

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 100-00-5-18

以樟樹及相思樹材培養牛樟芝
及其三萜類成分分析(1/2)

Artificial culture of *Antrodia cinnamomea* and its
triterpene analysis using Camphor and Acacia wood as
growing substrates (1/2)



委託機關：行政院農業委員會 林務局

執行機關：國立嘉義大學

中華民國 100 年 12 月

摘 要

以樟樹(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.)及相思樹(*Acacia confusa* Merr.)枝梢材為材料，裁製成木塊、徑級小於 7.0 cm 之小椴木及木屑(再調製成仿木塊)三種形態，配合營養液製作栽培介質供無菌環境中培養牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)，同時以牛樟樹(*Cinnamomum kanehirai* Hay.)木材進行相同處理(對照組)，分析其上培養之牛樟芝在生長情形，外觀形態及所含三萜類(triterpene)成份是否一致。試驗結果顯示，牛樟芝可在所有受測之樹種材料上生長良好，並以在仿木塊介質中生長最快。木塊介質及仿木塊介質個別在培養 6 個月後，其菌絲上有多孔狀結構及凸起於菌絲中的圓球狀組織發生。繼代培養之菌絲中則出現扣子體(clamp connection)。經 HPLC 分析得知，木質材料中並不含三萜類，所以牛樟芝中所含三萜類並非由培養介質中提供。隨栽培時間之延長，樟芝的化學組成分逐漸趨向複雜。在不同樹種之間以牛樟樹材調製之介質，生長其上之樟芝有較多化學成分，但這種差異在仿木塊介質中趨向不明顯。已知存在於牛樟芝中的 5 種三萜類，均穩定出現在所有介質培養的樟芝中。說明受測二種木材有取代牛樟樹來培育樟芝之可能。

關鍵詞：相思樹，牛樟芝，人工栽培，樟樹，三萜類

Abstract

This study deals with using *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. and *Acacia confusa* Merr. woods, collected from debarked branches, as incubation substrate to culture *Antrodia cinnamomea* *in vitro*. The wood material was cut into small blocks and logs (with diameter less than 7.0 cm) or fine chips (which to be further manipulated into cubic cakes). The *C. kanehirai* Hay. wood was also collected for same purpose used as control in this study. The growth condition, morphological characteristics and triterpene composition of *A. cinnamomea* grown on these substrates were compared. The results show that *A. cinnamomea* may grow well on all wood substrates with the best growth performance observed on cubic cakes. After 6 months in culture, a porous structure and a round/furry tissue were obtained on block-made substrate and cubic cakes, respectively. The clamp connection were observed in subcultured mycelia. The HPLC analysis revealed that all wood materials contain no triterpene and those detected in *A. cinnamomea* are therefore not provided from the culture substrates. The triterpene components in *A. cinnamomea* were increased as culture time been prolonged. Among all

three wood substrates, triterpene components were more abundant as *A. cinnamomea* samples were grown on *C. kanehirai* wood substrates, but this difference among tree species was not apparent as cubic cakes were applied. There are 5 triterpenes, commonly existing in *A. cinnamomea* cultures, were detected with consistency in all cultures we prepared in this study. This information suggests that the wood materials we used in the study may be good candidates to replace *C. kanehirai* for being used in artificial culture of *A. cinnamomea*.

Key words: *Acacia confusa*, *Antrodia cinnamomea*, Artificial culture, *Cinnamomum camphora*, Triterpene.

I、研究團隊：

姓名	工作屬性	所屬機關	職稱
廖宇賡	主持人	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	副教授
李世豪	共同主持人	國立嘉義大學林產科學暨家具工程學系	副教授
謝育玲	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
季亞垠	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
蔡杏枚	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
莊妙菁	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
莊婉婷	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生

II、前言

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣新興的保健食品並有極佳潛力作為醫療用藥，在野外僅發現生長在牛樟(*Cinnamomum kanehirai* Hay.)樹幹腐朽的中空內壁，以形成片狀橘紅色多孔狀子實體存在。由於牛樟樹本身的稀少性加上牛樟芝子實體生長緩慢，使得從野外大量採收牛樟芝變得相對困難。因為民間深信其具保健及醫療效果，且已有相當科學證據指出其抗腫瘤(呂美津，2003)、提升免疫力(曹巧吟，2003)、抗病毒(Lee *et al.*, 2002)及護肝(李炫璋，2003)等功效，因此價格昂貴。目前已有眾多企業、團體或研究單位投入發展人工培養牛樟芝的方法與技術，至少在牛樟椴木

