

蜜環菌發酵液凍乾粉之基因毒性及急毒性分析

楊千瑩¹ 林定威¹ 郭家芬² 劉忠憲³ 廖麗娟³ 吳家駒³ 陳勁初^{1,2*}

葡萄王生技股份有限公司¹ 中壢市，實踐大學食品營養與保健生技學系² 台北市
財團法人食品工業發展研究所³ 新竹市，台灣

摘要

蜜環菌(*Armillaria mellea*)為食藥用真菌，其子實體，菌絲體及菌索皆可入藥，具有很高的開發價值。本研究利用蜜環菌發酵液凍乾粉進行三項基因毒性試驗及單一劑量口服急性毒性試驗。探討蜜環菌發酵菌絲體是否會對生物體造成急性毒性或基因毒性傷害，並以此結果作為日後食用安全性之參考。當以體外細菌基因突變測試法進行試驗，測試樣品分別以水及DMSO萃取後經無菌過濾，使用50.1 µg/plate ~ 5,000 µg/plate等劑量，在含有或不含有代謝活化系統(S9混合物)的測試條件下，對*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537及*Escherichia coli* WP2 *uvrA*等菌的基因突變試驗結果與陰性對照組比較均無顯著性差異。而在體外鼠淋巴瘤tk分析中，測試樣品在脂溶性(DMSO) 0.63、1.25與2.5 mg/ml以及與水溶性(D-PBS) 1.25、2.5與5.0 mg/mL三個劑量組下所造成之基因突變頻率，在含有與不含有代謝活化系統S9之測試條件下，與陰性對照組(DMSO及D-PBS)比較，其值均小於陰性對照組值之2倍，因此，測試結果屬於陰性反應。另外，在動物體內周邊血液微核試驗中，經過低劑量0.5 g/kg body weight (bw)、中劑量2.5 g/kg bw與高劑量5.0 g/kg bw，處理的個別雄性小鼠，其等的周邊血液紅血球內之網狀紅血球之「微核生成比例」及紅血球中之「網狀紅血球生成比例」，與陰性對照組間均無顯著性差異。至於口服急性毒性試驗中，大鼠經口餵食單一高劑量8 g/kg body weight (bw)經口餵食大鼠後，連續觀察2週，結果顯示，試驗組大鼠活動狀況正常，平均體重及體重增加百分率(%)與對照組間並無差異，也無中毒或死亡現象。綜合上述，蜜環菌發酵液凍乾粉，不具有口服急性毒性及基因毒性之疑慮。

關鍵字：蜜環菌發酵液凍乾粉、口服急性毒性試驗、基因毒性試驗

前言

蜜環菌(*Armillaria mellea*)又名榛蘑，屬於擔子菌門、傘菌綱、傘菌目，蜜環菌屬之真菌。廣泛分布於熱帶及亞熱帶地區，為一中國傳統民間藥物，有清肺、驅寒、益胃等功效，可治療皮膚乾燥、眼炎和夜盲症⁽¹⁾。其菌索常生長於天麻的塊莖上，與之共生，為栽培天麻時不可缺少的共生菌⁽²⁾。天麻(*Gas-*

trodia data)為蘭科多年生草本寄生植物，《神農本草經》中記載天麻可治療腦神經疼痛，具有鎮靜安眠等作用。《本草綱目》中記載，天麻主治風濕、四肢痙攣、暈眩頭痛、小兒驚癇等。近幾年臨床證明，天麻素注射液有擴張腦血管、增加血管彈性作用，對治療暈眩、及腦動脈供血不足而引起的神經症狀和新血管疾病有顯著療效⁽³⁾。此外更將天麻作高空飛行員的腦保健藥物，認為可以增強視神經的分辨能力。由於天麻與蜜環菌在化學成分和藥理功能都極為相似，故有學者認為天麻之功效來自於共生之蜜環菌。

蜜環菌為傳統藥用真菌，其子實體，菌絲體及菌索皆可入藥，具有很高的開發價值

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

(4)。蜜環菌含有多種化合物，包含固醇類，脂肪酸，萜類，吡啶化合物及腺苷衍生物等成分⁽⁵⁾，相關之研究除固態栽培條件探討外，並有對蜜環菌之發螢光機制⁽⁶⁾及感染天麻機制⁽⁷⁾等進行探討。功能性部份子實體則有多醣及多酚類的抗氧化活性研究^(8, 9)，及多醣之抗腫瘤活性及免疫活性^(10, 11)等。

近年來更利用液有許多液態發酵技術進行培養⁽¹²⁾，以大量生產菌絲體⁽¹³⁾及胞內多醣⁽¹⁴⁾，而利用液態發酵技術進行大量培養，不僅能縮短培養時間，且栽培不受天候影響等優點。液態培養產生之多醣為重要活性成分之一^(15, 16)，具有免疫調節^(17, 18)、調節血糖⁽¹⁹⁾、抗氧化⁽²⁰⁾、抗暈眩⁽²¹⁾等活性，可見其功能性不亞於子實體，因此開發蜜環菌菌絲體作為天麻之代用品為現今發展趨勢。

本公司曾利用蜜環菌菌絲體進行液態發酵培養，經分離純化後得到一化合物 *Armillaridin*，經弘光科技大學陳建志教授及陽明大學陳裕仁教授研究得知，此成分具有抑制食道癌細胞增殖及增加癌細胞放射敏感性之功效⁽²²⁾，為確保此方式生產之蜜環菌不具有具有毒性，因此，須進行評估蜜環菌液態發酵的乾燥粉末是否具有基因毒性及急毒性，以提供未來產品開發時之劑量考量。

材料與方法

試驗物質

「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」所使用之蜜環菌(*Armillaria mellea*)為 BCRC 36361 菌種購自食品工業發展研究所生物資源與保存中心(新竹市，台灣)。

液態發酵條件

將培養於 PDA 平板上之蜜環菌菌絲，摺取 0.5 cm 正方大小菌塊，接入 2 L 三角搖瓶中，培養溫度控制為 25±2°C，震盪轉速為 120 rpm 條件下培養二週後，接入 500 L 發

酵槽，培養條件為攪拌 60 rpm，通氣量 0.5 vvm 下培養一週後，再接入 20 噸發酵槽培養一週(培養條件：溫度 25±2°C，攪拌 50 rpm，通氣量 0.5 vvm)，蜜環菌發酵液經濃縮、冷凍乾燥及磨粉後即成為「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」。

