

舞茸菌絲體之基因毒性試驗分析

陳彥博¹, 郭家芬², 林文源², 陳勁初^{1,2*}

葡萄王生技股份有限公司, 桃園縣¹; 實踐大學食品營養與保健生物學系, 台北市², 台灣

摘要

舞茸(學名 *Grifola frondosa*) 是日本東北野外稀有之藥食兩用菇類, 食用歷史已有上千年, 然而舞茸菌絲體卻缺少安全性報告。本研究目的即是以三項基因毒評估模式來探討舞茸菌絲體發酵液凍乾粉是否會對生物體造成基因毒性。結果顯示, 在沙門氏桿菌回復突變測試中, 最高濃度 0.625 mg/plate 以下, 皆不會使五株沙門氏菌造成突變; 在體外哺乳類細胞染色體變異試驗中, 最高劑量組 5 mg/mL 雖觀察到對 CHO-K1 哺乳類細胞具染色體變異之細胞數較陰性對照組有較高之差異, 但進一步以 Cochran-Armitage trend test 分析結果, 顯示具染色體變異之細胞數與測試劑量間不具有劑量-效應(Dose-response)之相關性, 顯示舞茸菌絲體對哺乳類細 CHO-K1 不具基因毒性; 在微核試驗中, 最高劑量 5000 mg/kg b.w 的舞茸菌絲體對 ICR 小鼠之微核發生率(MN-PCE%)及周邊血液多染性紅血球比例(PCE%)與陰性對照組相較, 均無顯著差異, 顯示舞茸菌絲體對 ICR 小鼠不具有基因毒性。此三種試驗的各種劑量下, 試驗組皆與陰性對照組無顯著差異, 顯示舞茸菌絲體不具有基因毒性。

關鍵字: 舞茸、沙門氏桿菌回復突變測試、體外哺乳類細胞染色體變異試驗、生體內哺乳類動物細胞微核試驗

前言

舞茸的食用歷史有上千年^[1], 由於舞茸獨特的香味, 且肉質柔軟脆嫩, 加上野生舞茸稀有且體積龐大, 在日本有「菇王」的美譽。舞茸的藥用作用最早記載於 17 世紀日本阪然的《菌譜》中就提到舞茸具有延年益壽的作用, 近來研究更發現舞茸富含大量的多醣體而被認為具有抗腫瘤^[2]、強化免疫系統功效^[3, 4]等作用。其中以熱水萃取舞茸所得之 D-fraction 成分物質^[5], 含有獨特的β-葡聚糖多醣體^[6](主鏈β-1,3, 支鏈β-1,6 聚合的葡聚糖多醣體), 具有更好的抗腫瘤活性, 對於實

驗老鼠腫瘤的抑制率達 80%^[6, 7]。舞茸萃取出物經口投予, 亦可發揮抗癌作用, 目前已投入人體臨床試驗。研究也指出, 舞茸以熱水萃取出之多醣對小鼠 S-180 腫瘤的抑制率達 96%以上^[8]。舞茸亦能促進體內辨識和吞噬外來病原菌的白血球活性^[9]的活性, 同時也能刺激其它免疫細胞, 如自然殺手細胞(natural killer cell)^[3, 10]、毒殺型 T 細胞(cytotoxic T cell)等。舞茸亦可以促進白血球細胞製造細胞介白素(interleukin)和增加淋巴細胞的活動^[11-13], 以增加身體抵禦疾病能力。另外舞茸尚有降低血糖^[14]、血壓^[15]和血中膽固醇^[16]的功效。最近的研究也指出舞茸能藉由活化促進神經細胞分化與增生的路徑^[17, 18], 被認為具有減緩神經退化疾病的潛力^[19, 20]。

但舞茸子實體的來源, 無論是野生或是人工栽培, 其生長時所使用椴木或木屑來源

*通訊地址: 葡萄王生技股份有限公司 陳勁初
桃園縣中壢市龍岡路三段 60 號
電話: (03) 4572121 ext. 234
E-mail: gkbioeng@grapeking.com.tw

之樹種複雜，樹木中成分可能被攝入菇類中，亦可能在攝入後被菇體內酵素轉化(biotransformation)，加上栽培的條件不一，均可能影響舞茸子實體之代謝物組成，進而可能影響其安全性；反之，菌絲體之培養乃在穩定的環境控制下進行培養，培養基來源較為穩定一致，故容易有再現性，又可快速大量商業化生產，有其應用潛力。自舞茸多醣體被認為具有抗腫瘤活性以後，日本、美國與英國相繼投入菌絲體開發的科學研究，並成功地分析出具抗腫瘤活性之舞茸多糖^[21]，亦製成產品販售。但利用深層發酵技術培養之舞茸菌絲體則尚無安全性的評估報告；依法規面則是屬於非傳統性食品原料，而且各家使用的菌株來源、培養的基質與培養條件不盡相同，故需各自評估其安全性，依照衛福部食品藥物管理署公告之「非傳統性食品原料」安全性評估方法應進行三項基因毒性測試及28天亞急性毒性餵食測試。本試驗利用三種基因毒性評估方式評估本研究室所研發出的舞茸菌絲體發酵液凍乾粉的初步安全性。

