

中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)深層發酵菌絲體 不具有基因毒性

楊碧華¹，葉淑幸¹，陳勁初^{1-3*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園市¹；國立台灣大學食品科技研究所，台北市²；
實踐大學食品營養與保健生技學系，台北市³，台灣

摘要

中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)是傳統中藥冬蟲夏草的分離菌株，具有多樣生理活性。本研究以取得冬蟲夏草子實體進行分離純化中華被毛孢菌株，經鑑定確認後公開寄存，深層發酵培養菌絲體再以三項基因毒性(i)沙門氏菌回復突變試驗、(ii)體外哺乳細胞染色體結構與(iii)生體內哺乳動物細胞微核測試來探討中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉之安全性，以作為提供人類安全食用之參考。結果顯示在(i)沙門氏菌回復突變試驗中，最高劑量 5 mg/plate 以下劑量皆不會使五株沙門氏菌造成突變。(ii)體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗結果顯示以最高劑量 5 mg/mL 及其以下劑量，對哺乳類細胞 CHO-K1 不具有致染色體變異之基因毒性。(iii)生體內哺乳動物細胞微核測試結果，在 5,000 mg/kg b.w. 及以下各劑量，皆不具誘發小鼠周邊血球細胞產生微核之能力。以及(iv)所有測試劑量組的多染性血球比例和陰性對照組比較下均無顯著差異，指出中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不會抑制小鼠之造血機能。綜合上述，實驗結果顯示中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不具有基因毒性。

關鍵字：中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉、沙門氏菌回復突變試驗、體外哺乳細胞染色體結構、生體內哺乳動物細胞微核測試

前言

冬蟲夏草子實體(*Ophiocordyceps sinensis*)是傳統珍貴中藥材被記載於趙學敏「本草綱目拾遺」中，主要由麥角科真菌 *Cordyceps sinensis* 寄生於蝙蝠蛾的幼蟲吸收蟲體中營養形成之蟲菌複合體，到了夏天時，蟲草菌絲再分化，形成棒狀子座並僵化從頭鑽出地表成為「夏草」^[1]，由於天然冬蟲夏草生長環境特殊，生長速度極慢，且遭過度採擷資源

瀕臨枯竭，價格更逼近黃金，另一方面天然子實體亦有重金屬污染之疑慮。由於不易人工環境培育子實體，因此以分離菌株進行人工發酵技術生產來是相對比較可行的。自二十世紀初研究人員開始爭相進行冬蟲夏草子實體的菌種分離培養，分離出菌種共涉及 13 屬 22 個學名，其中包含中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)、蟲草頭孢(*Cephalosporium sinensis*)、蝙蝠蛾擬青霉(*Paecilomyces hepialid*)、中國彎頸霉(*Tolyposcladium sinensis*)、頂孢頭孢霉(*Cephalosporium acremonium*)與蟲草棒束孢(*Isaria farinose*)^[1,2]等，在眾多真菌中只有中華被毛孢才是冬蟲夏草真正的無性世代，此菌株生長條件相當嚴苛，嗜低溫，最適生長

*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司龍潭園區分公司
桃園市龍潭區龍園一路 68 號 陳勁初
電話：(03)499-3093 ext. 5823
Email：gkbioeng@grapeking.com.tw

溫度範圍為 15~20°C，生長相當緩慢，在 25°C 以上生長受到抑制，而在環境 15°C 固態培養基需生長 50 天才形成可見菌落。

中華被毛孢的效用已被世人肯定其具有相當豐富腺苷類(adenosine)、蟲草多醣、甾醇類活性物質如麥角固醇等，具有抑制腫瘤生長與免疫調節^[3]、降低血糖及三酸甘油脂、抗疲勞、抗發炎、抑菌生長、抗病毒、高度清除氧自由基功能達到預防衰老，預防急性腎損傷達到護腎效果，肺部保護可預防肺纖維化、抗慢性肺阻塞、改善哮喘緩解等功能^[4]、防止排斥移植反應等多種功效^[2]。功效研究相當豐富，但其安全性評估的研究卻甚少，因本研究的目的係於以基因毒性試驗評估液態深層發酵之中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉之安全性，以作為人體食用安全性及安全劑量範圍之參考。

