

執行『籌組跨校研發團隊協助產業轉型升級』
計畫結案報告

白牛樟芝快速育成技術、生物活性及對 B 肝病毒癌細胞
之抑制效果計畫

執行單位
美和科技大學
屏東科技大學

補助單位
國立屏東科技大學
教育部區域產學合作中心-國立屏東科技大學

中華民國 106 年 11 月 6 日

壹、基本資料

計畫主持人:廖信昌

服務單位: 美和科技大學生物科技系

職稱: 副教授

計畫名稱:白牛樟芝快速育成技術、生物活性及對 B 肝病毒癌細胞之抑制效果計畫

合作企業: 金峰生物科技有限公司

貳、計畫本文

一、中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

本研究進行自製改良培養基及與市售培養基培育紅牛樟、白牛樟，並以野生型紅牛樟芝及椴木白牛樟芝做樟芝酸指標成份之比較及進一步萃取各式培育牛樟芝之成份分析測量包括總三萜類、多醣體、總多酚類及抗氧化力及抗 B 肝癌(MTT assay)效果比較，以尋找出最佳之生產方式以滿足產業需求。本研究結果發現皿培牛樟芝確可得到相當量的三萜類，而多醣體含量自製培養基之紅白牛樟均高於市售培養基，而總多酚類為皿培牛樟芝高於椴木白牛樟，在抗氧化力比較亦如此。另外研究發現皿培培養基添加重要元素 P1 的確可增加牛樟芝之指標成份如 Antcin A、B、H、DeSA 和 DeEA 等含量。在抗 B 肝癌細胞試驗發現皿培牛樟芝在 62.5ug/ml 即有約 60%抑制效果，而野生紅牛樟濃度高於 125ug/ml 以上，有超過 80%抑制效果，本研究結果顯示野生紅牛樟有不錯抑癌效果，然而取得不易、培育時間長及易雜藥污染等缺點，故研發適合的配方以生產皿培牛樟芝產品對 B 肝病人的健康保護是相當具有潛力生技健康產品。

關鍵字: 牛樟芝、高壓液相層析儀、三萜類、人類 B 肝癌細胞、抗氧化能力、MTT 測定

This plan is to develop the best culture medium, compare various types *Antrodia cinnamomea* extracts of bioactivities include total triterpenes, polysaccharides, total polyphenols and medicinal functions like to free radicals(DPPH) and anti-B liver cancer (MTT assay) on the regular form(red AC), white variant of AC, wild type(red AC) in petri-dish culture medium (HMWAC、HMWAC+P1、CMWAC、HMRWAC、HMNTAC+P1 and NTAC) and basswood AC(BWAC) should be conducted. Our studied results showed that the homemade medium can enhance crude triterpenoid of mycelia and basidiomatal formation of AC in petri-dish solid-state fermentation. The polysaccharides content of homemade medium for regular and white AC were higher than the

commercial medium. The total polyphenols of AC in the petri-dish culture was more than basswood white AC and DPPH was also the case. In addition, it was found that the addition of peptone to the culture medium could increase the contents of Antcin A、B、H、DeSA and DeEA. In the anti-B cell tests showed that about 60.5% inhibition was achieved at 62.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The wild type AC (NTAC) fruiting bodies extracted concentration was higher than 125 $\mu\text{g} / \text{ml}$, and the anti-B cancer cell effect was over 80%. The results showed that NTAC also had good anti-cancer effects. But it's not easy to obtain and need long-time about 2-3 years to culture and other shortcomings like infection issues to overcome. This study demonstrates that the development of culture medium formula to produce solid-state fermentation of AC products on the B liver health protection is considerable potential for health products making.

Keywords: *Antrodia cinnamomea*; HPLC; Triterpenoids; HepG2; DPPH; MTT assay.