成分分析

秤取蜜環菌發酵液凍乾品 0.2 g 加入 10 mL 甲醇震盪搖勻後，經超音波震盪萃取 30 分鐘，離心 5000 rpm 5 分鐘並以 0.45 μm 濾膜過濾後備用。高效液相層析儀分析條件如下，分離管柱為：Cosmosil 5C18 AR-II C18, 4.6×250 mm，移動相為 A - Water, B - Acetonitrile, 0 - 30 min, B 比例為 30 - 100%，流速設定為 1.0 mL/min，檢測波長為 UV 254 nm，管柱溫度設定為 40°C，進樣量為 10 μL。標準品 melleonal C 及 *armillaridin* 由弘光科技大學陳建志教授提供(自行分離純化)。

細菌基因突變分析(Ames test)⁽²³⁾

本試驗測試菌株為 *Salmonella typhimurium* TA1537、TA98、TA100 及 TA1535 等 4 菌株，其中 *Salmonella typhimurium* TA1537、TA98、TA100 及 TA1535 等 4 菌株，皆購自 Discovery Partners International (DPI, USA) 公司；*Escherichia coli* WP2 *uvrA*，購自 NITE Biological Research Center (NBRC) (Chiba, JAPAN)。各菌株使用之陽性對照藥劑如下：*S. typhimurium* TA98 使用 2-aminoanthracene (2-AAT, Sigma) (5 μg/plate) 及 4-nitro-*o*-phenylene-diamine (NPD, Clariant) (20 μg/plate)；*S. typhimurium* TA100 使用 2-aminoanthracene (5.0 μg/plate) 及 sodium azide (SA, Merck) (1.0 μg/plate)；*S. typhimurium* TA 1535 使用 2-aminoanthracene (10 μg/plate) 及 sodium azide (1.0 μg/plate)；*S. typhimurium*

TA1537 使用 2-aminoanthracene (5 µg/plate) 及 ICR-191(Sigma) (1.0 µg/plate); *E. coli* WP2 *uvrA* 則用 2-aminoanthracene (20 µg/plate) 及 N-Ethyl-N-nitro-nitrosoguanidine (10 µg/plate)。樣品分別以水及 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Merck) 萃取，製備成水溶性與脂溶性樣品，並使劑量為 50 mg/mL，經以 0.22 µm 無菌過濾膜過濾，取 0.1 mL 作為試驗最終濃度。

培養方式為前置培養法 (preincubation test)，測試之反應物包含 0.1 mL buffer、0.1 mL 測試樣品 (或陰性、陽性對照組)、0.1 mL 新鮮菌液、0.5 mL 新鮮配製的 S9 mix。置於 37°C 培養箱中，培養 20 分鐘後，將其內之混合液分別取出，加入含 2 mL 溶融態之 Top agar (已含 10% 之 0.5 mM Bio/His 或 tryptophan solution) 試管中，震盪均勻，舖在已製備好之 minimal glucose plate 平板上，將平板正放待凝後，於 37°C 培養箱中倒置培養 48-72 小時後計算逆突變菌落數。

結果判定依據，(i) 測試樣品對細菌造成之逆突變菌落數與陰性對照組有統計上之明顯差異，至少有一劑量高於 2 倍以上，且呈劑量與反應正相關性者，均視為具有逆突變正反應作用；(ii) 測試菌株 *S. typhimurium* TA98、TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* 菌系任一劑量之回復突變數高於陰性對照組之自然回復突變菌落數 (spontaneous revertants) 2 倍以上；或 (iii) *S. typhimurium* TA1535、TA1537 菌系之回復突變數高於陰性對照組之自然回復突變菌落數 3 倍以上，則判定試驗物質對測試菌株具有致變異性⁽²⁴⁾。

體外鼯鼠淋巴瘤 tk 分析法⁽²⁵⁾

本實驗所使用之細胞株名稱為 L5178Y tk[±]，為鼯鼠淋巴球細胞 (mouse lymphoma cell)，來源自食品工業發展研究所生物資源與保存中心 (新竹)，編號為 BCRC 60112。

細胞培養基 RM20：80% RPMI1640 含 0.1% Pluronic F-68 及 20% HI-HS (heat inactivated horse serum) (HS, Hyclone)。細胞培養條件為 37°C，5% CO₂。樣品以水及 DMSO 萃取，脂溶性最終測試濃度分別為 0.63、1.25、2.5 mg/mL，水溶性最終測試濃度分別為 1.25、2.5、5.0 mg/mL。細胞基因試驗分別於 -S9 與 +S9 下進行。在 -S9 的陽性對照組為 Ethyl methanesulfonate (EMS) (Sigma)，使用劑量為 0.32 mg/mL；在 +S9 的陽性對照組為 N-(2-Fluorenyl) acetamide (2AAF) (Sigma)，使用劑量為 0.2 mg/mL。

細胞活化去除自發性突變後，將不同濃度的水溶性樣品，以離心方式置換細胞培養基，於 37°C，5% CO₂ 下培養 4 小時，將細胞液取出，以 800 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 RM00 培養基清洗兩次去除樣品後，再以 RM20 培養基調整細胞濃度為 1 × 10⁵ cells/mL 種於 T25 flask，每個 T25 flask 加入 10 mL 的細胞培養液，於 37°C，5% CO₂ 培養 48 小時。以 RM20 培養基將細胞稀釋成 10 cells/mL，並以 200 µL/well 的量，相當於 2 cells/well 之細胞濃度，培養於 96 well 平盤三盤，在 37°C，5% CO₂ 培養 12 天。另以含有 5.0 µg/mL TFT 篩選劑的 RM20 培養基將細胞稀釋成 1 × 10⁴ cells/mL，以 2000 cells/well 之細胞濃度，培養於 96 well 平盤三盤，在 37°C，5% CO₂ 中，培養 12 天後，以肉眼觀察並計算形成細胞群落的孔數。

計算 zero term of Poisson distribution P(0)，plating efficiency (P.E. %)，cloning efficiency (C.E. %) 之數值。測試樣品若對細胞造成之基因突變頻率 (%) 超過陰性對照 2 倍以上，且有劑量與反應正相關性者，視為具有基因毒性正反應作用⁽²⁶⁾。

$$P(0) = \text{number of empty wells} / \text{total wells plated}$$
$$\text{P.E.} \% = (-\ln P(0) / \text{number of cells per well}) \times 100 \%$$