材料與方法

試驗樣品及試驗藥劑

中華被毛孢菌絲體之菌種分離自西藏高原之冬蟲夏草子實體，培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato dextrose agar, PDA) 18°C 低溫生長經幾代培養後，進行菌種保存。依以 ITS (Internal transcribed spacer) 基因進行分子序列鑑定，再與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的基因庫進行比對，鑑定結果為 *Hirsutella sinensis*。寄存於食品發展研究所之生物資源研究中心 (BCRC 930209)。樣品由噸級發酵設備培養，2 L 搖瓶及兩階槽體發酵製程：500 L 及 5 T 發酵槽體 (微聚生工，台灣)，搖瓶培養溫度為 18°C，120 rpm 培養 14 天；槽體溫度為 16°C，轉速 30 rpm，通氣分別為 300 L/min 及 800 L/min 培養 10 天，發酵結束進行離心、凍乾與磨粉即為中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉。本試驗所使用的代謝活化物質購自經由 Arcolor 1254-induced (Moltox, BOONE, USA) 處理

之大白鼠肝臟萃取 S9 (Moltox, BOONE, USA)。試驗物質與 S9 及 cofactor 混合後稱為 S9 代謝活化混合物 (簡稱 S9 混合物) 進行測試代謝活化試驗用以模擬代謝情形。

沙門氏桿菌回復突變測試

依循經濟合作暨發展組織 OECD 之良好作業規範 Test No. 471 進行操作^[5]。使用五株沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 (Moltox Inc., USA)，以沙門氏桿菌回復突變法進行中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉對微生物是否具有致突變性 (mutagenicity)。試驗物質「中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉」以 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/plate 對沙門氏桿菌 TA100 菌株進行劑量範圍測試。試驗以平板混合測試法 (plate incorporation method) 在含有 S9 混合物且最終反應濃度為 1.89% (v/v) 或無 S9 混合物的條件下進行沙門氏桿菌回復突變實驗。取 0.05 mL 的測試樣品加進 0.5 mL 的 0.2 M 磷酸緩衝液 pH 7.4 再加入 36±1°C 隔夜培養菌液 0.1 mL (約 1~2×10⁹ 沙門氏菌)，最後加入 0.5 mM histidine/biotin solution 的 top agar 2 mL 混勻後倒入 minimal glucose agar plate，待 top agar 凝固後倒放避光在 36±1°C 培養 48~72 小時後，計算突變菌落的數量。陰性對照組使用無菌水；陽性對照組對應藥劑如表 1，以 5 mg/plate 為中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉最高劑量，再以兩倍序列稀釋取得其他四個測試劑量，以上劑量組別及各對照組於含/不含 S9 混合物進行試驗。每組試劑進行三重複。計算各組之平均值及標準差和個別試驗的變異係數。在沙門氏桿菌回復突變試驗結果進行 ANOVA 分析，並作 Dunnett's test。分析結果以 $p < 0.05$ 始視為具有統計上的顯著差異，得以進行劑量-效應 (dose-response) 分析統計以判定各實驗組間是否具有劑量-效應的關聯性。有

效數據判定在不含 S9 混合物之下，TA98、TA100 與 TA102 的陽性對照組自發性回復突變必須達到陰性對照組的 2 倍以上；TA1535、TA1537 必須達到陰性對照組的 3 倍以上始視為有效試驗。

體外哺乳類細胞染色體變異試驗(*In vitro* chromosome aberration assay)

