

MC-Transaction on Biotechnology, 2014, Vol. 6, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

液態光發酵牛樟芝醇抽出物之化學組成與細胞活性

張家源¹、鄭建璋²、陳良宇^{1*}

¹ 銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系 (中華民國 台灣 桃園)

² 實踐大學 餐飲管理學系 (中華民國 台灣 台北)

中文摘要

牛樟芝為台灣特有且非常珍貴的藥用真菌，常做為增強免疫力、保肝、抗癌之保健食品素材，更為近年來天然藥用真菌的研究重點。而本研究主要是要利用光源調控與培養時間差異對液態培養牛樟芝生長之影響，更探討液態培養牛樟芝之代謝物組成變化及對癌細胞活性之效能。化學分析的結果呈現，培養天數越長所得粗三萜吸光值較高，代表其代謝產物(三萜類及油酸等)的含量越高，而光源強度在 15 W/m^2 下培養之最終產物具有較高的生物活性代謝物。體外細胞實驗之抗癌活性結果表明，液態培養牛樟芝菌絲體之乙醇萃取物對人類子宮頸癌上皮細胞 (HeLa) 具有效抑制性與劑量依賴關係，由培養菌絲體之醇抽出物於 $60 \mu\text{g/ml}$ 的劑量下可抑制癌細胞的活性達 73.6%，與相同劑量下野生牛樟子實體醇抽出物的 71.4% 差異不大。證明本研究之發酵技術具有生產與野生牛樟芝相當功效的應用潛力。

關鍵字：牛樟芝、化學組成分析、抗癌、乙醇萃取

通訊作者：陳良宇 [loknath@mail.mcu.edu.tw]

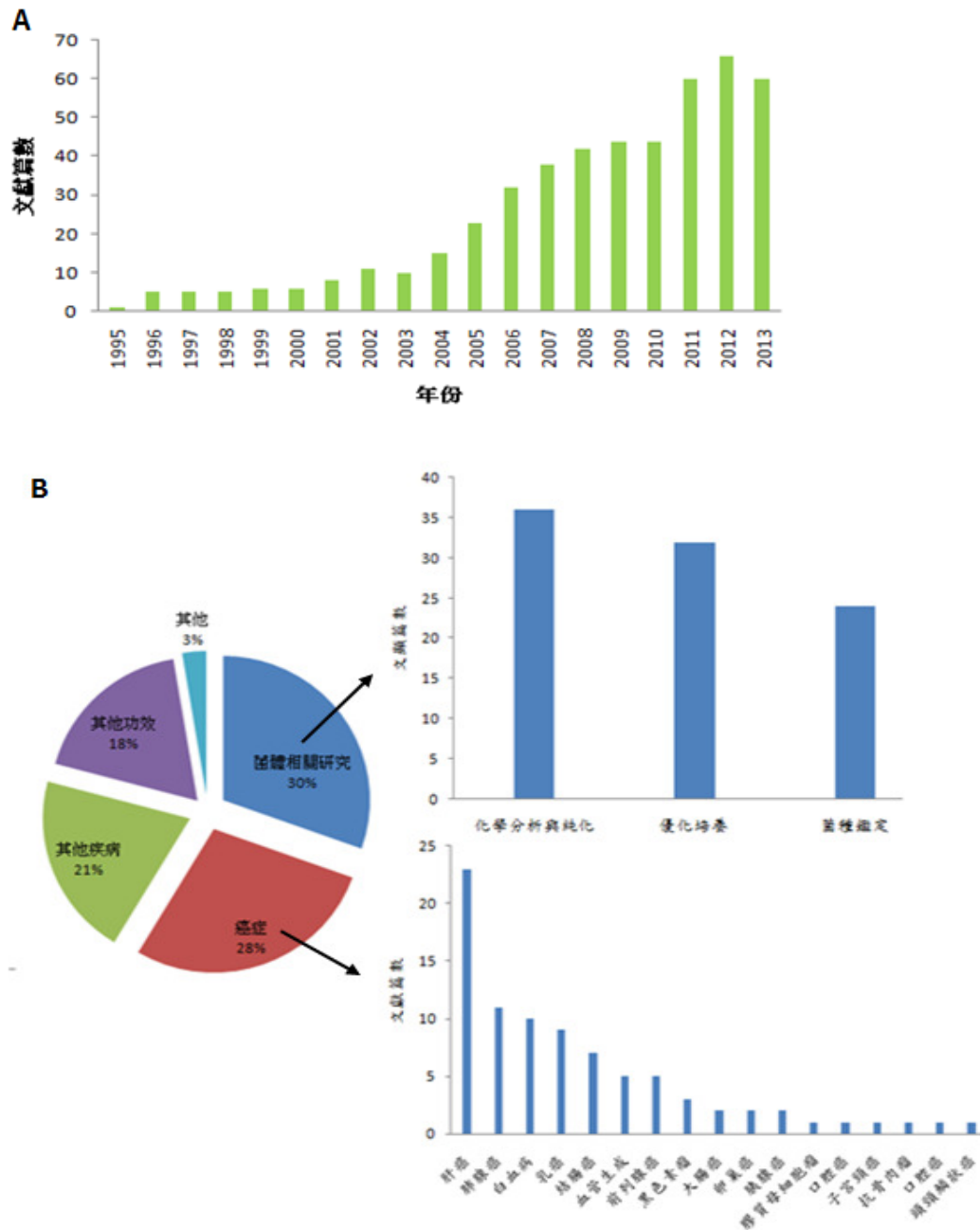
收稿：2014-3-26 修改：2014-4-2 接受：2014-4-4 線上發表：2014-4-12