上培養牛樟芝的模式已大致獲得進展，因此有相當多的椴木牛樟芝培養場陸續成立，隨著越來越多人了解這個技術的細節，相信培養場的規模與數量將在利益導向之下快速擴增，如此相對衍生的問題將是如何取得足量的牛樟樹椴木以提供商業生產之需。

以牛樟造林取得椴木材料固然為一合法可行的方式，但是牛樟的實生苗因採種不易，種子空粒多，目前均以扦插方式育苗為普遍。但扦插苗造林後初年生長緩慢，似有生長惰性，易遭雜草凌壓，且營養系之間生長差異極大(高毓斌等，1999)。若再從中篩選特定營養系後才加以無性繁殖以利用造林，則會使插穗來源受限，在大面積種植扦插苗之後又有造林木基因窄化，不符生態原則的爭議。在現階段一旦有大量牛樟木材需求量出現時，常有不肖業者入山進行非法盜伐，破壞牛樟立木甚巨。相關案例常見諸於報端，常此以往將使得這種臺灣特有珍貴樹種出現瀕臨滅絕的危機，這種行為不僅使違法者獲利，產生行政管理問題，也在挑戰法律的尊嚴。

本研究計畫有鑑於此，於是希望尋求替代樹種取代以牛樟椴木作為栽培基質。我們預計使用樟樹(*C. camphora* (L.) Presl.)以及相思樹(*Acacia confusa* Merr.)做為替代樹種，取材樟樹是因為其與牛樟為同屬植物，推論在木材化學成分應有較接近之組成，而相思樹則與牛樟在分類上親緣關係甚遠，木材化學組成也大有不同。以此可以作為論證之用，探討牛樟芝在選擇生長介質時，是否是因受限於需要有特定木材化學成分存在，

因此才只在牛樟樹上生長。另外樟樹及相思樹均為常見之造林樹種，淺山地帶種植頗多，取材不似牛樟受到數量限制。如果能開發成為替代牛樟的栽培介質，在受控制的生長及培養環境下，培育牛樟芝，則可充分發揮木材的利用方式，提高其經濟價值，嘉惠林農。我們在設計取材範圍時更以前述樹種之枝梢材為主，也是著眼於充分利用造林過程中撫育(打枝、疏伐)後之產物，創造更多元化及高附加價值的利用方式，促進林農造林撫育的意願，導正森林經營模式。我們希望能驗證這種多樣取材的培養方式亦能培育牛樟芝，同時檢定其成分是否與野生牛樟芝相近，如此本計畫若能順利發展，將會有以他種木料取代牛樟木培養牛樟芝之可能，除可解決牛樟木供不應求之狀況，也能增加相思樹及樟樹的多元化開發利用，減少盜伐牛樟樹的違法事件發生。

III、材料與方法

(I)栽培基質及牛樟芝菌種之準備

作為牛樟芝培養基質的材料，相思樹及樟樹取材於國立嘉義大學蘭潭校區內栽種之行道路樹，樹齡皆在 30 年生以上。因學校起造大型工程，在移植路樹時大量修枝，取材時均選擇斷枝伐斷面直徑小於 10 cm 之側枝為對象。牛樟(使用為對照組基質)則由農委會林務局花蓮林區管理處提

供，取材時也選用與相思樹及樟樹大小相似之側枝。修剪及收集各樹種之側枝並經曝曬氣乾數天後，除去樹皮，量取木材含水率。接著將木材處理成以下三種狀態(圖 1)：1. 直徑 4-6 cm，長度 7 cm 之小段木，2. 鋸切成約略為 $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ 之木塊，以及 3. 以粉碎機將木材打成木屑。牛樟芝菌種則由農委會林業試驗所張東柱博士贈送，在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗環境