C.E. % = $(-\ln P(0) / \text{number of cells per well}) \times 100 \%$

M.F. per survival = C.E. % in selective medium / P.E. % in non-selective medium

小鼠周邊血液微核試驗⁽²⁷⁾

實驗動物分五組，以無菌水作為陰性對照組(NC)，以餵食環磷酰胺(cyclophosphamide) 0.1 g/Kg bw 溶於無菌水作為陽性對照組(PC)。依最大餵食劑量 5.0 g/Kg bw 當作高劑量(H)，中劑量為 2.5 g/Kg bw(M)、低劑量為 0.5 g/Kg bw(L)，餵食 48 小時經 CO₂ 安樂死後，自小鼠心臟採血 200 μ L 血液，置於含 heparin 之離心管混合均勻，再從其中取混合液加入在 -80 °C 之甲醇中，固定隔夜後，將冷藏之 NaHCO₃ 等張溶液倒入，以 Swinging bucket 離心(1,000 \times g, 5 min)，去除上清液後，取其懸浮液加入 FITC-CD71(FITC conjugated anti-mouse CD71, eBioscience) 與 RNase(Ribonuclease I (EC 3.1.27.5) Type I-A, Sigma) 混合溶液，分別於 4 °C 及室溫下作用 30 min，再加入 PI(Propidium iodide, Sigma) 染劑，以流式細胞儀(Flow cytometric-BD FACScalibur)⁽²⁸⁾ 檢測 5,000 顆網狀紅血球，並以 Cell Quest 軟體進行分析，計算「微核生成比例」(含微核之網狀紅血球數/網狀紅血球數，%)，與「網狀紅血球生成比例」(網狀紅血球數/全部紅血球數，%)。每隻動物收集 5,000 顆網狀紅血球，分析「微核生成比例」，同時計算「網狀紅血球生成比例」。

單一劑量大鼠口服急毒試驗⁽²⁹⁾

實驗動物為 4 週齡 SD 大鼠，購自樂斯科技園區實驗動物培育及研發中心(宜蘭，台灣)。動物飼料由德國 Altromin 公司生產 1324N 真空包裝 SPF 級粒狀飼料，購自捷懿企業股份有限公司。動物飼養之環境設定為

溫度 23 \pm 2 °C，12 小時光照/黑暗、60 \pm 10% 相對濕度。

實驗前 1 天大鼠禁食，次日試驗組大鼠分二次(相隔 30min) 管餵測試樣品 8 g/Kg bw，試驗組與對照組分別使用 SD 雄性及雌性大鼠各 6 隻。餵食後每日觀察(動物中毒症狀、異常症狀的發生、復原及死亡時間) 及每週秤重一次至第 2 週為止。試驗期間死亡鼠隻立即解剖進行肉眼病理檢查並記錄。試驗結束後，所有鼠隻均以 CO₂ 安樂死犧牲，進行解剖肉眼檢查體內臟器病理變化，如：肝、脾、腎上腺、腎、小腸、睪丸(卵巢)、副睪與胸腔之心臟及肺臟。

統計方法

實驗結果數據以平均值(Mean) \pm 均值標準誤差(SEM) 來表示，以 One way ANOVA 依 Duncan's t 檢定⁽³⁰⁾ 進行統計，將各組與陰性對照組做比較。若 $p < 0.05$ ，則表示劑量組與陰性對照組之間有顯著性差異(以 * 表示)。

結 果

成分分析

目前蜜環菌菌絲體之產品仍以多醣體為主要指標項目，但因多醣體非為專一性指標，因此開發其他指標成分進行品質監控。蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉委託弘光科技大學陳建志教授進行分離純化，其主要成分為 mellelledonal C 及 armillaridin，因此將此二成分列為發酵液凍乾粉品管項目，菌絲凍乾粉經萃取分析後結果如圖 1，可測得 mellelledonal C 及 armillaridin 含量各為 1.77 mg/g 及 0.7 mg/g。

細菌基因突變分析(Ames test)

實驗結果顯示，測試樣品「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」分別以水及 DMSO 萃取後經無菌過濾，以 50.1 μ g/plate~5,000 μ g/plate

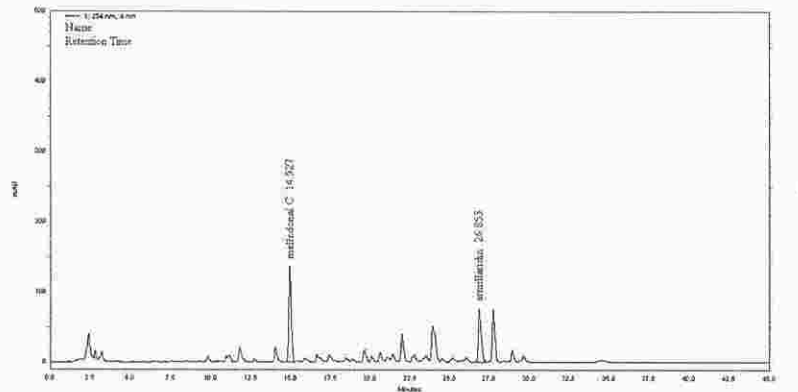


圖 1. 蜜環菌菌絲體(mycelium)發酵液凍乾粉的 HPLC 分析圖譜。

等劑量，在含有或不含有代謝活化系統（S9 混合物）的測試條件下，對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及 *E. coli* WP2 *uvrA* 等進行檢測。試驗結果如表 1（水相萃取）及表 2（DMSO 萃取）。結果顯示各測試菌株的致突變性不論樣品以水萃取或 DMSO 萃取，無論在有或無添加 S9 混合物測試時，各劑量的測試結果與陰性對照組相比無顯著的差異。即使試驗物質的對高劑量(5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)，仍未引起顯著突變差異；相對於陰性對照組，陽性對照組逆突變菌落數皆引發兩倍以上。綜合上述，指出該試驗物質與其代謝產物對測試菌株並不具有致變異性。

體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法

(*In vitro* Mouse Lymphoma tk assay)

測試樣品之脂溶物在-S9 條件下，測試濃度分別為 0.63、1.25 與 2.5 mg/mL，對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率(M.F. $\times 10^{-6}$)分別為 44.6 ± 11.2 、 40.9 ± 5.1 與 32.5 ± 7.6 ，其值均小於陰性對照組(32.4 ± 9.0) 2 倍（表 3）。在-S9 條件下，陽性對照組 EMS(0.32 mg/mL)對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率為 326.5 ± 12.9 ，誘發 tk 基因突變頻率高於陰性對照組 10 倍以上。在+S9 條件下，陽

性對照組 2AAF(0.2 mg/mL) 對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率為 439.8 ± 13.5 ，誘發 tk 基因突變頻率高於陰性對照組 10 倍以上。

測試樣品之水溶物在-S9 條件下，測試濃度分別為 1.25、2.5 與 5.0 mg/mL，對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率(M.F. $\times 10^{-6}$)分別為 55.6 ± 5.9 、 52.9 ± 12.4 與 52.7 ± 2.5 ，其值均小於陰性對照組(38.9 ± 2.2) 2 倍（表 4）。在-S9 條件下，陽性對照組 EMS(0.32 mg/mL)對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率為 $326.5312.9$ ，誘發 tk 基因突變頻率高於陰性對照組 8 倍以上。在+S9 條件下，對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率(M.F. $\times 10^{-6}$)分別為 69.7 ± 5.3 、 64.5 ± 7.3 與 59.0 ± 10.9 ，最高濃度(5 mg/mL)其值均小於陰性對照組(44.1 ± 5.7) 2 倍。在+S9 條件下，陽性對照組 2AAF(0.2 mg/mL) 對小鼠淋巴瘤細胞株之 tk 基因突變頻率為 439.8 ± 13.5 ，誘發 tk 基因突變頻率高於陰性對照組 9 倍以上。

