymol.



此外，本研究亦評估 5 種化合物混合後，薰蒸於紙張之協同作用，其結果如圖 17 所示。Car-Cin (圖 17A) 和 Car-Eug (圖 17B) 的 3 種混合比例皆無協同作用；Car-Ger(圖 17C)和 Car-Thy(圖 17D)的 3 種混合比例皆具協同作用。Cin-Eug (圖 17E) 的 3 種混合比例皆無協同作用和加成作用，而可能具拮抗作用；Cin-Ger (圖 17F) 混合比例 1:3 之配方案具協同作用；Cin-Thy (圖 17G) 的 3 種混合比例皆無協同作用。Eug-Ger(圖 17H)混合比例 1:3 和 1:1 之配方案皆具協同作用；Eug-Thy (圖 17I) 的 3 種混合比例皆無協同作用。Ger-Thy (圖 17J) 混合比例 1:1 和 3:1 之配方案皆具協同作用。

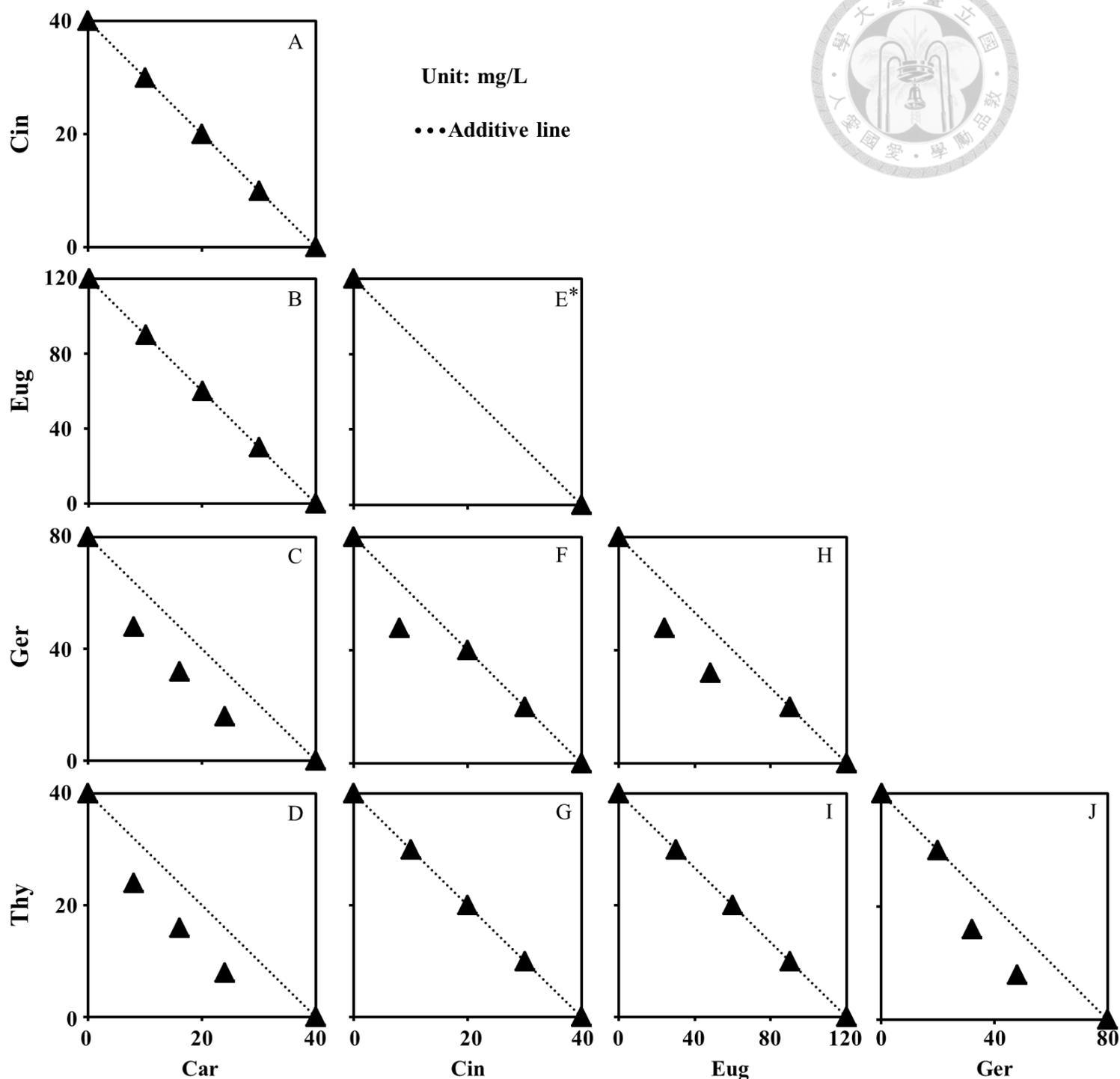


圖 17 5 種化合物二元混合後抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之等效線圖 (紙張薰蒸試驗)。

Fig. 17 Isobologram of two-combinations of 5 compounds against spores of *Aspergillus niger* using the fumigation method. Car: carvacrol; Cin: cinnamaldehyde; Eug: eugenol; Ger: geraniol; Thy: thymol. \*: the formulations of cinnamaldehyde and eugenol in the ratios (1:3), (1:1) and (3:1) might have antagonistic effects.



進一步比較並歸納各組合在紙張直接接觸和薰蒸試驗中，協同作用的變化如下。Car-Ger、Car-Thy 和 Cin-Ger 在兩種試驗方法皆具協同作用，但具協同作用的混合比例不盡相同；其中，Car-Ger 和 Car-Thy 於直接接觸試驗中，僅 1:1 和 3:1 混合比例具協同作用，於薰蒸試驗中，3 種混合比例皆具協同作用；Cin-Ger 於直接接觸試驗中，僅混合比例 3:1 具協同作用，於薰蒸試驗中，則混合比例 1:3 具協同作用。Car-Cin、Car-Eug、Cin-Eug 於直接接觸試驗中，分別為 1:3 混合比例、3 種混合比例及 3:1 混合比例具協同作用，但於薰蒸試驗中，此 3 種組合的 3 種混合比例皆無協同作用。Eug-Ger 和 Ger-Thy 的 3 種混合比例於直接接觸試驗中皆無協同作用，但於薰蒸試驗中，前者 1:3 和 1:1 比例具協同作用，後者則為 1:1 和 3:1 比例具協同作用。Cin-Thy 和 Eug-Thy 不論是於直接接觸試驗或於薰蒸試驗中，皆無協同作用。

綜合上述，可以發現紙張經各組合直接接觸或薰蒸處理後，其抑制黴菌孢子的協同作用狀況並不一致。然而，在單一成分的防黴活性結果中，5 種化合物中僅 Carvacrol 於薰蒸試驗中的防黴活性較於紙張直接接觸試驗佳，其餘化合物於兩試驗的防黴活性皆一致。此差異可能與化合物混合後的飽和蒸氣壓有關，飽和蒸氣壓會受不同化合物分子間的引力影響，進而增加或減少物質揮發到空氣中的量；此外，亦有可能源自於化合物直接接觸或薰蒸孢子的抑制機制不同，使其混合後協同作用狀況不同。實際造成此差異的確切原因仍有待未來研究瞭解。



### 3. 各混合配方於 3 種試驗之組合指數

各混合配方的 CI 值如表 12 所示，其中，配方標記如 Car-Thy (1:3) 表示此配方為 Car-Thy 以 1:3 比例混合而成，以此類推。此外，CI 值愈低則表示協同作用愈強。瓊脂稀釋試驗中，Car-Thy (1:3)、Car-Thy (1:1)、Car-Thy (3:1)、Cin-Thy (1:3) 及 Eug-Thy (1:3) 具有最低的 CI 值，其 CI 值為 0.7；其餘有協同作用之組合的 CI 值皆為 0.8，包含 Car-Cin (3:1)、Car-Ger (1:3)、Car-Ger (1:1)、Car-Ger (3:1)、Cin-Thy (1:1)、Eug-Ger (1:3)、Eug-Thy (1:1)、Eug-Thy (3:1) 及 Ger-Thy (1:3)。由此得知，各組合溶於瓊脂時，Car-Thy、Cin-Thy 和 Eug-Thy 具最強的協同作用，其中，僅 Car-Thy 的協同作用強度不受混合比例影響；Cin-Thy 和 Eug-Thy 於不同比例混合時，其協同作用強度不同，兩者的最適混合比例 (Optimal combination ratio) 皆為 1:3，即 Cin-Thy 和 Eug-Thy 混合比例為 1:3 時，達到最強的協同作用。Car-Ger 的協同作用強度亦不受混合比例影響，在不同混合比例時，其協同作用強度皆相當。

混合配方於紙張直接接觸試驗的 CI 值亦如表 12 所示，其中，最低的 CI 值為 0.7，分別為 Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1)；其餘具協同作用之組合的 CI 值皆為 0.8，分別是 Car-Cin (1:3)、Car-Eug (1:3)、Car-Eug (1:1)、Car-Eug (3:1)、Car-Ger (1:1)、Car-Ger (3:1)、Car-Thy (1:1) 及 Car-Thy (3:1)。由此得知，雖然 Carvacrol 與另 4 種化合物混合接觸紙張上的孢子時，皆具抑制效果的協同作用，但其協同作用強度皆不高 (CI = 0.8)；Cin-Eug 和 Cin-Ger 雖僅有 3:1 比例混合之配方具協同作用，但協同作用的強度最高 (CI = 0.7)。此外，值得注意的是，Cinnamaldehyde 與 Carvacrol、Eugenol 和 Geraniol 混合之配方中，當 Cinnamaldehyde 比例較高時，較具協同作用。



表 12 5 種化合物以不同比例二元混合於瓊脂稀釋試驗、紙張直接接觸試驗和紙張薰蒸試驗的組合指數

Table 12 Combination indices of two-combinations of 5 compounds under different mixing ratios in the agar dilution, direct contact and fumigation methods

Compound		Agar dilution			Direct contact			Fumigation		
A	B	Mixing ratio (A:B)			Mixing ratio (A:B)			Mixing ratio (A:B)		
		1:3	1:1	3:1	1:3	1:1	3:1	1:3	1:1	3:1
Car	Cin	1.0*	1.0	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Eug	1.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0
	Ger	0.8	0.8	0.8	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	Thy	0.7	0.7	0.7	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Cin	Eug	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	> 1	> 1	> 1
	Ger	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.8	1.0	1.0
	Thy	0.7	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Eug	Ger	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.8	1.0
	Thy	0.7	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ger	Thy	0.8	> 1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.8

\*: CI = 1.0, additive effect; CI > 1, antagonistic effect; CI < 1, synergistic effect. Car: carvacrol; Cin: cinnamaldehyde; Eug: eugenol; Ger: geraniol; Thy: thymol.

