

編號：CCMP95-TP-044

樟芝栽培與其抗癌活性之研究

張懿欣

中山醫學大學

摘 要

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是臺灣特有褐腐菌，只能生長在臺灣常綠闊葉樹—牛樟(*Cinnamomum kanehirae*)的內壁。牛樟芝氣味芳香，味辛苦，子實體富含多醣體與三萜類等成分，有抗 B 型肝炎與防癌等功效。基於其功效以及野生牛樟芝子實體數量極少，加上人工栽培不易等因素，所以價格昂貴；業者往往為了採取野生牛樟芝而大肆盜伐牛樟樹，使臺灣特有珍貴樹種瀕臨滅絕，破壞森林多樣性與生態平衡。本實驗室之研究以建立藥用牛樟芝人工培養技術及篩選並應用研發藥用牛樟芝成分抗癌活性相關產品為主要研究目的。第一階段以嘉義大學林產科學系與森林暨自然資源學系為主，研發並建立最佳之牛樟芝人工培養條件與技術。第二年則由中山醫學大學和弘光科技大學負責，以醫學生物角度出發，分析鑑定第一階段實驗室之人工栽培牛樟芝抗癌活性功效的成分。此外，本實驗室也探討靈芝與黑木耳萃取液之抗癌活性，並比較此兩種菇類與牛樟芝之抗癌活性。研究結果顯示，最佳樟芝菌絲體人工培養基為含有 8 g/L 瓊脂濃度之 MPA 配方；而最佳之培養生長條件為中性或弱酸性 pH 值，培養溫度為 30°C。本實驗室並首度發現添加米糠可有效促進樟芝在太空包培育中的生長，而且樟芝可在含有相思樹配方的太空包基質中形成原質。本實驗室利用細胞生長曲線、DNA 斷裂分析與癌細胞在半固態培養基上的群落分析等研究法多方面探討人工栽培樟芝的功效。樟芝發酵液、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取物都可抑制人類 H1299 肺癌細胞株、HepG2 肝癌細胞株與 CaCO2 大腸結腸癌細胞株的生長；但以樟芝發酵液抑制癌細胞生長的效果較佳。抑制癌細胞生長之活性比較，以樟芝發酵液的抗癌功效最佳，其次為樟芝甲醇萃取物、靈芝水萃物、黑木耳水萃物與樟芝水萃物。本實驗室也利用 DNA 斷裂分析探討上述萃取物是否可誘發癌細胞之細胞自戕作用(apoptosis)，達到抑制癌細胞生長的效果。實驗結果顯示樟芝發酵液、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取物都可以使 H1299、HepG2 與 CaCO2 之 DNA 產生斷裂，其中又以樟芝水萃物與甲醇萃取物誘發癌細胞 DNA 斷裂的情形較為顯著。而癌細胞在半固態培養基的群落分析方面，H1299 在含有樟芝發酵液、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取的半固態培養基中，隨著發酵液與萃取物濃度增高，細胞株群落形成數隨之遞減；但高濃度樟芝發酵液與樟芝水萃物可完全抑制 H1299 在半固態培養

基中形成細胞株群落。綜合本實驗室上述實驗結果，樟芝發酵液抑制癌細胞生長功效較佳；由 DNA 斷裂分析得知樟芝水萃物與甲醇萃取物則可較有效地誘發癌細胞之細胞自戕作用，而樟芝發酵液與樟芝水萃物則可有效抑制癌細胞在半固態培養基中形成細胞株群落的活性。本實驗室之研究成果不但已建立牛樟芝的最佳人工栽培條件與技術，並已證實在實驗室利用人工栽培之牛樟芝具有抗腫瘤細胞生長與誘發細胞自戕作用的活性。未來本實驗室將以上述實驗結果為基礎，進一步探討人工栽培牛樟芝抗癌活性與增進人體免疫作用之作用機制，同時也將分析其活性成分，研發相關之抗癌保健產品。

關鍵詞：牛樟芝、人工栽培、樟芝萃取液、抗癌活性成分分析

Number: CCMP95-TP-044

Study on the Culture Techniques and Anti-Tumor Activities of *Antrodia Cinnamomea*

Yih-Hsin Chang, Ph.D.

Chung Shan Medical University

ABSTRACT

Antrodia cinnamomea is a unique brown-rot fungus species which only parasitizes in the decayed heart wood of stout camphor (*Cinnamomum kanehirae*) in Taiwan. The fruiting body of *A. cinnamomea* contains abundant polysaccharrides and terpenes that are proved to have effective anti-viral function and anti-tumor activity. The price of *A. cinnamomea* therefore rocketed in the market and it has become the target of illegal harvesting. Consequently, *C. kanehirae* has become an endangered species in Taiwan due to the illegal felling. The present proposal is divided into 2 stages: the first stage is aimed to develop optimal culture conditions and techniques for cultivating *A. cinnamomea*. The second stage is to identify and compare the effective and active anti-tumor component(s) of cultured *A. cinnamomea*, and commercial available *Ganoderma* and *Auricularia* by the first stage. The active components and the ratio of active metabolites of *A. cinnamomea* derived from Lab. culture will be further analyzed. The purpose of this study was to investigate the anti-tumor components from *A. cinnamomea* to induce apoptosis in human liver, lung and intestine cancer cells. In addition to compare the anti-tumor components of cultured *A. cinnamomea* with *Ganoderma* and *Auricularia*. The results showed that the MPA we used was containing 8 g/L agar, and cultured in the 30°C, neutral or weak-acid condition. Mycelium could be promoted growth by rice bran and be formed the mycelium substrate in the space package which containing the prescription of *Acacia confuse*. Treatment of H1299, HepG2 and CaCO2 cells with *A. cinnamomea* extracts resulted in dose and time-dependent sequences of events marked by apoptosis, as evidenced by cell viability, DNA fragmentation and the assay of clonogenicity. The results showed that the fermented liquid, water and methanol-extracted *A. cinnamomea* can suppress the growth of the cancer cells. Our finding suggested that fermented liquid of *A. cinnamomea* have better anti-tumor effect than methanol-extracted *A. cinnamomea*,

water-extracted *Ganoderma*, water-extracted *Auricularia* and water-extracted *A. cinnamomea*. In DNA fragmentation assay, water-extracted and methanol-extracted *A. cinnamomea* have significant expression. Treatment of H1299 cell with *A. cinnamomea* extracts resulted in colony inhibition which was accompanied by dose-dependent manner. Analysis of the study data suggests that We not only develop optimal culture conditions and techniques for cultivating *A. cinnamomea*, but also demonstrate the *A. cinnamomea* extracts suppress the growth of the cancer cells and induce cell apoptosis. It may possess anti-tumor properties potentially valuable for application in health products.

Keywords: *Antrodia cinnamomea*, anti-tumor activities, DNA fragmentation

壹、前言

一、食藥用真菌菇類簡介

市場上常見的食用菇類種類繁多，常見的人工栽培菇類有洋菇 (*Agaricus bisporus*)、香菇 (*Lentinus edodes*) 及秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*) 等。此外，靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*)、舞菇 (*Grifola frondosa*)、牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 等都是具有保健機能且具保健食品發展潛力的藥用菇類(王伯徹等，1994)。

藥用真菌在中國的傳統藥草中佔有極重要的角色，近三十年來經過多方的努力研究，透過菌種分離培養、液態發酵技術、藥理分析、毒性試驗及臨床研究，已發展出二十餘種商業化產品。這一些藥用真菌成分大多是無毒或是低毒性的免疫促進劑--多醣體，可以增加免疫力，強化身體健康。

二、採用人工培養技術開發真菌次級代謝物之重要性

市場上大多採用發酵技術生產食藥用菇類相關產品的方式。目前商業上較常被應用的是液體發酵技術，發酵槽體積已超過五萬公升。然而液體培養真菌與天然栽培子實體的代謝不同，所以液體發酵多半只能生產以多醣體為主要成分之真菌初級代謝物，無法獲得大量具生物活性的真菌次級代謝物。真菌次級代謝物種類較多，結構變化也較大，有寬廣而值得開發的生物醫藥活性(王聲遠、蕭明熙，2001)。研究已顯示固態發酵是一種較接近天然栽培的技術，可培養出有效成分濃度遠高於液體發酵的真菌，因此具有很高的商業化潛力。

三、牛樟芝背景簡介

牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 俗稱牛樟菇，是屬於褐腐菌之臺灣特有真菌，牛樟芝的生長有宿主專一性，只能生長在臺灣的常綠闊葉樹—牛樟 (*Cinnamomum kanehirae*)。牛樟芝亦有取自沉水樟 {*Cinnamomum micranthum* (Hay.) Hay.} 腐朽心材之內壁(Yang *et al.*, 1996)。牛樟芝氣味芳香，味辛苦，早期原住民以牛樟芝解酒醒腦，甚至患有重症的原住民服食牛樟芝後竟然不藥而癒(臺灣原住民藥用植物彙編, 2000; 臺灣原住民藥用植物彙編(二版), 2001; 臺灣原住民藥用植物彙編(三版), 2002; 臺灣原住民藥用植物彙編(英文版), 2003)。此後牛樟芝的功效即廣被流傳，並素有「靈芝之王」美譽；此外，因牛樟芝子實體呈橘褐色，又稱為「臺灣紅寶石」(臺灣常用藥用植物圖鑑〈二〉、〈三〉, 2004)。

研究證實牛樟芝子實體富含多醣體 (polysaccharides)、倍半萜 (sesquiterpenes)、三萜類 (triterpenes)、類固醇 (steroids)、酚與二酚衍生物等

成分(Chiang *et al.*, 1995; Cherng *et al.*, 1995; Cherng *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996), 除了有靈芝的優點, 也有抗B型肝炎(陳建志等人, 2001)、抗氧化與防癌(Lee *et al.*, 2002)等功效。因此牛樟芝的抗肝炎病毒及抗腫瘤功效逐漸確立, 不再僅是民俗療方; 使牛樟芝成為極具學術研究價值與生物利用潛力的藥用真菌而在市場上奇貨可居, 變成盜伐者趨之若鶩的對象。

四、已知的牛樟芝活性成分

(一)多醣體

多醣體是目前藥用真菌市場上的主要產品。牛樟芝多醣體含量約為1-2%, 主要成份為 β -D-glucan, 已證實是一種可有效刺激人體免疫系統反應, 對抗腫瘤的生物反應調節劑(Kitamura *et al.*, 1994)。多醣體之主要的功效包括增進免疫系統細胞間的訊息傳遞、活化巨噬細胞的吞噬作用與誘發補體活化反應、促進免疫細胞分泌介白素(如 interleukin-1, IL-1 與 IL-2)及干擾素(γ -interferon, IFN- γ)等提升免疫作用之細胞激素, 增強宿主免疫機能, 抑制癌細胞增殖。