二、報告內容：

(一)前言

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)，又稱樟芝、牛樟菇或紅樟芝等，屬於非褶菌目(Aphyllophorales)、多孔菌科(Polyporaceae)之多年生蕈菌類，為台灣特有種真菌，僅生長於台灣保育類樹種—牛樟樹(*Cinnamoumkanehirai Hay*)之中空腐朽心材內壁上。由於牛樟樹分布數量極為稀少，加上人為的盜伐，使得野生牛樟芝數量更形稀少，且由於其子實體生長相當緩慢，因此價格非常昂貴。牛樟芝之子實體為多年生，無柄，呈木栓質至木質，其具強烈之樟樹香氣，且形態多變化。初生時為扁平型並呈鮮紅色，之後其周邊會呈現放射反捲狀，並向四周擴展生長，顏色亦轉變為淡紅褐色或淡黃褐色，且其係為牛樟芝之藥用價值最豐富的部位。近十年來，有關牛樟芝的相關研究已非常多，相關之研究論文有數百篇、至目前為止(106年)超過三百項以上的牛樟芝專利。據研究報告牛樟芝之生理活性成份有多醣體、三萜類、腺苷、超氧歧化酶、麥角固醇、免疫蛋白、維生素、核酸、胺基酸、及微量元素等，牛樟芝的有效成分，主要來自於多醣體、三萜類(約兩百餘種)，以及野生牛樟芝特有的成份——孢子囊及樟芝酸(A、B、C、K)。近十餘年來醫界與學界開始對牛樟芝進行深入研究，

其優異的保健效果也一一被證實，再加上商業廣告的推波助瀾，牛樟芝遂成為市面上炙手可熱的養生保健食品。由於牛樟樹已列入國家保育類植物，不准砍伐，牛樟芝採集不易，牛樟芝的民間需求日漸轉巨，野生樟芝的來源相當稀少，價位更在一斤數十萬以上，且品質不一。不同品質間的價格亦相差甚鉅。另外，由於環境污染日漸嚴重，天然野生樟芝可能多少含有重金屬污染，因台灣政府林務局加強查緝盜伐牛樟木，在政府未大量釋出深山現存的牛樟倒伏前，椴木取得不易及不合法，椴木栽培牛樟芝是耗時耗力及成本過高，固態及液態發酵不適合烹煮等缺點，相對而言，皿培牛樟芝是較安全、經濟及效益高的栽培方式。一般牛樟芝栽培法有 1.椴木栽培法:以牛樟樹椴木為培養基栽培牛樟芝 2.固體培養法: 將牛樟芝菌種以太空包進行菌絲體培養。太空包含有纖維物、醣類、五穀雜糧類等 3. 液體發酵法: 利用 500 公升甚至噸級以上的液體發酵槽進行菌種液體發酵以收取菌絲體。在台灣民俗醫學上，牛樟芝具有解毒、減輕腹瀉症狀、消炎、治療肝臟相關疾病及抗癌等功用。牛樟芝過去被原住民作為解酒及保肝之用，在民間流傳的功效甚多，包括解毒、治療皮膚病、氣喘、高血壓及高血脂症，以及抗多種癌症等療效(Chan *et al.*, 2009; Hung and Huang, 2007)，因此引發注意而展開科學性之研究。至目前為止，已有三百多篇科學性論文發表有關牛樟芝或其分離化合物具有治療及多種生物活性，牛樟芝的生理活性成分包含有三萜類化合物(triterpenoids)、多醣體(polysaccharides)、腺苷(adenosine)、超氧歧化酵素(superoxide dismutase; SOD)、維生素(如 Vit B、菸鹼酸)、麥角固醇(ergosterol)、蛋白質(含免疫蛋白)、核酸(nucleic acid)、凝集素(lectin)等(Wu 1995)，目前已有多項研究指出牛樟芝的萃取物具有抑制或毒殺癌細胞的作用。Cherng *et al.* (1995)從牛樟芝子實體(fruitingbody)萃取物中獲得 antcin A，證實其具有抑制老鼠血癌細胞(P-388 murine leukemia)的活性。Hseu *et al.* (2002)指出樟芝菌絲的水萃取物對淋巴癌細胞 HL-60 cells 具有有效的細胞毒性。Yeh *et al.*(2009)的研究則證實分離自子實體的萃取物，其中三種麥角甾烷型(egrostane)的化合物: methylantcinate B、zhankuic acid A 以及 zhankuic acid C

有最強的細胞毒殺作用，另外，國內食品工業研究所萃取牛樟芝胞外成分，以及業界萃取牛樟芝胞內成分，皆可有效抑制肝癌、子宮頸癌、胃癌及乳癌(Chen *et al.*2001)。在維護肝臟功能方面，牛樟芝水萃取物或酒精萃取物對肝癌細胞 Hep 3B、Hep G2 及 Alexander 細胞增生有顯著的抑制效果(Lee 2005)。Kuo (2002)則證實餵食大鼠牛樟芝發酵液可以改善其以四氯化碳誘發的慢性肝炎，或抑制由 dimethyl nitrosamine 所引起的肝纖維化(李等 2012)。