紙張薰蒸試驗中混合配方的 CI 值如表 12 所示，具協同作用的混合配方之 CI 值皆為 0.8，分別為 Car-Ger (1:3)、Car-Ger (1:1)、Car-Ger (3:1)、Car-Thy (1:3)、Car-Thy (1:1)、Car-Thy (3:1)、Cin-Ger (1:3)、Eug-Ger (1:3)、Eug-Ger (1:1)、Ger-Thy (1:1) 和 Ger-Thy (3:1)。由此可知，薰蒸處理時，Car-Ger 和 Car-Thy 各混合配方之協同作用強度相當，不受混合比例影響。綜合上述，本研究中各協同配方的 CI 值約為 0.7~0.8，屬於中度協同作用 (Moderate synergism, CI = 0.70~0.85) (Chou, 2011)。



## (二) 協同配方對使用劑量之影響

當 2 種化合物有協同作用時，表示兩者混合後能以較低的劑量獲得同樣的效果。因此，除了利用上述 CI 值，劑量降低的程度也是評量協同作用是否具有優勢的要點。為瞭解上述各協同配方可減少的使用劑量，本研究將配方中化合物的劑量相加，以得到配方於每單位培養基、濾紙或空間中的總量，即為最低抑制劑量 (Minimal inhibitory dosage, MID)。由於不同試驗方法所使用之劑量單位不同，以下將分別討論化合物於瓊脂稀釋、紙張直接接觸和紙張薰蒸試驗中，完全抑制細菌生長所需的使用劑量：

### 1. 瓊脂稀釋試驗中協同配方之劑量變化

瓊脂稀釋試驗中，MID 單位為每毫升培養基中化合物的重量，其結果如圖 18 所示，Car-Cin (3:1) 之 MID 為 220  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Car-Ger (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 220、200 和 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 皆為 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Cin-Thy (1:3) 和 (1:1) 之 MID 分別為 193 和 280  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Eug-Ger (1:3) 之 MID 為 260  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Eug-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 175、240 和 280  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Ger-Thy (1:3) 之 MID 為 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。綜合上述，最低劑量的協同配方為 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1)，其 MID 皆為 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，劑量次低的則分別為 Eug-Thy (1:3) (MID = 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、Car-Ger (3:1) (MID = 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、Ger-Thy (1:3) (MID = 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 Cin-Thy (1:3) (MID = 193  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。當 5 種化合物單獨使用時，Carvacrol 和 Thymol 所需的使用劑量最低，其 MID 為 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此可知，所有協同配方之劑量皆可低於單獨使用中的 Carvacrol 和 Thymol。

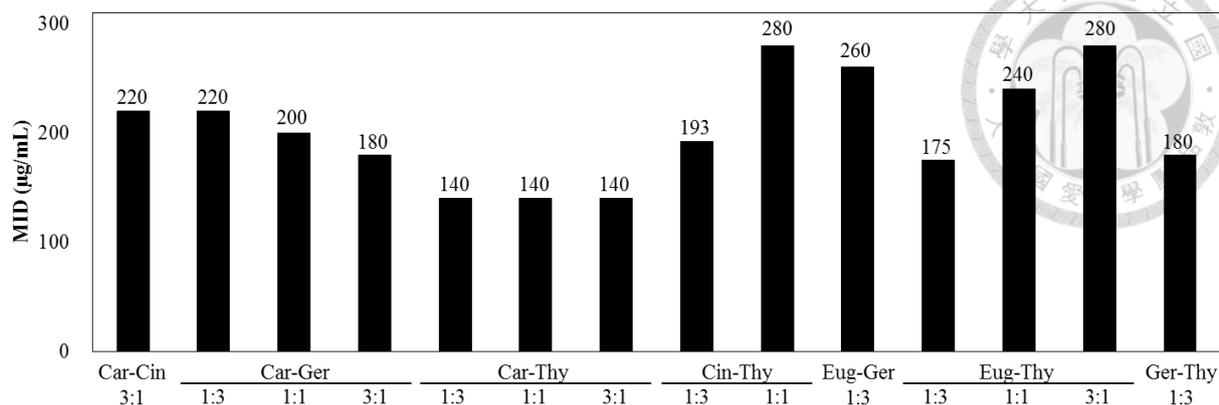


圖 18 瓊脂稀釋試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 菌絲體生長的最低抑制劑量 (單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次)。

Fig. 18 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against mycelium of *Aspergillus niger* in the agar dilution method. Car: carvacrol, MID = 200 µg/mL; Cin: cinnamaldehyde, MID = 500 µg/mL; Eug: eugenol, MID = 400 µg/mL; Ger: geraniol, MID = 300 µg/mL; Thy: thymol, MID = 200 µg/mL. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.

進一步檢視 5 種化合物於協同配方中之 MID (圖 19)，以瞭解其相較於單獨使用所需劑量的差異。圖 19A 中 Carvacrol 和 Thymol 在單獨使用下之 MID 皆為 200 µg/mL，當兩者以 1:3、1:1 和 3:1 的比例混合後，Carvacrol 的劑量分別為 35、70 和 105 µg/mL，約減少單獨使用的 83、65 和 48%；Thymol 的劑量則分別為 105、70 和 35 µg/mL，約減少單獨使用的 48、65 和 83%。由此得知，5 種化合物單獨使用時，Carvacrol 和 Thymol 的 MID 最低，兩者混合使用後，其劑量更可有效地降低。同樣具低劑量的 Car-Ger (3:1) 和 Ger-Thy (1:3)，其成分之 MID 變化則如圖 19B 所示，Carvacrol、Geraniol 和 Thymol 單獨使用的 MID 分別為 200、300 和 200 µg/mL，當 Carvacrol 和 Geraniol 以 3:1 比例混合後，Carvacrol 和 Geraniol 的劑量分別為 120 和 60 µg/mL，較單獨使用之劑量減少 40 和 80%；Geraniol 和 Thymol 以 1:3 比例混合，Geraniol 和 Thymol 的劑量分別為 60 和 120 µg/mL，較單獨使用減少 80 和 40%。由此證實，協同作用可有效的降低劑量，增加化合物的使用效率。

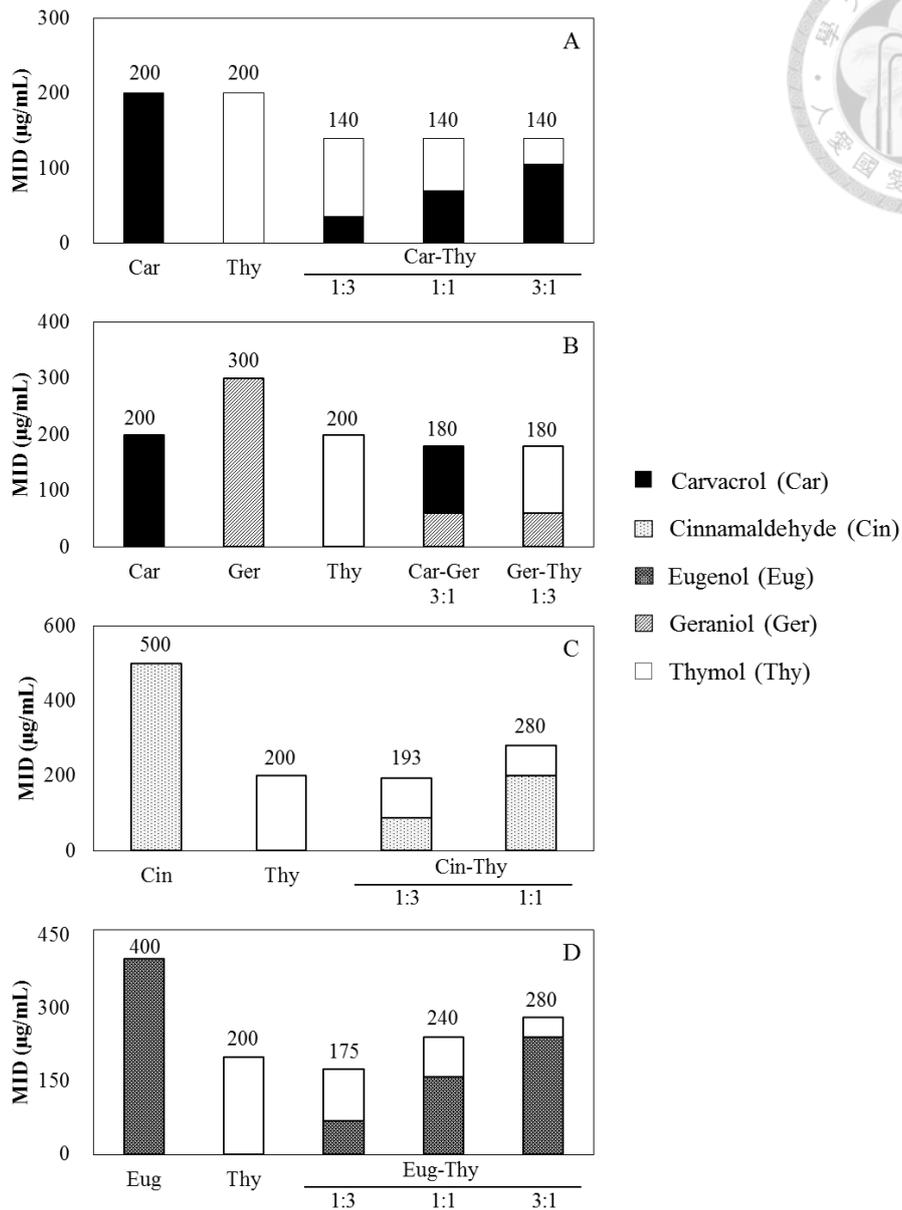


圖 19 協同配方 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) (A)；Car-Ger (3:1) 和 Ger-Thy (1:3) (B)；Cin-Thy (1:3) 和 (1:1) (C)；Eug-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) (D) 中各化合物抑制 *Aspergillus niger* 菌絲體生長之最低抑制劑量的變化 (瓊脂稀釋試驗，單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次)。

Fig. 19 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic formulations, including Car-Thy (1:3), (1:1) and (3:1) (A); Car-Ger (3:1) and Ger-Thy (1:3) (B); Cin-Thy(1:3) and (1:1) (C); Eug-Thy (1:3), (1:1) and (3:1) (D), against mycelium of *Aspergillus niger* using the agar dilution method. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.