(二)三萜類

萜類(terpene)化合物是碳氫化合物或脂質經代謝而產生的物質, 以異戊二烯為單體單元, 分子式為 $(C_5H_8)_n$; 由六個異戊二烯單體聚合而成的化合物稱為三萜(triterpenes; 肖崇厚等, 1989)。

靈芝子實體含有上百種三萜類化合物, 其中靈芝酸具有抑制肝癌細胞的活性(Zhong *et al.*, 2001)。牛樟芝子實體的三萜類含量約占10-45%, 而靈芝的三萜類含量僅約1-3%。牛樟芝三萜類具有抗腫瘤及抑制癌細胞生長以及活化神經細胞生長的功效。

(三)其他物質

牛樟芝還含有核苷酸、超氧歧化酵素、維生素B、菸鹼酸、礦物質、蛋白質等成分。腺苷有抑制血小板凝結的作用(抗血栓作用; 李奇翰, 2001); 超氧歧化酵素可迅速將超氧自由基轉換為過氧化氫而有抗氧化的效果(毛正倫等, 2003)。另外, 牛樟芝也含鈣、磷、鋅、鐵等多種礦物質(吳德鵬, 1995)。

五、牛樟芝之需求與醫療保健及產業之相關性

天然牛樟芝只生長在臺灣特有樹種牛樟樹上, 所以也僅在臺灣才能採到天然牛樟芝。目前市面上的牛樟芝產品多是僅含菌絲體萃取物(多為多醣體)的食用膠囊, 現今人工栽培技術仍無法成功的大量栽培牛樟芝。產業界雖然常應用已臻成熟的液體發酵技術生產食藥用牛樟芝成分產品, 發酵槽

體積也已超過五萬公升以上，但由於液體培養真菌與天然栽培真菌的代謝作用不同，所以液體發酵無法取得如同天然栽培藥用真菌子實體生物藥理活性較佳的次級代謝物。固態發酵是較接近天然栽培真菌的培育技術，培養出的有效真菌成分濃度遠高於液體發酵產品，因此有高度商業化潛力。

基於牛樟芝之功效以及野生牛樟芝子實體數量極少，加上牛樟芝人工栽培不易等多項因素，所以牛樟芝價格昂貴。業者往往為了採取野生牛樟芝而大肆盜伐牛樟樹，使臺灣特有珍貴樹種瀕臨滅絕的危機，這種行為不僅使違法者獲利，喪失法律尊嚴，甚至更破壞森林多樣性與生態平衡。此外，目前市面上牛樟芝產品以多醣體為主要成份，因此本研究計畫希望建立實驗室牛樟芝之人工栽培條件與技術，配合生物技術分析實驗室人工栽培牛樟芝具抗癌活性的成分，降低成本大量生產具有高濃度抗癌活性成分的牛樟芝產品。本研究計畫目標不但符合藥用植物資源開發研究類之研究重點項目：藥用菇菌微藻之研究與開發的研究目的，研究成果可提供臺灣本土特有藥用菇菌之文獻資料相關資訊、建立藥用菇菌之最佳人工栽培條件與技術，並根據抗癌活性之分析，進行人工培養及篩檢研發符合市場需求的牛樟芝保健產品，符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標(行政院衛生署中醫藥委員會成立六週年特刊—臺灣中醫藥未來的發展與策略, 2001)。使一般大眾可享有物美價廉之保健食品，符合社會大眾與市場需求以及推動推廣中草藥產業之目標；更可有效遏止大肆盜伐牛樟樹，以挽救臺灣特有珍貴樹種牛樟樹，避免瀕臨滅絕的命運。此外，更可透過研發發掘並進一步發展新穎之牛樟芝抗癌活性成分與製程。

貳、材料與方法

第一階段：探討並建立最佳之牛樟芝人工培養條件與技術

第一階段觀察牛樟芝在各種培養條件(營養、環境、刺激添加物、樹種基質)的生長情形，建立最佳牛樟芝之人工栽培條件。

一、試驗材料

(一)試驗菌株：由林試所生物組張東柱博士提供牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* Chang T T & W N Chou 菌體(採集於高雄縣六龜鄉)。

(二)固態培養基備製：秤取下列配方加入去離子水，將培養液倒入燒瓶，放置於高溫高壓滅菌釜中蒸煮(溫度 121°C、壓力 1.5 kg/cm²、30 分鐘)，進行滅菌。滅菌後將培養液倒入培養皿內(25cc)，待冷卻凝固即完成培養基製備。

1.PDA 培養基：主要成份為馬鈴薯去皮液(potato) 200 g、葡萄糖(glucose) 20 g/L 及瓊脂(agar) 20 g/L。

2.MPA 培養基：主要成份為麥芽抽出物(malt extract) 30 g/L、蛋白胨(peptone) 5 g/L 及瓊脂 15 g/L。

3.PDA⁺培養基：主要成份為馬鈴薯去皮液 200 g、葡萄糖 20 g/L、瓊脂 20 g/L、磷酸二氫鉀(potassium phosphate) 3 g/L、維他命 B1 (thiamine) 10 mg 及硫酸鎂(magnesium sulphate) 1.5 g/L。

4.MPA⁺培養基：主要成份為麥芽抽出物 30 g/L、蛋白胨 5 g/L、瓊脂 15 g/L 磷酸二氫鉀 3 g/L、維他命 B1 10 mg 及硫酸鎂 1.5 g/L。

二、試驗方法

(一)培養基種類與瓊脂濃度對樟芝生長的影響：備製下列成分之培養基，於無菌操作臺中用解剖刀分別將樟芝菌絲體分割為 5mm × 5mm 大小，分別將樟芝菌絲體接種至培養基中心並加以密封，置於生長箱中以 25±1°C 培養。每隔 2 天測量菌絲之生長半徑(mm)，測量至第七週，並且推算其生長速率及其生長指數。

1. 培養基影響：備上述 4 種固態培養基(直徑 85mm)。

2. 瓊脂濃度對樟芝菌絲體的影響：在 MA (malt extract 30 g/L、agar 15 g/L)培養基中以 1 g/L 瓊脂濃度為單位，分別製備含有 8 ~15 g/L 瓊脂的 MA 培養基。

(二)環境因子對樟芝生長的影響：於無菌操作臺中用解剖刀分別將樟芝菌絲體分割為 5mm × 5mm 大小，分別將樟芝菌絲體接種至培養基中心並加以密封，置於下列環境條件中培養。每隔 2 天測量菌絲之

生長半徑(mm)，測量至第七週，並且推算其生長速率及其生長指數。

1. 溫度：分別放置 10°C、15°C、20°C、25°C、30°C 與 35°C 培養。
2. pH 值：將培養基 pH 值分別調至 4、5、6、7、8 與 9。

(三) 不同容器之培育

1. 試管生長：試管中放置 75% 牛樟木粉 + 25% 米糠 + 200% MPA 培養液。將木粉、米糠摻摻在一起後於攪拌箱內均勻攪拌，並加入已製備好的 200% 培養液。即可將調配好的基質裝入試管內，每支試管(202 mm)內容物重量約為 50g。滅菌完成後，即可進行接種。並測試瓊脂與蛋白胨濃度對樟芝生長的影響。
2. 不同樹種太空包生長：本試驗選定一般市面常見的樟樹 (*Cinnamomum camphora*)、大葉桃花心木 (*Swietenia macrophylla*) 以及相思樹 (*Acacia confuse*) 等樹種材料製成太空包，比較各種樹種太空包與牛樟 (*Cinnamomum kanehirae*) 太空包種植牛樟芝的情形，找尋可供牛樟芝生長所需之替代樹種。太空包基質之成分為 75 % 木粉 + 25 % 米糠 + 200 % MPA 培養液，製備方法與如 (a) 所述。

三、統計分析及計算

統計分析以 SPSS 10.0 版本為主，進行變異數分析 (analysis of variance)，並以 Duncan's test 來檢定不同處理時的顯著差異效果。生長速率及生長指數可以判斷菌種之生長活力。生長指數方面，與控制組互相比較之後，如果所呈現的數值越大，即代表生長效果越佳；生長速率所呈現的值越高，代表促進的生長速度越快。

$$\text{生長指數(\%)} = \frac{\text{實驗組生長半徑}}{\text{對照組生長半徑}} \times 100 \%$$

$$\text{生長速率(\%)} = \frac{\text{生長半徑}}{\text{實驗天數}}$$

第二階段：分析鑑定實驗室栽培牛樟芝萃取液的抗癌功效與活性

一、試驗材料

(一) 牛樟芝、靈芝與黑木耳萃取液製備

以嘉義大學林產科學系與森林與自然資源學系於第一階段在實驗室利用固態栽培之牛樟芝為試驗材料，首先將培養於三角瓶中之樟芝子實體與培養液分開，將所得培養液離心處理 (4°C, 8000 rpm 15 分鐘) 後，取上清液，再以冷凍乾燥機處理為粉末狀態，此及為樟芝發酵液萃取物。樟芝子實體經水洗及冷凍乾燥處理，取 10g 以均質機打成碎片，加入 2L 之去離子水，再以超音

波破碎機處理以破碎細胞壁，將處理完之液體裝入三角瓶中，置於震盪箱中以 30 °C 萃取 24hr，以 Whatman#2 濾紙抽氣過濾，過濾液用冷凍乾燥機處理為粉末狀態，此及為樟芝水萃物。

取 10g 以均質機打成碎片，加入 2L 之 99 % 甲醇，再以超音波破碎機處理以破碎細胞壁，將處理完之液體裝入三角瓶中，置於震盪箱中以 30 °C 萃取 24hr，以 Whatman#2 濾紙抽氣過濾後，再以減壓濃縮機濃縮至乾，得膏狀物，此及為樟芝甲醇萃取物。靈芝與黑木耳材料製備同上。

(二) 癌症細胞株

本實驗將以 2005 年衛生署癌症死因統計之前三名：肺癌(H1299 非小細胞肺癌)、肝癌(HepG2 肝癌細胞)與大腸癌(CaCO2 結腸腺細胞癌)為實驗細胞模式，探討牛樟芝萃取液的抗癌功效。

二、試驗方法

將上述癌細胞株以含有不同濃度的樟芝萃取物在 37 °C 培養 24~72 小時後，以下列方式分析牛樟芝蛋白質萃取液的抗癌活性。

(一) 細胞生長曲線

將細胞種在含有樟芝萃取物之後，每隔 24 小時計算總細胞數，並以 trypan blue 染色計算活細胞數目；紀錄上述數據，作圖了解每種癌細胞株在樟芝條件培養基中的生長情形。