前 言

牛樟薄孔菌 (*Antrodia camphorata*) 也就是俗稱的牛樟芝，是台灣特有的珍貴藥用真菌，也為台灣最受商業歡迎的保健食用菌。但市面上販售之牛樟子實體相當昂貴，每公克單價將近 20 美元，因而開發具有相當功效、活性成分的菌體與量產發酵培養技術成為目前最受生化工程師與研究人員所重視。

1995 年至今已有三百多篇牛樟芝相關的研究發表於學術期刊上，如圖一(A)，牛

樟芝在2003年才正式確定為台灣特有種菌株，別名為*Taiwanofungus camphoratus*及*Antrodia cinnamomea*，在2003年後吸引許多的研究人員及團隊投入牛樟芝相關的發展應用。目前主要的研究方向大致可分為五大領域，分別為癌症、菌體、疾病、健康功效、其他相關研究，圖一(B)。菌體相關研究佔總體文獻的30%，可再細分為化學分析純化、優化培養與菌種鑑定，其三種研究的比例相當。癌症研究(總共17種癌症類型)佔牛樟芝總體研究的28%，其中肝癌(23篇)、肺腺癌(11篇)、白血病(10篇)之研究，佔癌症研究的半數51%。



圖一、(A)科學研究文獻發表趨勢(B)研究趨勢及比重分析

目前牛樟芝菌絲體已被證實具有以下生物活性:抗氧化^[1, 2]、抗發炎^[3-6]、抗腫瘤^[7-9]，保護肝臟^[10, 11]、調節免疫機能、降血脂、調節血壓^[2, 12, 13]等多項功能，在目前的分析中發現菌絲體含有脂肪酸、木質素、倍半萜類、三萜類化合物、類固醇及多醣、超氧歧化酶、腺苷、苯醌衍生物等多達 78 種以上的化合物^[14-17]，其中又以萜類化合物被認為是最具生物活性的物質^[17]。然而，文獻也指出牛樟芝子實體所含之生物活性物質較菌絲體來的多^[16]。

在我們先前的研究中發現，以光源調控之液態培養牛樟芝可以對菌絲體產量、菌絲體大小、形態及總多醣含量造成改變^[18]。進一步的動物實驗的結果也證明培養條件對菌絲體的改善運動性疲勞功效也具有顯著的影響^[18]。

本研究進一步探討液態培養牛樟芝之代謝物組成與細胞活性，同時觀察比較液態培養牛樟芝與野生牛樟芝子實體之間的差異。在代謝產物分析方面，我們利用氣相層析質譜儀對牛樟芝乙醇抽出物進行成分分析與鑑定，降低分析代謝物所需之時間，並建立樟芝菌絲體代謝物之氣相層析質譜資料庫。最後，我們更利用人類子宮頸癌細胞測試，比較液態培養所得之牛樟菌絲體與子實體間之細胞活性差異。因此本實驗的總體目標為尋找最佳生物活性牛樟芝菌絲體之光發酵條件，做為工業化量產技術開發的基礎。

材料與方法

1. 藥品：

細胞染劑 (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、dimethyl sulfoxide (DMSO)及碳酸氫鈉均購自 Sigma-Aldrich，甲醇、乙醇、乙酸乙酯、甲酸、正己醇購自於 J. T. Baker，本研究使用藥品均為超純試藥級，使用前未純化。

2. 菌體培養：

本研究使用之牛樟芝菌株(*Antrodia camphorata*)為本實驗室保存培養，其來源為台灣新竹之生物資源保存研究中心(BCRC)，生長溫度為 25 °C，培養並保存於馬鈴薯葡萄糖洋菜固態平板培養基(Potato Dextrose Agar)與斜面培養基中，每兩周進行一次繼代培養。並將生長良好之固態培養兩周之平板培養牛樟芝菌絲體，接種於含 100 ml 馬鈴薯葡萄糖液態培養基(PD)的三角搖瓶，轉動速率 100 rpm 的恆溫(25°C)，搖動培養箱內進行三周的培養。

3. 菌體的醇抽出與粗三萜分析：

取冷凍乾燥後之樟芝菌絲體粉末 100 mg，加入 3 mL 95%乙醇，超音波震盪萃取 12 小時後離心(2,700 rpm, 5 分鐘)，取上清液至新管。再加入 95%乙醇 3 mL 利用強力震盪器使菌粉再次均質後，進行 12 小時的二次超音波萃取，離心，取上清液與第一次萃取液混和，並將萃取液進行吹氮濃縮(60 °C)至乾。加 3 mL 去離子水回溶，再加入 3 mL 的乙酸乙酯超音波震盪 30 分鐘，取上層加入 3 ml 5%碳酸氫鈉超音波震盪 30 分鐘。利用 98%甲酸調整 pH 值於 3 以下，以 2,700 rpm 離心 10 分鐘，取上層液吹氮濃縮至乾，再將樣品回溶於 2 ml 乙醇，測定 245 nm 之吸光值，並將樣品保存於負 20 °C 的冰箱中。

4. 氣相層析質譜儀方法設定：

本實驗是利用自動進樣系統搭配安捷倫 6890N 氣相層析質譜儀，質譜端為電子離子化(electron ionization, EI)維持 1529.4 伏特(電離源：230 °C)，並連接單一四極柱(溫度設定為 150 °C)，並利用高純度氦氣當作流動相，溶劑延遲設定為 4 分鐘，並在全掃描模式(質量範圍設定為：50~550 m/z)下進行樣品分析。