材料與方法

舞茸菌絲體凍乾粉制備

舞茸菌種來源(BCRC-36434)是購買自財團法人食品工業發展研究所生資中心(新竹, 台灣)。利用深層液態方式加以發酵培養可得到菌絲體及其培養液，其製法為先將新繼代後之菌種，接種至馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)上，放置於恆溫培養室(24°C)培養約2-3周。液態發酵培養時則是將平板上的菌株接種到內含1L培養基(1.0%葡萄糖、0.5%黃豆粉、0.5%消化蛋白胍、0.5%酵母萃取物，調整至pH 5.5)的2-L Hinton 燒瓶中，在25°C下振盪培養十天(120 rpm)。培養出之菌絲體再接種至一內含400 L上述培養基的500 L發酵槽中，在25°C下發酵12天。最後將發酵完成所得之菌絲體

發酵液加熱至100°C，2小時後，將其於55°C下減壓濃縮，再冷凍乾燥及磨粉後，保存於-20°C備用。

實驗動物和飼養

在體內哺乳類動物細胞微核測試中，所使用之ICR品系老鼠，是購買自樂斯科生物科技股份有限公司(宜蘭, 台灣)，試驗動物為7周齡，動物先於飼育室中經過7天之隔離檢疫與適應後，始進行試驗。動物飼養於進階生物科技股份有限公司(Level Biotechnology Inc. Taipei, Taiwan.)中，經國際實驗動物管理評估及認證協會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International, AAALAC)認證之SPF等級動物房，並提供一個通風良好的環境及維持溫度在21°C，室內相對溼度55%，每天恆定12小時的光照制度；每籠飼養5隻小鼠，使用飼料為經滅菌後之LabDiet 5010 (PMI® Nutrition International, LLC. Richmond, Indiana, USA)，試驗期間不限食，飲水為經高壓蒸氣滅菌處理的RO水。墊料為Aspen Chips (Northeastern Products Corp., USA)，每週更換。

沙門氏桿菌回復突變測試

本試驗依循經濟合作暨發展組織(OECD)之良好作業規範^[23]進行操作，使用五株沙門氏桿菌 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535及TA1537 (Moltox Inc., U.S.A.)，以沙門氏桿菌回復突變的數目，來評估測試舞茸菌絲體發酵液凍乾粉是否對微生物具有致突變性(mutagenicity)。

試驗物質舞茸菌絲體發酵液凍乾粉以5、2.5、1.25、0.625及0.313 mg/plate為測試劑量，先利用沙門氏桿菌TA100菌株進行劑量範圍測試。由於試驗物質溶解度不高，在5 mg/plate、2.5 mg/plate及1.25 mg/plate濃

度下產生沉澱而物影響TA100 菌株之判讀；而 0.625 mg/plate 則未有影響菌落數判讀之情形；故依據此劑量測試範圍結果，乃以 0.625 mg/plate 為最高測試劑量，其餘四個測試劑量分別為 0.313、0.156、0.078、及 0.039 mg/plate。試驗利用五株沙門氏桿菌，以平板混合測試法(Plate incorporation method)，在有無小鼠肝臟提取混合物 S9 存在的條件下，進行沙門氏桿菌回復突變測試。試驗所使用之 S9 是購自 Moltox (Aroclor 1254-induced; Moltox, BOONE, USA)。進行代謝活化測試時，需在反應物中加入 S9 和 cofactor，用以模擬代謝情形，最終 S9 代謝活化混合物濃度為 1.89% (v/v)。試驗時先加入 0.05 mL 的測試樣品（試驗物質、陰性或陽性對照物質），於 37°C 下反應 24 小時後，再加入含 0.5 mM Histidine/biotin solution 的 top agar 2 mL，混合均勻後，倒在 minimal glucose agar plate 上，並均勻鋪平。待 top agar 凝固後，將培養皿置於 37°C 培養箱中避光培養 482 小時後，計算每個培養皿中突變菌落的數量。

每一種菌株皆用各自不同種類及劑量的致變劑，並在添加及不添加 S9 混合物作用下處理，作為各項試驗之陽性對照組，各菌株使用之致突變劑(Sigma-Aldrich, MO, USA)