(二) DNA 斷裂分析

將細胞置於含有 0.5 ml lysis buffer (10 mM Tris buffer pH8.0、100 mM NaCl、0.5 % SDS、25 mM EDTA, pH8.0)的試管中，並加入 10µl 的 proteinase K (10 mg/ml)，置於 56°C 作用 18 小時，使細胞完全水解。再以 0.5 ml phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)溶液萃取 3 次，取上清液加入 1/10 倍體積的 3 M NaOAc (pH5.2)及 2 倍體積的 ice cold 100 % 酒精，將 DNA 沉澱出，並以 1.5% agarose gel 電泳法檢測 DNA 斷裂情形。

(三) 半固態培養基上的細胞株落數分析 (assay of clonogenicity)

將細胞種在含有樟芝萃取物的半固態培養基上，在 37 °C 培養 14~21 天，觀察細胞生長之情形。

三、統計分析及計算

統計分析以 SPSS 10.0 版本為主，進行變異數分析，並以 Duncan's test 來檢定不同處理時的顯著差異效果。

參、結果

第一階段

一、不同配方對生長指數與生長速率的關係

實驗結果如表 1 所示。首先在 PDA 及 MPA 實驗方面，菌絲在培養五週之後，PDA 培養基中菌絲的生長半徑為 $19.46 \pm 2.30 \text{mm}$ ；MPA 培養基中菌絲的生長半徑為 $30.68 \pm 0.95 \text{mm}$ 。然而在相同的培養條件下時，再添加磷酸二氫鉀、維他命 B₁ 及硫酸鎂至培養基中時發現，PDA⁺配方可使樟芝菌絲生長半徑增加 4.8mm。PDA⁺配方的生長速率也增加了 0.13mm/day，生長指數上升了 25%。MPA⁺配方樟芝菌絲生長半徑僅只增加 0.12mm，生長速率與生長指數幾乎是有增加的。在這個實驗得知，總體來說，MPA 配方的培養基各方面的評估指數都比 PDA 配方的培養基來的好。在 PDA 培養基中添加磷酸二氫鉀、維他命 B₁ 及硫酸鎂時，是有助於樟芝菌絲的生長，相對的，在 MPA 培養基中添加上述營養物質時，對樟芝菌絲生長的幫助有限。

二、不同瓊脂濃度對生長指數與生長速率的關係

培養基中瓊脂不同濃度表示其培養基中營養物質的軟硬程度或是水分含量的多寡。而在這個項目的實驗中，將培養基的瓊脂含量逐次的由 15 g/L 降低至 8 g/L，藉由不同瓊脂含量來觀察樟芝菌絲體的生長。在這個實驗中的結果，如表 2 所示。在五週的實驗中，培養基中以 8 g/L 的樟芝菌絲體生長為最佳，生長半徑可以達到 $31.42 \pm 0.4 \text{mm}$ 。生長指數與生長速率皆比對照組的數據來的高，約為增加 14%。在固態培養基中減少瓊脂的含量時，可促進樟芝菌絲體的外擴生長(簡秋原等人，1997)。

三、不同 pH 值對樟芝生長速率的關係

為了瞭解不同 pH 值對樟芝菌絲生長半徑及生長速率方面的差異，分別的製備 pH4、5、6、7、8、9 的固態培養基來觀察菌絲生長。經過五週的觀察時間後結果如表 3 所示。試驗中發現菌絲在弱酸性及中性環境時菌絲的平均生長半徑大於酸性環境及鹼性環境，平均值達到 28.6mm，比酸性或是鹼性環境高出了約為 2mm；在酸性環境及鹼性環境時，樟芝菌絲體的生長速率並沒有差異，約為 0.75mm/day，但是在弱酸性及中性環境培養樟芝菌絲體時，生長速率約為 0.82mm/day，比酸性及鹼性環境高出來 0.07mm/day。

四、不同溫度對樟芝生長速率的關係

為了瞭解不同溫度對樟芝菌絲生長半徑及生長速率方面的差異，分別將固態培養基放置於 10°C、20°C、25°C、30°C、35°C 等不同溫度下培養觀察菌絲生長。經過五週的觀察時間後結果如表 4 所示。平均生長速率以

30°C>25°C>20°C>15°C>35°C>10°C。從生長速率可知，30°C是較適合樟芝菌絲生長，生長速率達到0.97mm/day；當溫度超過30°C時，生長速率急速下降，約為0.24mm/day，這可能是樟芝該菌種並不是屬於嗜高溫菌，所以當培養溫度過高時，是會阻礙樟芝該菌種的生長；相對的，當將培養的溫度降低時，雖然生長速率不及25°C及30°C時那麼高，但是平均來說，生長速率約為0.50mm/day，生長指數也約為下降50%，但是在低溫時培養的樟芝菌絲顏色也較為深紅。在樟芝固態培養基中，MEA配方在30°C時的生長為最佳，且當溫度超過30°C時，樟芝菌絲生長速率會急速下降(張東柱、曾顯雄，2000)。

五、不同溫度對樟芝菌絲的菌落觀察

在不同溫度對樟芝菌絲體生長的菌落觀察方面，如圖1所示。樟芝菌絲體在10°C時是完全無法生長的，在其他溫度下，樟芝菌絲體皆可生長。樟芝在低溫培養時發現菌絲所呈現的顏色是鮮紅，隨著溫度的降低顏色也隨之加深；但相對的，當溫度在20°C以上時，樟芝菌絲所呈現的顏色為淡橘色，隨著培養溫度上升，菌絲所呈現的顏色也越來越淡。當溫度達到35°C時，樟芝菌絲所呈現的顏色為淡黃色。

六、不同樹種對菌絲生長影響

在此實驗中，分別使用牛樟、樟樹、桃花心木及相思樹做為太空包中木粉的來源，以便找出可作為樟芝唯一宿主-牛樟的替代數種，以免牛樟受到不肖商人之盜伐。在這實驗中，分別將樟芝接種至各個不同樹種配方的太空包中，培育30天後，結果如表5所示。樟芝在樟樹配方及桃花心木配方皆無法生長；但在牛樟配方及相思樹配方下，樟芝母株可以順利生長，且所培育出的菌絲皆可由初期的白色轉為橘色。當牛樟配方及相思樹樹配方太空包菌絲包覆該基質後，將這二種配方分別放置於20°C的恆溫培養箱以及室溫下的培養箱中培養生長，當培育時間於60天後，發現在20°C下所培育出菌絲已有了轉變，如圖2所示。然而置放於室溫下的牛樟芝配方的太空包，在培育50週後太空包的菌絲轉為淡褐色，且原基有增厚的現象，出現了微孔狀。

第二階段

一、細胞生長曲線

利用trypan blue測試H1299、HepG2與CaCO₂對樟芝萃取物(發酵液、子實體水萃與甲醇萃)培養於6 well microplate中經24、48、72hr的生長狀況。因為細胞生長速率不同所以選用不同細胞數作為實驗的細胞數。H1299使用3x10⁴cell/ml；HepG2使用7.5x10⁴cell/ml與CaCO₂使用5x10⁴cell/ml。

結果顯示，H1299、HepG2 與 CaCO₂ 對樟芝發酵液 1 µg/ml 培養 48hr 都不會影響細胞存活率；對樟芝發酵液 50 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 67%、37%、76%；對樟芝發酵液 100 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 51%、18%、34%(圖 3、4、5)。選用樟芝發酵液 50 µg/ml 作為後續實驗的濃度。

H1299、HepG2 與 CaCO₂ 對樟芝水草物 100µg/ml 培養 48hr 都不會影響細胞存活率；對樟芝水草物 500 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 77%、79%、53%；對樟芝水草物 700 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 71%、58%、42%(圖 6、7、8)。

H1299、HepG2 與 CaCO₂ 對樟芝甲醇萃取物 500 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 57%、40%、50%；對樟芝甲醇萃取物 700 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 46%、37%、31%(圖 9、10、11)。

HepG2 對靈芝水草物與黑木耳水草物 500 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 55%、48%；對靈芝水草物與黑木耳水草物 700 µg/ml 培養 48hr 細胞存活率為 39%、34% (圖 12)。

二、DNA 斷裂分析

將 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 處理樟芝萃取物(發酵液、子實體水草與甲醇萃)培養於 10cm dish 經 48hr 之後，將細胞刮下，利用 DNA Ladder 方法觀察 DNA 斷裂的情形。

圖 14 為 H1299 細胞處理樟芝發酵液(50 µg/ml)48hr 之後 DNA 斷裂的情形，N 為 negative control 沒有處理任何藥品，P 為 positive control 利用 1µM 的 Dexamethasone 誘導細胞凋亡 (Brown et al., 1993)，S 為處理樟芝發酵液 (50 µg/ml)。結果顯示，樟芝發酵液(50µg/ml)確實會使 H1299 細胞造成 DNA 斷裂的情形。

圖 14 為 HepG2 細胞處理樟芝發酵液(50 µg/ml)48hr 之後 DNA 斷裂的情形。結果顯示，樟芝發酵液(50 µg/ml)確實會使 HepG2 細胞造成 DNA 斷裂的情形。圖 14 為 CaCO₂ 細胞處理樟芝發酵液(50 µg/ml) 48hr 之後 DNA 斷裂的情形。結果顯示，樟芝發酵液(50 µg/ml)確實會使 CaCO₂ 細胞造成 DNA 斷裂的情形。

圖 15、16、17 為 H1299、HepG2、CaCO₂ 細胞處理樟芝水草物 (700,500,300,100 µg/ml) 與樟芝甲醇萃取物(700,500,300,100 µg/ml)48hr 之後 DNA 斷裂的情形，N 為 negative control 沒有處理任何藥品，P 為 positive control 利用 1µM 的 Dexamethasone 誘導細胞 apoptosis(Brown et al., 1993)，S 為處理樟芝水草物(700, 500, 300, 100 µg/ml) 與樟芝甲醇萃取物(700, 500, 300, 100 µg/ml)。結果顯示，圖 15 樟芝甲醇萃取物 DNA ladder 的情形比樟

芝水萃物顯著。圖 16 樟芝水萃物與甲醇萃取物都有 DNA ladder 情形。圖 17 樟芝水萃物 700、500 $\mu\text{g/ml}$ 的 DNA ladder 情形較顯著。

三、半固態培養基上的細胞株落數分析(assay of clonogenicity)

將 H1299 細胞種在含有樟芝萃取物(發酵液、樟芝水萃與甲醇萃)的半固態培養基上，在 37°C 培養 14~21 天，觀察細胞生長之情形。H1299 對樟芝萃取物(發酵液、樟芝水萃與甲醇萃)之細胞生長情形(圖 18、19、20)。結果顯示，圖 18 為 H1299 培養在不同濃度樟芝發酵液(500, 300, 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$)的半固態培養基中，隨樟芝發酵液濃度愈高細胞株群落愈少，在 500、300 $\mu\text{g/ml}$ 濃度中 H1299 幾乎沒有細胞株群落，而 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的細胞株群落與控制組無顯著差異。圖 19 為 H1299 培養在不同濃度樟芝水萃物(700, 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$)的半固態培養基中，隨樟芝水萃物濃度愈高細胞株群落愈少，到 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 H1299 細胞才開始有細胞株群落的形成。圖 20 為 H1299 培養在不同濃度樟芝甲醇萃取物(700, 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$)的半固態培養基中，在 300、100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 H1299 細胞株群落明顯較控制組少。