將牛樟菌絲體萃取物回溶於 2 ml 乙酸乙酯，並以 0.45 µm 濾膜過濾，樣品注射量為 1 µl，汽化室溫度為 290 °C，設定不分流。流動相為超氦氣，流速 100 毫升/分鐘，使用層析管柱為 HP-5MS 分析管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)流速設定 0.6 毫升/分鐘的梯度分離。而烘箱初始溫度調控在 35 °C，平衡時間為 0.5 分鐘，升溫速度為每分鐘 10 °C，達 200 °C 後以每分鐘 20 °C 的速度升溫至 290 °C，並保持 8 分鐘(完成時間 30 分鐘)之後降溫至 35 °C。

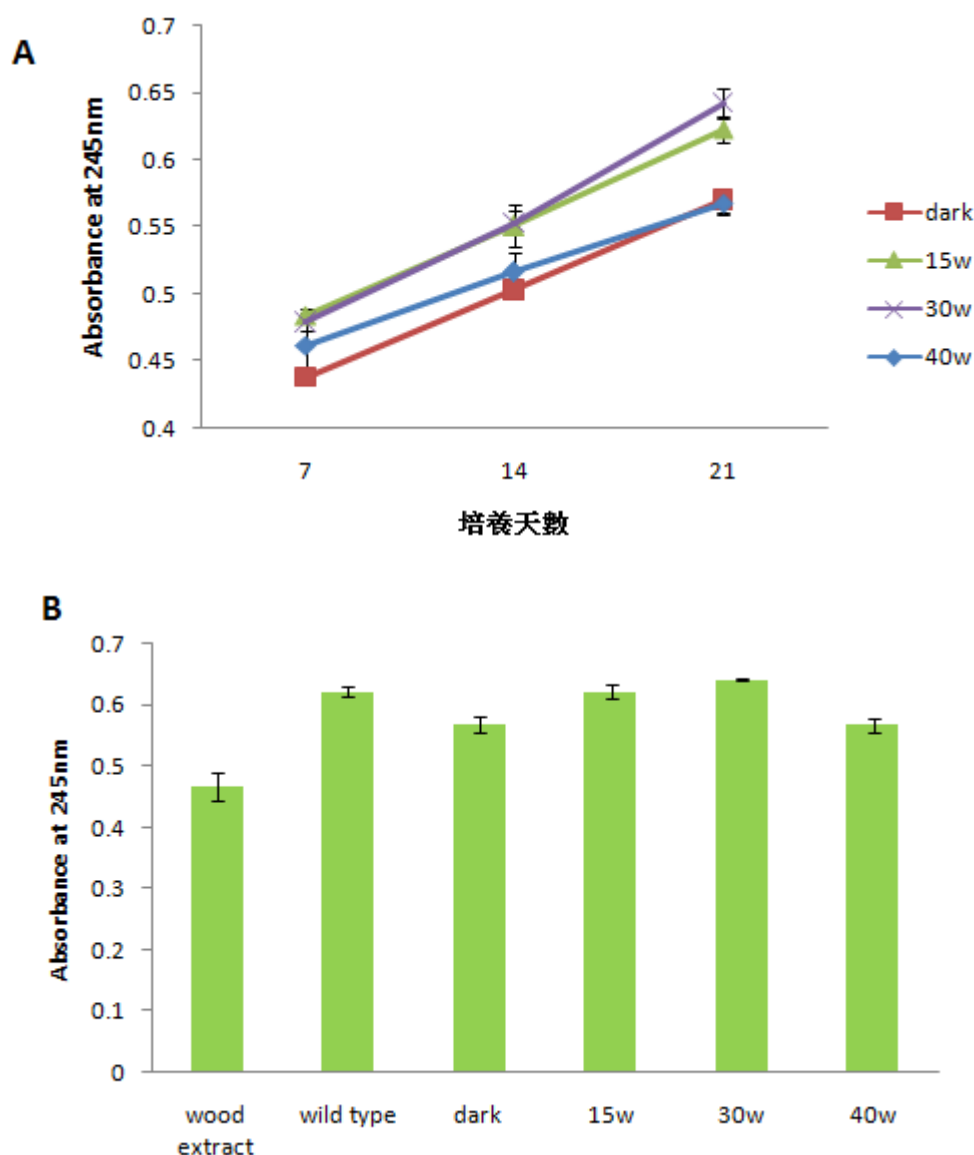
5. 細胞存活率分析：

本實驗所用之細胞株為人類子宮頸癌上皮細胞 (HeLa Cells, BCRC60005)，其來源為 BCRC 生物資源保存研究中心，此細胞皆繼代於細胞培養基 DMEM (10% 胎牛血清，1%青黴素-鏈黴素)，並培養於 5% CO₂，37 °C 之細胞培養箱中。

將細胞分別注於 96 孔盤中，每孔定細胞量為 2×10^3 cells/100 µl DMEM /well，培養 16 小時，替換 100 µl 已混和牛樟菌絲體萃出物之細胞培養基(包含 1%青黴素-鏈黴素)，培養 24 小時後除去含藥培養基，再加入 100 µl MTT 染劑(0.5 mg/ml) 4 小時，再除去 MTT 染劑加入 200 µl DMSO 作用 1 小時，用酵素免疫微盤分析儀在波長 570 nm 下進行測定，再由吸光值計算細胞存活率。