此外，由各協同配方中可發現，Cin-Thy (1:3) 中的 Cinnamaldehyde 和 Eug-Thy (1:3) 中的 Eugenol 劑量相較於其他組明顯減少，將其各別依 MID 作圖，如圖 19C 和 D 所示。Cin-Thy (1:3) 和 (1:1) 中，Cinnamaldehyde 和 Thymol 的 MID 分別為 88 / 105 和 200 / 80  $\mu\text{g/mL}$ (圖 19C)，相較於單獨使用的 Cinnamaldehyde(MID = 500  $\mu\text{g/mL}$ )，其劑量分別減少 412 和 300  $\mu\text{g/mL}$ 。同樣地，圖 19D 中 Eug-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 中 Eugenol 和 Thymol 的 MID 分別為 70 / 105、160 / 80 和 240 / 40  $\mu\text{g/mL}$ ，相較於 Eugenol 單獨使用 (MID = 400  $\mu\text{g/mL}$ )，分別可減少 330、240 和 160  $\mu\text{g/mL}$ 。

綜合上述可知，縱然 Cinnamaldehyde 和 Eugenol 單獨使用時需要較高的劑量方可達到防黴效果，但當 Cinnamaldehyde 或 Eugenol 與少量的 Thymol 混合後，其使用劑量皆可大幅減少 82%。Cinnamaldehyde 為食品保存中頗具發展性的防黴藥劑，已應用於奈米可食用乳膠薄膜 (Nanoemulsion edible composite films) 及幾丁聚醣薄膜 (Chitosan films) 之製作 (Higueras *et al.*, 2014; Otoni *et al.*, 2014)，未來將可望藉由添加 Thymol 於 Cinnamaldehyde 製品中，增強其防黴效果。



## 2. 紙張直接接觸試驗中協同配方之劑量變化

紙張直接接觸試驗中，各混合配方處理紙張之 MID 如圖 20 所示。結果顯示，Car-Cin (1:3) 之 MID 為  $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Car-Eug (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 210、180 和  $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Car-Ger (1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 140 和  $130 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Car-Thy (1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 100 和  $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 之 MID 分別為 105 和  $88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。由此可知，10 種協同配方中，Cin-Ger (3:1) 具有最低的 MID ( $88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )，其次 MID 由低到高依序為 Car-Cin (1:3) (MID =  $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )、Car-Thy (1:1) (MID =  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )、Cin-Eug (3:1) (MID =  $105 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 和 Car-Thy (3:1) (MID =  $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )。

5 種化合物單獨使用時，Carvacrol 和 Thymol 具有最低的 MID ( $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )；相較於此，Cin-Ger (3:1) 和 Car-Cin (1:3) 之 MID ( $88$  和  $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 較單獨使用的 Carvacrol 和 Thymol 更低；而 Car-Thy (1:1) 之 MID ( $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 則僅與 Carvacrol 和 Thymol 相當。由此可知，10 組協同配方中，Cin-Ger (3:1) 和 Car-Cin (1:3) 的使用劑量可低於 5 種化合物中劑量最低者，應用上具有低劑量的優勢。

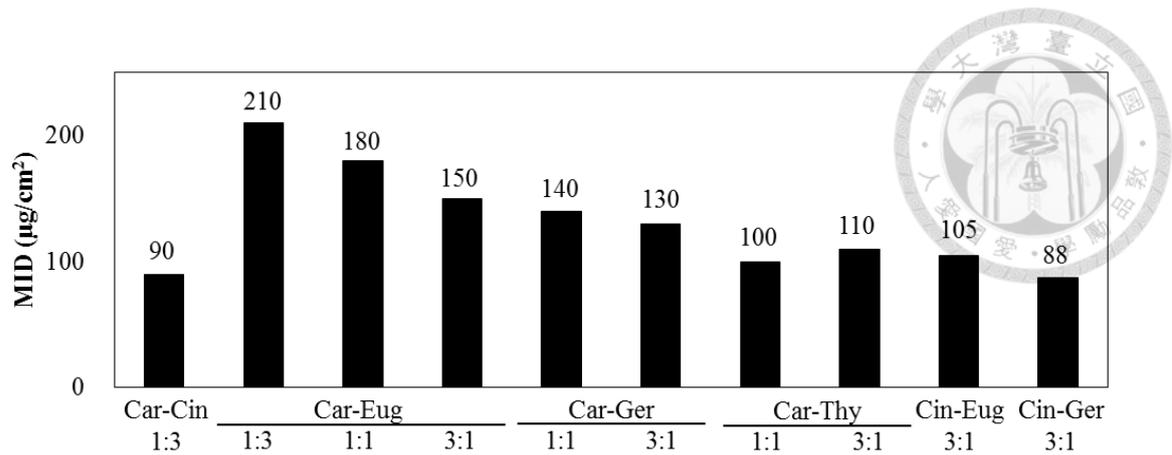


圖 20 紙張直接接觸試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發的最低抑制劑量（單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次）。

Fig. 20 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* in the direct contact method. Car: carvacrol, MID = 150 µg/cm<sup>2</sup>; Cin: cinnamaldehyde, MID = 100 µg/cm<sup>2</sup>; Eug: eugenol, MID = 300 µg/cm<sup>2</sup>; Ger: geraniol, MID = 200 µg/cm<sup>2</sup>; Thy: thymol, MID = 100 µg/cm<sup>2</sup>. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.

進一步分析上述低 MID 之配方中各成分所需的劑量，其結果如圖 21 所示，可以發現 Car-Cin (1:3) 中，Carvacrol 和 Cinnamaldehyde 的 MID 分別為 30 和 60 µg/cm<sup>2</sup>，較單獨使用的劑量減少 80 和 40%。Car-Thy (1:1) 中，Carvacrol 和 Thymol 的 MID 分別為 60 和 40 µg/cm<sup>2</sup>，較單獨使用的 Carvacrol 和 Thymol 皆減少 60%。Cin-Ger (3:1) 中，Cinnamaldehyde 和 Geraniol 的 MID 分別為 53 和 35 µg/cm<sup>2</sup>，較單獨使用的劑量減少 48 和 83%。綜合上述結果，Cin-Ger (3:1) 不僅為劑量最低的協同配方，更是組成分劑量減少最多的配方，實為紙張直接接觸試驗中最佳的防黴藥劑。

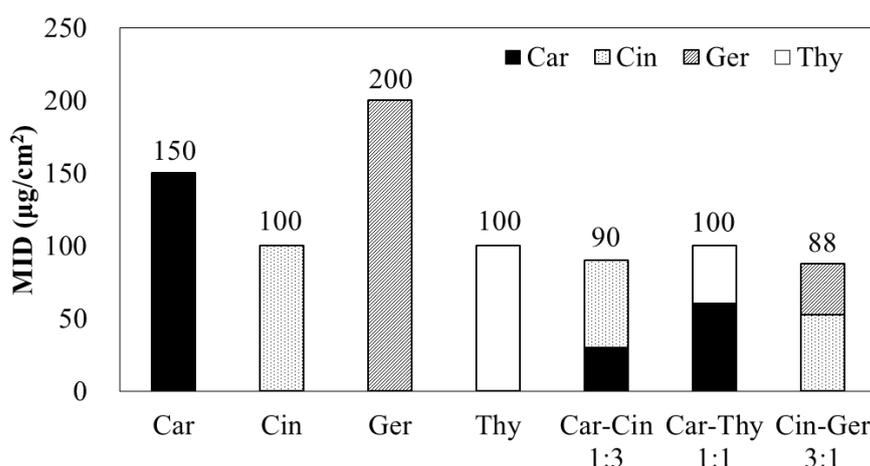


圖 21 協同配方中各化合物抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之最低抑制劑量的變化 (紙張直接接觸試驗，單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次)。

Fig. 21 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* using the direct contact method. Car: carvacrol; Cin: cinnamaldehyde; Ger: geraniol; Thy: thymol. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.