肆、討論

本實驗分為兩階段，第一階段為探討並建立最佳之牛樟芝人工培養條件與技術；第二階段為分析鑑定實驗室栽培牛樟芝萃取液的抗癌功效與活性。在牛樟芝人工培養條件與技術方面，將取得的樟芝菌絲體配置於不同條件下去觀察樟芝菌絲體的生長情況。在營養物質方面得知，固態培養配方中 MPA 培養基的生長情況會優於 PDA 培養基；再者，將配方中的瓊脂濃度減少至 8 g/L 時，是有助於樟芝菌絲體的外擴。在環境因子方面得知，在 MPA 固態培養中培養溫度以 30 °C 培養為最佳；pH 值以中性或是弱酸性固態培養為最佳。添加米糠做為營養物質的太空包基質比未添加米糠做為營養物質的太空包基質來的較佳。太空包方面，以相思樹作為培育樟芝太空包基質時，在培育 60 天後，樟芝子實體的前驅物—原基出現。未來，若在相思樹基質中成功培育出樟芝子實體，將可避免牛樟被盜伐之虞。在牛樟芝萃取液的抗癌功效與活性方面，樟芝發酵液(100, 50 µg/ml)、樟芝水萃物(700, 500 µg/ml)與樟芝甲醇萃取物(700, 500 µg/ml)都有抑制 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞生長的效果，以樟芝發酵液較具有功效，只需 50 µg/ml 濃度就有明顯差異。而樟芝甲醇萃取物抑制癌細胞生長的效果較樟芝水萃物佳。靈芝水萃物與黑木耳水萃物 500 µg/ml 都可以抑制 HepG2 細胞的生長。兩者在抑制細胞生長上是無顯著差異。對在 DNA 斷裂分析方面，樟芝發酵液都可以使 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞造成 DNA 斷裂的情形；樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取也都可以使 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞造成 DNA 斷裂的情形。半固態培養基上的細胞株落數分析方面，H1299 培養在樟芝發酵液(500, 300, 100, 50, 10µg/ml)、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取(700, 500, 300, 100 µg/ml)半固態培養基中，隨樟芝發酵液、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取濃度愈高細胞株群落愈少，樟芝發酵液(500, 300µg/ml)幾乎沒有細胞株群落；樟芝水萃物(700, 500, 300 µg/ml) 也幾乎沒有細胞株群落，但樟芝甲醇萃取物則無此現象。

伍、結論與建議

本研究針對薄孔菌屬中樟芝在不同條件下固態培養探討與太空包子實體人工培育方法上之研討，以及實驗室栽培牛樟芝萃取液的抗癌功效與活性；菌絲體方面針對不同的營養條件、不同環境因子對樟芝菌絲體的生長影響；太空包培育方面針對樟芝添加米糠時的菌絲生長情形，並在以上述條件製備成不同樹種的太空包，藉以尋找替代牛樟之樹種。牛樟芝萃取液的抗癌功效與活性方面，針對樟芝發酵液、樟芝水萃物與甲醇萃物、靈芝水萃物與黑木耳水萃物對肺癌(H1299 非小細胞肺癌)、肝癌(HepG2 肝癌細胞)與大腸癌(CaCO₂ 結腸腺細胞癌)的生長影響。DNA 斷裂分析方面，利用不同濃度之樟芝發酵液、樟芝水萃物與甲醇萃物培養於 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞，觀察是否可以造成 DNA 斷裂的情形。半固態培養基方面，利用不同濃度之樟芝發酵液、樟芝水萃物與甲醇萃物培養於 H1299 細胞，觀察細胞株群落的生長情形。茲將研究結果整理如下：

一、菌絲體培養方面

- (一)營養添加物方面得知培養樟芝菌絲體所使用的 MPA 配方其生長速率及生長指數方面皆比 PDA 配方來的較佳；當配方中瓊脂濃度減少至 8g/L 時可以有效的使樟芝菌絲體外擴。所以最佳之生長條件應為 MPA 配方與瓊脂濃度 8 g/L。
- (二)在不同的環境因子下可得知樟芝菌絲體培養環境以 pH 值中性或是弱酸性較佳；在溫度因子方面比較得知最佳的生長溫度以 30 °C > 25 °C > 20 °C > 35 °C > 15 °C > 10 °C，並以 30 °C 溫度培養下得到最佳的生長速率。所以最佳之生長條件應為 pH 值中性或是弱酸性與溫度培養 30 °C。

二、太空包培育方面

- (一)添加米糠可以有效的作為太空包中附加的營養物質來源，且可以有效的促進太空包中菌絲生長。
- (二)太空包所選用的基質方面得知使用牛樟木粉及相思樹木粉皆可使接種後樟芝菌絲生長，進一步得知樟芝可在相思樹配方的基質中形成原質，距樟孢子實體形成的時機已跨進一大步並且可免除牛樟受到盜伐之虞。

三、細胞生長曲線

- (一)樟芝發酵液(100, 50 µg/ml)、樟芝水萃物(700, 500 µg/ml)與樟芝甲醇萃物(700, 500 µg/ml)都有抑制 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞生

長的效果，以樟芝發酵液較具有功效，只需 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度就有明顯差異。樟芝水萃物與樟芝甲醇萃物則需要 500 $\mu\text{g/ml}$ 才有效果。靈芝水萃物與黑木耳水萃物 500 $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制 HepG2 細胞的生長。兩者在抑制細胞生長上是無顯著差異。以抑制癌細胞生長的比較，樟芝發酵液 > 樟芝甲醇萃物 > 靈芝水萃物 > 黑木耳水萃物 > 樟芝水萃物。

(二)在 DNA 斷裂分析方面，樟芝發酵液(50 $\mu\text{g/ml}$)、樟芝水萃物(700,500,300,100 $\mu\text{g/ml}$)與樟芝甲醇萃物(700, 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$)都可以使 H1299、HepG2 與 CaCO₂ 細胞造成 DNA 斷裂的情形。樟芝水萃物與甲醇萃物 700, 500 $\mu\text{g/ml}$ 的 DNA ladder 情形較顯著。推論在細胞生長曲線方面，樟芝發酵液較佳；在 DNA 斷裂分析方面，樟芝水萃物與甲醇萃物較佳。

(三)半固態培養基分析方面，H1299 培養在樟芝發酵液(500, 300, 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$)、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取(700, 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$)半固態培養基中，隨樟芝發酵液、樟芝水萃物與樟芝甲醇萃取濃度愈高細胞株群落愈少，樟芝發酵液(500, 300 $\mu\text{g/ml}$)幾乎沒有細胞株群落；樟芝水萃物(700, 500, 300 $\mu\text{g/ml}$)也幾乎沒有細胞株群落，但樟芝甲醇萃物則無此現象。所以可抑制癌細胞形成細胞株群落。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-044 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 毛正倫、黃佩甯、黃仕政、陳勁初 (2003) 深層培養中牛樟菇抗氧化物產生之時程。Fungal Science 18(3,4)。
2. 王伯徹、陳啓楨 (1994) 常用食藥用菇類介紹。食品工業研究所。
3. 王聲遠、蕭明熙 (2001) 開發真菌次級代謝物為醫藥品。Fungal Science 16:1-6。
4. 吳德鵬 (1995) 牛樟菇微量成分之研究。臺灣師範大學化學研究所碩士論文。
5. 李奇翰 (2001) 靈芝抗癌之效果。國立臺灣大學醫事技術學研究所碩士論文。
6. 肖崇厚、陳蘊如 (1989) 中藥化學。上海科學技術出版社。
7. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2000) 臺灣原住民藥用植物彙編
8. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2001) 臺灣原住民藥用植物彙編 (二版)
9. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2002) 臺灣原住民藥用植物彙編 (三版)
10. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2003) 臺灣原住民藥用植物彙編 (英文版)
11. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2004) 臺灣常用藥用植物圖鑑 (二)、(三)
12. 行政院衛生署中醫藥委員會出版品 (2001) 行政院衛生署中醫藥委員會成立六週年特刊—臺灣中醫藥未來的發展與策略
13. 陳建志、陳勁初、陳清農、許勝傑、曾虹萍、盛莉莎 (2001) 牛樟菇菌絲體對B型肝炎病毒表面抗原及e抗原之活性檢測。中華民國食品科學技術學會第三十一次會員大會論文摘要。
14. 張東柱、曾顯雄 (2000) 牛樟菇之生物活性物質檢測及其初估條件探討。農委會林務局委託計畫。
15. 簡秋原、姜宏哲、陳淑貞 (1997) 牛樟菇培養性狀及三萜類成分分析之研究。牛樟生物學及育林技術研討會論文集。
16. Brown DG, Sun XM, and Cohen GM: Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. Journal of Biological Chemistry 1993;268:3037-3039
17. Cherng IH, and Chiang HC: Three new triterpenoids from *Antrodia*

- cinnamomea*. *Journal of Natural Products* 1995;58:365-371
18. Cherng IH, Wu DP, and Chiang HC: Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 1996;41:263-267
19. Chiang HC, Wu DP, Cherng IH, and Ueng CH: A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 1995;39:613-616
20. Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, and Lu MK: *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters* 2002;209:63-67
21. Kitamura S, Hori T, Kurita K, Takeo K, Hara C, Itoh W, Tabata K, Elasaeter A, and Stokke BT: An antitumor branched β -(1-3)-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydrate Research* 1994;263:111-121
22. Yang SW, Shen YC, and Chen CH: Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*—a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry* 1996;41:1389-1392
23. Zhong JJ, Tang YJ, and Fang QH: Significance of inoculation density control in production of polysaccharides and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 2001;37:1375-1379