結果與討論

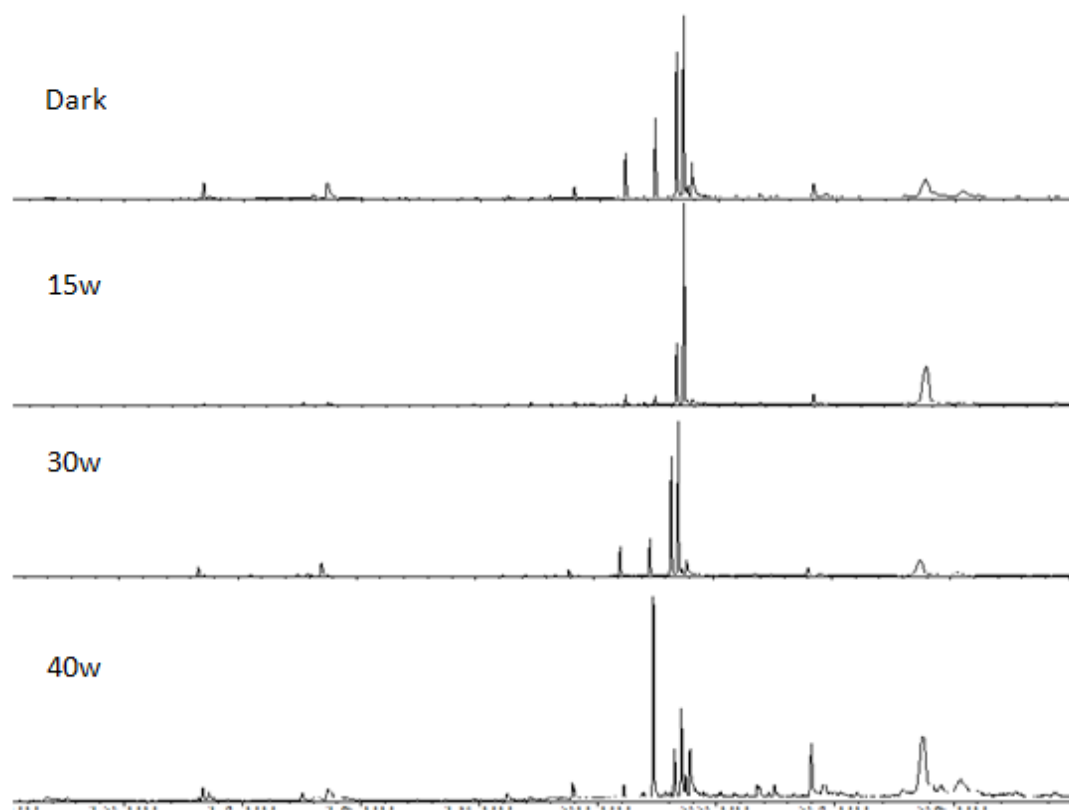
1. 光發酵對菇類與代謝物組成的影響



圖二、(A)主要是比較培養天數與光照條件(黑暗、15、30、40 w/m²)間粗三菇類的變化量。(B)最佳天數之各瓦數培養條件比較野生牛樟子實體粗三菇量。每組測定皆為三重複，數值為平均值±標準差。

圖二(A)是將菌絲體醇抽出萃取液至於 245 nm 下測定吸光值，吸光值越高代表粗三菇類越多，由圖一(A)可以發現吸光值會因培養天數的增長而升高，同時發現 21 天為較佳的培養天數，而 30 W/m² 天培養組吸光值為 0.64187，次高為 15 W/m² 的 0.62257，兩組間並無顯著的差異。圖二(B)則是比較各組最終天數粗三菇與野

生牛樟芝之粗三萜吸光值，可明顯得知 30 W/m² 培養組具最大吸光值甚至超過野生牛樟子實體的粗三萜含量，代表光照培養菌絲體可明顯提升粗三萜量，並可與野生牛樟子實體同量甚至更高。



圖三、菌絲體培養 21 天之化學組成比較

以 21 天培養之牛樟芝菌絲體為基礎，比較牛樟芝醇抽出物之氣相層析圖，如圖三所示。而 19-28 分鐘之時段為訊號反映高量且複雜之化學組成。接著我們會從 19-28 分鐘間挑選以判別及鑑定天然物之結構，並以吸收訊號反應較明顯之峰值(主要離子)進行半定量的比對。