依循經濟合作暨發展組織 (OECD) 之良好作業規範 Test No. 473 相關規定執行^[6,7]，選用中國倉鼠卵巢細胞株 (CHO-K1 cell line；BCRC 60006，食品工業發展研究所) 測試中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉是否具誘發哺乳類細胞染色體變異之能力。其細胞株型態類似於上皮細胞，染色體數目為 20 ± 2 。試驗開始時，將中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉以細胞培養液製備成 10 mg/mL 之溶液，經 $0.2 \mu\text{m}$ 濾膜過濾 [surfactant-free cellulose acetate (SFCA), Corning®, USA] 後，以細胞培養液或含有 S9 混合物之細胞培養液 2 倍進行稀釋，S9 混合物最終反應濃度為 1%。CHO-K1 細胞株培養至對數生長期後進行分盤，每孔植入 $3 \sim 4 \times 10^5$ 細胞/孔。培養 24 ± 3 小時後投予試驗物質，每組進行二重複試驗。試驗中不含 S9 混合物的陽性對照組試劑為 mitomycin C $0.5 \mu\text{g/mL}$ ，含有 S9 混合物的試劑為 benzo(a)pyrene $25 \mu\text{g/mL}$ ，陰性對照組皆為細胞培養液。3-6 小時試驗具有含/不含 S9 混合物共兩組；18-22 小時則進行不含 S9 混合物之試驗。在細胞毒性試驗分別測試劑量 5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/mL 共計 5 個測試劑量，以 5 mg/mL 中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉作為最高測試劑量。以 MTT 比色法計算出細胞存活率，大於 50% 存活率之最高濃度作為染色體變異試驗中最高劑量並依序往下取兩個劑量進行試驗。Giemsa 染劑進行細胞染色後以光學顯微鏡觀察染色體的結構性變異，紀錄數量與變異細胞之發生頻

率進行統計分析。數據經卜瓦松分佈分析 (Poisson distribution analysis)。 $p < 0.05$ 將視為統計上具有顯著差異。陽性對照組染色體產生變異之細胞數和陰性對照組相較之下，必須有顯著增加。若有 2 個以上的試驗物質劑量組染色體產生變異之細胞數與對照組(陰性或溶劑)相較之下有顯著差異，則判定試驗物質會造成 CHO-K1 細胞染色體變異。

生體內哺乳動物細胞微核測試

依據經濟合作暨發展組織 (OECD) 之良好作業規範 Test No.474 相關規定進行^[6,8]。利用齧齒類動物的周邊血液細胞(peripheral blood cells)進行實驗，評估中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉是否抑制哺乳動物造血功能及誘發生體內細胞染色體變異之基因毒性。以七周齡之 ICR 小鼠進行試驗，飼養條件：每籠飼養 5 隻小鼠，飼養環境溫度 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ，室內相對溼度為 $55 \pm 20\%$ ；12 小時光暗週期，飲水經高壓滅菌處理 RO 水，飼料為滅菌後之 LabDiet 5010 (PMI@ Nutrition International, LLC. Richmond, Indiana, USA)，試驗期間不限飲水及食物；墊料 Aspen Chip (Northeastern Products Corp., USA)，每周更換。隨機分配使各組含有雌雄各 5 隻。中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉以無菌水配製後經口服途徑餵食，劑量為 1,250、2,500 及 $5,000 \text{ mg/kg b.w.}$ 。以口服無菌水作為陰性對照組 (20 mL/kg b.w.)，腹腔注射 cyclophosphamide (Sigma) 為陽性對照組 (80 mg/kg b.w.)。陰性對照組及試驗物質投藥頻率為兩次(因考量動物福祉， 20 mL/kg b.w 將分為兩次投予動物，每次 10 mL/kg b.w ，兩次間隔不超過六小時)，陽性對照組為單次投藥，第一次投藥後在第 48 ± 2 和 72 ± 2 小時，採集小鼠尾靜脈 $2 \sim 3 \mu\text{L}$ 周邊血液樣本，陽性對照組僅採集 48 ± 2 小時之樣本。以 acridine orange 預染之載玻片製備血液抹片室溫避光靜置 $2 \sim 3$ 小

時後，以螢光顯微鏡進行觀察，並計算多染性紅血球之比例 (polychromatic erythrocytes ; PCE%) 和微核的發生機率 (MN%_{PCE})。每樣品觀察至少 1,000 顆紅血球，計算多染色紅血球占比(PCE%)，至少觀察 2,000 顆之多染性紅血球 (PCE)，計算每千顆 PCE 中微核出現機率 (MN%_{PCE})。陽性對照組的微核發生頻率應高於陰性對照組兩倍以上。實驗數據以卜瓦松分佈來分析試驗組與陰性對照組間微核發生機率的統計差異，若 $p < 0.05$ 則認為兩組間在統計上具有顯著差異。當試驗組與陰性對照組間出現顯著差異時，則進一步以 Cochran-Armitage trend test 分析是否有劑量-效應之相關性。另外，造血系統具有抑制效果，以試驗組動物的多染性紅血球比例低於陰性對照組達 20% 以上作為判定。