(二)計畫目的

本研究計畫為開發自製人工培養基以取代昂貴的市售培養基及快速育成皿培牛樟芝並增加牛樟芝三萜類含量，本研究室已建置了牛樟芝之 8 大指標成份，並開發出一種以蔬果為基質之培養基成份配方，其中南瓜牛樟芝之育成，此部份成果已於 105 年 10 月中華民國經濟部智慧財產局之發明專利 I551686，中國大陸發明專利正審查中(申請案號 201610822784.5)，市售皿培牛樟芝培育時間為 120-150 天左右，因本皿培牛樟技術之育成時間僅 28 天，以市場潛力具有相當大的優勢，再進一步利用 HPLC 進行定量實驗確定比較各種培養基培育紅、白牛樟芝，野生紅牛樟芝、椴木紅牛樟芝及市售培養基育成之皿培牛樟芝等之八大指標成份樟芝酸，及進行總多醣體含量定量、總三萜類含量及抗氧化能力等生物活性之探討與比較，並進行白牛樟芝抗 B 肝病毒細胞株 (HepG2)之 MTT 試驗比較，做為下一步產業化之準備。

(三)合作方式

本跨校研發團隊協助產業轉型升級計畫，由美和科技大學/生物科技系廖信昌副教授為計畫主持人，進行多種蔬果配方為牛樟培養基之主成份篩選試驗，成份分析及生物活性試驗及藉助屏東科技大學生物科技研究所施玫玲教授之學術專長在微生物免疫及在抗癌細胞的研究有深入之研究，包括 B 肝病毒細胞株 (HepG2 及 2.2.15)之細胞培養(Cancer cells culture)、MTT 反應分析、Flow

cytometry 偵測癌細胞凋亡均有相當豐富的經驗，對計畫之深入研究及產出能量有相當大的提升幫助，以開發快速、安全及經濟的牛樟芝培養技術，並進一步將成果產業化。

(四)結果與討論 (含結論與建議)

本研究計畫主要探討白牛樟芝之成分與生物活性，以自製培養基與市售培養基之培育成果進行比較。在樟芝酸之八大指標成分總含量方面，利用 HPLC 高效能液相層析儀分析結果顯示，在牛樟芝八大指標成分含量測試，發現以自製培養基培育白牛樟芝加微量元素 P 為 2.98%，自製培養基培育白牛樟芝為 1.81%，由實驗結果顯示，微量元素 P 的添加，有助於白牛樟芝樟芝酸含量的增加。Antcin K 未在市售培養基培育之白牛樟芝萃取物中被發現，然而在自製培養基培育之白牛樟芝(P)有測到 antcin K(0.02%)，antcin K 已由 Lai *et al.* (2014)證實具有誘導人類肝癌細胞凋亡之功能。由 DPPH 抗氧化能力結果顯示，自製培養基培育之白牛樟芝(P)萃取物，其抗氧化能力優於自製培養基培育之紅牛樟芝與市售培養基培育之白牛樟芝；且兩種白牛樟芝抗氧化能力亦優於兩種培養基培育之紅牛樟芝。由抗氧化力及抗癌細胞株 HepG2 能力實驗結果，白牛樟芝自製培養基(P)皆優於紅牛樟芝自製培養基與市售培養基白牛樟芝。由此可知，後兩者樟芝酸成分雖較高，但由上述生物活性顯示與樟芝酸之總含量高低，似乎無直接關聯性。總多醣體含量測定結果，自製培養基培育白牛樟芝(P)的總多醣體含量為 31.06%，較市售培養基白牛樟芝為 18.50% 高出許多；由此可知，總多醣體的含量多寡，可能是影響著生物活性表現的重要因素。由上述結果顯示培養基成份與牛樟芝生長後之生物活性有關且與抗癌效果有明顯相關性。建議為進一步將以此研發成果加以產業化量產。

(五)計畫經費結算表

項目	區產補助款	企業配合款	小計	說明
人事費		70,000	70,000	支付臨時工包括工讀費、勞保、勞退、職業災害費及補充保費等
材料費	132,100			Methanol(甲醇)、Vanillin(香草醛素)、Perchloric acid(過氯酸); Fetal bovine serum(FBS, 牛胎盤血清 10437)、Dextrose powder(果糖); 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 測去自由基試劑); Sodium carbonate(碳酸鈉)、培養基原料包括 malt extract(麥芽糖抽出物)、peptone(蛋白胨)、agar(洋菜)、glucose、garlic acid(沒食子酸)、acetonitrile(乙腈, HPLC elution buffer) 培養皿 9cm、培養皿 15cm、一及二級抗體、與蛋白質西方轉漬(western blotting)相關試劑、PVDF轉漬膜、DMSO(溶細胞用)、注射過濾器、0.2uM 小飛碟過濾器、錐形瓶、DMEM 細胞培養基、Penicillin/Streptomycin 抗生素、200ul Tips 微量滴管、1000ul Tips 微量滴管、0.22um 濾膜、96孔細胞培養盤、15ml 離心管等試驗材料
差旅費	8,400		8,400	參加 106 台北國際發明展或參加國內研討會及企業合作洽談等差旅費用
印刷費	500		500	論文報告印刷、影印等費用
雜支	9,000	20,000	29,000	資料夾、文具等(以補助金額 6%為上限), 企業配合款用於論文發表之諮詢、國際會議期刊發表及翻譯潤飾稿等