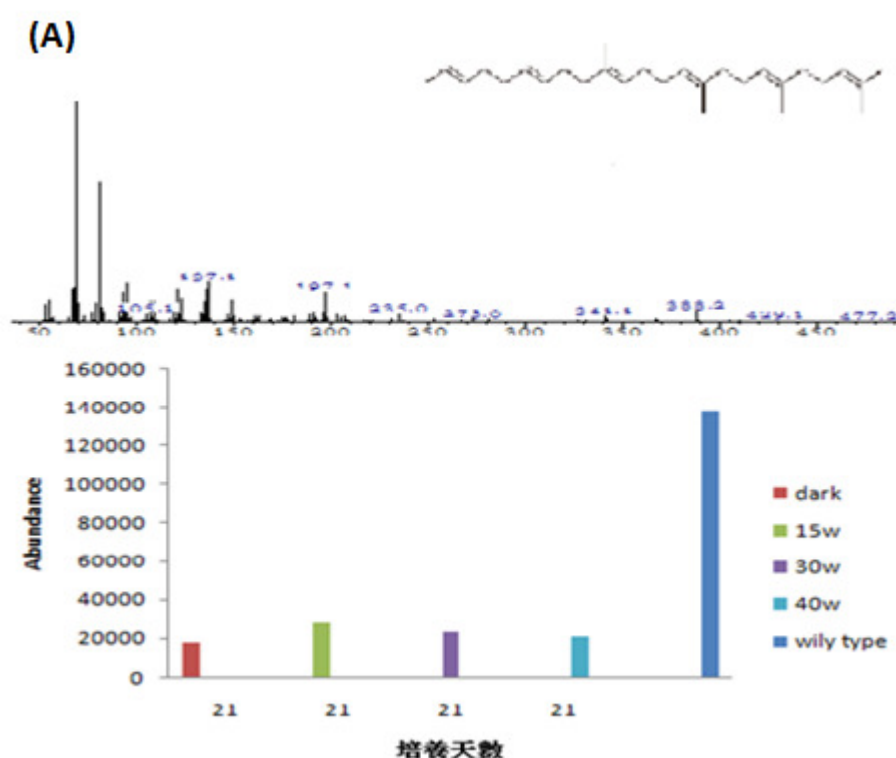
2. 光發酵代謝物的鑑定與變異：

圖四(A)為滯留時間 22.692 分鐘的角鯊烯(squalene)，是一種開鏈三萜類化合物，動物體膽固醇生物合成中間體之一，也是所有類固醇類物質的生物合成前體。具有攝取氧的功能，可增強機體組織對氧的利用能力，強化肝功能^[19]，各條件組在 21 天後始出現可偵測量，也以 15 W 培養組之相對豐度為最高，但量仍遠遠不及樟芝子實體。

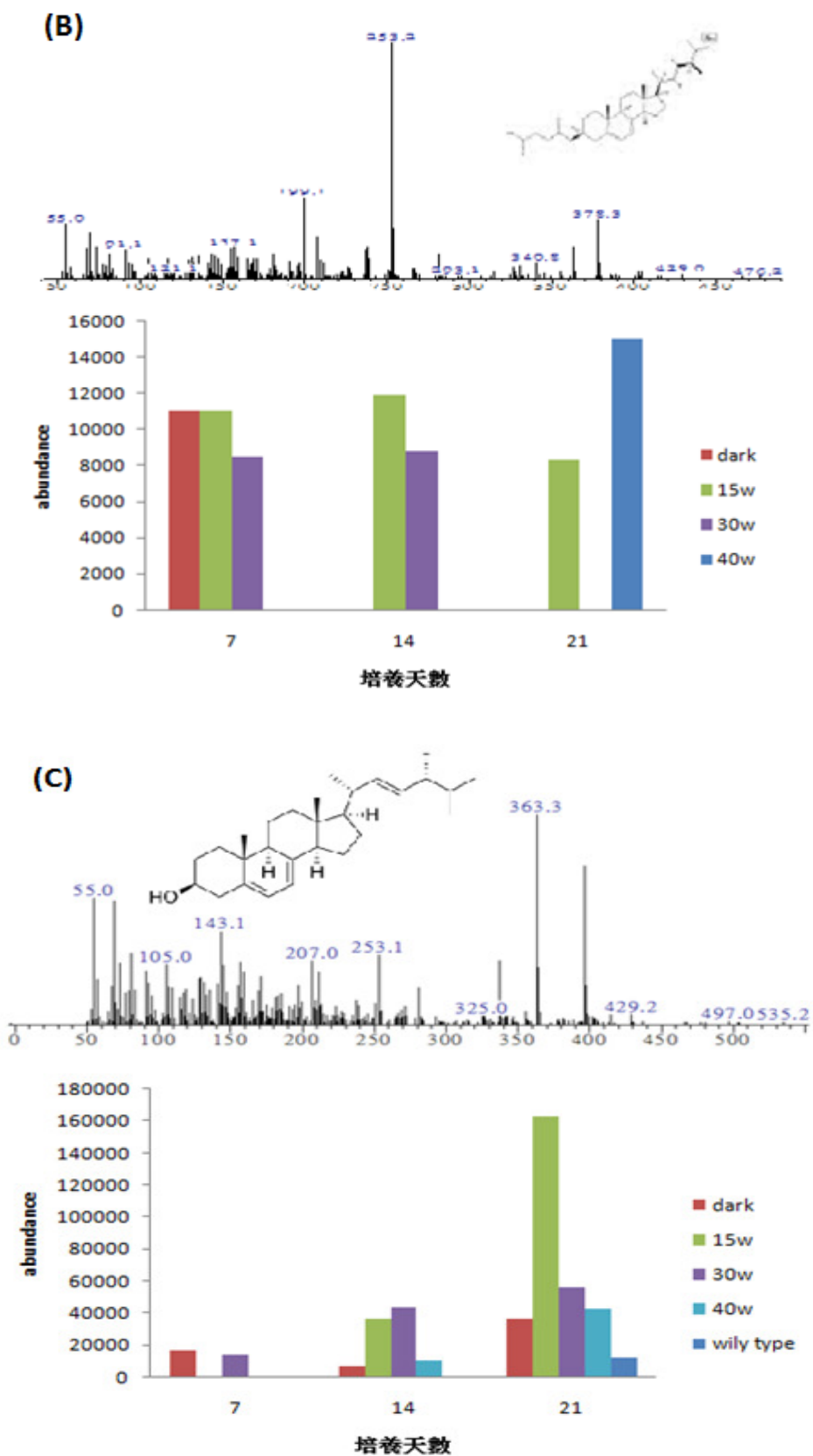
圖四(B)為滯留時間 22.983 分鐘的 3,5-cyclo-6,8(14),22-ergostatriene，僅菌絲體有發現，目前均無相關生物活性的研究報導。15 W 培養組在各培養階段皆有測得，且依培養天數拉長豐度也隨之遞減，而黑暗組培養 7 天有微量被偵測到，最高豐度則落在 40 W 培養 21 天。

圖四(C)為滯留時間 25.493 分鐘的麥角甾醇，為三萜類也是維生素 D 合成前驅物與合成其他三萜類之素材，且研究顯示麥角固醇具有抗腫瘤與提升免疫能力之特性^[20, 21]。圖中發現麥角甾醇會因培養天數的增加其豐度也相對增加，僅黑暗培養 14 天組有微幅下降的趨勢，以 15 W 光照培養 21 天具有最高豐度，相較於其他條件至少高於 2.9 倍更高於野生牛樟子實體 13.8 倍且對於各組條件皆具顯著差異。