小鼠周邊血液微核試驗(The micronuclei assay in the mouse peripheral blood)

陰性對照組之微核試驗，其周邊血液中「微核生成比例」為 $0.36 \pm 0.12\%$ ，網狀紅血球比例為 $2.61 \pm 0.28\%$ （圖 2、表 5）。陽性對照組，不僅會顯著增加「微核生成比

表 1. 試驗物質蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉的細菌基因突變分析結果 (水溶性)

Compound and amount (/plate)	No. of histidine (/ tryptophan) revertants/plate ^a										<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>		
	TA1537		TA98		TA100		TA1535		+S9	-S9			
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9					
Negative control													
Buffer	7.8 ± 0.8	6.6 ± 1.1	39.4 ± 3.6	22.6 ± 4.4	106.0 ± 5.5	113.6 ± 14.2	15.8 ± 2.6	24.2 ± 3.0	21.8 ± 2.9	15.6 ± 2.1			
H ₂ O	9.4 ± 0.9	5.8 ± 0.8	39.6 ± 4.9	21.2 ± 1.6	123.4 ± 9.6	104.8 ± 7.3	14.2 ± 2.8	19.0 ± 3.2	21.6 ± 3.4	19.0 ± 2.8			
Positive control													
2-Aminoanthracene (5 μg)	441.8 ± 20.2	-	>3000	-	>3000	-	-	-	-	-	-	-	
2-Aminoanthracene (10 μg)	-	-	-	-	-	-	105.4 ± 14.6	-	-	-	-	-	
2-Aminoanthracene (20 μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	141.4 ± 15.3	-	-	-	
4-Nitro-o-phenylene-diamine (20 μg)	-	-	-	908.0 ± 101.6	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sodium azide (1.0 μg)	-	-	-	-	-	-	>1000	-	821.2 ± 51.66	-	-	-	
ICR-191(1μg)	-	>3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N-Ethyl-N-nitro-nitrosoguanidine (10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>3000	
H ₂ O extract													
(1) 5000 μg	8.0 ± 1.0	7.0 ± 1.2	37.8 ± 6.5	25.2 ± 3.1	120.4 ± 8.1	115.0 ± 17.4	19.8 ± 3.5	25.8 ± 4.2	21.4 ± 2.9	18.2 ± 2.1			
(2) 1582.3 μg	8.8 ± 0.8	7.6 ± 1.1	34.4 ± 6.9	25.0 ± 4.5	115.4 ± 7.3	107.8 ± 16.4	35.4 ± 2.4	19.8 ± 3.6	22.0 ± 2.9	16.4 ± 3.0			
(3) 500.7 μg	7.2 ± 0.8	5.8 ± 0.8	32.4 ± 8.1	24.2 ± 3.3	116.0 ± 17.7	104.0 ± 13.2	16.4 ± 2.3	26.6 ± 5.2	22.0 ± 2.8	13.2 ± 2.5			
(4) 158.5 μg	7.0 ± 1.0	6.0 ± 1.0	34.0 ± 6.8	25.4 ± 3.0	113.8 ± 12.6	95.6 ± 7.3	14.8 ± 2.2	24.0 ± 3.3	17.0 ± 2.9	15.4 ± 3.0			
(5) 50.1 μg	8.8 ± 1.1	6.4 ± 0.9	34.0 ± 5.4	26.4 ± 4.1	104.2 ± 6.9	105.8 ± 11.0	16.6 ± 3.0	25.4 ± 5.1	20.8 ± 3.8	16.6 ± 2.1			

^a Results are expressed as mean ± SD of five repeat.

* P<0.05

* two or three folds more than negative control

表 2. 試驗物質蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉的細菌基因突變分析結果 (脂溶性)

Compound and amount (/plate)	No. of histidine (/ tryptophan) revertants/plate ^a										<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	
	TA1537		TA98		TA100		TA1535		+S9	-S9		
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9				
Negative control												
Buffer	10.0 ± 1.6	6.0 ± 0.7	31.8 ± 4.0	21.4 ± 2.7	104.0 ± 11.3	111.6 ± 12.2	17.2 ± 1.8	31.0 ± 5.5	22.4 ± 2.7	19.0 ± 2.7		
H ₂ O	8.6 ± 1.7	7.2 ± 0.8	35.6 ± 4.5	22.6 ± 4.1	94.6 ± 10.1	98.8 ± 9.1	16.0 ± 2.8	28.8 ± 1.8	20.8 ± 3.6	17.6 ± 1.8		
Positive control												
2-Aminoanthracene (5 μg)	147.6 ± 11.3	-	>3000	-	>3000	-	-	-	-	-	-	-
2-Aminoanthracene (10 μg)	-	-	-	-	-	-	467.6 ± 33.3	-	-	-	-	-
2-Aminoanthracene (20 μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	86.8 ± 8.0	-	-	-
4-Nitro-o-phenylene-diamine (20 μg)	-	-	-	>2000	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium azide (1.0 μg)	-	-	-	-	-	-	>1000	-	>1000	-	-	-
ICR-191(1μg)	-	>3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Ethyl-N-nitro-nitrosoguanidine (10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>2500
DMSO extract												
(1) 5000 μg	9.2 ± 1.8	6.2 ± 1.1	33.6 ± 4.7	21.8 ± 4.0	99.4 ± 13.8	122.2 ± 11.9	20.4 ± 2.7	26.6 ± 3.4	21.0 ± 3.7	19.8 ± 2.4		
(2) 1582.3 μg	8.8 ± 1.6	5.8 ± 0.4	33.2 ± 6.3	20.2 ± 3.8	118.6 ± 13.4	97.2 ± 4.7	20.2 ± 3.0	25.2 ± 2.7	20.8 ± 2.6	18.4 ± 2.9		
(3) 500.7 μg	9.6 ± 1.5	6.8 ± 1.3	30.8 ± 2.9	23.2 ± 4.1	110.8 ± 7.9	97.4 ± 9.6	19.0 ± 3.3	25.2 ± 2.3	21.6 ± 1.5	18.8 ± 2.8		
(4) 158.5 μg	12.8 ± 2.0	6.2 ± 1.1	35.0 ± 4.8	18.6 ± 3.3	108.4 ± 8.6	93.2 ± 11.0	21.6 ± 3.4	27.4 ± 4.3	19.4 ± 2.3	19.8 ± 3.5		
(5) 50.1 μg	12.2 ± 1.1	5.8 ± 0.8	34.0 ± 6.4	17.0 ± 3.1	112.6 ± 7.4	93.2 ± 15.7	20.0 ± 2.9	26.4 ± 4.2	23.2 ± 3.6	17.4 ± 1.1		

^a Results are expressed as mean ± SD of five repeat.