及劑量如下：

哺乳類細胞染色體變異試驗

體外染色體變異測試法乃依循經濟合作暨發展組織(OECD)之良好作業規範^[24]及健康食品安全性評估方法^[22]相關規定執行。依據試驗物質是否具誘發哺乳類細胞 CHO-K1 染色體或染色單體產生斷裂、互換或重組等傷害來評估其是否具有基因毒性。將 CHO-K1 細胞進行繼代培養，並使用處於對數生長期之細胞進行試驗。試驗前先將細胞依以下敘述進行分盤，每孔植入 3×10^5 細胞。每個試驗組進行二重複試驗，培養 24 ± 3 小時後，投予試驗物質。在細胞毒性測試部分，依短時間（3-6 小時）跟長時間（18-22 小時）處理細胞後，選出細胞存活率大於 50% 之最高劑量，再依序往下取兩個劑量進行染色體變異測試。本案舞茸菌絲體發酵液凍乾粉在最高測試劑量 5 mg/mL 之試驗組中，處理 18 小時後，細胞存活率為 $53.19 \pm 4.36\%$ ，故使用 5 mg/mL 為最高劑量，其餘劑量依兩倍序列稀釋，往下取四個濃度，共計使用 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/mL 五個測試劑量。細胞先以 colcemid (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 處理，2~4 小時後收集細胞，再以低張溶液(0.075 M KCl)處理後，以 Methanol/Acetic acid 混

表 1. 在添加及不添加 S9 混合物作用下不同菌株的陽性對照組所用之致突變劑及劑量

Strain	S9	Positive control, $\mu\text{g/plate}$	
TA98		2-nitro fluorene (2-NF)	1 $\mu\text{g/plate}$
TA100		Sodium azkium azide (SA)	1 $\mu\text{g/plate}$
TA102	-	Mitomycin (MMC)	0.2 $\mu\text{g/plate}$
TA1535		SA	1 $\mu\text{g/plate}$
TA1537		9-aminoacridine (9-AA)	50 $\mu\text{g/plate}$
TA98		2-aminoanthracene (2-AA)	1 $\mu\text{g/plate}$
TA100		Benzo[a]pyrene (BP)	1 $\mu\text{g/plate}$
TA102	+	2-AA	5 $\mu\text{g/plate}$
TA1535		2-AA	5 $\mu\text{g/plate}$
TA1537		2-AA	5 $\mu\text{g/plate}$

合液(3:1, v/v)固定細胞。將固定後之細胞玻片，以 Giemsa 染劑進行染色。

試驗統計方式為每個試驗組觀察 200 顆細胞，檢查結構性的染色體變異，如染色單體(chromatid)的斷裂(breakage; ctb)與互換(exchange; cte)，染色體(chromosome)的斷裂(breakage; csb)、互換(exchange; cse)或其他異常之染色體變異。紀錄染色體變異的種類及數量，並拍照紀錄。藉此推算染色體變異細胞之機率。

生體內哺乳類動物細胞微核試驗

本試驗利用齧齒類動物之周邊血液細胞，進行生體內哺乳類動物細胞微核測試，以評估舞茸菌絲體發酵液凍乾粉之基因毒性。試驗設計依據經濟合作暨發展組織(OECD)良好作業規範^[25]之相關規定。以無菌水配製驗物質舞茸菌絲體發酵液凍乾粉使成為懸浮液後管餵七周齡大 ICR 小鼠(20 mL/kg b.w.)，測試劑量分別為 1250、2500 及 5000 mg/kg b.w.。本試驗使用口服無菌水做為陰性對照組，腹腔注射 cyclophosphamide 做為陽性對照組(80 mg/kg b.w.)。陰性對照組及試驗物質組以餵食管進行胃管灌食兩次，兩次投予間隔不超過 6 小時，而陽性對照組之投藥頻率為單次。於試驗物質第一次投予後 48 ± 2 與 72 ± 2 小時，由小鼠尾靜脈收集 2 mL 周邊血液製備抹片標本，陽性對照組僅採集 48 ± 2 小時之血液樣本。將血液樣本置於以 acridine orange 預染之載玻片上製作血液抹片，室溫避光靜置 2~3 小時後，以螢光顯微鏡觀察多染性紅血球的比例(polychromatic erythrocytes, PCE %)和微核的發生頻率(micronucleus frequency, MN-PCE%)。

每隻動物在每個採血時間點觀察至少 1,000 顆之紅血球，計算多染性紅血球(polychromatic erythrocytes; PCE)在所有紅血球中所占之比例(PCE %)。至少觀察 2000 顆之