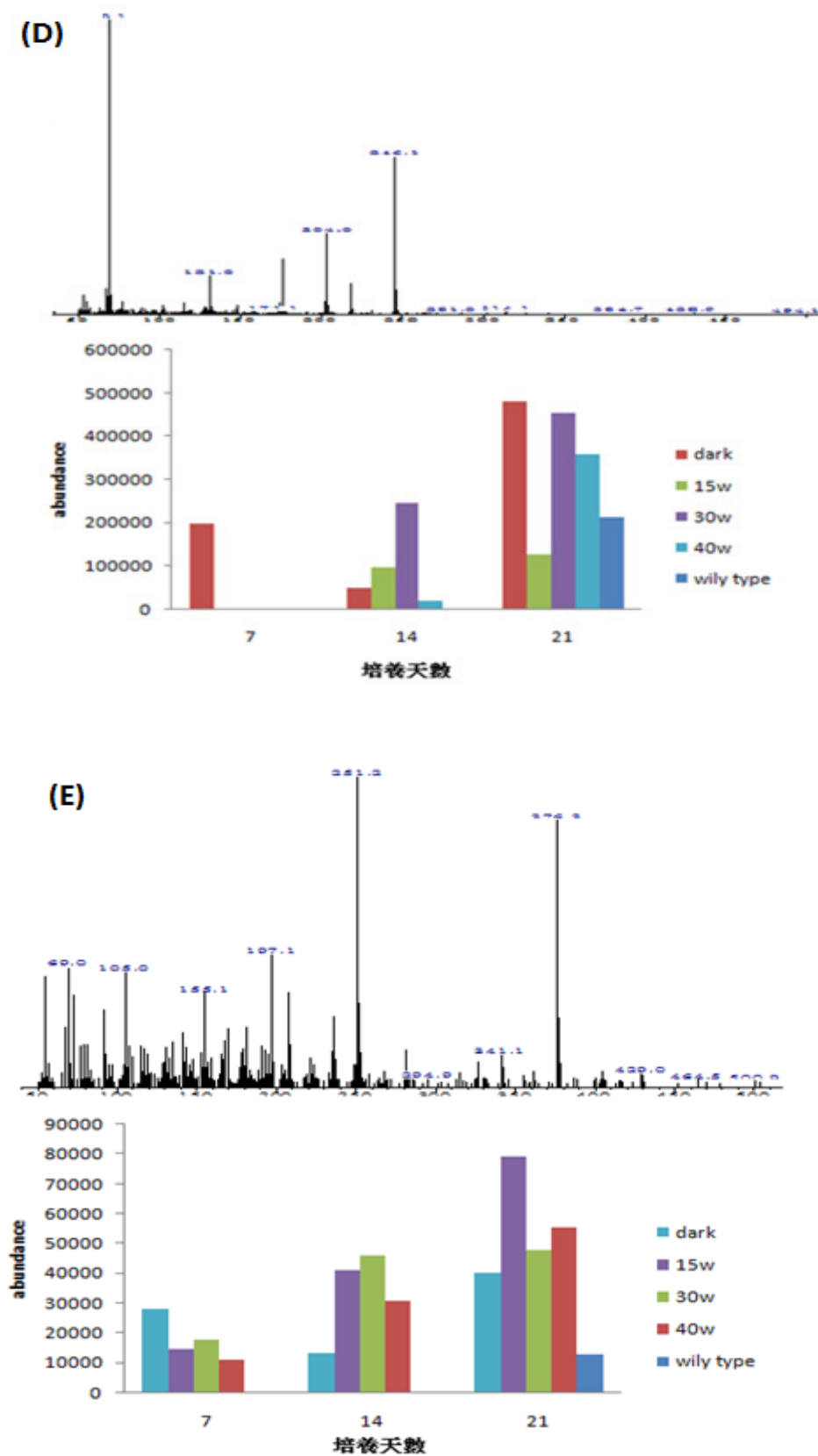
圖四(D)為滯留時間 20.935 分鐘的未知物 16 號，可發現各條件除 15 W 組外之豐度至少高於野生子實體所含量的 1.7 倍。圖四(E)為未知物 31 號，滯留時間為 23.603 分鐘，此物質會因培養時間的拉長而有量的增加，且各條件菌絲體含量皆高於子實體，由圖中也發現 15 W，經 21 天的培養菌絲體具有最高豐度，甚至高於野生子實體達 6.4 倍且具顯著差異。



圖四 (A)角蕨烯、(B)3,5-cyclo-6,8(14),22-ergostatriene、(C)麥角甾醇、(D)未知物肉粽 16、(E)未知物肉粽 31 之特徵質譜圖及相對豐度的比較。