圖 1. 培養牛樟芝的三種基質狀態，後方直立者為小段木，右方為木塊，左方盤中盛裝者為木屑。

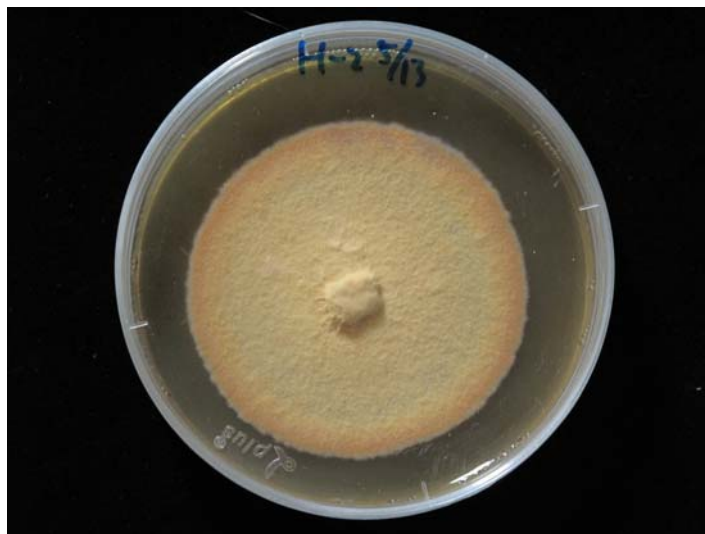


圖 2. 牛樟芝菌種在 MEA 固態培養基中生長情形，此即為本試驗中之接種源。

下以 MEA (malt extract agar) 固體培養基培養(圖 2)，每 4 週切取小菌塊移往新配製的相同培養基進行繼代以維持菌種活力。

(II) 培養介質的調配

小椴木及木塊均置入塑膠培養罐中高溫高壓滅菌 2 h，木屑則先團聚塑造成四方形仿木塊(圖 3)之後，以相同容器盛裝也進行高溫高壓滅菌 2 h。以上三種介質在塑膠培養罐中均加入 200 mL 營養液，但添加在木塊中之營養液另外以 20 g/L 洋菜固化。待冷卻後，於無菌操作環境中切取固態培養基上生長的菌絲 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ，移置於培養介質上完成接種。接種後之培養容器以封口膜密封，在 25 °C 黑暗環境中培養，容器中維持 90% 以上之相對濕度。

(III) 培養樟芝之形態觀察

培養的樟芝在 6 個月時，逢機選取小塊樣本置於載玻片上以甘油浸潤後覆上蓋玻片進行光學顯微鏡觀察。同時不定期觀察培養樟芝之形態構造以釐清是否在轉化進行子實體之生長，並以解剖立體顯微鏡拍照紀錄觀察所得。



圖 3. 以木屑調製完成之仿木塊，經高溫高壓滅菌後作為培養介質。

(IV) 化學成分分析

本研究因為需要檢定所培養的牛樟芝成分，因此先針對培養基質進行化學成分背景分析，以瞭解木材中是否含有三萜類(triterpene)成份。取三種木材之木屑研磨成細粉，各秤取 10 g 以乙酸乙酯為溶劑進行索氏迴流萃取 8 h，粗萃取物以減壓濃縮至乾燥狀態再以氮氣吹乾 2 h。

牛樟芝接種不同介質的試驗共完成 10 種不同的處理(表 1)，在培養屆滿 3 及 6 個月時，收取其上生長之牛樟芝亦進行三萜類成分分析。其中因介質調配時均外加營養液，因此又針對單獨以營養液(添加洋菜固化)為介質而培養之牛樟芝進行成分分析，作為對照。

表 1. 牛樟芝不同接種介質之組合，於其上生長之牛樟芝將進行成份分析

受測物名稱	供牛樟芝生長的不同培養介質組合			
	--	相思樹	樟樹	牛樟
生長於右列培養介質之樟芝共四種	營養液 (對照組)	木塊加 營養液	木塊加 營養液	木塊加 營養液
生長於右列小椴木培養介質之樟芝共三種	--	小椴木加 營養液	小椴木加 營養液	小椴木加 營養液
生長於右列仿木塊培養介質之樟芝共三種	--	仿木塊加 營養液	仿木塊加 營養液	仿木塊加 營養液