多染性紅血球(PCE)，計算每千顆多染性紅血球(PCE)中微核(micronucleus; MN)出現之機率(MN-PCE %)。

統計分析

實驗結果數據以平均值(Mean)±均值標準誤差(SEM)來表示，試驗數據依照卜瓦松(Poisson)分佈進行統計分析。若 $p < 0.05$ 則視為具有統計上的顯著差異，需進一步進行劑量-效應分析統計，以判定各實驗組間是否具有劑量-效應(dose-response)的關聯性。

結 果

沙門氏桿菌回復突變測試

本試驗是利用五株 *S. typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 各具不同基因特性，帶有數種突變基因，作為篩選致突變劑的模式。這五種沙門氏菌突變株在合成組胺酸的基因上都有缺陷而無法合成組胺酸(*his*)；在含少量的組胺酸培養基中，除少數自發性回復突變(revertant)的細胞外，絕大部分具有缺陷的菌株則無法形成菌落。若將致突變物跟菌株一起培養，則有可能使其再次突變的頻率增加而回復成能合成組胺酸的原型。根據選擇性培養基上出現 *his*⁺ 的回復突變率之高低可測出待測物質的誘變效率。此外，這五株菌的細胞壁基因皆有缺陷，為 LPS 層缺乏(*rfa*)，使試驗物質更易於進入細胞內；TA98、TA100、TA1535、TA1537 四株菌缺乏紫外線照射修復系統(Δ *uvrB*)，同時其附近的硝基還原酶基因缺失，使紫外線照射引起的遺傳損傷的自我修復能力降到最小的程度。菌株 TA1535 與 TA100 含有一個鹼基置換(substitution)突變，能檢測具引起置換突變的致突變劑。TA1537 與 TA98 在重複的 G-C 鹼基對序列中有一個移碼突變(frame-shift)，能檢測引起移碼的致突變劑。而 TA100 和 TA98 就是上述菌株分別加上一個具有抗

ampicillin的質體pKM101，從而提高了檢出的靈敏性。TA102 帶有抗紫外線的修復基因與抗 ampicillin 的質體 pKM101 外，還帶有抗四環黴素的 pAQ1 質體，由於有許多物質本身並不具突變性，但是一旦進入體內經過肝臟酵素代謝活化後就會轉化成致突變劑，因此利用從小鼠肝臟提取的S9混合物，來模擬試驗物質進入體內後的代謝效應，經代謝後再評估是否具突變性。

在平板混合測試中，菌株TA98、TA100、TA102 陽性對照組的自發性回復突變數必須達陰性對照組的2倍以上；而TA1535、TA1537 必須達陰性對照組的3倍以上。每一試驗菌株需有大於三組（含）可分析之劑量組，並符合以上兩項條件，始視為有效試驗。當任一試驗物質劑量組相較於同一次試驗的陰性對照組，所引起之回復突變菌落數達2倍以上，且具有劑量-效應關係時，判定試驗結果為陽性反應；反之則判定為陰性反應。

試驗結果如表一所示，舞茸菌絲體發酵液凍乾粉不論在有無S9代謝活化的情況下，每個測試劑量皆未明顯增加五株菌株的回復突變菌落數，與陰性對照組皆無顯著差異。因此在本次的試驗條件下，舞茸菌絲體發酵液凍乾粉對 *S. typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 等五株菌株不具致突變性(mutagenicity)。

體外哺乳類細胞染色體變異試驗

在初步細胞毒性試驗中，試驗物質在最高測試劑量 5 mg/mL 下對 CHO-K1 細胞並沒有毒性（存活率 > 50 %），故選擇 5 mg/mL 為最高測試劑量，其他測試劑量則依序以兩倍稀釋而得。結果如表二所示，CHO-K1 細胞經試驗物質處理短時間 3-6 小時、長時間 18 小時、在添加 S9 混合物處理短時間 3-6 小時後，以顯微鏡觀察 200 個細胞，並記錄其中具有結構性的染色體變異之細胞數，如染

色單體的斷裂、互換，染色體的斷裂、互換或其他異常之染色體變異。由於在未添加 S9 mixture 組別中，不論是 3 小時或 18 小時試驗組中所使用的 positive control 皆為 0.5 µg/mL mitomycin C，由於在 3 小時處理的陽性對照(positive control)組別，已可觀察到產生染色體變異的細胞數有明顯增加的現象，已確認 mitomycin C 致染色體變異之效果，因此 18 小時處理陽性對照組別可不進行判讀。本試驗中陰性對照組的染色體細胞數皆低於 3%，而各劑量試驗組的染色體變異測試之結果經卜瓦松分佈分析(Poisson distribution analysis)後顯示，舞茸菌絲體發酵液凍乾粉在短時間處理（3 小時含或不含 S9 代謝活化混合物）組別所觀察到具染色體變異之細胞數，相較於陰性對照組皆無顯著差異。然而在長時間處理（18 小時不含 S9 代謝活化混合物）組別中，最高劑量組(5 mg/mL)可觀察到具染色體變異之細胞數，相較於陰性對照組具有顯著差異。