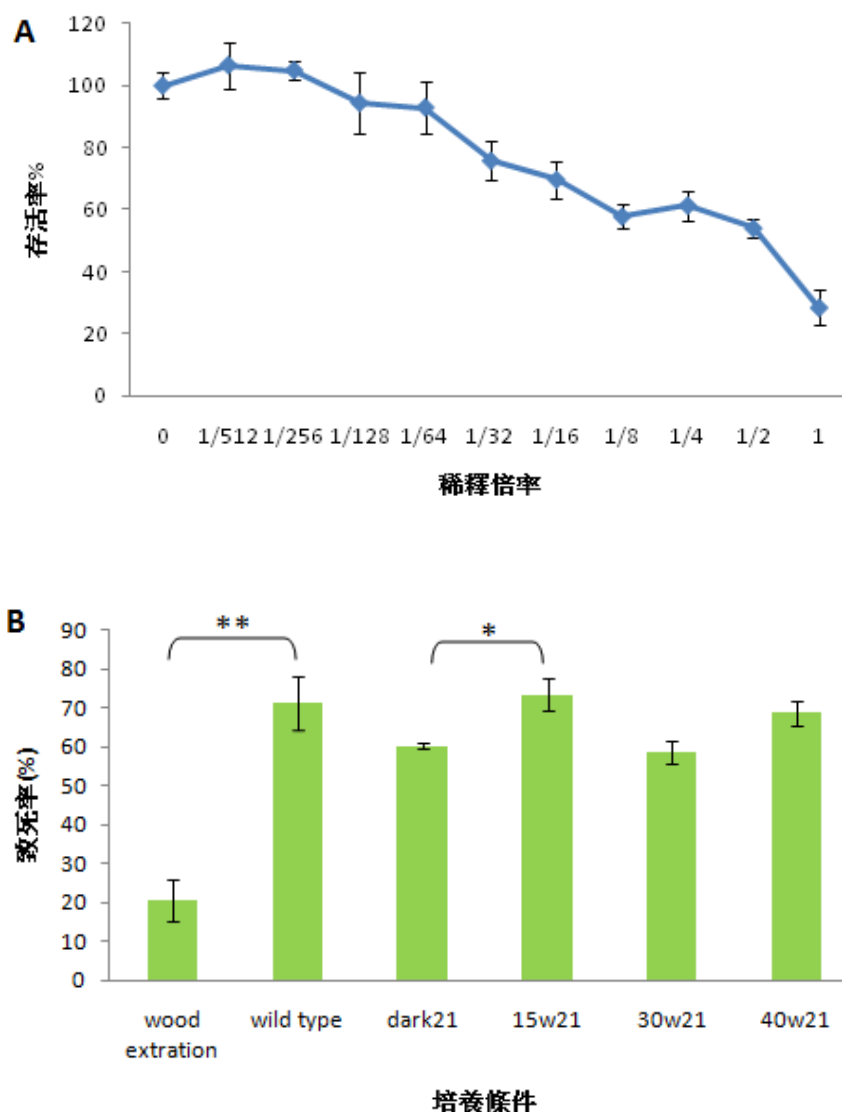
圖四 (A)角鯊烯、(B)3,5-cyclo-6,8(14),22-ergostatriene、(C)麥角甾醇、(D)未知物肉粽 16、(E)未知物肉粽 31 之特徵質譜圖及相對豐度的比較。



圖四 (A)角鯊烯、(B)3,5-cyclo-6,8(14),22-ergostatriene、(C)麥角甾醇、(D)未知物肉粽 16、(E)未知物肉粽 31 之特徵質譜圖及相對豐度的比較。

3. 光發酵產物之醇抽出物的抗癌活性評估

利用培養 16 小時之人類子宮頸癌上皮細胞(*HeLa* Cells)進行細胞存活率試驗，用以評估光發酵產物之細胞活性。圖五(A)是將樟芝萃取液序列稀釋與細胞反應 24 小時後之結果，實驗結果顯示人類子宮頸癌上皮細胞會因藥劑濃度的上升而導致存活率下降，呈現明顯的劑量依賴性關係，並在稀釋倍率 1 (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)中發現存活率僅剩 28%，而的萃取物的半致死劑量(IC_{50})則為 34.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。我們還發現較長天期培養的菌絲體對子宮頸癌上皮細胞的存活率有抑制的趨勢，在黑暗與紅光 15 W 培養 7 天之牛樟菌絲體萃取液尚有 50%的存活率，但培養 14 天組之牛樟菌絲體萃取液使細胞存活率都達 50%以下，且在第 21 天的培養組中發現 15 W/ m^2 細胞存活率僅存 28.8%，就此結果推斷培養 21 天為最佳實驗條件。



圖五、(A) 牛樟芝抽出物濃度與癌細胞存活率之劑量關係。(B)最佳培養樣本與野生子實體、樟木之致死率比較。每組測定皆為三重複，數值為平均值±標準差。

挑選具有最佳細胞活性的培養菌絲體與野生牛樟芝及牛樟木進行比較(萃取液濃度皆為 60 µg/ml)，由圖五(B)中可知牛樟木的化學組成對於抗癌活性並無太大效益。然而，一般人認為野生子實體之抗癌能力應較佳，但實驗發現經由光照培養之牛樟菌絲體萃取液對於人類子宮頸癌上皮細胞以達到與野生牛樟子實體萃取液相同的致死率甚至更高， 15 W/m^2 與野生牛樟子實體之細胞活性僅差 2.2%，並無顯著的差異。

結 論

適當的光照與較長的培養時間可提升菌絲體代謝物產量與複雜性，光源調控培養的牛樟芝菌絲體，對於子宮頸癌細胞的生長，具有明顯的抑制效果，與相同劑量下野生牛樟芝子實體的生物活性相當。由本研究結果可知 15 W/m^2 的光照培養下 21 天之牛樟芝菌絲體為具有商業化量產的最佳培養條件。本研究使用氣相層析質譜儀技術可加快發酵產物之組成分析的效能，便於應用在大量培養試驗的品質管制與監控上，對於牛樟菌絲體之商業化應用與天然藥理研究具有相當貢獻。

致 謝

本研究感謝國科會計畫(NSC 102-2113-M-130-001)部分經費的支持，作者非常感謝慈濟大學醫學檢驗暨生物科技學系 胡安仁教授及楊明曄老師的支持，概予提供質譜分析技術的協助。同時也感謝生技學報編輯在投稿上的建議與協助。

參考文獻

- [1] Song TY, Yen GC: Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. J Agr Food Chem 2002, 50:3322-7.
- [2] Mau JL, Huang PN, Huang SJ, Chen CC: Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. Food Chem 2004, 86:25-31.
- [3] Shen YC, Chou CJ, Wang YH, Chen CF, Chou YC, Lu MK: Anti-inflammatory activity

of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. FEMS Microbiol Lett 2004, 231:137-43.