				費用
管理費		10,000		學校行政作業等費用
合計	150,000	100,000	申請區產中心補助000,000元 企業配合款 100,000 元	

(六) 計畫成效：

項目	說明	備註
申請金額	申請補助款：150,000 元，企業配合款：100,000 元 學校配合款：○元，計畫總金額：250,000 元	
計畫衍生 產學成效	產學合作：1 案，金額 100,000 元	
	技術移轉：○案，金額○○○,○○○元	
	進駐育成：企業名稱：金峰生物科技有限公司	
學生參與 計畫人數	專科/高職部：3 位 大學部：5 位、碩士班：1 位、博士班：○位 合計：6 位	
衍生學生 人培成效	指導學生實務專題件數：3 件 指導碩士論文數：1 件	
教師赴產業研習	教師姓名：	
	推行方式： <input type="checkbox"/> 產學合作 <input type="checkbox"/> 深耕服務 <input type="checkbox"/> 深度研習	
其它有益產學 合作推動項目	1.提供企業諮詢輔導 3 人次。 2.相關企業輔導成效，如衍生投資、增加員工數、學生實習及增加營業額等成效。 3.其他成效，請列舉。 1)相關研發技術產品已入選參展 2017 台北國際發明暨技術交易展(28/9-30/9)- 南瓜樟芝深層發酵飲品 (2)部份研究成果已被 ISER(238 th) International Conference on Agricultural and Biological Science(ICABS) 接受並發表 (Kuala Lumpur, Malaysia, 1 st -2 nd October, 2017)	

(七)附錄資料



白牛樟芝快速育成技術、生物活性及對B肝病毒癌細胞之抑制效果計畫

- 1. 完成研發培養牛樟芝原種培養基配方，來達成白牛樟芝之快速二培培養及液木培養技術，以提供產量生產高三萜類二培牛樟芝，提升產量產量。
- 2. 完成探討白牛樟芝野生紅牛樟芝、市售培養基培養白牛樟、自製二培白牛樟、液木白牛樟(實驗室培養1個月)之有效成分分析
- 3. 完成白牛樟芝野生紅牛樟芝、市售培養基培養白牛樟、自製二培白牛樟、液木白牛樟(實驗室培養1個月)之生物活性差異如總多醣體、總三萜類、總多酚含量及抗氧化力(DPPH)之測定。
- 5. 完成野生紅牛樟芝、市售培養基培養白牛樟、自製二培白牛樟、液木白牛樟(實驗室培養1個月)對肝癌細胞(Hep G2)之抑制效果。
- 6. 入選及完成參加2017台北國際發明暨技術交易展參展及參加2017ISER國際研討會發表研究成果一屆。
- 7. 完成產學合作契約一份(10萬元)

表1.各式牛樟芝樣品萃取物之八大指標成分分析統計

每克牛樟芝樣品中八種指標成分分析表									
樣品號	A	B	C	D	E	F	G	H	註
Automa A	0.73	0.68	0.70	0.56	0.55	1.04	0.17	0.00	A 液木白牛樟芝
Automa B	0.67	0.70	0.60	0.54	0.50	0.90	0.18	0.00	B 液木白牛樟芝(市售)
Automa C	0.55	0.57	0.67	0.50	0.48	1.23	0.16	0.00	C 液木白牛樟芝(自製培養基)
Automa D	0.67	0.70	0.74	0.54	0.48	1.27	0.17	0.00	D 液木白牛樟芝(自製培養基)
Automa E	0.67	0.70	0.66	0.53	0.50	0.98	0.17	0.00	E 液木白牛樟芝(自製培養基)
CHS100	0.14	0.16	0.43	0.13	0.15	1.01	0.17	0.00	F 野山紅牛樟芝(自製培養基)
DM1A	1.02	0.70	0.97	1.42	0.55	1.67	1.40	0.00	G 野山紅牛樟芝
DM1A	0.74	0.77	1.08	1.17	0.88	0.92	0.10	0.00	F 液木白牛樟芝
Total	1.31	1.17	1.38	0.93	1.07	26.68	0.23	0.00	液木白牛樟芝