由於僅有一劑量組具有顯著差異，因此進一步以 Cochran-Armitage trend test 分析是否有劑量-效應之相關性。經 Cochran-Armitage trend test 分析結果指出具染色體變異之細胞數與測試劑量間不具有劑量-效應之相關性，因此判定該處理條件下為陰性反應。依據本次測試結果，舞茸菌絲體發酵液凍乾粉在本試驗之測試條件下，對哺乳類細胞 CHO-K1 不具有致染色體變異之基因毒性。

生體內哺乳類動物細胞微核試驗

哺乳類動物細胞微核試驗是取老鼠尾靜脈血液，製備血液抹片，觀察樣本為紅血球，因紅血球在分化成熟過程中會丟失細胞核，其胞漿內只殘留少量的核酸物質，故相對低背景值較低，而這些細胞若是因試驗物質而產生微核(micronucleus)，因其富含核酸物質，可用核酸特異性染劑來辨識。

本試驗包含陰性對照組、陽性對照組與 3 個測試劑量組共五組。同時使用雄性及雌性動物。ICR 小鼠在投藥前一天先進行秤重，並隨機分配至各組，每組包含雌雄各 5 隻動物。最高劑量設計參考中華民國衛生福利部健康食品安全性評估方法，以急性極限測試之劑量(5,000 mg/kg b.w.)做為本試驗之最高投予劑量。陽性對照組以腹腔注射單次投予 Cyclophosphamide 溶液。陰性對照組與試驗組以餵食管進行胃管灌食兩次，分別投予無菌水或試驗物質溶液，並觀察 48 小時跟 72 小時的染色體變異情況。結果顯示試驗期間各劑量組皆未對小鼠無產生任何毒性，且對體重也沒明顯變化。

依據表四結果顯示，在給予試驗物質 48 小時，陽性對照組微核發生率(MN-PCE %)明顯由 0.50±0.35%增加為 17.50±2.09%而所

有測試劑量組之微核發生率相較於陰性對照組則皆無顯著差異，顯示舞茸菌絲體發酵液凍乾粉不具誘發小鼠周邊血球細胞產生微核的能力。另外，多染性紅血球在陰性對照組的比例 3.42±0.26%，與之相較，陽性對照組(cyclophosphamide)為 0.90±0.14%，呈現明顯下降，而在各試驗劑量組中其周邊血液多染性紅血球在所有紅血球之比例與陰性對照組相較下亦無明顯差異(表 4)，顯示試驗物質不會抑制 ICR 小鼠之造血功能。綜合本次試驗結果，舞茸菌絲體發酵液凍乾粉於本試驗系統下對於 ICR 小鼠不具有基因毒性，亦不影響其造血機能。

討 論

菇類具有低糖、低鹽、低膽固醇、高纖維等健康特質，又具有許多的生理功能性，因

表 1. 試驗物質舞茸菌絲體發酵液凍乾粉的沙門氏菌回復突變基因毒性分析結果

Dose (mg/plate)	Number of revertants/plate (without S9 activator, Mean ± S.D., n=3)				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Negative control ^a	54.3 ± 10.3	181.7 ± 9.1	306.7 ± 17.0	9.7 ± 4.0	12.0 ± 2.6
Positive control ^b	197.7 ± 25.2*	729.3 ± 89.7*	3392.0 ± 334.1*	426.7 ± 26.3*	251.0 ± 36.8*
0.625	54.0 ± 3.5	188.0 ± 7.9	321.7 ± 17.2	14.7 ± 2.5	9.3 ± 3.2
0.313	55.0 ± 2.6	190.3 ± 3.1	315.3 ± 31.9	17.0 ± 4.0	10.3 ± 0.6
0.156	40.3 ± 3.5	189.7 ± 6.1	308.0 ± 5.6	13.3 ± 4.6	10.7 ± 2.1
0.078	41.0 ± 6.2	185.7 ± 14.4	306.3 ± 36.6	6.7 ± 0.6	8.5 ± 2.1
0.039	35.0 ± 4.6	188.7 ± 10.0	303.3 ± 8.1	12.0 ± 3.0	10.7 ± 1.2
Dose (mg/plate)	Number of revertants/plate (with S9 activator, Mean ± S.D., n=3)				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Negative control ^a	36.3 ± 8.4	182.3 ± 8.4	321.7 ± 9.6	12.0 ± 2.6	11.3 ± 4.5
Positive control ^c	918.3 ± 126.1*	833.3 ± 30.0*	956.7 ± 88.2*	264.5 ± 6.4*#	601.7 ± 82.0*
0.625	31.7 ± 1.5	174.7 ± 12.7	377.0 ± 16.5	13.3 ± 1.5	10.3 ± 2.1
0.313	39.7 ± 6.0	179.0 ± 6.2	336.0 ± 58.2	11.7 ± 3.8	8.3 ± 0.6
0.156	39.0 ± 2.0	184.3 ± 4.0	389.0 ± 14.2	12.0 ± 3.6	9.0 ± 1.7
0.078	43.0 ± 3.5	179.3 ± 11.0	391.3 ± 44.4	11.0 ± 2.0	9.7 ± 2.9
0.039	40.0 ± 2.6	177.3 ± 9.5	387.3 ± 26.6	10.3 ± 2.1	10.0 ± 3.5