收取不同介質上生長的牛樟芝，於室內陰乾後秤取其重量。以剪刀剪成碎屑後使用相同的索氏萃取法進行三萜類的萃取。牛樟芝受測樣本之乙酸乙酯萃取物在完成減壓濃縮之後，粗萃取物均以減壓濃縮至乾燥狀態再以氮氣吹乾 2 h (步驟與前述三種木材粉末萃取流程相同)，紀錄粗抽出物重量後以定量乙醇回溶，使其濃度固定在 10 mg/mL，以 0.2 μm 濾膜過濾後進入 high performance liquid chromatography (HPLC) 分析。

HPLC 使用之設備及分析條件係參考 Geethangili (2011) 建議的方案，摘要敘述如下：以 Hitachi (Tokyo, Japan) L-7100 pump 附加 20 μL fixed loop，聯接 J' sphere ODS-M80 C-18 管柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 4 μm,

YMC Sep. Technol., Japan), 並以 Hitachi L-7400 型號之 diode array detector (DAD) 在 220 nm 波長吸收值偵測三萜類訊號。HPLC 移動相(mobile phase) 由 acetonitrile 混合含有甲酸(formic acid)之三次水而成，流速固定在 1 mL/min。

III、結果與討論

(I) 三種木粉成分分析

三種作為培養基質的樹種，經曝曬氣乾後取材時其含水率各為牛樟：9.45%、樟樹：8.83%、相思樹：9.31%。在進行是否含有三萜類的背景成份分析之後，以相思樹所含成份最單純，並無類似三萜類的訊號出現(圖 4)。然樟樹及牛樟樹在相同檢測條件下，雖出現特定訊號(圖 5, 6)，