### 3. 紙張薰蒸試驗中協同配方之劑量變化

紙張薰蒸試驗結果發現，11 種配方具有協同作用，進一步分析其劑量如圖 22 所示，圖中 MID 為每公升空氣中完全抑制黴菌生長所需的劑量。Car-Ger (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 56、48 和 40 mg/L；Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID 皆為 32 mg/L；Cin-Ger (1:3) 之 MID 分別為 56 mg/L；Eug-Ger (1:3) 和 (1:1) 之 MID 分別為 72 和 80 mg/L；Ger-Thy (1:1) 和 (3:1) 之 MID 分別為 48 和 56 mg/L。由此得知，11 種配方中，Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 具有最低的 MID(32 mg/L)，其次 MID 由低到高分別為 Car-Ger (3:1)(MID = 40 mg/L)、Car-Ger (1:1)(MID = 48 mg/L) 和 Ger-Thy (1:1) (MID = 48 mg/L)。

5 種成分單獨使用時，Carvacrol、Cinnamaldehyde 和 Thymol 具有最低的 MID (40 mg/L)；相較於此，上述協同配方中，僅 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 之 MID



(32 mg/L) 可低於 40 mg/L，由此可知，上述 3 組協同配方及 Car-Ger (3:1) (MID = 40 mg/L) 較具開發的潛力。

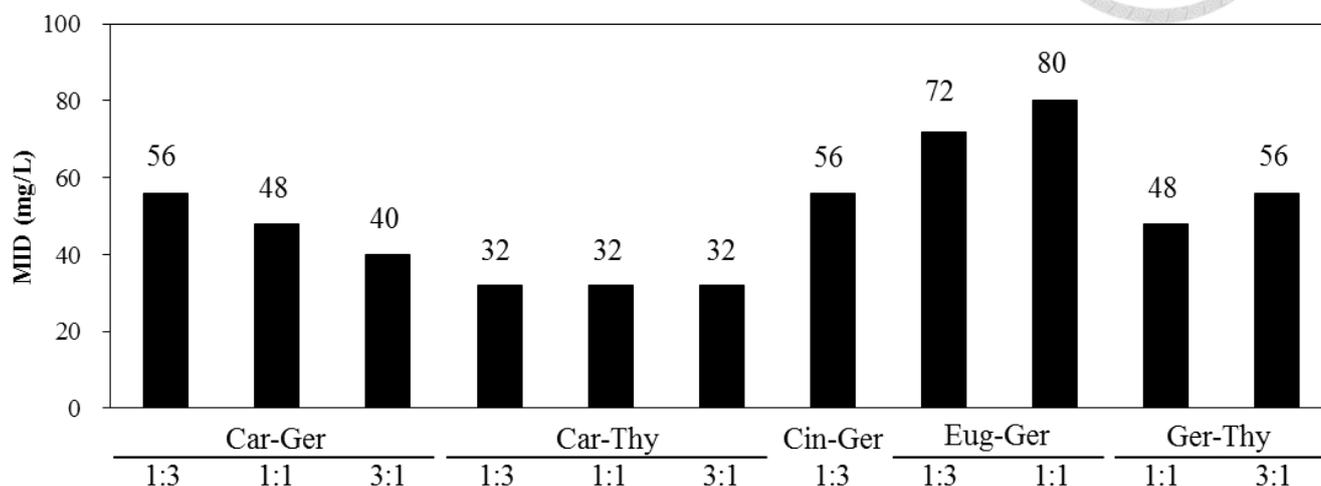


圖 22 紙張薰蒸試驗中協同配方抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發的最低抑制劑量(單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次)。

Fig. 22 Minimal inhibitory dosage (MID) of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* in the fumigation method. Car: carvacrol, MID = 40 mg/L; Cin: cinnamaldehyde, MID = 40 mg/L; Eug: eugenol, MID = 120 mg/L; Ger: geraniol, MID = 80 mg/L; Thy: thymol, MID = 40 mg/L. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.

進一步檢視上述 MID 較低之配方中化合物的劑量變化，其結果如圖 23 所示。Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 中，Carvacrol 和 Thymol 的 MID 分別降為 8 / 24、16 / 16 和 24 / 8 mg/L，相較於單獨使用，Carvacrol 的劑量減少 80、60 和 40%；Thymol 的劑量則減少 40、60 和 80%。Car-Ger (3:1) 中 Carvacrol 和 Geraniol 的 MID 分別為 24 和 16 mg/L，相較於單獨使用，Carvacrol 的劑量減少 16 mg/L，約為單獨使用的 40%；Geraniol 則減少 64 mg/L，為單獨使用的 80%。由此可知，Car-Thy 在 3 種混合比例下，皆可減少 40~80% 的用量，同為最佳的協同配方；因此，在應用上可依照個人氣味喜好及化合物取得之便利性，任意比例混合。

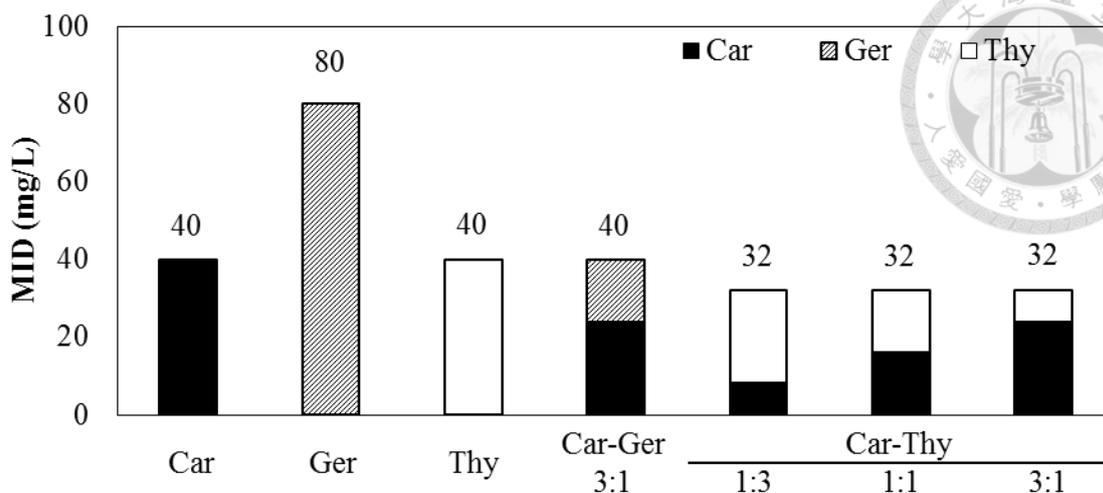


圖 23 協同配方中各化合物於抑制 *Aspergillus niger* 孢子萌發之最低抑制劑量的變化（紙張薰蒸試驗，單次試驗樣本數為 4，並至少重複試驗 3 次）。

Fig. 23 Changes in minimal inhibitory dosage (MID) of the compounds of synergistic formulations against spores of *Aspergillus niger* using the fumigation method. Car: carvacrol; Ger: geraniol; Thy: thymol. The samples size per test was 4 and the test repeated at least 3 times.

根據前述紙張直接接觸試驗之結果，Cin-Ger (3:1) 具有最低的 MID ( $88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )；紙張薰蒸試驗之結果則以 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 具有最低的 MID (32 mg/L)，將兩者皆換算成每個培養皿之試樣重後，其 MID 分別為 2.2 和 2.0 mg/dish。相較之下，可發現薰蒸所需的使用劑量較直接接觸低，就劑量多寡考量，Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1) 為本研究中最值得後續開發的防黴藥劑。然而，化合物的協同作用除了可降低使用劑量上，更可能增加其對不同菌種的抑制效果。因此，後續將進一步評估各協同配方對於其它常見紙張黴菌的抑制效果，以瞭解各協同配方的優劣，篩選出最佳的配方。



### (三) 協同配方抑制紙張常見黴菌之孢子萌發的效果

近年來，化合物協同作用之應用逐漸興起，除了源自於其能降低使用劑量的優點，更由於各成分能抵禦不同的黴菌，賦予複合配方對抗不同菌種的潛力。Abdel-Kareem (2010) 調查發現，纖維素製品上常可見 *Aspergillus*、*Chaetomium*、*Penicillium* 和 *Alternaria* 屬的黴菌；夏滄琪 (2000) 的鑑定結果亦發現，在臺灣，污染紙張的主要黴菌為 *Aspergillus* 和 *Penicillium* 兩屬，約占 60% 以上的污染。若能同時抑制此兩屬黴菌的生長，將可有效地減少紙張被污染的情形。因此，本研究亦評估前述試驗得到的協同配方和單一成分，抑制 2 種常見紙張黴菌 (*A. terreus* 和 *P. citrinum*) 的效果，並將前述抑制 *A. niger* 之效果一同呈現於圖表中，以探討化合物對不同菌種的效果差異。

5 種化合物處理紙張直接接觸孢子時，完全抑制 2 種黴菌所需的最低濃度如圖 24 所示。其中，Carvacrol 和 Thymol 抑制 2 種黴菌的 MIC 皆為  $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Cinnamaldehyde 抑制 2 種黴菌的 MIC 皆為  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Eugenol 對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的 MIC 分別為 400 和  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Geraniol 對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的 MIC 亦分別為 400 和  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。依照 5 種化合物抑制 2 種黴菌的活性排序，可發現其趨勢相同，皆以 Cinnamaldehyde 的活性最佳，其次為 Carvacrol 和 Thymol，兩者的活性相當，活性最低的為 Eugenol 和 Geraniol；此與 5 種化合物抑制 *A. niger* 的活性趨勢 (Cin = Thy > Car > Ger > Eug) 稍有不同。

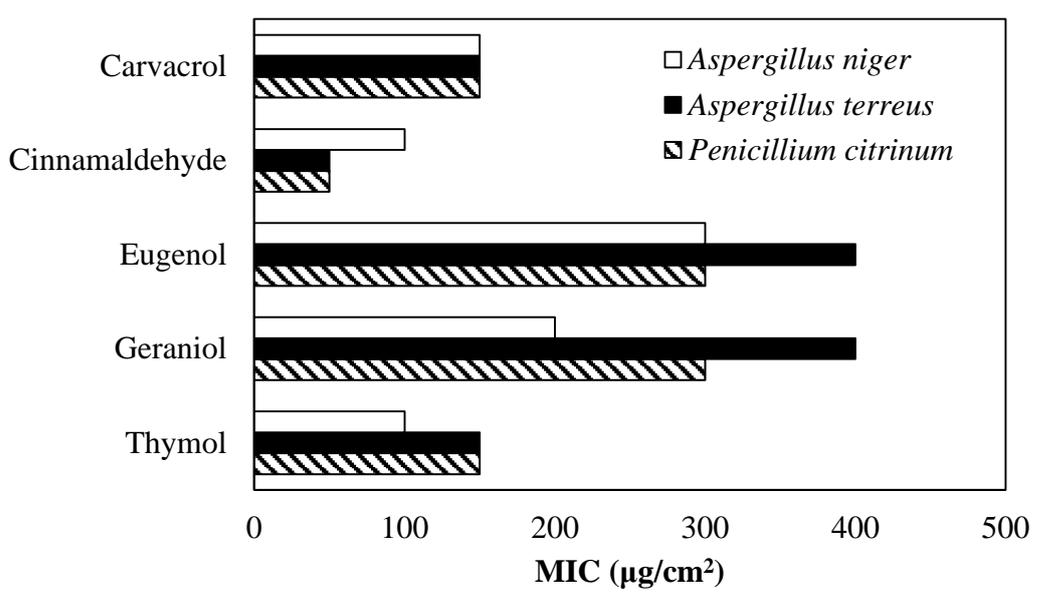


圖 24 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低抑制濃度（紙張直接接觸試驗）。

Fig. 24 Minimal inhibitory concentration (MIC) of 5 compounds against common mold spores on paper using the direct contact method.