結 果

沙門氏桿菌回復突變試驗結果顯示，所有中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉測試劑量範圍皆不具有細胞毒性(cytotoxic)及致突變性(non-mutagenic)如表 2，因此以 5 mg/plate 作為最高測試劑量，及 2.5、1.25、0.625 與 0.313 mg/plate 進行回復突變測試試驗。在 5 株沙門氏菌的陰陽對照比較結果在有效試驗範圍下，所有中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉測試組別均未達陰性對照組的兩倍或三倍以上如表 3，顯示中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉對沙門氏桿菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 五種菌株不具致突變性(mutagenicity)。

體外哺乳類細胞染色體結構變異試驗結果，細胞毒性測定在不含 S9 混合物下處理 3 小時，5、2.5、1.25、0.625 及 0.313 mg/mL 等劑量之中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉其細胞存活率範圍在 91.34±2.01%~103.25±2.62% 之間；在含 S9 混合物下處理 3 小時，細胞存活率範圍在 85.77±13.32%~113.22±3.58% 之

間；在不含 S9 混合物下進行 18 小時，細胞存活率範圍在 86.24±4.08%~109.11±8.33% 之間。存活率皆高 50%，故取 5、2.5 與 1.25 mg/mL 進行試驗。陽性對照組的染色體變異細胞數：在短時間處理 (不含或含 S9 混合物) 之條件下分別為 20 及 19 顆，與陰性對照組相較之下具有顯著差異($p < 0.05$)。中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉試驗結果在短時間不含 S9 混合物，5、2.5 與 1.25 mg/mL 之劑量的染色體變異細胞數分別為 3 顆、1 顆及 0 顆；含 S9 混合物之染色體變異細胞數承上述劑量順序依序為 3 顆、0 顆及 2 顆；長時間不含 S9 混合物染色體變異細胞數依序為 2 顆、0 顆及 2 顆 (表 4)。各組數據進行系統分析後，結果顯示不論是短時間 (不含/含 S9 混合物) 或是長時間不含 S9 混合物，中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉與陰性對照組皆無顯著差異($p < 0.05$)。顯示中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不會引起 CHO-K1 細胞產生染色體變異。

生體內哺乳動物細胞微核測試，試驗過程中各組死亡率均為 0%，且在投予試驗物質後至試驗結束期間未觀察到異常的臨床反應，秤量小鼠的體重經 *t*-test 分析後，各組試驗老鼠皆與陰性對照組無顯著差異 (圖 1)。顯示中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不影響動物體重。多染性紅血球比例分析中，投予試驗物質 48 小時後陽性對照組的多染性紅血球比例在雄鼠與雌鼠分別為 1.10±0.19%、1.24±0.15%，相較於陰性對照組 3.66±0.31%、3.58±0.26% 具有明顯下降，顯示 cyclophosphamide 具有抑制造血機能的效果 (表 5)。投予中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉 48 及 72 小時，不論雄鼠或雌鼠其多染性紅血球比例與陰性對照組比較均無顯著差異，顯示中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不會抑制小鼠之造血機能。微核發生頻率數據經統計分析後顯示，不論是雄鼠或雌鼠，各試驗劑量組

在投予中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉 48 及 72 小時，其周邊血球細胞之微核發生率和陰性對照組相較之下皆無顯著差異如表 5。且陽性對照組之微核發生率高於陰性對照組兩倍以上。因此判定此試驗結果為有效試驗，依據以上結果判定中華被毛孢菌絲體發酵液

凍乾粉不具有誘發小鼠周邊血球細胞產生微核之能力。

討 論

冬蟲夏草多種藥用功效備受學者的關注，甚至投入幾十年的研究，才得以從 20 幾種自

表 1. 中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌絲體之沙門氏菌致突變試驗所使用之突變劑種類及使用劑量