[4] Shen YC, Wang YH, Chou YC, Chen CF, Lin LC, Chang TT, Tien JH, Chou CJ: Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. Planta Med 2004, 70:310-4.

[5] Liu DZ, Liang HJ, Chen CH, Su CH, Lee TH, Huang CT, Hou WC, Lin SY, Zhong WB, Lin PJ, Hung LF, Liang YC: Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. J Ethnopharmacol 2007, 113:45-53.

[6] Chen CC, Liu YW, Ker YB, Wu YY, Lai EY, Chyau CC, Hseu TH, Peng RY: Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Antrodia camphorata* mycelia. J Agric Food Chem 2007, 55:5007-12.

[7] Liu JJ, Huang TS, Hsu ML, Chen CC, Lin WS, Lu FJ, Chang WH: Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. Toxicol Appl Pharm 2004, 201:186-93.

[8] Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, Hseu TH, KuoCT, Hseu YC: Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. Cancer Lett 2006, 231:215-27.

[9] Yeh CT, Rao YK, Yao CJ, Yeh CF, Li CH, Chuang SE, Luong JH, Lai GM, Tzeng YM: Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. Cancer Lett 2009, 285:73-9.

[10] Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR: Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. J Agric Food Chem 2003, 51:3302-8.

[11] Song TY, Yen GC: Protective effects of fermented filtrate from *Antrodia camphorata* in submerged culture against CCl₄-induced hepatic toxicity in rats. J

Agric Food Chem 2003, 51:1571-7.

[12] Tsai MC, Song TY, Shih PH, Yen GC: Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. Food Chem 2007, 104:1115-22.

[13] Wen CL, Chang CC, Huang SS, Kuo CL, Hsu SL, Deng JS, Huang GJ: Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both *in vitro* and *in vivo*. J Ethnopharmacol 2011, 137:575-84.

[14] Tzeng YM, Geethangili M, Ling ST: Purification of bioactive compounds from *Antrodia camphorata* and their pharmacological activities. J Biosci Bioeng 2009, 108:S23.

[15] Huang CC, Hsu MC, Huang WC, Yang HR, Hou CC: Triterpenoid-Rich Extract from *Antrodia camphorata* Improves Physical Fatigue and Exercise Performance in Mice. Evid-Based Compl Alt Med 2012, article ID 364741, 8 pages.

[16] Liu CJ, Chiang CC, Chiang BH: The elicited two-stage submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* for enhancing triterpenoids production and antitumor activity. Biochem Eng J 2012, 64:48-54.

[17] Chiang CC, Chiang BH: Processing characteristics of submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea* in airlift bioreactor. Biochem Eng J 2013, 73:65-71.

[18] Chang YL, Cheng CW: *In vivo* study on the anti-fatigue health benefits of liquid cultured Taiwanofungus camphoratus. Master Thesis of Biotech. Dept., Ming-Chuan University, 2013.

[19] 顧翼東。化學辭典。建宏出版社，1994。

[20] Yazawa Y, Yokota M, Sugiyama K: Antitumor promoting effect of an active component of Polyporus, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. Biol Pharm Bull 2000, 23: 1298-302.

[21] Takaku T, Kimura Y, Okuda, H: Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. J Nutr 2001, 131: 1409-13.

Chemical Profiling and Cyto-Activities of Ethanol Extracts of *Antrodia camphorata* in Submerged Photo-Fermentation

Scott Chia-Yuan Chang¹, Chien-Wei Cheng², Liang-Yu Chen^{1*}

¹Biotechnology Department, School of Health Technology, Ming Chuan University, 333 Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

²Department of Restaurant and Institutional Management, Shih-Chien University, Taipei, Taiwan, R.O.C

Abstract

Antrodia camphorata is a unique and valuable traditional medicinal fungus and used for healthy functions, liked as immunity regulation, hepatoprotection, anticancer in Taiwan. Using color lights to regulate the growth and metabolites of *Antrodia camphorate* in submerged fermentation. The chemical compositions and the cyto-activities of ethanol extracts of fermentation products were evaluated by GC/MS and cytotoxicity, respectively. Results of chemical profiling indicate that the triterpenoid amounts (A_{245nm}) and the complexity in submerged mycelium increased with the cultured days under the constant illumination. The *in vitro* anticancer assay also indicates that the ethanol extracts have a dosage dependent inhibitory on human cervical epithelioid carcinoma (*HeLa*) cells. The mycelium extract of 60 $\mu\text{g/ml}$ inhibits *HeLa* cell activity of 73.6%. Comparing to the 71.4% inhibitory of wild fruiting bodies extract of *A. camphorate* in the same concentration, the nuance in anticancer assay is negligible. Our study demonstrates the photo-fermentation has the potential to promote the functional chemicals and bio-activities of *A. camphorata* for economic production.

Keyword: *Antrodia camphorata*, chemical profiling, anticancer, ethanol extract

Corresponding author: Liang-Yu Chen [lokmath@mail.mcu.edu.tw]

Received 3-26-2014 / Revised 4-2-2014 / Accepted 4-4-2014 / Online published 4-12-2014

MC-Transaction on Biotechnology, 2014, Vol. 6, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.