由 5 種化合物各別對 3 種黴菌的抑制效果可發現，同樣的化合物對不同菌種的抑制效果不盡相同。Carvacrol 對 3 種黴菌的抑制效果皆相當；Cinnamaldehyde 則對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的抑制效果較佳，對 *A. niger* 的抑制效果較差；Eugenol 對 *A. niger* 和 *P. citrinum* 的抑制效果較佳，對 *A. terreus* 的抑制效果較差；Geraniol 和 Thymol 皆對 *A. niger* 的抑制效果較佳，對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的抑制效果較差。由此可知，3 種黴菌的最佳抑制藥劑均不相同，若混合配方能結合化合物對不同黴菌的抑制效果，或許能找到同時抑制多種黴菌的最佳配方。

協同配方處理紙張直接接觸 3 種黴菌 (*A. niger*、*A. terreus* 和 *P. citrinum*) 的抑制效果如表 13 所示，10 種配方中僅 Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 可完全抑制 3 種黴菌生長，其餘配方皆只能抑制 *A. niger* 生長。值得注意的是，此 3 種配方中皆含有 Cinnamaldehyde，且 5 種化合物中 Cinnamaldehyde 最具抑制 3 種黴菌的效果。因此，Cinnamaldehyde 對於配方抑制 3 種黴菌的效果可能具有很大的貢獻，但這推論仍有待未來研究證實。

表 13 協同配方抑制紙張常見黴菌孢子萌發之效果 (紙張直接接觸試驗)

Table 13 Inhibitory effects of synergistic formulations against common mold spores on paper using the direct contact method

Combination	Mixing ratio	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
Car-Cin	1:3	-*	-	-
Car-Eug	1:3	-	+	+
	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+
Car-Ger	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+
Car-Thy	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+
Cin-Eug	3:1	-	-	-
Cin-Ger	3:1	-	-	-

\*: - = no growth; + = growth

紙張薰蒸試驗中，5種化合物單獨使用時，抑制2種黴菌 MIC 濃度如圖 25 所示，Carvacrol 和 Thymol 抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 皆為 60 mg/L；Cinnamaldehyde 抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的 MIC 則皆為 20 mg/L；Eugenol 抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的 MIC 分別為 160 和 120 mg/L；Geraniol 抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的 MIC 分別為 120 和 80 mg/L。依 5 種化合物抑制的強弱分別排序，可發現化合物抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的活性有相同的趨勢，皆以 Cinnamaldehyde 的抑制效果最強，Carvacrol 和 Thymol 的效果相當，僅次於 Cinnamaldehyde，效果最弱的則為 Eugenol 和 Geraniol；此與 5 種化合物抑制 *A. niger* 的活性趨勢（Cin = Thy = Car > Ger > Eug）不同，但與化合物於紙張直接接觸試驗中抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的趨勢一致。

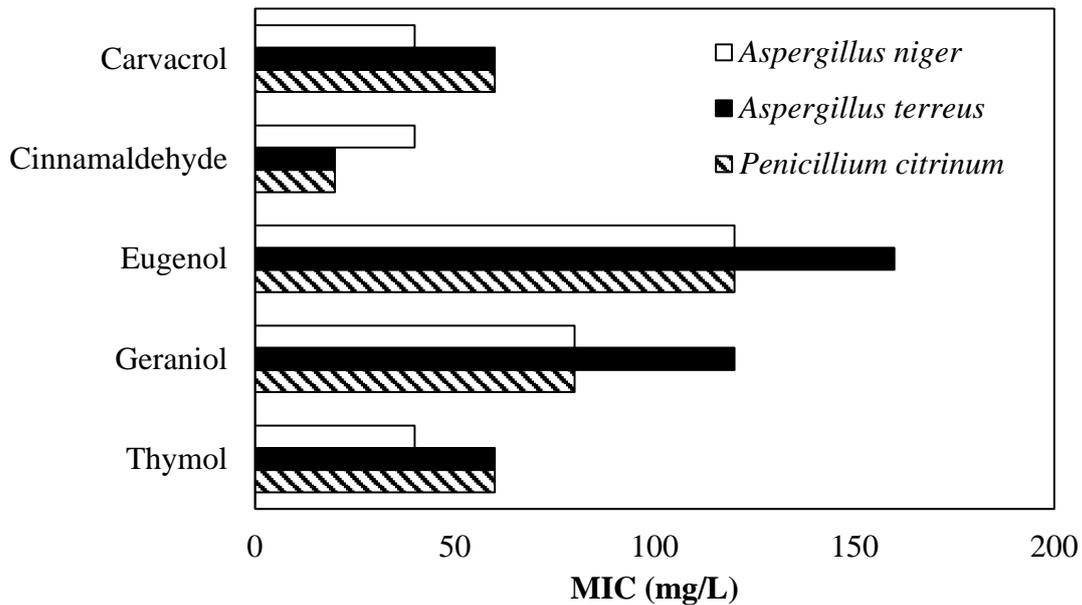


圖 25 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低抑制濃度（紙張薰蒸試驗）。

Fig. 25 Minimal inhibitory concentration (MIC) of 5 compounds against common mold spores on paper using the fumigation method.



此外，從化合物個別抑制 3 種黴菌的效果來看，可發現 Carvacrol 和 Thymol 對 *A. niger* 的抑制效果較佳，對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的效果較差；Cinnamaldehyde 則和 Carvacrol 及 Thymol 相反，其對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的抑制效果較佳，對 *A. niger* 的效果較差；Eugenol 和 Geraniol 則皆對 *A. niger* 和 *P. citrinum* 的抑制效果較佳，對 *A. terreus* 的效果較差。由此可知，每種化合物能抑制的菌種不盡相同，推測其混合後對多種黴菌能產生具良好的抑制效果。然而，11 種配方皆僅能抑制 *A. niger* 的生長，而無法抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* (表 14)；造成此結果的主要原因可能是這些化合物的混合配方對 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 2 種菌的抑制並無協同作用，使配方於此劑量下無法完全抑制黴菌的生長。

綜合上述結果得知，並非所有協同配方皆可廣泛地抑制紙張上常見的多種黴菌，如：使用劑量最低的薰蒸配方 Car-Thy (1:3)、(1:1) 和 (3:1)，雖可提供大面積的防黴處理，但僅能抑制 *A. niger* 的孢子萌發，而無法完全抑制 *A. terreus* 和 *P. citrinum* 的孢子萌發。協同配方中，僅 Car-Cin (1:3)、Cin-Ger (3:1) 和 Cin-Eug (3:1) 處理紙張直接接觸孢子時，可有效的抑制紙張上常見的 3 種黴菌，降低紙張受黴菌污染的情形。



表 14 協同配方抑制紙張常見黴菌孢子萌發之效果 (紙張薰蒸試驗)

Table 14 Inhibitory effects of synergistic formulations against common mold spores on paper using the fumigation method

Combination	Mixing ratio	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
Car-Ger	1:3	-*	+	+
	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+
Car-Thy	1:3	-	+	+
	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+
Cin-Ger	1:3	-	+	+
Eug-Ger	1:3	-	+	+
	1:1	-	+	+
Ger-Thy	1:1	-	+	+
	3:1	-	+	+

\*: - = no growth; + = growth



### 三、協同配方毒殺紙張常見黴菌孢子之效果

現有的紙張防黴方法中，溫溼度調控是最為常見的，將紙質文物典藏於 13~18°C，相對溼度 55~60% 的通風環境中，即可有效地抑制黴菌的生長 (夏滄琪，2000)。然而，此方法無法有效的殺死黴菌孢子；一旦環境的溫溼度失去控制，黴菌將可大量繁殖。因此，輔以可殺死孢子之藥劑，針對較易受黴菌污染區域加以消毒，是更為妥善的防黴處置。本研究中，5 種化合物於紙張直接接觸試驗中，對黴菌孢子的最低致死濃度 (Minimal fungicidal concentration, MFC) 如表 15 所示，Carvacrol 對 3 種黴菌的 MFC 皆為 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Cinnamaldehyde 對 *A. niger* 和 *A. terreus* 的 MFC 皆為 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，對 *P. citrinum* 的 MFC 則為 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Eugenol 對 *A. niger* 和 *P. citrinum* 的 MFC 分別為 400 和 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，但當濃度提升到 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  時，仍無法殺死 *A. terreus*；Geraniol 和 Eugenol 對 3 種黴菌的 MFC 一致；Thymol 對 3 種黴菌的 MFC 皆為 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

表 15 5 種化合物對紙張常見黴菌孢子之最低致死濃度 (紙張直接接觸試驗)

Table 15 Minimal fungicidal concentration (MFC) of 5 compounds against common mold spores on paper using the direct contact method.