Strain	S9	positive control	µg/ plate
TA98		2-nitrofluorene (2-NF)	1
TA100		Sodium azide (SA)	1
TA102	-	Mitomycin C (MMC)	0.2
TA1535		SA	1
TA1537		9-aminoacridine (9-AA)	50
TA98		2-aminoanthracene (2-AA)	1
TA100		Benzo [a] pyrene (BP)	1
TA102	+	2-AA	5
TA1535		2-AA	5
TA1537		2-AA	5

9-AA, SA 及 MMC 溶於無菌水；2-NF, 2-AA 及 BP 溶於 DMSO。

表 2. 中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌絲體發酵液凍乾粉以 TA100 菌株進行沙門氏菌劑量範圍測試結果

Dose mg/plate	Number of revertants/plate (Mean ± S.D., n=3)	
	w/o S9 mixture	
Negative control ^a	155.0 ± 11.1	
Positive control ^b	791.3 ± 99.8*	
發酵液凍乾粉 (<i>Hirsutella sinensis</i>) 中華被毛孢菌絲體	5	180.3 ± 5.5
	2.5	176.7 ± 4.2
	1.25	168.3 ± 19.5
	0.625	169.3 ± 11.7
	0.313	170.7 ± 10.0

* 陽性對照組突變數平均值達陰性對照組 2 倍以上

^a Negative control (陽性對照組) : Sterile water (無菌水)

^b Postive control (陰性對照組) : Sodium azide, 1 µg/ plate

表 3. 中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌絲體之沙門氏桿菌回復突變的測試結果

Group (mg/plate)		Number of revertants/plate (w/o S9 activator, Mean ±S.D., n=3)				
		TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Negative control		37.7 ± 10.5	165.7 ± 11.6	361.7 ± 26.2	8.0 ± 0.0	11.3 ± 3.1
Positive control		200.0 ± 29.3*	756.7 ± 113.4*	1654.7 ± 72.5*	466.7 ± 5.4*	224.5 ± 10.6*#
發 酵 液 凍 乾 粉 (<i>Hirsutella sinensis</i>) 中 華 被 毛 孢 菌 絲 體	5	30.3 ± 4.0	164.3 ± 10.5	382.7 ± 17.4	14.0 ± 5.2	12.7 ± 2.1
	2.5	31.7 ± 2.1	154.3 ± 5.5	364.7 ± 17.2	11.7 ± 0.6	6.3 ± 1.2
	1.25	28.3 ± 6.1	161.7 ± 11.8	358.7 ± 7.4	11.7 ± 3.5	6.7 ± 2.1
	0.625	31.0 ± 3.6	155.3 ± 18.0	354.3 ± 13.6	9.3 ± 2.1	9.3 ± 1.5
	0.313	32.3 ± 1.2	156.7 ± 16.1	373.7 ± 15.2	10.0 ± 1.7	7.3 ± 1.2
Group (mg/plate)		Number of revertants/plate (with S9 activator, Mean ±S.D., n=3)				
Negative control		30.7 ± 6.5	132.7 ± 16.6	370.7 ± 7.4	6.7 ± 1.5	10.3 ± 2.1
Positive control		411.0 ± 26.9*#	618.7 ± 93.2*	940.0 ± 101.0*	238.3 ± 33.6*	403.3 ± 53.3*
發 酵 液 凍 乾 粉 (<i>Hirsutella sinensis</i>) 中 華 被 毛 孢 菌 絲 體	5	49.3 ± 3.5	150.7 ± 15.4	314.7 ± 3.1	15.3 ± 1.2	16.0 ± 4.0
	2.5	43.7 ± 6.4	142.3 ± 8.3	374.0 ± 7.0	12.7 ± 3.8	8.3 ± 4.0
	1.25	47.3 ± 11.0	148.7 ± 27.7	377.3 ± 30.9	11.0 ± 3.0	9.3 ± 4.2
	0.625	38.0 ± 4.0	139.3 ± 19.0	323.3 ± 10.0	8.3 ± 1.5	8.0 ± 1.0
	0.313	40.3 ± 4.2	161.3 ± 5.5	388.7 ± 39.3	11.7 ± 4.0	9.3 ± 1.2