* P<0.05

* two or three folds more than negative control

例」為 $5.99 \pm 0.97\%$ ，且會影響紅血球成熟過程之代謝機制，導致「網狀紅血球生成比例」下降為 $0.17 \pm 0.03\%$ ，較陰性對照組顯著減少 ($p < 0.05$) (圖 3、表 5)。於低、中、高劑量組之「微核生成比例」分別為 0.24 ± 0.04 、 0.29 ± 0.14 及 $0.47 \pm 0.07\%$ ，且與陰性對照組間皆無顯著性差異 (圖 4、表 5)。餵食試驗物質，經 48 小時後，低、中、高劑

量組之「網狀紅血球生成比例」，分別為 2.73 ± 0.13 、 2.52 ± 0.19 及 $2.76 \pm 0.21\%$ ，與陰性對照組間均無顯著性差異 (表 5)。

單一劑量大鼠口服急毒試驗

單一劑量口服急性毒性試驗，乃以單劑量高濃度試驗物質餵食實驗動物 (或 24 小時內完成的多次餵食)，觀察其對實驗動物影

表3 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」對體外小鼠淋巴瘤細胞tk基因突變頻率分析(脂溶性)

In 1% DMSO ^a	Non-selective Medium (2 cells/well)		Selective Medium (TFT) (2000 cells/well)			
	P.E.% ^b		C.E.% ($\times 10^{-4}$) ^{2b}		M.F. ($\times 10^{-6}$) ^b	
	Mean	\pm SD ^c	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD
-S9						
0.63 mg/mL	131.3	\pm 7.2	59.1	\pm 18.0	44.6	\pm 11.2
1.25 mg/mL	120.3	\pm 17.4	49.3	\pm 9.9	40.9	\pm 5.1
2.5 mg/mL	132.3	\pm 14.7	43.7	\pm 15.1	32.5	\pm 7.6
陰性對照組(DMSO)	116.6	\pm 3.0	37.9	\pm 11.2	32.4	\pm 9.0
陽性對照組(EMS) ^d	104.1	\pm 4.2	340.1	\pm 24.1	326.5	\pm 12.9
+S9						
0.63 mg/mL	104.4	\pm 8.4	62.8	\pm 6.8	60.1	\pm 3.7
1.25 mg/mL	106.9	\pm 2.5	47.3	\pm 6.6	44.3	\pm 5.7
2.5 mg/mL	131.3	\pm 7.2	57.0	\pm 12.1	43.2	\pm 7.2
陰性對照組(DMSO)	87.5	\pm 1.8	43.5	\pm 5.7	49.6	\pm 5.6
陽性對照組(2-AAF) ^e	38.7	\pm 2.4	170.1	\pm 11.1	439.8	\pm 13.5

^a 樣品以二甲亞砜DMSO (Dimethyl sulfoxide)溶解

^b Zero term of poisson distribution(P(0)) ; Plating efficiency(P.E.%); Cloning efficiency(C.E.%); Mutation frequency (MF) ; P(0) = number of empty wells/total wells plated ; C.E.% = $(-\ln P(0)/\text{number of cells per well}) \times 100\%$; P.E.% = $(-\ln P(0)/\text{number of cells per well}) \times 100\%$; M.F. per survival = C.E.% in selective medium/P.E.% in non-selective medium.

^c Mean \pm SD, n = 3.

^d EMS(N-(2-Fluorenyl) acetamide)以 DMSO 溶解, 最終處理濃度為 0.32 mg/mL.

^e 2AAF(Ethyl methanesulfonate)以 DMSO 溶解, 最終處理濃度為 0.2 mg/mL.

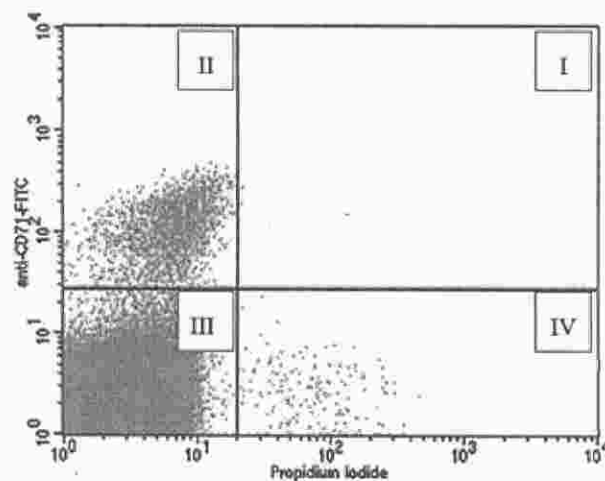


圖2. 以流式細胞儀分析陰性對照組小鼠週邊血液中之紅血球示意圖。I, 含微核之網狀紅血球; II, 網狀紅血球; III, 成熟紅血球及IV, 具微核之成熟紅血球。

表 4 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」對體外小鼠淋巴瘤細胞tk基因突變頻率分析（水溶性）

In 10 % D-PBS ^a	Non-selective Medium (2 cells/well)		Selective Medium (TFT) (2000 cells/well)			
	P.E.% ^b		C.E.% ($\times 10^{-4}$) ^b		M.F. ($\times 10^{-6}$) ^b	
	Mean	\pm SD ^c	Mean	\pm SD	Mean	\pm SD
-S9						
1.25 mg/mL	134.3	\pm 12.1	74.9	\pm 12.5	55.6	\pm 5.9
2.5 mg/mL	121.2	\pm 11.6	65.1	\pm 20.8	52.9	\pm 12.4
5.0 mg/mL	126.7	\pm 7.3	66.8	\pm 6.0	52.7	\pm 2.5
陰性對照組(D-PBS)	106.9	\pm 2.5	41.6	\pm 3.3	38.9	\pm 2.2
陽性對照組(EMS) ^d	104.1	\pm 4.2	340.1	\pm 24.1	326.5	\pm 12.9
+S9						
1.25 mg/mL	107.4	\pm 9.7	74.8	\pm 7.0	69.7	\pm 5.3
2.5 mg/mL	96.9	\pm 10.0	62.9	\pm 13.7	64.5	\pm 7.3
5.0 mg/mL	133.5	\pm 4.4	79.0	\pm 16.0	59.0	\pm 10.9
陰性對照組(D-PBS)	133.5	\pm 4.4	58.9	\pm 8.9	44.1	\pm 5.7
陽性對照組(2-AAF) ^e	38.7	\pm 2.4	170.1	\pm 11.1	439.8	\pm 13.5

^a 樣品以二甲亞砜 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶解

^b Zero term of poisson distribution (P(0)); Plating efficiency (P.E.%); Cloning efficiency (C.E.%); Mutation frequency (MF); $P(0) = \text{number of empty wells} / \text{total wells plated}$; $C.E.\% = (-\ln P(0) / \text{number of cells per well}) \times 100\%$; $P.E.\% = (-\ln P(0) / \text{number of cells per well}) \times 100\%$; $M.F. \text{ per survival} = C.E.\% \text{ in selective medium} / P.E.\% \text{ in non-selective medium}$.