Compounds	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
Carvacrol	200	200	200
Cinnamaldehyde	100	100	50
Eugenol	400	> 500	500
Geraniol	400	> 500	500
Thymol	300	300	300

依 5 種化合物對 3 種黴菌的 MFC 分別排序，可發現化合物對 3 種黴菌的殺菌效果有相同的趨勢，皆以 Cinnamaldehyde 的效果最強，其次由強到弱依序為 Carvacrol、Thymol、Eugenol 和 Geraniol。從化合物各別對 3 種黴菌的殺菌效果來看，則可發現 Carvacrol 和 Thymol 對 3 種黴菌的效果皆相同，但 Cinnamaldehyde 對 *P. citrinum* 的效果較另 2 種黴菌高，Eugenol 和 Geraniol 對 *A. niger* 和 *A. terreus* 的效果則較對 *P. citrinum* 的效果強。

進一步，將紙張以先前試驗得到的最佳協同配方 (Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1)) 處理後，其結果顯示，處理紙張皆可有效地殺死黴菌 (*A. niger*、*A. terreus* 和 *P. citrinum*) 孢子，且其殺菌效果不因菌種差異而減弱 (表 16)。此外，相較於單獨使用的劑量，3 種配方的劑量分別為 90、105 和 88  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (圖 20)，其中，Car-Cin (1:3) 和 Cin-Ger (3:1) 雖然略高於 Cinnamaldehyde 對 *P. citrinum* 的 MFC ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )，但仍顯著低於各化合物對於 3 種黴菌的 MFC ( $100\sim 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )；由此可知，3 種協同配方皆可在低使用劑量下，殺死紙張常見黴菌，防止紙張發黴。

表 16 最佳協同配方毒殺紙張常見黴菌孢子之效果 (紙張直接接觸試驗)

Table 16 Fungicidal effects of the best synergistic formulations against common mold spores on paper using the direct contact method

Formulation	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
Car-Cin 1:3	-*	-	-
Cin-Eug 3:1	-	-	-
Cin-Ger 3:1	-	-	-

\*: - = no growth; + = growth



#### 四、協同配方之留存率

由前述試驗中可知，紙張經 Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理後，可有效的殺死黴菌孢子。然而，上述各協同配方的化合物 (Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol 和 Geraniol) 皆具揮發性，處理後紙張上的化合物會逐漸釋放至空氣中。因此，為瞭解各協同配方之化合物於紙張上的留存狀況，本研究將 3 種協同配方處理之濾紙於室內放置 1 天後，測量濾紙上化合物含量的變化，計算得到留存率 (表 17)。結果顯示，處理濾紙放置 1 天後，化合物的含量僅剩原來的 0.7~25.5%，其中，Car-Cin (1:3) 中 Carvacrol 和 Cinnamaldehyde 的留存率分別為 5.9 和 0.9%；Cin-Eug (3:1) 中 Cinnamaldehyde 和 Eugenol 的留存率分別為 4.4 和 25.5%；Cin-Ger (3:1) 中 Cinnamaldehyde 和 Geraniol 的留存率分別為 0.7 和 15.8%。

表 17 協同配方處理之濾紙於室內放置 1 天後化合物的留存率 (%)

Table 17 Retention (%) of compounds on filter papers treated with synergistic formulations after indoor exposure for 1 day

Formulation	Compound			
	Car	Cin	Eug	Ger
Car-Cin 1:3	5.9 ± 1.4	0.9 ± 0.3	-	-
Cin-Eug 3:1	-*	4.4 ± 3.2	25.5 ± 6.2	-
Cin-Ger 3:1	-	0.7 ± 0.1	-	15.8 ± 4.2

\*: - = not detected.

根據此結果得知，4 種化合物中 Cinnamaldehyde 在 3 種協同配方處理的濾紙上留存率最低 (0.9、4.4 和 0.7%)；然而，根據 Parchem fine & specialty Chemicals 提供的資料顯示，Cinnamaldehyde 的飽和蒸氣壓較 Carvacrol 低，應較易留存於濾紙上。因此推測，Cinnamaldehyde 與濾紙的作用力較其他化合物低，方易脫附至空氣中。值得注意的是，Cin-Eug (3:1) 處理的濾紙上，Cinnamaldehyde 的留存率

略高於另 2 種協同配方處理的濾紙；由此推測，Cinnamaldehyde 和 Eugenol 混合後會減少 Cinnamaldehyde 的脫附量。

黴菌的繁殖主要藉由大量的孢子散佈於空氣中，隨著人體、物品和風的移動擴散傳播。因此，為防止紙質文物發黴，藏品庫房皆會定期清潔，並將要入庫典藏的文物先滅菌消毒（檔案管理局，2006）。然而，典藏的文物在移出庫房、參與展覽的過程，很有可能沾染空氣中的黴菌孢子，且由於肉眼無法看見附著於文物的孢子，文物再次入庫後仍有可能污染庫房，因此，有效地防範文物在移動過程的感染，將可降低黴菌大舉入侵庫房的風險。前述結果可知，Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理的濾紙不僅可殺死觸碰到的黴菌孢子，且 3 種協同配方會逐漸釋放於空氣中，不易殘留於紙張上。因此，若將紙張經此 3 種協同配方處理後，製成防黴封套或防黴袋，包裝於文物後再進行轉移，將可望減少移動過程中污染的機會；且此 3 種協同配方的低殘留特性，可應用於短時間的文物移動，並避免藥劑長期留存影響文物的疑慮。



## 五、協同配方對紙張性質的影響

由上述結果可知，3種協同配方處理的紙張適合製成防黴封套或防黴袋使用，因此，紙張經協同配方處理後是否會改變其顏色、引張強度和破裂強度等是重要的關鍵。此外，由於3種協同配方會逐漸揮發於空氣中，可能會影響到周邊或受包覆的文物；因此，使用時，除了要考慮協同配方對處理紙張性質的影響，亦要考量受包覆或周邊的紙質文物是否受到影響。以下將分別評估3種協同配方在此兩層面的影響：

### (一) 濾紙經協同配方處理後的性質變化

市面上能選用於製作防黴封套或防黴袋的紙質基材種類繁多，為便於未來將協同配方應用不同的基材，本研究選用僅由纖維素構成、無添加化學品（如：澱粉、塗料和乾強劑等）的濾紙，評估其經3種協同配方（Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1)）處理後的性質變化。結果如表 18 所示，相較於未處理的組別，3種協同配方皆會使濾紙產生些許色差（ $\Delta E^*$ ），其色差值分別為 0.2、0.5 和 0.2；根據蘇裕昌等人（1999b）的報告提到，色差值小於 3 時，肉眼無法辨認其差異，所以，此 3 種協同配方處理後濾紙的色差是肉眼無法察覺的。由酸鹼度來看可發現，相較於未處理組的 pH 值（6.7），3 種處理的 pH 值皆明顯降為 5.9、5.6 和 5.9；破裂強度則較未處理組（82.4 kpa）略低，分別為 73.0、74.4 和 72.7 kpa；引張強度亦較未處理組（1.05 kN/m）略降低為 0.96、0.97 和 0.97 kN/m。製漿抄紙的過程中會利用打漿使纖維帚化，增加裸露的氫氧基（Hydroxyl group, OH），使纖維間的氫鍵增加，紙力增強；但當濾紙經協同配方處理後，化合物上的氫氧基或羰基（Carbonyl group, C=O）會和纖維上的氫氧基形成氫鍵，因而降低處理濾紙的破裂和引張強度。由此可知，製作含有 3 種協同配方的防黴封套或防黴袋時，需選用紙力較強的基材，以維持使用所需的紙張強度。

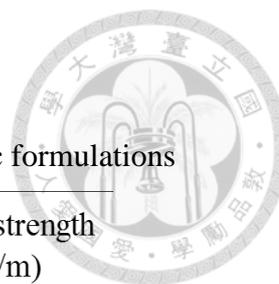


表 18 濾紙經協同配方處理後的性質變化

Table 18 Change in properties of filter papers treated with synergistic formulations

Formulation	$\Delta E^*$	pH	Burst strength (kpa)	Tensile strength (kN/m)
Untreated	-	$6.7 \pm 0.2^A$	$82.4 \pm 6.3^A$	$1.05 \pm 0.07^B$
Control	$0.1 \pm 0.1$	$6.6 \pm 0.1^A$	$84.1 \pm 6.5^A$	$1.14 \pm 0.04^A$
Car-Cin 1:3	$0.2 \pm 0.1$	$5.9 \pm 0.2^B$	$73.0 \pm 5.0^B$	$0.96 \pm 0.06^C$
Cin-Eug 3:1	$0.5 \pm 0.2$	$5.6 \pm 0.1^C$	$74.4 \pm 6.0^B$	$0.97 \pm 0.04^C$
Cin-Ger 3:1	$0.2 \pm 0.1$	$5.9 \pm 0.1^{BC}$	$72.7 \pm 5.6^B$	$0.97 \pm 0.06^C$

Different letters (<sup>A-C</sup>) are significantly different at  $p < 0.05$  according to Scheffe's test. Mean  $\pm$  SD,  $n = 12 - 14$ .

## (二) 紙張接觸協同配方處理濾紙後的性質變化

本研究選用傳統藝術用紙—宣紙和文化用紙的大宗—道林紙為代表，評估其接觸 3 種協同配方處理濾紙後，放置於室內 14 天的紙張顏色和性質變化。

### 1. 宣紙接觸處理濾紙後的性質變化

宣紙的性質變化如表 19 所示，如與未處理組比較，宣紙接觸 3 種協同配方 (Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1)) 處理的濾紙後，其色差值分別為 1.1、0.5 和 0.5，肉眼皆無法辨識其顏色差異。由酸鹼值來看，其酸鹼值分別為 8.3、8.6 和 8.4 次，相較於未處理組 (8.2 次) 無顯著差異；耐摺強度則分別為 23.5、32.9 和 28.8，相較於未處理組 (35.6)，僅接觸 Car-Cin (1:3) 處理濾紙的耐摺強度會些微降低，但仍有 23.5 次的耐摺性，其餘組別無顯著差異；引張強度分別為 1.0、1.2 和 1.1，相較於未處理組 (1.1)，接觸 Cin-Ger (3:1) 處理濾紙的引張強度會些微提升，其餘組別無顯著差異。由此可知，宣紙接觸 Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理濾紙後，其顏色、酸鹼值、引張強度和耐摺強度皆無變化，Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理的紙張適合製為供宣紙使用的防黴封套或防黴袋。



表 19 宣紙接觸協同配方處理濾紙後並於室內放置 14 天後的性質變化

Table 19 Change in properties of Xuan papers which was contacted with synergistic-formulation-treated filter papers after indoor exposure for 14 days

Formulation	$\Delta E^*$	pH	Folding endurance (counts)	Tensile strength (kN/m)
Untreated	-	8.2 ± 0.1 <sup>B</sup>	35.6 ± 8.0 <sup>A</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>BC</sup>
Car-Cin 1:3	1.1 ± 0.4	8.3 ± 0.2 <sup>AB</sup>	23.5 ± 6.6 <sup>B</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>C</sup>
Cin-Eug 3:1	0.5 ± 0.4	8.6 ± 0.2 <sup>A</sup>	32.9 ± 7.2 <sup>A</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>A</sup>
Cin-Ger 3:1	0.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2 <sup>AB</sup>	28.8 ± 7.5 <sup>AB</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>AB</sup>

Different letters (<sup>A-C</sup>) are significantly different at  $p < 0.05$  according to Scheffe's test. Mean ± SD,  $n = 12 - 14$ .