*突變數平均值達陰性對照組 2 倍或 3 倍以上

n=2

表 4. 中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌絲體發酵液凍乾粉對體外哺乳類細胞染色體變異頻率分析

	Sample	S9	ctb	cte	csb	cse	Other	Total number of aberrations	Total cell number with aberrations	ctg	csg	AF ⁴	p value
Short-term treatment	Negative ¹	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/200	—
	Positive ²	-	5	6	2	0	8	21	20	0	0	20/200	0.0000*
	5 mg/L	-	2	0	1	0	0	3	3	0	0	3/200	0.1991
	2.5 mg/L	-	1	0	0	1	0	2	1	0	1	1/200	0.7358
	1.25 mg/L	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/200	1.0000
	Negative ¹	+	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1/200	—
	Positive ³	+	13	0	3	2	4	22	19	2	5	19/200	0.0000*
	5 mg/L	+	3	0	0	0	0	3	3	1	0	3/200	0.1991
	2.5 mg/L	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/200	1.0000
	1.25 mg/L	+	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2/200	0.4060
Long-term	Negative ¹	-	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1/200	—
	5 mg/L	-	1	0	1	0	1	3	2	0	0	2/200	0.4060
	2.5 mg/L	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/200	1.0000
	1.25 mg/L	-	1	0	0	0	1	2	2	0	0	2/200	0.4060

*與陰性對照組比較在統計上具有顯著差異(p < 0.05)

¹ 細胞培養液；² Mitomycin C 0.5 µg/mL；³ Benzo [a] pyrene 25 µg/mL；⁴ AF, 變異頻率：為觀察 200 顆處於細胞分裂中期 (metaphase) 的細胞中帶有染色體變異的細胞數。

註：ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; other, other abnormalities; ctg, chromatid gap 以及 csg, chromosome gap

表 5. 中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)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及微核生成發生頻率之影響

組別	投予劑量 mg/kg b.w.	多染性紅血球比例 ^a (PCE%, mean±SD, n = 5)			
		♂		♀	
		48 hr	72 hr	48 hr	72 hr
Negative ^c	—	3.66 ± 0.31	3.64 ± 0.17	3.58 ± 0.26	3.72 ± 0.13
Positive ^d	80	1.10 ± 0.19	—	1.24 ± 0.15	—
中華被毛孢菌絲體 (<i>Hirsutella sinensis</i>) 發酵液凍乾粉	1250	3.58 ± 0.19	3.72 ± 0.23	3.48 ± 0.25	3.56 ± 0.18
	2500	3.60 ± 0.29	3.60 ± 0.27	3.76 ± 0.25	3.46 ± 0.15
	5000	3.56 ± 0.15	3.60 ± 0.31	3.70 ± 0.10	3.80 ± 0.22
多染性紅血球細胞微核發生頻率 ^b (MN%PCE, mean±SD, n = 5)					
Negative ^c	—	0.40 ± 0.42	0.40 ± 0.22	0.50 ± 0.50	0.80 ± 0.27
Positive ^d	80	21.70 ± 5.24*	—	14.60 ± 6.08*	—
中華被毛孢菌絲體 (<i>Hirsutella sinensis</i>) 發酵液凍乾粉	1250	0.60 ± 0.22	0.50 ± 0.35	0.40 ± 0.42	0.60 ± 0.65
	2500	0.30 ± 0.45	0.60 ± 0.42	0.30 ± 0.27	0.30 ± 0.45
	5000	0.50 ± 0.71	0.50 ± 0.35	0.50 ± 0.50	0.80 ± 0.76

^a 每隻動物至少觀察 1,000 顆紅血球，多染性紅血球之比例(PCE%)以平均值±標準差(mean±SD)呈現。^b 每隻動物觀察 2,000 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±標準差(mean±SD)呈現。^c Negative: Sterile water. ^d Positive: Cyclophosphamide * 經卜瓦松分佈統計分析與陰性對照組間具有顯著差異($p < 0.05$)。