^c Mean \pm SD, n = 3.

^d EMS (N-(2-Fluorenyl) acetamide) 以 DMSO 溶解，最終處理濃度為 0.32 mg/mL.

^e 2-AAF (Ethyl methanesulfonate) 以 DMSO 溶解，最終處理濃度為 0.2 mg/mL.

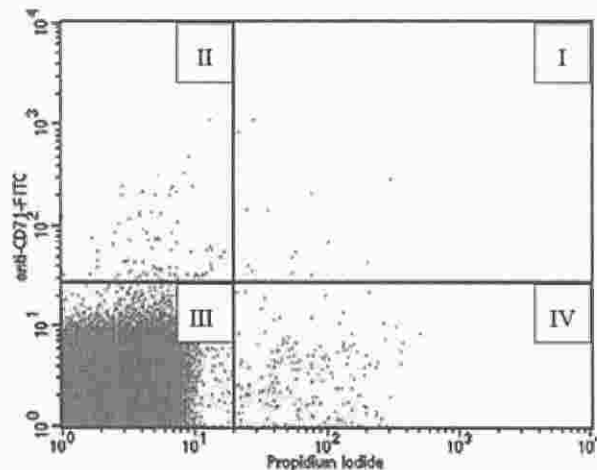


圖 3. 以流式細胞儀分析陽性對照組小鼠週邊血液中之紅血球示意圖。I，含微核之網狀紅血球；II，網狀紅血球；III，成熟紅血球及IV，具微核之成熟紅血球。

表 5 餵食「蜜環菌絲體發酵液凍乾粉」對 ICR 雄性小鼠周邊血液中「微核生成比例」與「網狀紅血球生成比例」之影響

組別	劑量 (g/kg bw)	處理後 48 小時	
		微核生成比例(%) ^a	網狀紅血球生成比例(%) ^b
陰性對照組 (無菌水)	0	0.36±0.12 ^c	2.61±0.28
陽性對照組 (Cyclophosphamide)	0.1	5.99±0.97 ^d	0.17±0.03*
低劑量	0.5	0.24±0.04	2.73±0.13
中劑量	2.5	0.29±0.14	2.52±0.19
高劑量	5.0	0.47±0.07	2.76 ±0.21

^a 「微核生成比例」%=含微核之網狀紅血球數/網狀紅血球數(%), 流式細胞儀計數每隻小鼠 5,000 個網狀紅血球含微核之比例。

^b 「網狀紅血球生成比例」%=網狀紅血球數/全部紅血球數(%).

^c 每組隻數為 5, 結果以平均值±均值標準誤差(Mean ± SEM)表示。

^d 依 Dunnett t 檢定進行統計分析, 將各組與陰性對照組比較, 表示有顯著性差異($p < 0.05$)。

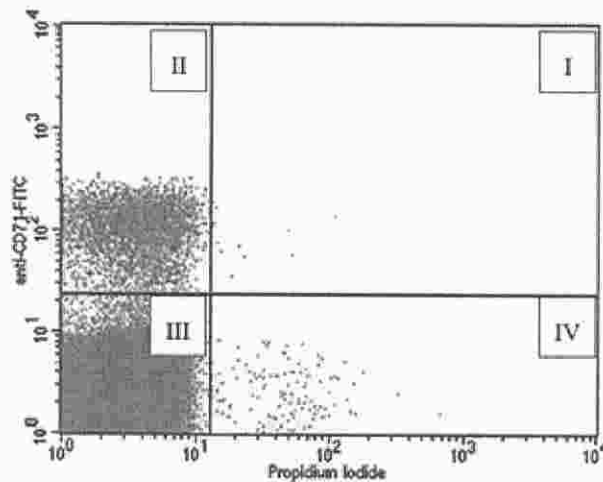


圖 4. 以流式細胞儀分析高劑量組小鼠週邊血液中之紅血球示意圖。I, 含微核之網狀紅血球; II, 網狀紅血球; III, 成熟紅血球及 IV, 具微核之成熟紅血球。

響, 檢測項目包括動物之死亡及肉眼檢查身體各器官毒性病變等。試驗物質 8 g/kgbw 餵食大鼠後, 在 2 週觀察期均未見動物死亡 (表 6), 臨床症狀觀察顯示, 所有大鼠活動狀況正常 (表 7)。大鼠平均體重及體重增長百分率, 其試驗組與對照組之間均無顯著性差異 (表 8 及 9)。試驗組餵食後 2 週之個別解剖肉眼觀察, 雄鼠及雌鼠均無明顯病理變化

(data not show)。口服急性毒性試驗結果顯示, 試驗組與對照組之間均無明顯差異。對雌性大鼠之口服急性毒性 LD₅₀ 值大於 8 g/kgbw。

討論

蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 為傳統食藥用菇類, 由於蜜環菌與天麻及豬苓等中藥材具

表 6 餵食「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」造成 SD 大鼠死亡情形

組別	口服劑量 (g/kg bw)	死亡數/處理數 (隻數)			死亡率 ^a (%)
		雄性	雌性	對照組	
動物總數	0	0/6	0/6	0/12	0
試驗組	8	0/6	0/6	0/12	0