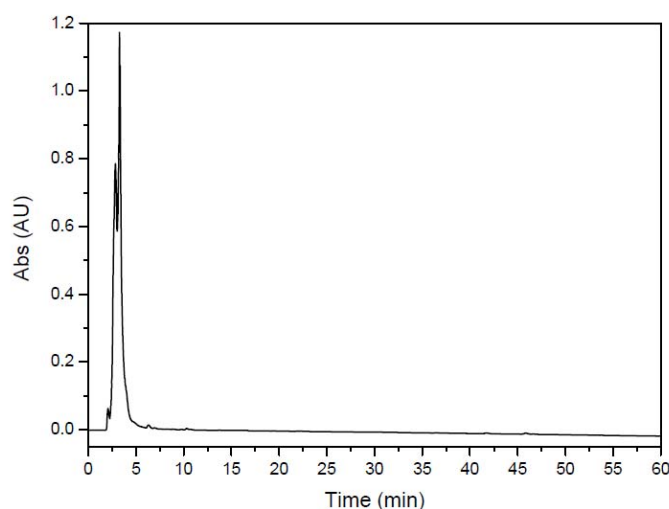


圖 4. 相思樹木粉進行三萜類分析之 HPLC 圖譜。

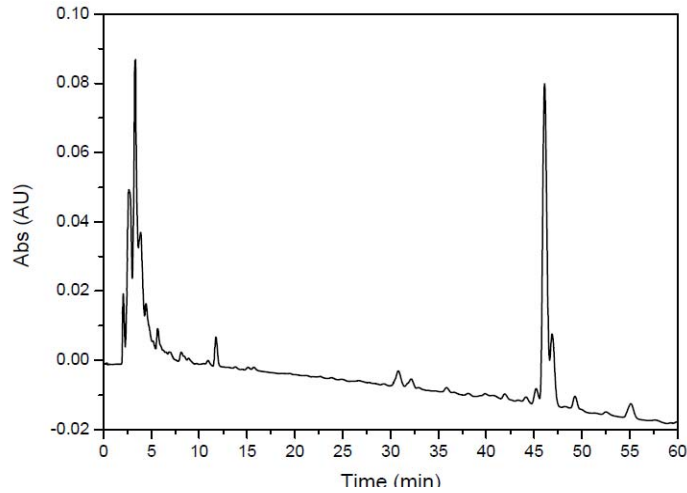


圖 5. 樟樹木粉進行三萜類分析之 HPLC 圖譜。

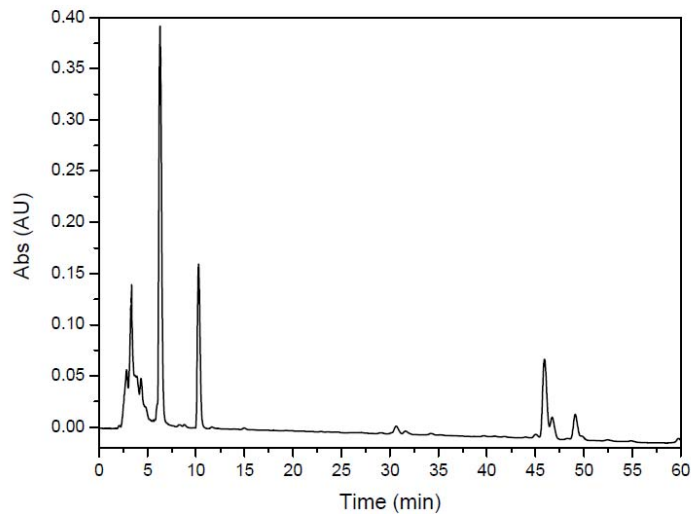


圖 6. 牛樟樹木粉進行三萜類分析之 HPLC 圖譜。

但與標準品比對之後，知道這些訊號均非已知牛樟芝所含之三萜類，且因訊號強度低，在木料中應非主要成分。因此認定本研究所取材之木料，並無法提供三萜類，讓生長其上之牛樟芝吸收後累積在菌絲體或子實體中。

在木材中並不含三萜類的背景之下，本研究亦使用了僅為洋菜固化

之營養液為基質作對照組，其也無三萜類存在之可能。但是培養在這些介質上的牛樟芝，卻能產出 5 種穩定出現之三萜類，另外尚有可能為(7)及(12)之三萜類在某些特定處理組合中被偵測到，說明牛樟芝在生長過程中合成或代謝轉化成多種三萜類時，並不需要從起始培養基質中取得三萜類作為最初的前趨轉換物質，這個資訊讓我們在選擇栽培用的木料基質時有較寬鬆的條件。

(II) 不同介質接種牛樟芝生長狀況

在以不同形態介質接種牛樟芝菌絲的試驗中，完全以營養液固化之培養介質(圖 7)、小椴木+營養液介質(圖 8A-C)、木塊+營養液配製的介質(圖 8D-F)、以及以木屑塑造成仿木塊+營養液之介質(圖 8G-I)都能有效提供菌絲生長之環境。接種之菌絲在 2 週之內，即開始增生，並在 4-8 週之後佈滿介質表面，顏色呈現橘紅色，並有顯著之特殊氣味。本計畫在期末總結樟芝生長情形時得知，牛樟芝菌絲體在樟樹或相思樹木質材料所調製之培養介質上均能生長，若以同一種形態的培養介質(同為木塊、小椴木或仿木塊)作為比較基礎時，生長在不同樹種間的菌絲其色澤、外觀，均與生長在牛樟樹介質上之菌絲體相仿，無明顯差別。但是在比較