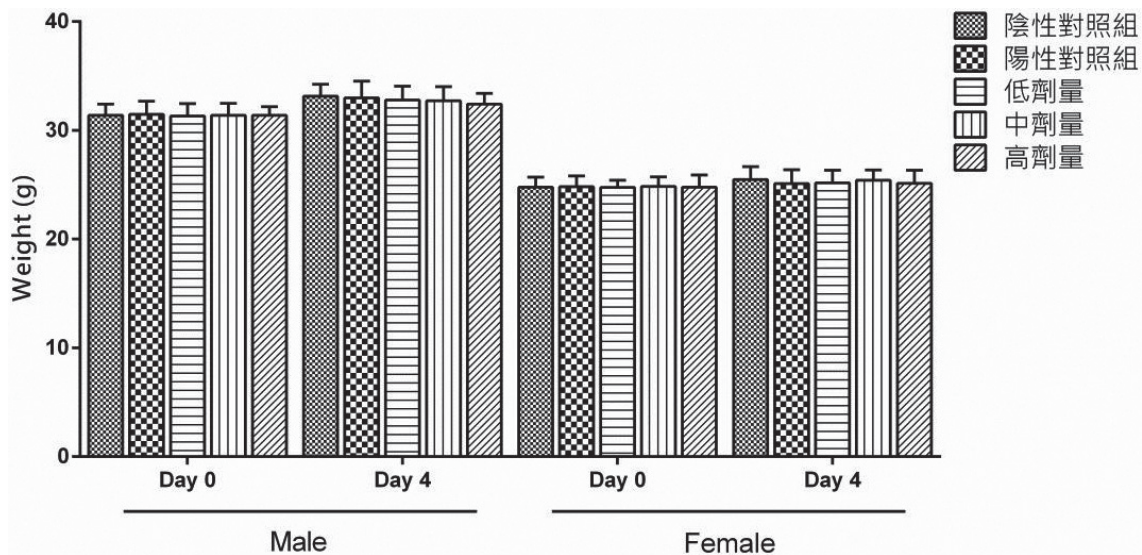


圖 1. 中華被毛孢菌絲體之 *In vivo* 生體內哺乳動物細胞微核試驗之動物平均體重

試驗動物體重以平均值±標準差(mean±SD)呈現 (n=5)，陰性對照組投予無菌水；陽性對照組投予Cyclophosphamide 80 mg/kg b.w.；試驗樣品中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉低、中與高劑量分別為 1,250、2,500、5,000 mg/kg b.w.；結果經 *t*-test 分析無顯著差異。

子實體所分離獲得的菌種，經分子生物技術的方法驗證，確認冬蟲夏草子實體所形成的菌種為中華被毛孢(*Hirsutella sinensis*)，其他如蝙蝠蛾擬青霉(*Paecilomyces hepialid*)、蟲草頭孢(*Cephalosporium sinensis*)等皆為冬蟲夏草的伴生菌。現今有相當多關於冬蟲夏草相關的文獻資料，但卻非以中華被毛孢菌株進行研究，故對於冬蟲夏草的科學價值，需要慎選研究材料以確定其功效，才能避免魚目混珠而造成錯誤判斷。

低溫培養條件以及生長緩慢是中華被毛孢重要特徵，利用深層液態發酵中華被毛孢取代冬蟲夏草子實體的使用，減緩天然野生冬蟲夏草大量採集破壞生態環境，同時也因發酵過程的管控可產出品質穩定且不含重金屬之保健產品。真菌多醣體具有抗發炎、抗氧化、刺激免疫調節、抗癌^[9]等多種功效，中華被毛孢多醣含量達 10% 且蟲草多醣與一般菌菇多醣略有差異，具有開發潛能。目前研究指出對四氯化碳誘導肝臟損傷具保護作用^[10]，預防不可逆之肺纖維化功能^[11]以及減緩馬兜鈴酸(aristolochic acid)誘導之腎臟損傷^[12]等多重功效，更多研究正在開發中卻罕見食用安全資訊，故以食品安全為第一優先。本研究之中華被毛孢菌絲體進行發酵後，將發酵液凍乾進行三項基因毒性評估其食用安全。綜合上述研究結果顯示，中華被毛孢菌絲體發酵液凍乾粉不會造成沙門氏菌造成突變、對哺乳類細胞 CHO-K1 不具有致染色體變異之基因毒性且不具誘發小鼠周邊血球細胞產生微核之能力，以此作為食用安全依據，以利後續功能性開發，以作為人體保健應用之依據。