^a死亡率(%) = 死亡數 ÷ 動物總數 × 100%。

表 7 大鼠經單次口服餵食「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」後 2 週之臨床症狀觀察

系統/器官	觀察及 檢查項目	中毒後 一般表現	中毒大鼠隻數 ^a				
			對照組(0 g/kg bw)		試驗組(8 g/kg bw)		
			雄性	雌性	雄性	雌性	
中樞神經系統及 軀體運動	行為	俯臥	0	0	0	0	
		側臥	0	0	0	0	
		叫聲異常	0	0	0	0	
		活動增加	0	0	0	0	
		活動減少	0	0	0	0	
	動作	抽搐	0	0	0	0	
		運動失調	0	0	0	0	
		麻痺	0	0	0	0	
		對各種刺激的 反應性肌肉張力	遲鈍	0	0	0	0
			知覺過敏	0	0	0	0
自主神經系統	瞳孔大小	強直	0	0	0	0	
		疲軟	0	0	0	0	
	分泌	縮小	0	0	0	0	
		放大	0	0	0	0	
呼吸系統	流涎	0	0	0	0		
	鼻孔	鼻分泌物	0	0	0	0	
		呼吸性質和速率	困難	0	0	0	0
胃腸系統	胃腸	潮式呼吸 (急促—腹部)	0	0	0	0	
		腹瀉	0	0	0	0	
泌尿系統	泌尿	排尿失禁	0	0	0	0	
皮膚和毛皮	完整性	豎毛	0	0	0	0	
		黏膜	黏膜	出血性紫紺	0	0	0
眼	眼瞼	上瞼下垂	0	0	0	0	
		眼球	眼球突出	0	0	0	0
	淚眼	淚眼	0	0	0	0	

^a試驗組與對照組雄、雌大鼠各為 6 隻，共計 24 隻。

表 8 餵食「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」對大鼠平均體重之影響

性別	組別 (劑量, g/kg bw)	平均體重(g)		
		0-wk	1-wk	2-wk
雄性	對照組(0)	130.42±3.42 ¹⁾	186.08±4.22	246.83±6.42
	試驗組(8)	139.48±4.49	196.23±6.75	261.62±9.29
雌性	對照組(0)	124.92±4.97	155.87±5.82	179.25±5.77
	試驗組(8)	126.60±4.18	158.32±5.58	181.88±5.39

¹⁾大鼠平均體重(g)以平均值±均數標準誤差表示(n=6)；雄、雌分別計算。

表 9 餵食「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」對大鼠體重增長百分率之影響

性別	組別 (劑量, g/kg bw)	體重增長百分率(%)	
		第 1 週 ¹⁾	第 2 週 ²⁾
雄性	對照組(0)	42.77±1.36 ³⁾	89.37±2.76
	試驗組(8)	40.69±1.58	87.57±2.78
雌性	對照組(0)	24.83±0.87	43.67±1.21
	試驗組(8)	25.04±1.20	43.87±2.95

1) 第 1 週體重增長百分率(%) = (第 1 週 - 第 0 週) 體重(g) ÷ 第 0 週體重(g) × 100%

2) 第 2 週體重增長百分率(%) = (第 2 週 - 第 0 週) 體重(g) ÷ 第 0 週體重(g) × 100%

3) 大鼠體重增長百分率(%)以平均值±平均數之標準誤差表示(n=6)

特殊共生關係⁽²⁾，因此產學各界著手對蜜環菌栽培及保健機能與功效等進行相關研究，目前中國亦有天麻蜜環菌片、腦心舒口服液、健腦露等相關產品進行販售。有鑑於此，本公司著手開發蜜環菌液態發酵技術，進行發酵培養條件測試及原料生產，並將生產之原料進一步進行安全性測試，確保其原料之安全性。本實驗依據衛福部食藥署健康食品安全性評估方法^(23,25,27,29)，進行基因毒性試驗及單一劑量口服急性毒性試驗。

體外細菌基因突變測試法為利用一系列具有需組氨酸 (histidine) 始可生長之沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 及需色胺酸 (tryptophan) 始可生長之 *Escherichia coli*，藉由此特性，當受到致突變物刺激時，此需組氨酸或色胺酸之營養缺乏型菌株可逆突變成為自行合成組氨酸或色胺酸生長發育。此基因毒性試驗可預測試驗物質的潛在致癌性，

並有助於致癌性試驗的結果分析。結果顯示，不論在有或無添加S9狀況下，其結果與陰性對照組比較均無顯著性差異。

體外鼠淋巴瘤tk分析法之測試目的為檢測試驗物質是否會造成體外培養細胞之tk基因突變。一般會引發基因突變的產品，有可能為人體致癌物或致突變原，可能會導致癌症或遺傳缺陷。因此，以體外鼠淋巴瘤tk分析法，不僅能預測試驗物質的致癌性，且其試驗結果將有助於致癌性試驗的結果分析。結果顯示，測試樣品在含有與不含有代謝活化系統S9之測試條件下，與陰性對照組比較，其值均小於陰性對照組值之2倍，測試結果為陰性反應。

微核之產生主要是在細胞有絲分裂後期染色體有規律的進入子細胞形成細胞核時，仍留在細胞質中的染色單體或染色體的無著絲片斷或環所造成。在正常情形下發生率極

低，但若致突變劑(mutagens)存在時，則會明顯增加。如環磷醯氨(cyclophosphamide)為一已知致突變劑，不僅會增加具有微核之網狀紅血球比例，且會影響紅血球生長過程之代謝機制，導致周邊血液中網狀紅血球與正常成熟紅血球之比例較陰性對照組顯著減少。藉由啮齒類動物模式進行之周邊血液微核測試試驗物質是否對染色體造成影響。動物體內周邊血液微核試驗中，各處理組之網狀紅血球之「微核生成比例」及紅血球中之「網狀紅血球生成比例」，與陰性對照組間均無顯著性差異。口服急性毒性試驗結果顯示，對雌性及雄性大鼠之口服急性毒性LD₅₀值大於8 g/kgbw。綜合上述各項研究結果，顯示本公司生產之蜜環菌發酵液凍乾粉，不具有口服急性毒性及基因毒性。另28天亞急毒性之試驗也已完成（尚未發表），因此確認蜜環菌發酵液凍乾粉可作為安全的營養保健品。