此圖表顯示在各實驗條件下沙門氏菌落回復突變的菌落數(Mean ± S.D., n=3)。測試菌株 TA98, TA100, TA102, TA1535 和 TA1537 分別試驗代謝前(不添加 S9)跟模擬代謝後(添加 S9)的致突變性。

註 a: 無菌水。b、c: 陽性對照組，詳見材料與方法。

*: 表示陽性反應，試驗物質劑量組之菌落數達陰性對照組的 2 倍或 3 倍以上。

此加深民眾對菇類之膳食功能與營養價值的認同，促進了菇類以及保健食品市場的高度成長。補充健康食品來增加平常較少攝取的營養素，已逐漸成為國人飲食習慣的一部分。菇類子實體雖然擁有長久且普及的食用經驗，然而在栽培上因使用雜木屑來培養，事實上栽培者亦無能力來掌握所使用木屑來源的樹種，故樹木中成分極可能被菇類攝入或轉換(biotransformation)，故子實體中成分相對複雜。但利用生物技發酵來生產菌絲體，其培養基穩定，且可在標準作業流程的環境控制下進行培養，故能提供來源品質穩定且再現性高的菌絲體產品供食用。目前愈來愈多文獻指出，液態發酵培養舞茸菌絲體能利用培養用基質得到大量代謝物，且其代謝產物具有抗氧化活性⁽²⁶⁾；且對比於固態培養，液態發酵能將廢棄原料進行二次發酵，利用舞茸發酵特性產生的有機酸來改變茶葉的風味

⁽²⁷⁾，可見舞茸菌絲體發酵應用上的潛力。

舞茸為傳統性食用食材，其子實體已有長期的食用歷史，在市面上已屬普遍常見，本次實驗利用深層發酵技術培養舞茸菌絲體，雖主成分菌絲體之菌絲組成跟子實體中之DNA相同，但因製造過程新穎，故屬於非傳統食用原料，因此乃依照衛福部食品藥物管理署公告「健康食品安全性評估方法」先進行三項基因毒性之安全性評估試驗物質舞茸菌絲體是否會引起細菌突變或是細胞染色體變異等基因毒性。本研究結果顯示，舞茸菌絲體對細菌、體外細胞培養跟動物體內周邊血液的測試都沒有明顯基因毒性反應，另外我們也進行大鼠單一劑量急性毒性試驗，在試驗的最高餵食劑量 2000 mg/kg/下，舞茸菌絲體對大鼠體重改變、血液生化值、組織病理切片以及臟器相對重量都未發現相關毒性症狀（數據未顯示）。故初步認定在本研究

表 2. 舞茸菌絲體發酵液凍乾粉對體外 CHO-K1 細胞染色體變異頻率分析

Dose	S9 mixture	ctb	cte	csb	cse	Other	AF	p value
Short-term treatment								
Negative control ^a	--	5	0	0	0	0	5/200	--
5 mg/mL	--	5	0	2	0	0	7/200	0.3007
2.5 mg/mL	--	2	0	1	1	0	4/200	0.7851
1.25 mg/mL	--	0	1	0	0	1	2/200	0.9834
Positive control ^b	--	13	5	3	0	0	21/200	0.0000*
long-term treatment								
Negative control ^a	+	4	0	0	0	0	4/200	--
5 mg/mL	+	5	0	0	0	0	5/200	0.4405
2.5 mg/mL	+	5	0	0	1	0	6/200	0.2851
1.25 mg/mL	+	7	0	1	0	0	8/200	0.0996
Positive control ^c	+	12	8	0	2	1	23/200	0.0000*
long-term treatment								
Negative control ^a	--	1	0	1	0	0	2/200	--
5 mg/mL	--	7	1	0	0	0	8/200	0.0138*
2.5 mg/mL	--	3	1	0	0	1	5/200	0.1247
1.25 mg/mL	--	5	0	0	0	0	5/200	0.1247