## 2. 道林紙接觸處理濾紙後的性質變化

道林紙的性質變化如表 20 所示，道林紙接觸 3 種協同配方（Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1)）處理的濾紙後，僅產生些微的色差（ $\Delta E^* = 0.2, 0.2, 0.3$ ），肉眼無法辨識；其酸鹼度分別為 8.7、9.1 和 8.9，與未處理組（8.8）無顯著差異；耐摺強度分別為 75.5、92.8 和 100.7 次，但由於道林紙本身耐摺強度變異較大，3 種處理在統計上皆與未處理組（92.2 次）無顯著差異；引張強度則分別為 3.6、3.8 和 3.8 kN/m，僅 Car-Cin (1:3) 與未處理組（3.9 kN/m）有顯著差異，其他組別則無影響。由此可知，道林紙接觸 Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (1:3) 處理濾紙後，無論是顏色、酸鹼值、耐摺強度和引張強度，皆無顯著影響，Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (1:3) 均適合應用於製作保護道林紙的防黴封套或防黴袋。



表 20 道林紙接觸協同配方處理濾紙室內放置 14 天後的性質變化

Table 20 Change in properties of wood-free papers which was contacted with synergistic-formulation-treated filter papers after indoor exposure for 14 days

Formulation	$\Delta E^*$	pH	Folding endurance (counts)	Tensile strength (kN/m)
Untreated	-	$8.8 \pm 0.2^{AB}$	$92.2 \pm 37.7^A$	$3.9 \pm 0.1^A$
Car-Cin 1:3	$0.2 \pm 0.0$	$8.7 \pm 0.2^B$	$75.5 \pm 14.7^A$	$3.6 \pm 0.1^B$
Cin-Eug 3:1	$0.2 \pm 0.1$	$9.1 \pm 0.2^A$	$92.8 \pm 24.8^A$	$3.8 \pm 0.2^A$
Cin-Ger 3:1	$0.3 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.3^{AB}$	$100.7 \pm 22.3^A$	$3.8 \pm 0.1^A$

Different letters (<sup>A, B</sup>) are significantly different at  $p < 0.05$  according to Scheffe's test. Mean  $\pm$  SD,  $n = 12 - 14$ .

綜合上述可知，宣紙和道林紙接觸 3 種協同配方處理的濾紙後，皆不會造成肉眼可見的色差，但 Car-Cin (1:3) 處理濾紙會分別造成宣紙的耐摺強度和道林紙的引張強度降低，較不適合用於製作防黴封套或防黴袋；Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理的濾紙則皆不影響宣紙和道林紙的性質，為本研究中最適合用於未來開發防黴封套或防黴袋的協同配方。

## 伍、結論



本研究為尋得良好的紙質文物防黴處理，選用 5 種具防黴活性的植物精油成分 (Carvacrol、Cinnamaldehyde、Eugenol、Geraniol 和 Thymol)，並將其兩兩混合成多種配方後，評估化合物和混合配方對 *Aspergillus niger* 的防黴活性。首先由瓊脂稀釋試驗結果得知，5 種化合物中 Carvacrol 和 Thymol 對 *A. niger* 菌絲體的抑制效果最佳，且兩者以不同比例混合的 3 種配方 (Car-Thy (1:3)、Car-Thy (1:1)、Car-Thy (3:1)) 協同作用強度皆最高，且完全抑制所需的使用劑量亦最低。

進一步為瞭解試樣於紙張上的防黴效果，將紙張經化合物和其混合配方處理後，分別直接接觸和薰蒸 *A. niger* 孢子，評估其對孢子的抑制效果。由試驗結果得知，化合物單獨使用時，Cinnamaldehyde 和 Thymol 在直接接觸和薰蒸試驗的防黴效果皆最佳，Carvacrol 則僅在薰蒸試驗中的效果最佳。化合物混合使用時，無論是直接接觸或薰蒸，皆有多種配方的協同作用，較單獨使用的化合物減少 40~80% 的劑量。為篩選得到最佳的防黴藥劑，分別從協同作用強度高低、使用劑量多寡和對多種紙張上常見黴菌 (*A. terreus* 和 *Penicillium citrinum*) 的防黴效果考量。其中，紙張直接接觸試驗中，Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1) 不僅協同作用強度高、使用劑量低，更可完全毒殺 *A. niger*、*A. terreus* 和 *P. citrinum* 的孢子；然而，紙張薰蒸試驗中，各協同配方的協同作用強度皆相當，但使用劑量最低的 Car-Thy (1:3)、Car-Thy (1:1) 和 Car-Thy (3:1) 不具毒殺孢子的能力。

至於紙張性質的影響，Car-Cin (1:3)、Cin-Eug (3:1)、Cin-Ger (3:1) 分別處理於濾紙後，雖會略降低紙張的力學強度，但其不易殘留於紙張，可避免對文物的長期影響；接觸 Cin-Eug (3:1) 和 Cin-Ger (3:1) 處理濾紙的宣紙和道林紙，其顏色、酸鹼值和力學強度皆無顯著變化。因此，綜合試驗結果可知，Cin-Ger (3:1) 處理於紙張時，可在最低的使用劑量殺死多種黴菌孢子，防止黴菌污染的擴散，並可避免損傷其所接觸之文物，實為本研究中最優良的複合防黴藥劑。

## 陸、參考文獻



- 古惠菁、張惠婷、張上鎮 (2007) 臺灣肖楠精油對紙張防黴性之影響。中華林學季刊 40(1)：113-121。
- 夏滄琪 (2000) 紙質文物著生褐斑之探討與移除。國立中興大學森林學研究所博士論文。174 頁。
- 夏滄琪、張東柱、傅春旭 (2001) 微波處理應用於紙張滅菌之初探。台灣林業科學 16(4)：327-332。
- 夏滄琪、張豐吉 (2002) 紙質文物著生褐斑真菌類之分離與鑑別。林業研究季刊 24(4)：29-44。
- 許雅青 (2007) 土肉桂葉子精油及其成分應用於防黴紙之研製。國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士班論文。75 頁。
- 許雅青、吳季玲、張惠婷、張上鎮 (2007) 樟屬植物葉精油及其成分應用於防黴紙之研製。中華林學季刊 40(3)：391-404。
- 葉信甫、林群雅、張上鎮 (2014) 貯存因子對土肉桂葉子精油安定性之影響。中華林學季刊 47(1)：95-108。
- 蘇裕昌、趙國評、陳鴻財、陳家杰 (1999a)  $\gamma$ -射線照射對文化用紙光學性質的影響。台灣林業科學 14(1)：37-44。
- 蘇裕昌、趙國評、陳鴻財、陳家傑 (1999b)  $\gamma$ -射線照射對紙張物理化學性質的影響。臺灣林業科學 14(2)：119-130。
- 檔案管理局 (2006) 檔案入庫保管。檔案管理局。139 頁。
- Abdel-Kareem, O. (2010) Monitoring, controlling and prevention of the fungal deterioration of textile artifacts in the museum of jordanian heritage. Mediterranean Archaeology and Archaeometry 10(2): 85-96.

Afsharpour, M. and M. Hadadi (2014) Titanium dioxide thin film: Environmental control for preservation of paper-art-works. *Journal of Cultural Heritage* 15(5): 569-574.

Afsharpour, M., F. T. Rad and H. Malekian (2011) New cellulosic titanium dioxide nanocomposite as a protective coating for preserving paper-art-works. *Journal of Cultural Heritage* 12(4): 380-383.

Ashadi, R. W., K. Shimokawa and K. Ogawa (1996) The mechanism of enzymatic cellulose degradation (II). Mode of action of cellulose hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* UC. *Journal of General and Applied Microbiology* 42(2): 103-108.

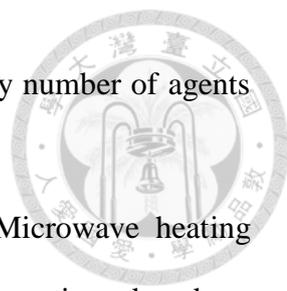
Ballard, M. W. and N. S. Baer (1986) Ethylene oxide fumigation: Results and risk assessment. *Restaurator* 7(4): 143-168.

Bang, K. H., D. W. Lee, H. M. Park and Y. H. Rhee (2000) Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by *trans*-cinnamaldehyde. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64(5): 1061-1063.

Bard, M., M. Albrecht, N. Gupta, C. Guynn and W. Stillwell (1988) Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* 23(6): 534-538.

Barnard, J. E. and H. de R. Morgan (1903) Upon the bactericidal action of some ultra-violet radiations as produced by the continuous-current arc. *Proceedings of the Royal Society of London* 72(477-486): 126-128.

Becerril, R., R. Gomez-Lus, P. Goni, P. Lopez and C. Nerin (2007) Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(5): 1003-1011.

- 
- Berenbaum, M. C. (1978) A method for testing for synergy with any number of agents  
The Journal of Infectious Diseases 137(2): 122-130.
- Bradshaw, S. M., E. J. Van Wyk and J. B. De Swardt (1998) Microwave heating  
principles and the application to the regeneration of granular activated carbon.  
Journal of the South African Institute of Mining and Metallurgy 98(4): 201-210.
- Chang, S. T., S. Y. Wang, C. L. Wu, Y. C. Su and Y. H. Kuo (1999) Antifungal  
compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania*  
(*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* 53(5): 487-490.
- Charles, D. J. and J. E. Simon (1992) A new geraniol chemotype of *Ocimum*  
*gratissimum* L.. *Journal of Essential Oil Research* 4(3): 231-234.
- Chou, T. C. and P. Talalay (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the  
combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme*  
*Regulation* 22: 27-55.
- Chou, T. C. (2011) The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green  
bio-research. *Integrative Biology* 3(5): 548-559.
- Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*  
*Reviews* 12(4): 564-582.
- Craig, R. (1986) Alternative approaches to the treatment of mould biodeterioration - an  
international problem. *The Paper Conservator* 10(1): 27-30.
- Cristani, M., M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M. G. Sarpietro, D. Micieli, V.  
Venuti, G. Bisignano, A. Saija and D. Trombetta (2007) Interaction of four  
monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for  
their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15):  
6300-6308.