參考文獻

1. 王嵐、楊祝良。中國西南的蜜環菌屬真菌。中國食用菌 2003; 22(5):4-6。
2. 林曉民、李振岐、侯軍、王少先。蜜環菌。中國菌物。中國農業出版社。2007; 229-230。
3. 王相綱。蜜環菌與天麻。蕈菌學。中國林業出版社。2010; 437-462。
4. 楊淑雲、林遠崇、羿紅、王琛、楊永彬、藍家細。珍稀食藥用菌-蜜環菌的開發與應用。生物學雜誌 2007; 24(3):52-54。
5. Muszyńska B1, Sulowska-Ziaja K, Wolkowska M, Ekiert H. Chemical, pharmacological, and biological characterization of the culinary-medicinal honey mushroom, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. (Agaricomycetideae): a review. Int J Med Mushrooms 2011; 13:167-75.
6. Mihail JD, Bruhn JN. Dynamics of bioluminescence by *Armillaria gallica*, *A. mellea* and *A. tabescens*. Mycologia 2007; 99:341-50.
7. Collin C, Keane TM, Turner DJ, O'Keeffe G, Fitzpatrick DA and Doyle S. Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, *Armillaria mellea*: Toward a new infection model system. J Proteome Res 2012; 12:2552-70.
8. Radzki W, Slawinska A, Jablonska-Rys E, Gustaw W. Antioxidant capacity and polyphenolic content of dried wild edible mushrooms from Poland. Int J Med Mushrooms 2014; 16:65-75.
9. Lai MN, Ng LT. Antioxidant and anti-edema properties of solid-state cultured honey mushroom, *Armillaria mellea* (higher Basidiomycetes), extracts and their polysaccharide and polyphenol contents. Int J Med Mushrooms 2013; 15:1-8.
10. Wu J, Zhou J, Lang Y, Yao L, Xu H, Shi H, Xu S. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. Int J Biol Macromol 2012; 51:663-7.
11. Sun Y1, Liang H, Zhang X, Tong H, Liu J. Structural elucidation and immunological activity of a polysaccharide from the fruiting body of *Armillaria mellea*. Bioresour Technol. 2009; 100:1860-3.
12. 邵偉、樂超銀、劉世玲、侯凌雲。蜜環菌深層液態發酵條件研究。中國食用菌。2004; 23: 50-1。
13. Lung MY, Huang PC. Optimization of exopolysaccharide production from *Armillaria mellea* in submerged cultures. Lett Appl Microbiol. 2010 Feb;50(2):198-204.
14. Cheng XH1, Liu LD, Dong HX, Qu HG, Cai DH. Optimization of submerged culture condition for production of mycelial biomass by *Armillaria mellea*. Zhong Yao Cai 2007; 30:509-12.
15. 王秋穎、郭順星、樊錦艷。不同蜜環菌菌株生物學特性及菌絲體多醣含量的研究。中藥及天然物 2001; 36:588-590。
16. 譚周進、謝達平、王微、肖啟明、李立恆。蜜環菌多醣分離純化及性質之研究。食品科學 2002; 23: 49-52。
17. 于敏、沈業壽、梅一德、王芳。蜜環菌菌索多醣的免疫增強作用研究。生物學雜誌 2001; 18:16-18。
18. 戴玲、王華、沈業壽。蜜環菌多醣對小鼠腹腔巨噬細胞免疫功能的影響。生物學雜誌 2000; 17:20-21。
19. 于敏、沈業壽。蜜環菌菌索多醣對小鼠血糖及急性毒性作用研究。中國食用菌 2002; 21:35-36。
20. Lung MY, Chang YC. Antioxidant properties of edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. Int J Mol Sci 2011; 12:6367-6384.
21. 虞磊、沈業壽、李廣、吳建民、謝群英。培養方式對蜜環菌胞內多醣合成與抗暈眩症活性影響的研究。中國食用菌 2006; 25:37-39。
22. Chi CW, Chen CC, Chen YJ. Therapeutic and radiosensitizing effects of *Armillaridinon* human esophageal cancer cells. Evid Based Complement Alternat Med 2013; ID 459271.

- http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/459271/
23. 行政院衛福部食藥署。微生物基因突變分析(Ames test)。健康食品安全性評估方法。1999。台北。
 24. Donald, C., Caspary, W., Kirby, P. E., Krehl, R. Moore, M. Mayo, J., and Oberly, T. J Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutation Res* 1987; 189: 143-156.
 25. 行政院衛福部食藥署。體外鼠淋巴瘤 tk 分析法。健康食品安全性評估方法。1999。台北。
 26. Mortelmans, K. and Zeiger, E The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 2000; 45:29-60.
 27. 行政院衛福部食藥署。周邊血液微核試驗。健康食品安全性評估方法。1999。台北。
 28. Litron Laboratories. MicroFlow™ Prototype microFlowplus Mouse Micronucleus Analysis Kit instruction manual Revision 010607 (for *in vitro* only) 2001. USA.
 29. 行政院衛福部食藥署。口服急性毒性試驗(Acute oral LD₅₀ study)。健康食品安全性評估方法。1999。台北。
 30. Ramírez J. H., Palacios M., Tamayo O., Jaramillo R, Gutiérrez O Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109:348-53.

Genotoxicity and Acute Oral Toxicity Test of *Armillaria mellea* Mycelium

Chian-Ying Yang¹, Ting-Wei Lin¹, Chia-Feng Kuo², Jong-Shian Liou³, Li-Chuan Liao³,
Jia-Jiu Wu³, Chin-Chu Chen^{1,2*}

¹Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Zhong-Li City; ²Department of Food Science, Nutrition and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei City; ³Food Industry Research and Development Institute, Hsin-chu City, Taiwan

Abstract

Armillaria mellea is edible and medicinal fungi, their fruiting bodies and mycelia rhizomorph can be used as medicine, with high development value. In this study, *Armillaria mellea* mycelium freeze-dried powder in three genotoxicity tests and single dose oral acute toxicity. To investigate *Armillaria mellea* mycelium freeze-dried powder would cause acute toxicity or genotoxicity, and as a result for future food security. In vitro bacterial testing method of gene mutation, test samples were extracted in DMSO and water after sterile filtration, 50.1 µg/plate~5,000 µg/plate in test conditions with or without metabolic activation system (S9 mixture), on *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 uvrA, the results of the negative control group showed no significant

difference. In vitro lymphoma tk analysis, the test sample in the lipophilic (DMSO) 0.63, 1.25 and 2.5 mg / ml with water soluble (D-PBS) 1.25, 2.5 and 5.0 mg / mL of the resulting three dose groups mutation frequencies in the presence of metabolic activation system with and without S9 containing the test conditions, were compared with the negative control (DMSO, and D-PBS), which were less than two times the value of the negative control group, the test result is negative. In vivo analysis of peripheral blood micronucleus test, low doses of 0.5 g / kg body weight (bw); middle dose of 2.5 g / kg bw and high dose 5.0 g / kg bw, their red blood cells in the peripheral blood of male mice in each treatment group the reticulocyte the reticulocytes in the "micronuclear proportions", and "reticular erythropoiesis

proportion" was no significant difference between the negative control group. Acute oral toxicity test, a single high dose of 8 g / kg body weight (bw) in rats after oral feeding, continuous observation of two weeks. The results showed that the experimental group of rats activity status is normal, there is no difference between the average weight and weight gain percentage (%) and the control group, no poisoning or death

phenomenon. So that, *Armillaria mellea* mycelium freeze-dried powder, does not have a suspect oral acute toxicity and genetic toxicity. So that, the mycelium freeze-dried powder, does not have doubts oral acute toxicity and genetic toxicity.

Keywords: *Armillaria mellea* mycelium freeze-dried powder, oral acute toxicity, genetic toxicity test