^a在各實驗條件下沙門氏菌落回復突變的菌落數 (Mean ± S.D., n=3)。測試菌株 TA98, TA100, TA102, TA1535 和 TA1537 分別試驗代謝前（不添加 S9）與模擬代謝後（添加 S9）的致突變性。

註^b無菌水；^{c,d}陽性對照組。

*表示陽性反應，即試驗物質劑量組之菌落數達陰性對照組的 2 倍或 3 倍以上。

的試驗劑量下具有安全性，但仍需進行亞急毒試驗來觀察慢性累積的毒性。

表 3. 舞茸菌絲體發酵液凍乾粉對體內哺乳類動物細胞周邊血液中「多染性紅血球」發生頻率之影響。

Dose(mg/kg b.w.)	(PCE%, mean \pm SD, n=5)			
	male		female	
	48h	72h	48h	72h
Negative control (sterile water)	3.42 \pm 0.26	3.72 \pm 0.08	3.78 \pm 0.13	3.64 \pm 0.17
Positive control (Cyclophosphamide)	0.90 \pm 0.14	--	1.14 \pm 0.21	--
1250	3.60 \pm 0.17	3.76 \pm 0.13	3.68 \pm 0.28	3.70 \pm 0.14
2500	3.52 \pm 0.13	3.72 \pm 0.22	3.50 \pm 0.24	3.78 \pm 0.04
5000	3.70 \pm 0.14	3.74 \pm 0.05	3.64 \pm 0.09	3.66 \pm 0.13

^a在各實驗條件下每 200 顆細胞中染色體變異的頻率 (n/200)。每一組實驗中各有陽性對照組、陰性對照組與 3 個劑量的舞茸菌絲體試驗物質。

註^b細胞培養液：^cMitomycinC (0.5 μ g/mL)；^dBenzo (a) pyrene (25 μ g/mL)；AF, 變異頻率 (Aberration frequency)，細胞分裂中期時染色體變異的細胞數 (n/200)。

*與陰性對照組比較有顯著差異, p<0.05; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; other, other abnormalities.

表 4. 舞茸菌絲體發酵液凍乾粉對體內哺乳類動物細胞周邊血液中「微核生成」發生頻率之影響。

Dose(mg/kg b.w.)	(MN %PCE, mean \pm SD, n=5)			
	male		female	
	48h	72h	48h	72h
Negative control (sterile water)	0.50 \pm 0.35	0.40 \pm 0.42	0.50 \pm 0.35	0.30 \pm 0.45
Positive control (Cyclophosphamide)	17.50 \pm 2.09*	--	18.20 \pm 2.44*	--
1250	0.30 \pm 0.27	0.30 \pm 0.27	0.40 \pm 0.42	0.50 \pm 0.35
2500	0.50 \pm 0.50	0.40 \pm 0.42	0.40 \pm 0.42	0.40 \pm 0.65
5000	0.60 \pm 0.42	0.50 \pm 0.71	0.60 \pm 0.65	0.60 \pm 0.42

每隻動物觀察 2000 顆多染性紅血球(PCE)產生微核之數量。微核發生率以每千顆 PCE 產生微核的數量計算(MN-PCE%)，微核發生率以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)呈現。

*：經卜瓦松分佈統計分析與陰性對照組間具有顯著差異(p<0.05)

參考文獻

1. Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity. Proc Soc Experi Bio Med 1999; 221:281-93.
2. Suzuki I, Itani T, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T et al. Antitumor activity of a polysaccharide fraction extracted from cultured fruiting bodies of *Grifola frondosa*. J Pharmacobiodynamics 1984; 7:492-500.
3. Huyen T, Li Q, Yang H, Jin ML, Zhang MJ, Ye LJ et al. Protective effect of polysaccharides on simulated microgravity-induced functional inhibition of human NK cells. Carbohydrate polymers 2014; 101:819-27.
4. Suzuki I, Itani T, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T et al. Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. J Pharmacobiodynamics 1985; 8:217-26.
5. Matsui K, Kodama N, Nanba H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the carcinoma angiogenesis.