參考文獻

1. 謝松源。具潛能食藥用真菌之鑑定與分享現況-BCRB 之研發能量與經驗分享。生物資源保存集研究簡訊 2013; 26:4-7。
2. 邱雪紅，曹莉，韓日壽。冬蟲夏草的研究進展、現存問題與研究展望。環境昆蟲學報 2016; 38:62-9。
3. Zhang W, Yang J, Chen J *et al.* Immunomodulatory and antitumor effects of an exopolysaccharide fraction from a cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumor-bearing mice. *Biotechnol Appl Biochem* 2005; 42:9-15.
4. 張穎茁，楊曉彤，楊慶堯，馮惠琴，楊明俊。蟲草對肺部疾病治療的研究進展。現代生物醫學進展 2014; 14:6786-93。
5. 行政院衛生福利部食品藥物管理署。健康食品安全性評估方法。衛署食字第 88037803 號公告。1999。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
6. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. 1997. OECD.
7. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 473: *In vitro* mammalian chromosome aberration Test. 1997. OECD.
8. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. 1997. OECD.
9. Friedman M. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods* 2016; 5. doi: 10.3390/foods5040080.
10. 楊槐俊，郭素萍，薛莉。冬蟲夏草菌絲提取物對化學性肝損傷的輔助保護作用。菌物學報 2014; 33: 394-400。
11. Yue H, Zhao Y, Wang H *et al.* Anti-fibrosis effect for *Hirsutella sinensis* mycelium based on inhibition of mTOR p70S6K phosphorylation. *Innate Immunity* 2017; 23:615-24.
12. Xu XY, Chai JJ, Chen YP *et al.* *Hirsutella sinensis* attenuates aristolochic acid-induced renal tubular epithelial mesenchymal transition by inhibiting TGF- β 1 and snail expression. *PLoS ONE* 2016; 11. doi: 10.1371/journal.pone.0149242.

***Hirsutella sinensis* Mycelium Fermented Powder Has No Genotoxicity**

Bi-Hua Yang¹, Shu-Hsing Yeh¹, Chin-Chu Chen^{1-3*}

¹Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd, Taoyuan City ; ²Institute of Food Science and Technology , National Taiwan University, Taipei ; ³Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei, Taiwan

Abstract

Cordyceps sinensis is a medicinal mushroom that possess multiple bioactivities. *Hirsutella sinensis* is the mycelial form of *Cordyceps sinensis*. In this research, *Hirsutella sinensis* cells were isolated and purified from the fruit body of *Cordyceps sinensis*. The strain was identified by ITS sequencing. The sequences were deposited in the Bioresource Collection and Research Center (BCRC) at the Food Industry Research and Development Institute. The isolated *Hirsutella sinensis* was analyzed for genotoxicity by Ames, chromosomal aberration, and bone marrow cell micronucleus tests. In the Ames test, the powder of *H. sinensis* mycelium was found to have no mutagenic effect on 5 different strains of *Salmonella typhimurium* at the concentration of 5 mg per plate. At a concentration

of 5 mg/ml, the powder of *H. sinensis* mycelium caused no chromosome aberrations in CHO-K1 cells. *In vivo*, erythrocyte micronucleus test revealed no significant increase in the number of polychromatic erythrocytes or erythrocytes with micronuclei in ICR mice treated with the formulation at a dose of 5,000 mg/kg body weight. This result indicates that the powder of *H. sinensis* mycelium has no adverse effect on bone marrow hematopoiesis. Taken together, results of this study suggest that *H. sinensis* has no genotoxicity.

Keywords: *Hirsutella sinensis* mycelium fermented powder, Ames test, *In vitro* chromosomal aberration test, *In vivo* erythrocyte micronucleus test