柒、圖、表



圖1-1 10°C



圖1-2 15°C

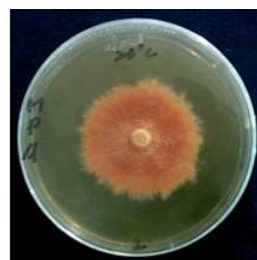


圖1-3 20°C



圖1-4 25°C



圖1-5 30°C



圖1-6 35°C

圖1 樟芝菌絲體在不同溫度下的菌落型態



圖2 太空包相思樹培養基所培育出的樟芝原基

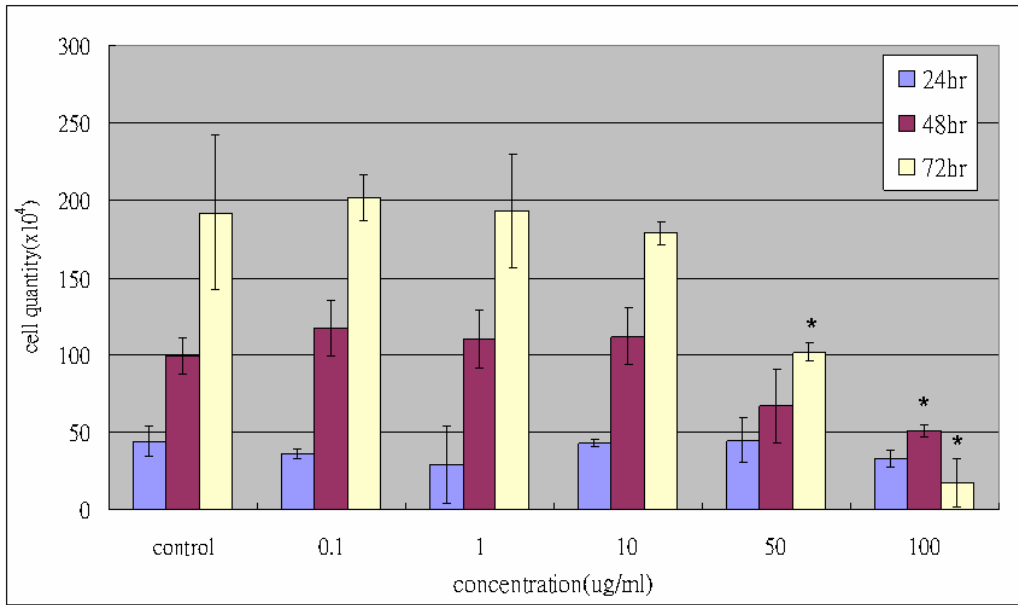


圖3 H1299細胞對樟芝發酵液之生長情形

* P<0.05 one-way ANOVA

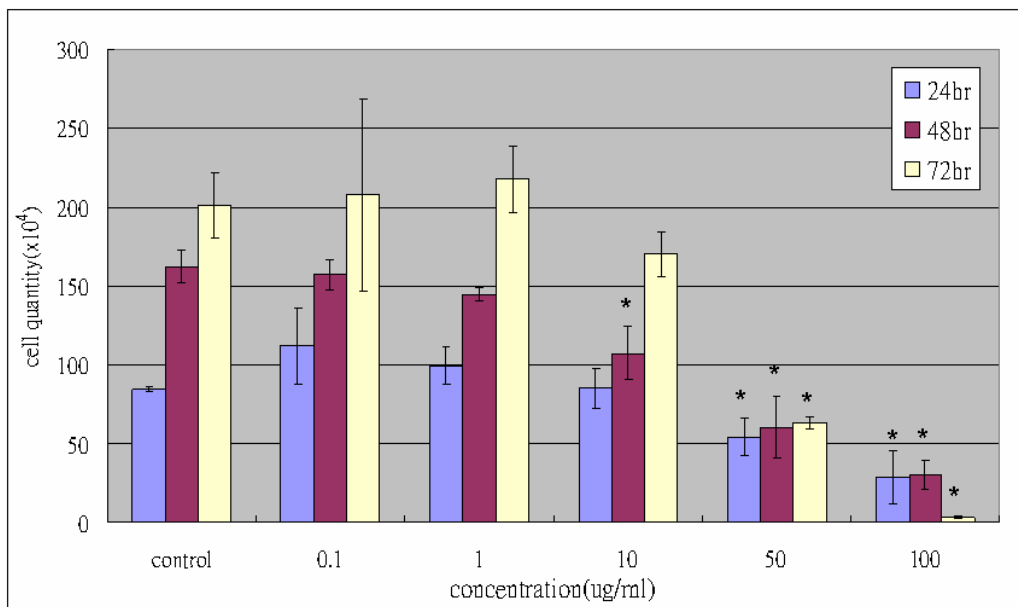


圖4 HepG2細胞對樟芝發酵液之生長情形

* P<0.05 one-way ANOVA

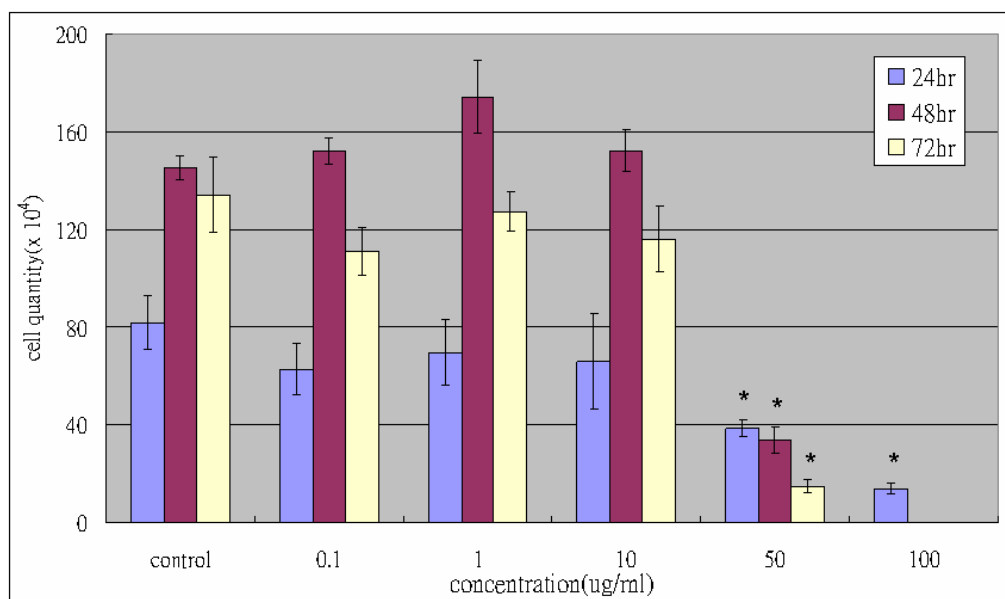


圖5 CaCO₂細胞對樟芝發酵液之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

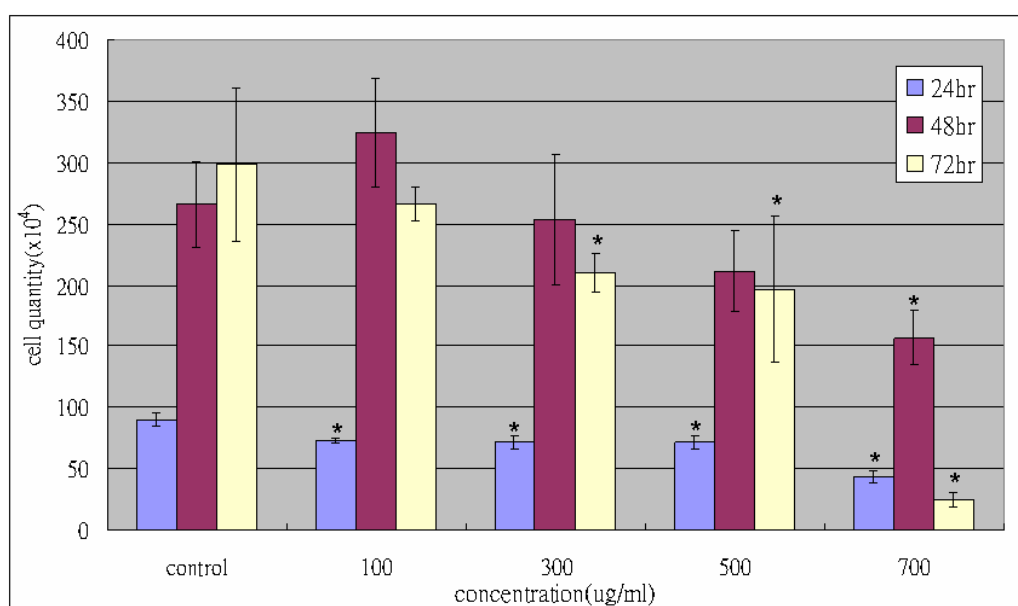


圖6 H1299細胞對樟芝水草物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

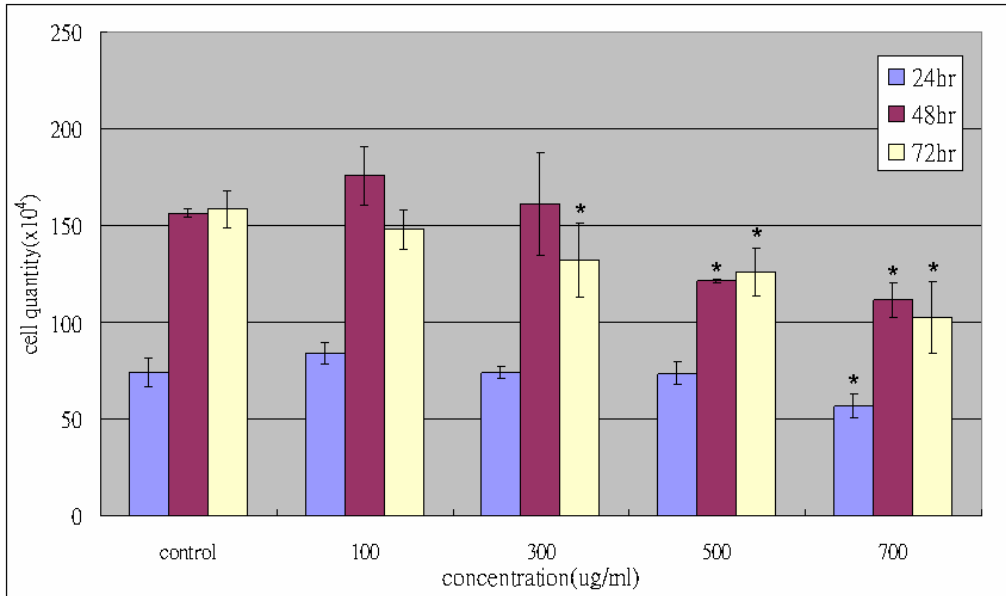


圖7 HepG2細胞對樟芝水萃物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