Devi, K. P., S. A. Nisha, R. Sakthivel and S. K. Pandian (2010) Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130(1): 107-115.

Devi, K. P., R. Sakthivel, S. A. Nisha, N. Suganthy and S. K. Pandian (2013) Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. *Archives of Pharmacal Research* 36(3): 282-292.

EC (2008) Regulation (EC) No 689/2008 of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 concerning the export and import of dangerous chemicals. *Official Journal of the European Union* L204/1, 17 June 2008.

Fabbri, A. A., A. Ricelli, S. Brasini and C. Fanelli (1997) Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 39(1): 61-65.

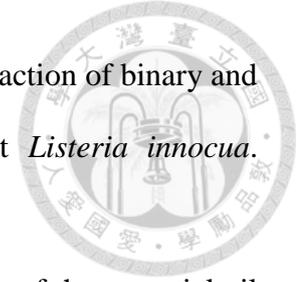
Farag, R. S., Z. Y. Daw, M. A. Sidky Mahassen and H. Mohamed Saffaa (1998) Biochemical and biological studies on some tea trees (*Melaleuca* spp.) essential oils. *Advances in Food Sciences* 20(5-6): 153-162.

Farag, R. S., A. S. Shalaby, G. A. El-Baroty, N. A. Ibrahim, M. A. Ali and E. M. Hassan (2004) Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research* 18(1): 30-35.

Farsam, H., M. Amanlou, M. R. Radpour, A. N. Salehinia and A. Shafiee (2004) Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzistanica* Jamzad from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 19(4): 308-310.

Fontenelle, R. O. S., S. M. Morais, E. H. S. Brito, R. S. N. Brilhante, R. A. Cordeiro, Y. C. Lima, N. V. G. P. S. Brasil, A. J. Monteiro, J. J. C. Sidrim and M. F. G. Rocha (2011) Alkylphenol activity against *Candida* spp. and *Microsporium canis*: A focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and *o*-methyl derivatives. *Molecules* 16(12): 6422-6431.

García-García, R., A. López-Malo and E. Palou (2011) Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. Journal of Food Science 76(2): M95-M100.



Gatenby, S. and P. Townley (2003) Preliminary research into the use of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) in museum conservation. AICCM Bulletin 28(1): 67-70.

Giavini, E. and E. Menegola (2010) Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? Toxicology Letters 198(2): 106-111.

Gill, A. O. and R. A. Holley (2004) Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology 70(10): 5750-5755.

Guarda, A., J. F. Rubilar, J. Miltz and M. J. Galotto (2011) The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. International Journal of Food Microbiology 146(2): 144-150.

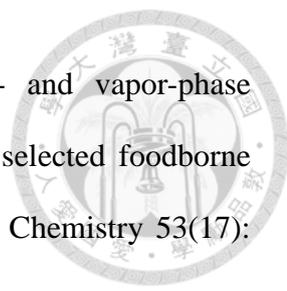
Gutarowska, B., J. Skora, K. Zduniak and D. Rembisz (2012) Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. International Biodeterioration and Biodegradation 68: 7-17.

Hearne, D. G. and S. J. Shrager (2004) Ethylene Oxide Commercial Sterilization and Fumigation Operations NESHAP-Implementation Document, United States Environmental Protection Agency, United States. 70 pp.

Higueras, L., G. López-Carballo, R. Gavara and P. Hernández-Muñoz (2014) Reversible covalent immobilization of cinnamaldehyde on chitosan films via schiff base formation and their application in active food packaging. Food and Bioprocess Technology 8(3): 526-538.



- Isao, K., M. Himejima and H. Muroi (1991) Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elattaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39(11): 1984-1986.
- Isbell, L. H. (1997) The effects of thymol on paper, pigments, and media. *The Abbey Newsletter* 21(3): 39-43.
- Jahangeer, S., N. Khan, S. Jahangeer, M. Sohail, S. Shahzad, A. Ahmad and S. A. Khan (2005) Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pakistan Journal of Botany* 37(3): 739-748.
- Jantan, I. b., M. S. M. Yassin, C. B. Chin, L. L. Chen and N. L. Sim (2003) Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae Species. *Pharmaceutical Biology* 41(5): 392-397.
- Khan, A., A. Ahmad, F. Akhtar, S. Yousuf, I. Xess, L. A. Khan and N. Manzoor (2010) *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology* 161(10): 816-823.
- Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong and M. H. Cho (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3(1): 95-101.
- Leong, S. L., A. D. Hocking and E. S. Scott (2006) Effects of water activity and temperature on the survival of *Aspergillus carbonarius* spores *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* 42(4): 326-330.
- López-Malo, A., S. Maris Alzamora and E. Palou (2005) *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99(2): 119-128.

- 
- Lopez, P., C. Sanchez, R. Batlle and C. Nerin (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(17): 6939-6946.
- Markowska-Szczupak, A., K. Ulfig and A. W. Morawski (2011) The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: An overview. *Catalysis Today* 169(1): 249-257.
- Matan, N., H. Rimkeeree, A. J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan and M. Parker (2006) Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107(2): 180-185.
- Neri, F., M. Mari and S. Brigati (2006) Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology* 55(1): 100-105.
- Nyberg, S. (1987) The Invasion of the Giant Spore. SOLINET Preservation Program Leaflet Number 5, Southeastern Library Network, U.S.A. 20 pp.
- Ota, Y., A. Hamada, M. Nakano and H. Saito (2003) Evaluation of percutaneous absorption of midazolam by terpenes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18(4): 261-266.
- Otoni, C. G., M. R. de Moura, F. A. Aouada, G. P. Camilloto, R. S. Cruz, M. V. Lorevice, N. Soares and L. H. C. Mattoso (2014) Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids* 41: 188-194.
- Pathania, A. S., S. K. Guru, M. K. Verma, C. Sharma, S. T. Abdullah, F. Malik, S. Chandra, M. Katoch and S. Bhushan (2013) Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. *Food and Chemical Toxicology* 62: 246-254.

Paulus, W. (2004) Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 777 pp.

Perez-Rivera, A. A., T. Hu, M. J. Aardema and J. F. Nash (2009) Evaluation of the genotoxicity of the imidazole antifungal climbazole: Comparison to published results for other azole compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672(1): 27-39.

Prakash, B., A. Media, P. K. Mishra and N. K. Dubey (2015) Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control* 47: 381-391.

Prashar, A., P. Hili, R. G. Veness and C. S. Evans (2003) Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 63(5): 569-575.

Rakotonirainy, M. S., F. Fohrer and F. Flieder (1999) Research on fungicides for aerial disinfection by thermal fogging in libraries and archives. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44(2-3): 133-139.

Rakotonirainy, M. S. and B. Lavédrine (2005) Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55(2): 141-147.

Rasooli, I., M. B. Rezaei and A. Allameh (2006) Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control* 17(5): 359-364.

Sequeira, S., E. J. Cabrita and M. F. Macedo (2012) Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 74: 67-86.

Shukla, R., P. Singh, B. Prakash and N. K. Dubey (2012) Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control* 25(1): 27-33.

Spidhar, S. R., R. V. Rajagopal, R. Rajavel, S. Masilamani and S. Narasimhan (2003) Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(26): 7596-7599.

Srivastava, A. K., S. K. Srivastava and K. V. Syamsundar (2005) Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 51-53.

Stupar, M., M. L. Grbic, A. Dzamic, N. Unkovic, M. Ristic, A. Jelikic and J. Vukojevic (2014) Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany* 93: 118-124.

Ultee, A., M. H. J. Bennik and R. Moezelaar (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1561-1568.

Van Vuuren, S. F. and A. M. Viljoen (2007) Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal* 22(6): 540-544.

Vermeulen, E., K. Lagrou and P. E. Verweij (2013) Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Current Opinion in Infectious Diseases* 26(6): 493-500.

Wagner, H. and G. Ulrich-Merzenich (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Journal of Natural Remedies* 9(2): 121-141.

Woo, I. S., I. K. Rhee and H. D. Park (2000) Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 2243-2247.

Xu, J., F. Zhou, B. P. Ji, R. S. Pei and N. Xu (2008) The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47(3): 174-179.

Zhou, F., B. Ji, H. Zhang, H. Jiang, Z. Yang, J. Li, J. Li and W. Yan (2007) The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety* 27(2): 124-133.



## 柒、附錄



附錄 1 濾紙經協同配方處理後的顏色變化

Formulation	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta YI$	BR (%)
Untreated	-	-	-	-	-
Control	$0.0 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.1$	$0.1 \pm 0.2$	$99.9 \pm 0.3$
Car-Cin 1:3	$-0.1 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.0$	$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$	$99.9 \pm 0.3$
Cin-Eug 3:1	$-0.1 \pm 0.1$	$-0.2 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.3$	$99.7 \pm 0.4$
Cin-Ger 3:1	$-0.1 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.1$	$99.6 \pm 0.4$

附錄 2 宣紙接觸協同配方處理濾紙後並於室內放置 14 天後的顏色變化

Formulation	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta YI$	BR (%)
Untreated	-	-	-	-	-
Car-Cin 1:3	$-0.3 \pm 0.1$	$0.1 \pm 0.1$	$-1.0 \pm 0.4$	$8.8 \pm 0.8$	$99.3 \pm 0.2$
Cin-Eug 3:1	$0.1 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.0$	$0.3 \pm 0.6$	$10.9 \pm 1.0$	$100.3 \pm 0.3$
Cin-Ger 3:1	$0.1 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.5$	$10.3 \pm 0.9$	$100.2 \pm 0.3$

附錄 3 道林紙接觸協同配方處理濾紙後並於室內放置 14 天後的顏色變化

Formulation	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta YI$	BR (%)
Untreated	-	-	-	-	-
Car-Cin 1:3	$0.0 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.0$	$-0.2 \pm 0.1$	$9.5 \pm 0.1$	$100.0 \pm 0.2$
Cin-Eug 3:1	$0.0 \pm 0.1$	$-0.1 \pm 0.0$	$-0.2 \pm 0.1$	$9.5 \pm 0.1$	$100.0 \pm 0.1$
Cin-Ger 3:1	$0.0 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.0$	$-0.3 \pm 0.1$	$9.3 \pm 0.1$	$100.1 \pm 0.2$