有效成分增加，有助於白牛樟芝產量產量的增長

圖 1. 各式牛樟芝樣品萃取物之八大指標成分分析統計



圖 2. 自製培養基、市售培養基培養之白牛樟芝萃取物對 HepG2 之抑制作用

美和科技大學//生物科技系/廖信昌教師

籌組跨校研發團隊協助產業轉型升級













圖 1. 入選參加 2017 台北國際發明暨技術交易展產品























於 2017 台北國際發明暨技術交易展簽約研發計畫獲金峰生物科
技有限公司產學計畫

IRAJ INTERNATIONAL JOURNALS


 <p style="text-align: center;">IJMPE</p> <p style="text-align: center;">www.ijmpe.org.in</p> <p>International Journal of Mechanical and Product Engineering</p> <p>ISSN(P):2320-2092 ISSN(E):2321-2071</p>	 <p style="text-align: center;">IJSCAI</p> <p>International Journal of Soft Computing And Artificial Intelligence (IJSCAI)</p> <p>ISSN(P):2321-404X ISSN(E):2321-4034 www.ijsc.ai</p>
 <p style="text-align: center;">IJEEDC</p> <p style="text-align: center;">www.ijeedc.org.in</p> <p>International Journal of Electrical, Electronics and Data Communication</p> <p>ISSN(P):2320-2084 ISSN(E):2321-2050</p>	 <p style="text-align: center;">IJASCC</p> <p>International Journal of Advances in Computer Science and Cloud Computing (IJASCC)</p> <p>ISSN(P):2321-4058 ISSN(E):2321-4562 www.ijascc.org.in</p>
 <p style="text-align: center;">IJACEN</p> <p style="text-align: center;">www.ijacen.org.in</p> <p>International Journal of Advance Computational Engineering and Networking</p> <p>ISSN(P):2320-2106 ISSN(E):2320-2106</p>	 <p style="text-align: center;">IJASEAT</p> <p>International Journal of Advances in Science, Engineering and Technology (IJASEAT)</p> <p>ISSN(P):2321-8991 ISSN(E):2321-8909 www.ijaseat.org.in</p>
 <p style="text-align: center;">IJAMCE</p> <p>International Journal of Advances in Mechanical and Civil Engineering (IJAMCE)</p> <p>ISSN(P):2324-2827 www.ijamce.org.in</p>	 <p style="text-align: center;">IJEEE</p> <p>International Journal of Advances in Science, Engineering and Electrical Engineering (IJEEE)</p> <p>ISSN(P):2321-8991 ISSN(E):2321-8909 www.ijeee.org.in</p>
 <p style="text-align: center;">IJMAS</p> <p>International Journal of Management and Applied Science (IJMAS)</p> <p>ISSN(P):2324-7926 www.ijmas.org.in</p>	 <p style="text-align: center;">IJAECS</p> <p>International Journal of Advance in Electronics and Computer Science (IJAECS)</p> <p>ISSN(P):2323-2835 www.ijaece.org.in</p>

Journal indexed in



PROCEEDINGS OF ISER INTERNATIONAL CONFERENCE




Date: 1st-2nd October, 2017 | Venue: Kuala Lumpur, Malaysia

IRAJ Journals Listed in University Library
MIT, University of California Berkeley,
Stanford, Cambridge, Oxford, Harvard

Journal Publication Partner
IRAJ INTERNATIONAL JOURNALS


Visit for Upcoming Conferences www.iser.co This book will be available online at
WORLD RESEARCH LIBRARY
www.worldresearchlibrary.org

ISBN



978-93-86083-34-0

Association With



World
Research
Library

研發成果已發表於 2017, ISER International Conference, Kuala Lumpur, Malaysia



INTERNATIONAL SOCIETY FOR ENGINEERS AND RESEARCHERS

International Conference on
Agricultural and Biological Science

Certificate

This is to certify that Sin-chung Liao has presented a paper entitled "Anticancer Effects of Different Extracts of Various Antrodia Cinnamomea Types on Human Liver Hepg2 Cells and Analyses of Compositions and Bioactivities" at the International Conference on Agricultural and Biological Science (ICABS) held in Kuala Lumpur, Malaysia on 1st-2nd October 2017.



Abel
Chairman

International Society for Engineers and Researchers