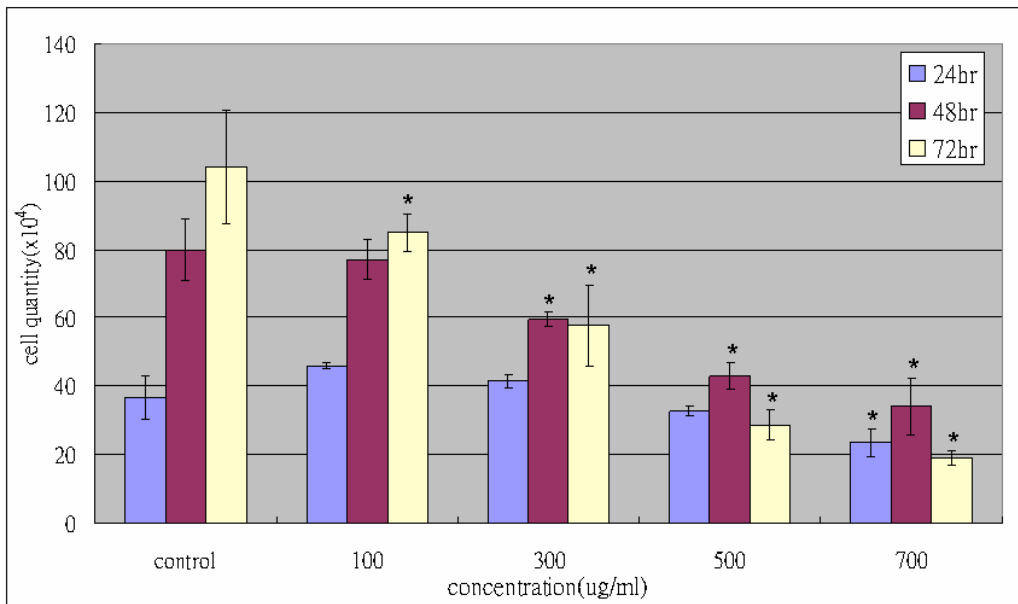


圖8 CaCO2細胞對樟芝水萃物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

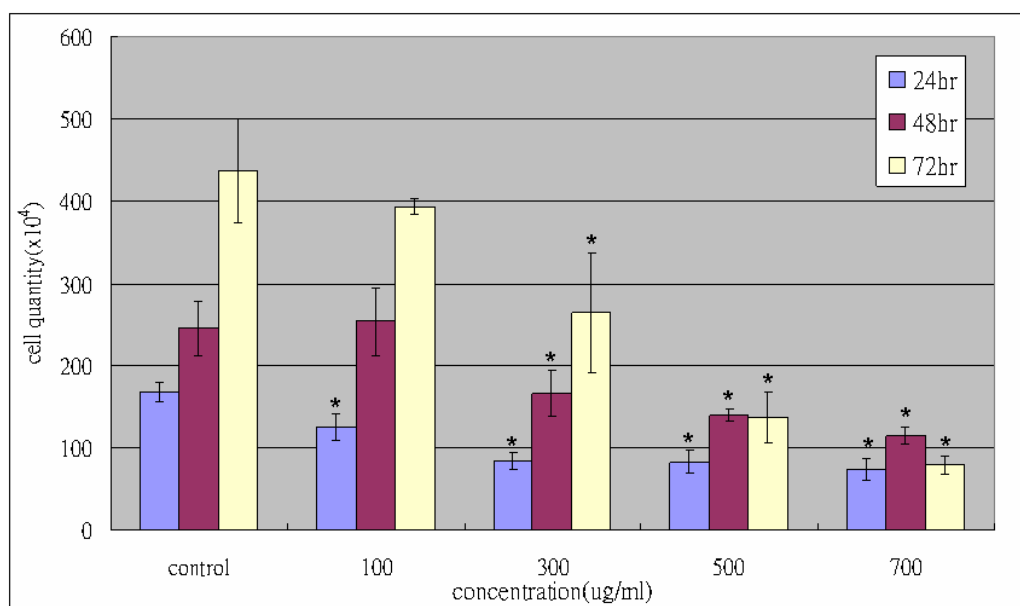


圖9 H1299細胞對樟芝甲醇萃取物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

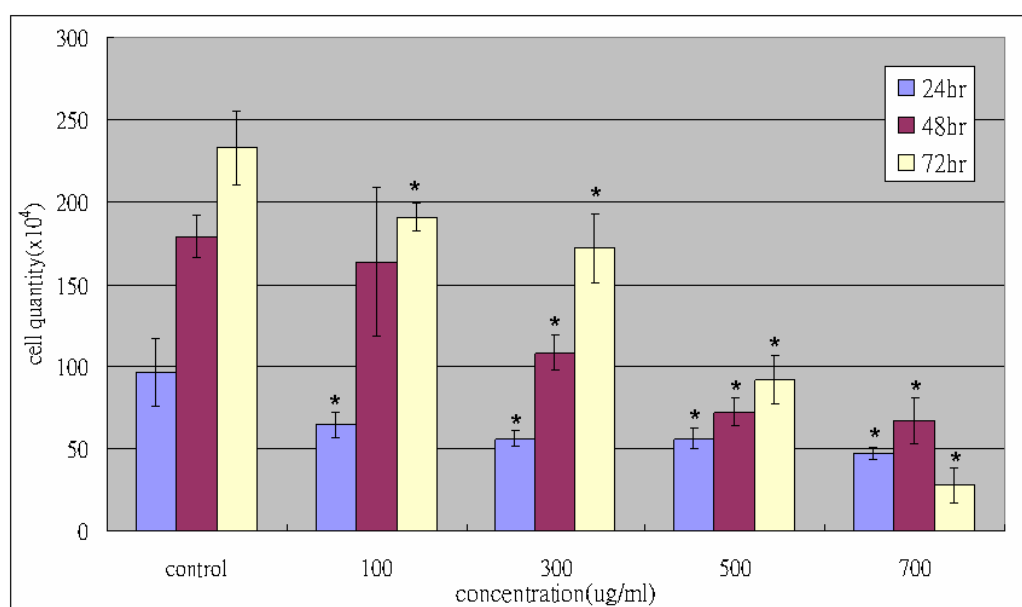


圖10 HepG2細胞對樟芝甲醇萃取物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

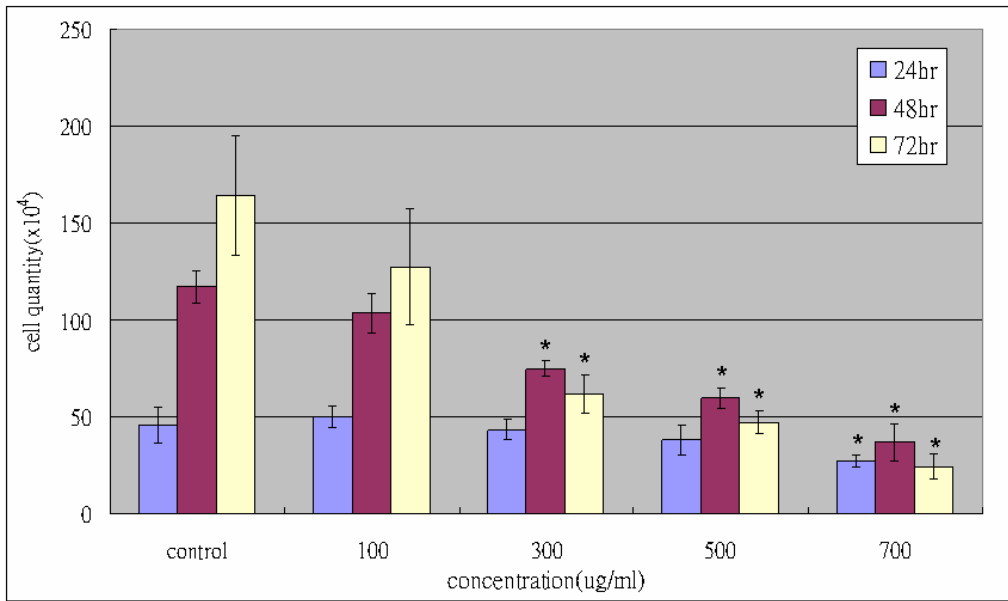


圖11 CaCO₂細胞對樟芝甲醇萃取物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

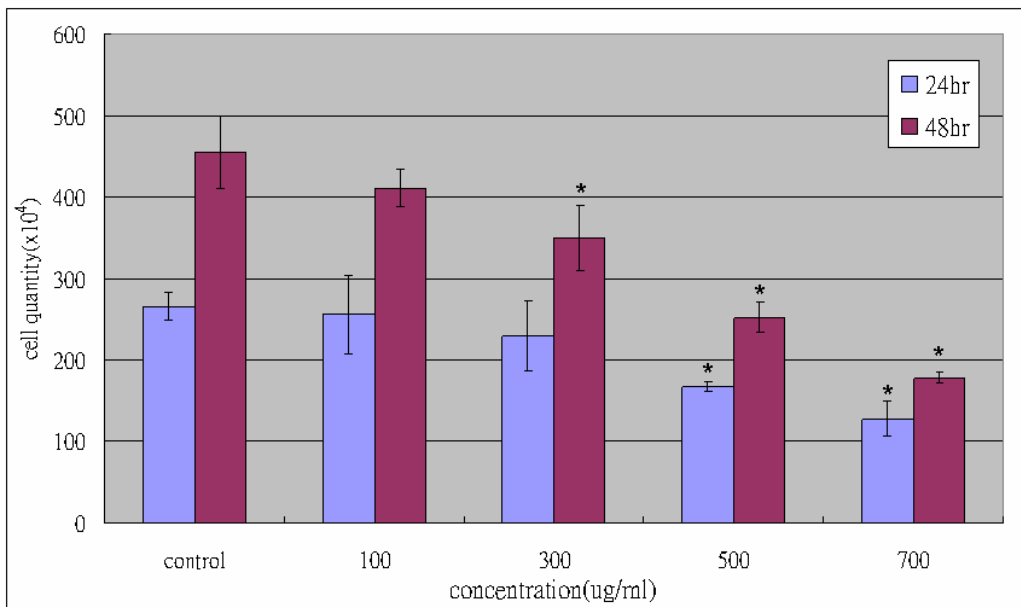


圖12 HepG₂細胞對靈芝水萃取物之生長情形

* P < 0.05 one-way ANOVA

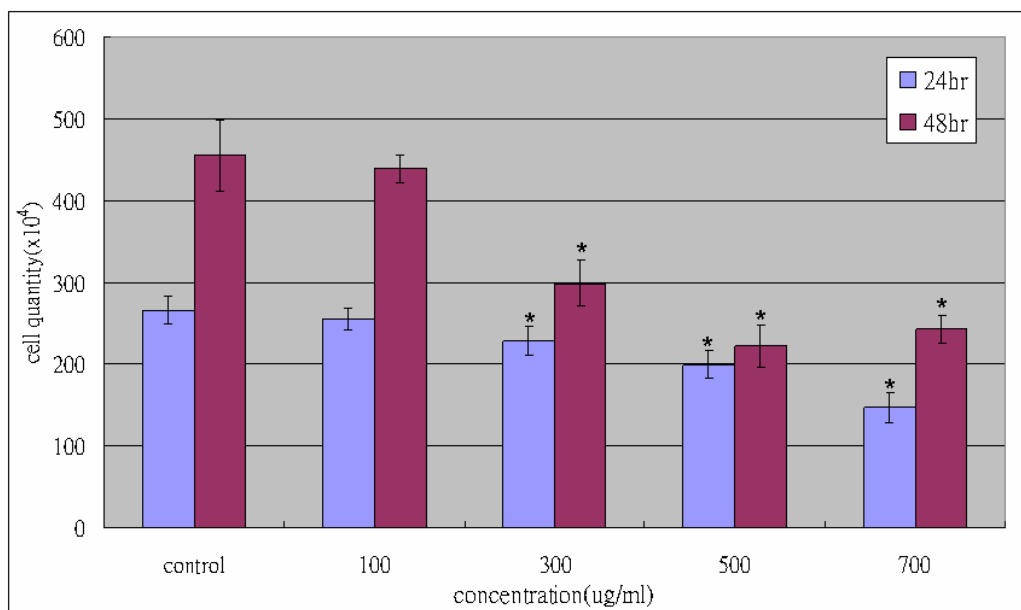


圖13 HepG2細胞對黑木耳水草物之生長情形

* P<0.05 one-way ANOVA