- Cancer Lett 2001; 172:193-8.
6. Iino K, Ohno N, Suzuki I, Sato K, Oikawa S, Yadomae T. Structure-function relationship of antitumor beta-1,3-glucan obtained from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*. Chem Pharma Bull (Tokyo) 1985; 33: 4950-6.
 7. Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-beta-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages *in vitro*. Biosci Biotech Biochem 2001; 65:1993-2000.
 8. Suzuki I, Takeyama T, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Suzuki Y et al. Antitumor effect of polysaccharide grifolan NMF-5N on syngeneic tumor in mice. J Pharmacobio-dyn 1987; 10:72-7.
 9. Abe M, Seguchi M. Proteases of Maitake (*Grifola frondosa*) responsible for breakdown of wheat flour dough and their reaction with gluten proteins. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67:2018-21.
 10. Masuda Y, Murata Y, Hayashi M, Nanba H. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells. Bio Pharma Bull 2008; 31:1104-8.
 11. Ike K, Kameyama N, Ito A, Imai S. Induction of a T-helper 1 (Th1) immune response in mice by an extract from the *Pleurotus eryngii* (Eringi) mushroom. J Med Food 2012; 15:1124-8.
 12. Kodama N, Harada N, Nanba H. A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice. Japanese J Pharmacol 2002; 90:357-60.
 13. Inoue A, Kodama N, Nanba H. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion. Biol Pharm Bull 2002; 25:536-40.
 14. Kubo K, Aoki H, Nanba H. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). Biol Pharm Bull 1994; 17:1106-10.
 15. Adachi K, Nanba H, Otsuka M, Kuroda H. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). Chem Pharma Bull 1988; 36:1000-6.
 16. Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. Experiment Bio Med 2001; 226:758-65.
 17. Nishina A, Kimura H, Sekiguchi A, Fukumoto RH, Nakajima S, Furukawa S. Lysophosphatidylethanolamine in *Grifola frondosa* as a neurotrophic activator via activation of MAPK. J Lipid Res 2006; 47:1434-43.
 18. Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. Neurite outgrowth stimulatory effects of culinary-medicinal mushrooms and their toxicity assessment using differentiating Neuro-2a and embryonic fibroblast BALB/3T3. BMC Complement Alternat Med 2013; 13: 261.
 19. Sabaratnam V, Kah-Hui W, Naidu M, Rosie David P. Neuronal health - can culinary and medicinal mushrooms help? J Tradit Complement Med 2013; 3:62-8.
 20. Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. Criti Rev Biotech. 2014.
 21. Cui F, Zan X, Li Y, Yang Y, Sun W, Zhou Q et al. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa*. Interna J Biol Macromole 2013.
 22. 行政院衛生署藥物食品檢驗局。健康食品安全性評估方法。衛署食字第 88037803 號公告，1999。行政院衛生署，台灣。
 23. OECD. Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. 1997. OECD
 24. OECD. Test No. 473: *In vitro* mammalian chromosome aberration test. 1997. OECD
 25. OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. 1997. OECD
 26. Huang SJ *et al.* Preparation of culinary-medicinal maitake mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphyllphoromycetideae)-fermented wheat and its antioxidant properties. Int J Med Mush 2011; 13:61-71.
 27. Bai WF *et al.* Chemical composition and sensory evaluation of fermented tea with medicinal mushrooms. Indian J Microbiol 2013. 53:70-6.

Mutagenicity and genotoxicity effects of *Grifola frondosa* mycelium

Yen-Po Chen¹, Chia-Feng Kuo², Wun-Yuan Lin², Chin-Chu Chen^{1,2*}

Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan County¹, Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei city², Taiwan

Abstract

Maitake (*Grifola frondosa*) is an edible and medicinal mushroom that has been widely consumed in Japan and other Asian countries for centuries. However, there should be guidelines to ensure its safety as well as information on its risks for the recipient since mushroom mycelium has an identity distinct from mushrooms. To ensure more information about the safety of *G. frondosa* mycelium, three genotoxicity tests were performed. Results show that in Ames test, no cytotoxic or mutagenic potential was found in five *Salmonella typhimurium* strains at a concentration as high as 0.625 mg/plate. In the *in vitro* chromosome aberration test, 5 mg/mL *G. frondosa* mycelium was found to induce structural chromosome when compared to the negative control group. These results were further evaluated

using the Cochran-Armitage trend test, which showed negative for a dose response. Hence, *G. frondosa* mycelium presents negative reaction in this assay. At the highest dose of 5000 mg/kg b.w. of *G. frondosa* mycelium, no significant increase was observed in the frequency of MN-PCE and PCE, indicating that the dose used was not toxic to ICR bone marrow. These results conclude that *G. frondosa* mycelium does not provoke mutagenicity and genotoxicity in these systems.

Key words: *Grifola frondosa*, Ames test, *In vitro* chromosome aberration test, *In vivo* erythrocyte micronucleus test