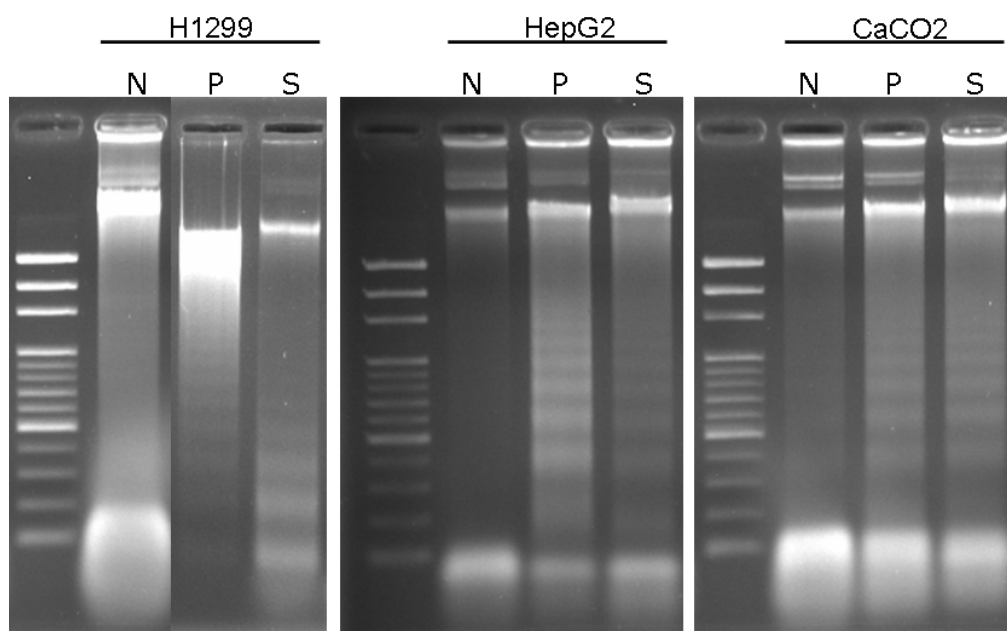


圖14 H1299、HepG2與CaCO2細胞處理樟芝發酵液之DNA斷裂情形

N-negative

P-positive (1uM Dexamethasone)

S-樟芝發酵液 50 μg/ml

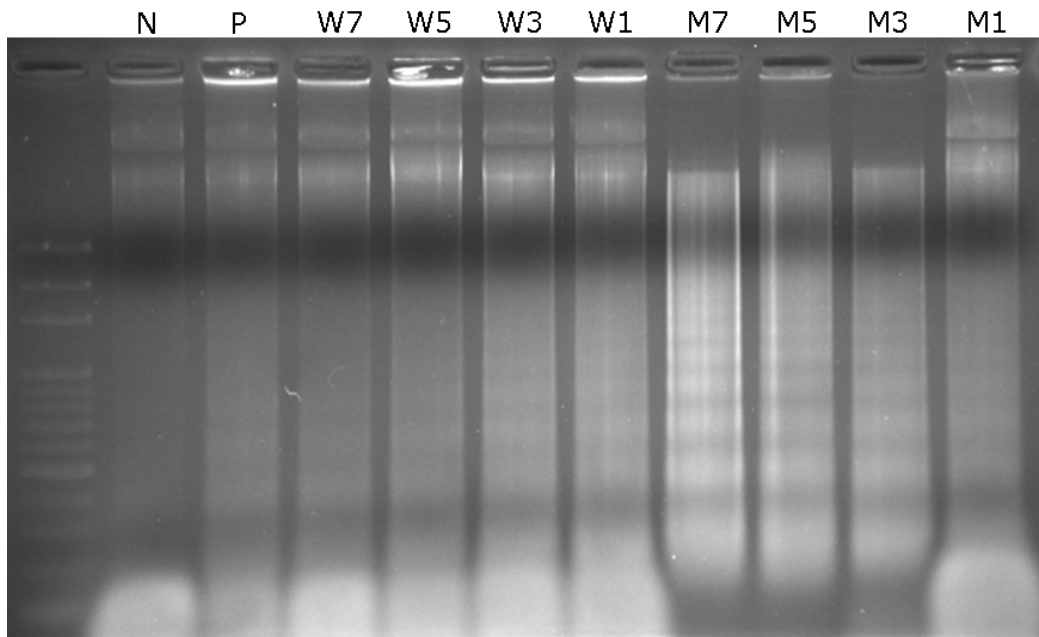


圖15 H1299細胞處理樟芝水萃物與甲醇萃取物之DNA斷裂情形

N-negative P-positive (1uM Dexamethasone)

W7~W1-樟芝水萃物 700~100 μ g/ml

M7~M1-樟芝甲醇萃取物 700~100 μ g/ml

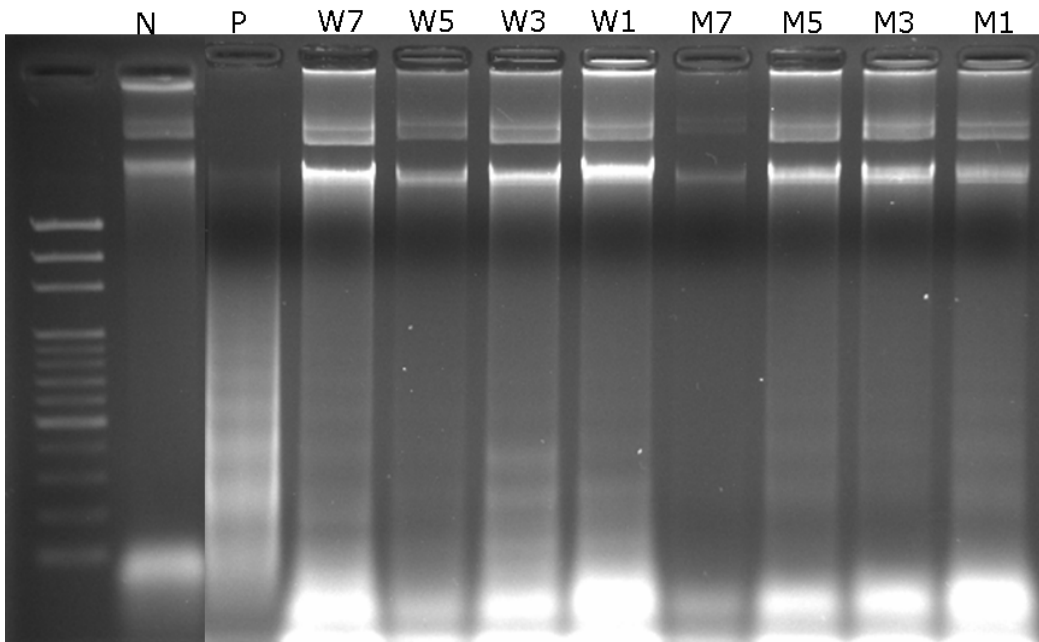


圖16 HepG2細胞處理樟芝水萃物與甲醇萃取物之DNA斷裂情形

N-negative P-positive (1uM Dexamethasone)

W7~W1-樟芝水萃物 700~100 μ g/ml

M7~M1-樟芝甲醇萃取物 700~100 μ g/ml

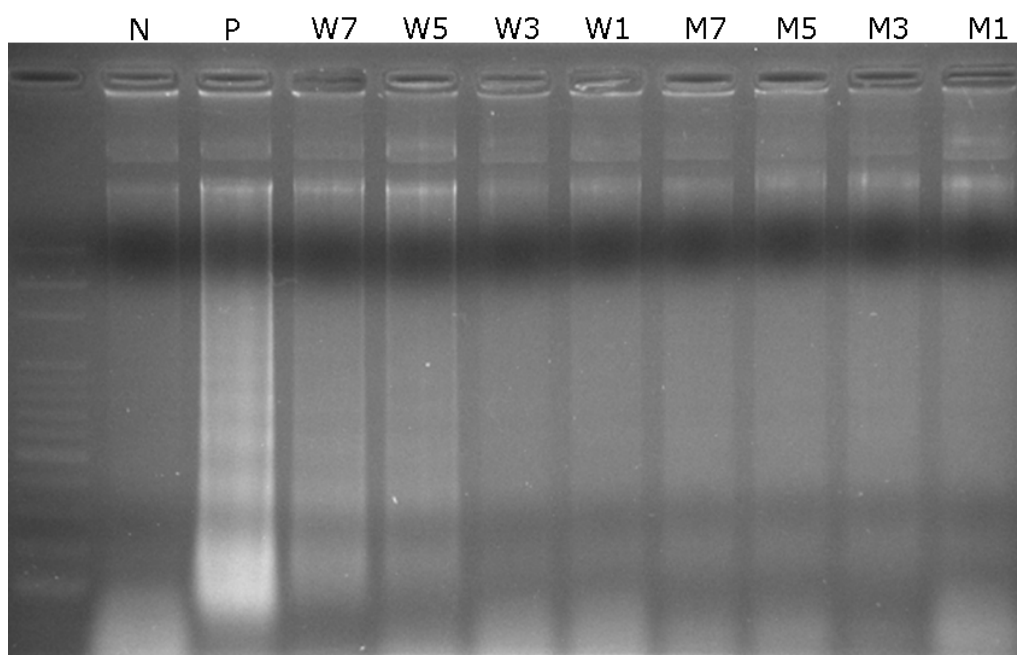


圖17 CaCO₂細胞處理樟芝水萃物與甲醇萃取物之DNA斷裂情形
N-negative P-positive (1μM Dexamethasone)
W7~W1-樟芝水萃物 700~100 μg/ml
M7~M1-樟芝甲醇萃取物 700~100 μg/ml

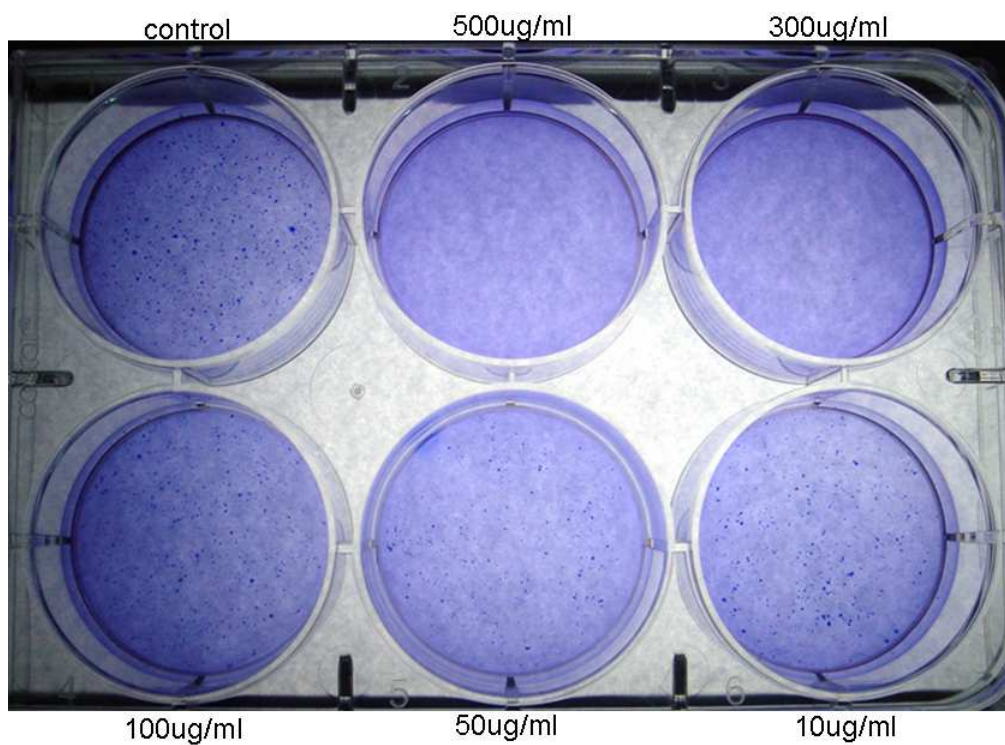


圖18 不同濃度樟芝發酵液對H1299細胞在半固態培養基上的生長情形

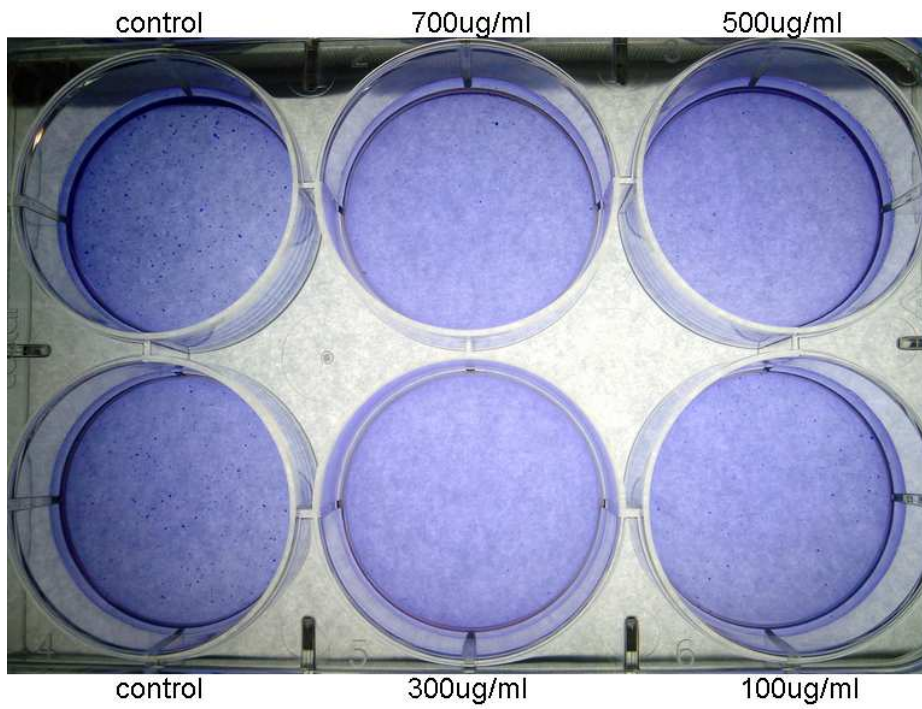


圖19 不同濃度樟芝水萃物對H1299細胞在半固態培養基上的生長情形

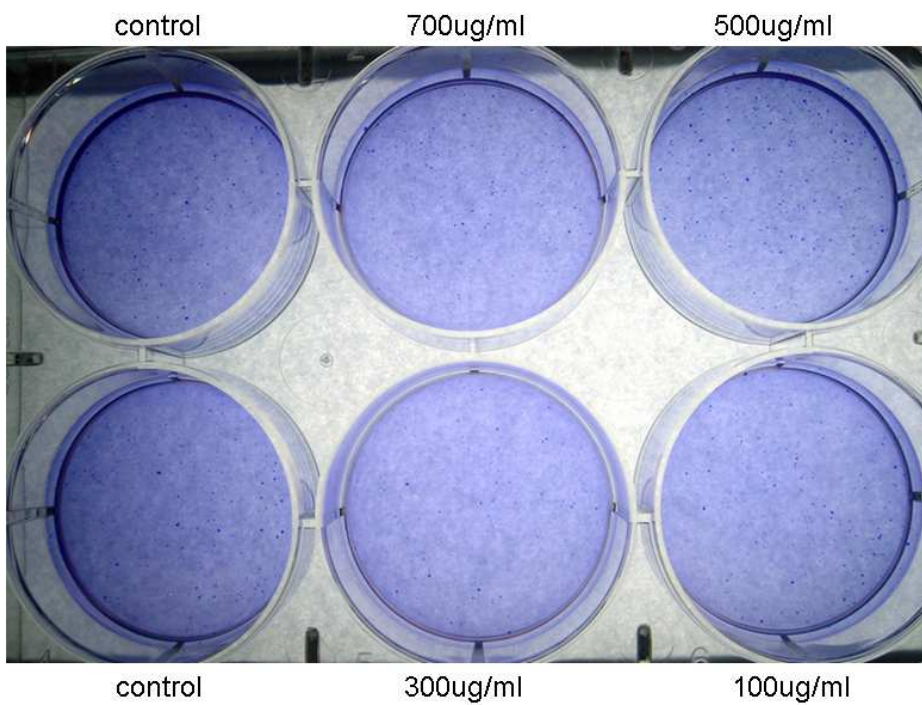


圖20 不同濃度樟芝甲醇萃物對H1299細胞在半固態培養基上的生長情形

表1 不同營養成分對樟芝生長速率之影響

Table 1 The effects of different nutritional compositions on the growth rate of *Antrodia cinnamomea*.

培養基	生長半徑 (mm/35 day)	生長指數 (%)	平均生長速率 (mm/day)
PDA	19.46 ^c ±2.30	100%	0.56
PDA ⁺	24.28 ^b ±3.62	125%	0.69
MPA	30.68 ^a ±0.95	158%	0.88
MPA ⁺	30.80 ^a ±0.89	158%	0.88

1、生長半徑以平均值±標準差所表示

2、同列數字後小寫英文字母不同，表示具有差異， $\alpha=0.05$ ， $P<0.01$

3、以PDA配方作為對照組

表2 不同瓊脂濃度對樟芝菌絲體生長速率之影響

Table 2 The effect of different agar concentrations on the growth rate of *Antrodia cinnamomea*.

不同瓊脂濃度 (g/L)	生長半徑 (mm/35 day)	生長指數 (%)	平均生長速率 (mm/day)
8	31.42 ^a ±0.40	114	0.90
9	30.06 ^b ±1.04	109	0.86
10	29.54 ^{bc} ±0.84	107	0.84
11	28.92 ^c ±0.66	105	0.83
12	27.48 ^d ±0.39	100	0.79
13	27.84 ^d ±0.36	100	0.79
14	27.94 ^d ±0.69	101	0.79
15	27.58 ^d ±0.21	100	0.79

1、生長半徑以平均值±標準差所表示

2、同列數字後小寫英文字母不同，表示具有差異， $\alpha=0.05$ ， $P<0.01$

3、以瓊脂15 g/L為對照組

表3 pH值對樟芝生長速率之影響

Table 3 The effect of pH values on the growth rate of *Antrodia cinnamomea*.

不同pH值	平均生長半徑 (mm/35 day)	生長指數 (%)	平均生長速率 (mm/day)
4	26.3 ^b ±0.96	93	0.75
5	26.5 ^b ±0.92	94	0.76
6	28.6 ^a ±0.31	101	0.82
7	28.3 ^a ±1.32	100	0.81
8	26.2 ^b ±0.25	93	0.75
9	26.3 ^b ±0.55	93	0.75

1. 生長半徑以平均值±標準差所表示

2. 同列數字後小寫英文字母不同，表示具有差異， $\alpha=0.05$ ， $P<0.01$

3. 以pH 7培養作為對照組

表4 溫度對樟芝菌絲體生長速率的影響

Table 4 The effect of temperatures on the growth rate of *Antrodia cinnamomea*.

不同培養溫度 (°C)	平均生長半徑 (mm/35 day)	生長指數 (%)	平均生長速率 (mm/day)
10	0.0 ^f ±0.00	0	0.00
15	14.0 ^d ±1.34	45	0.40
20	18.8 ^c ±0.79	60	0.54
25	31.3 ^b ±1.10	100	0.89
30	33.7 ^a ±0.97	108	0.97
35	8.4 ^e ±0.87	27	0.24

1、生長半徑以平均值±標準差所表示

2、同列數字後小寫英文字母不同，表示具有差異， $\alpha=0.05$ ， $P<0.01$

3、以25°C培養作為對照組

表5 不同木粉對樟芝菌絲生長之影響

Table 5 The effect of different wood flours on the mycelium growth of *Antrodia cinnamomea*.

木粉/添加物 (3:1)	菌絲生長情形			
	10天	20天	30天	60天
牛樟/無	*	*	*	*
牛樟/米糠	*	**	**	**
樟樹/米糠	*	—	—	—
大葉桃花心木/米糠	*	—	—	—
相思樹/米糠	*	**	***	****

1. 木粉/添加物的比例以乾重計算。

2. *, 菌絲稀疏; **, 菌絲中等密; ***, 菌絲很密; ****, 菌絲極密。