圖 7. 牛樟芝在只含固化營養液的介質上生長的情形。

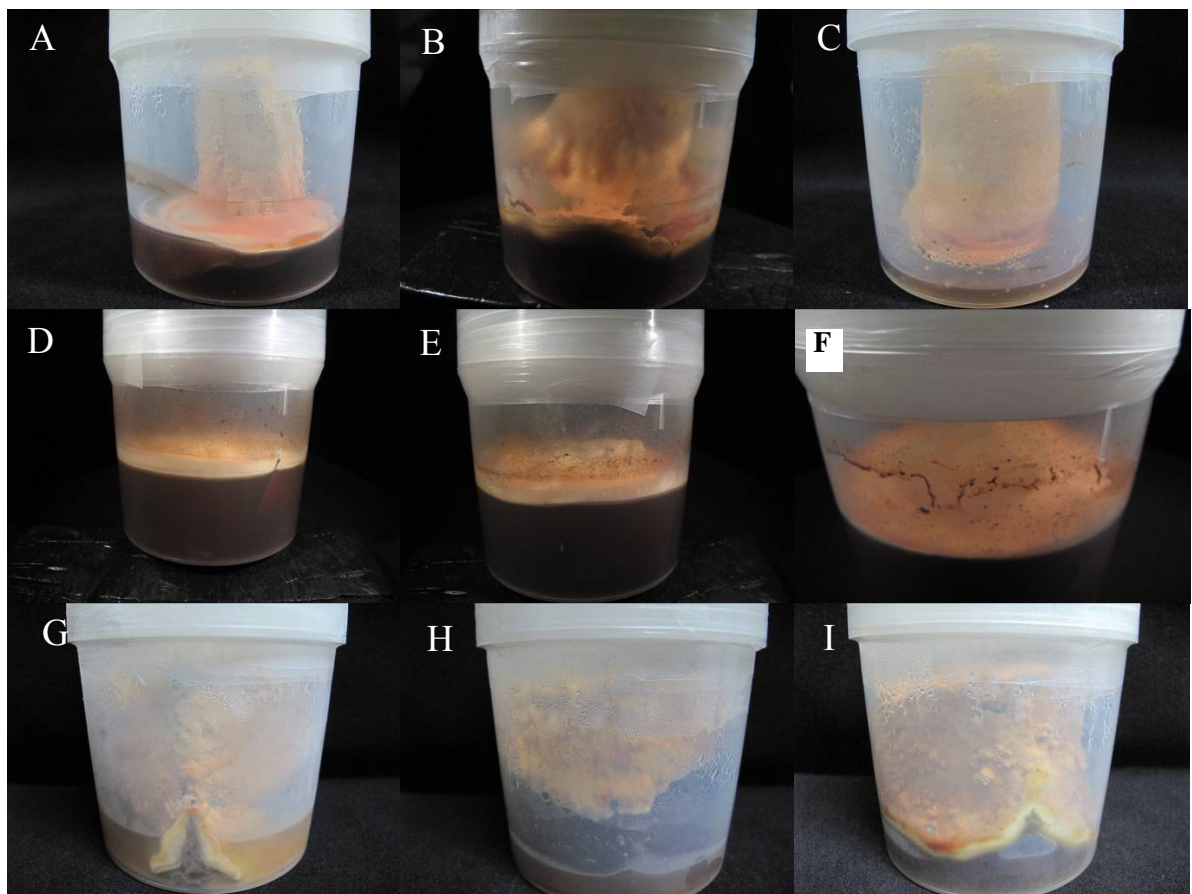


圖 8. 以三種樹種不同形態介質培養牛樟芝菌絲之生長情形。(A)-(C)小椴木介質經接種 8 週後菌絲佈滿介質表面，(D)-(F)牛樟芝菌絲接種在木塊介質上 4 週即覆滿表面，(G)-(I)為仿木塊接種後 8 週之情形。本圖中(A)(D)(G)為牛樟樹、(B)(E)(H)為樟樹、(C)(F)(I)為相思樹。

不同形態的培養介質時，以小椴木上生長的菌絲最薄(圖 9)，只能緊貼木材表面生長而擴大其面積，而以仿木塊及木塊調製的介質，菌絲生長其上，除了面積擴增快速，菌絲體有顯著增厚之現象，在菌絲生長接觸容器內壁而反捲的邊緣可以見到增厚約達 0.5 cm 的淺黃色菌絲層(圖 10)。

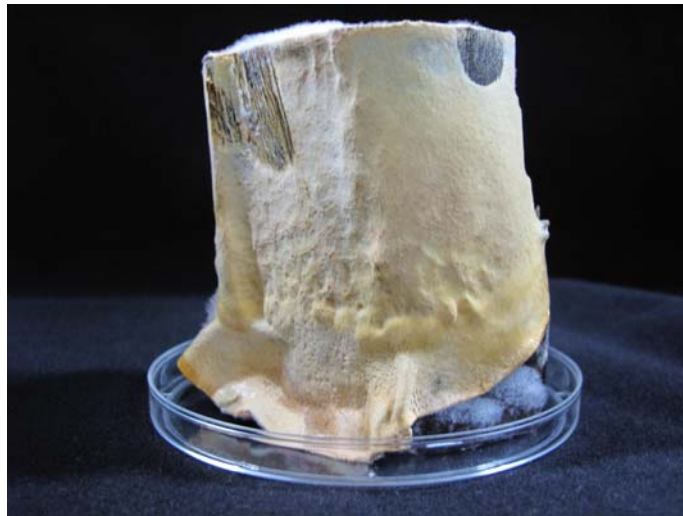


圖 9. 生長在牛樟小椴木介質上的牛樟芝菌絲體相對較薄。

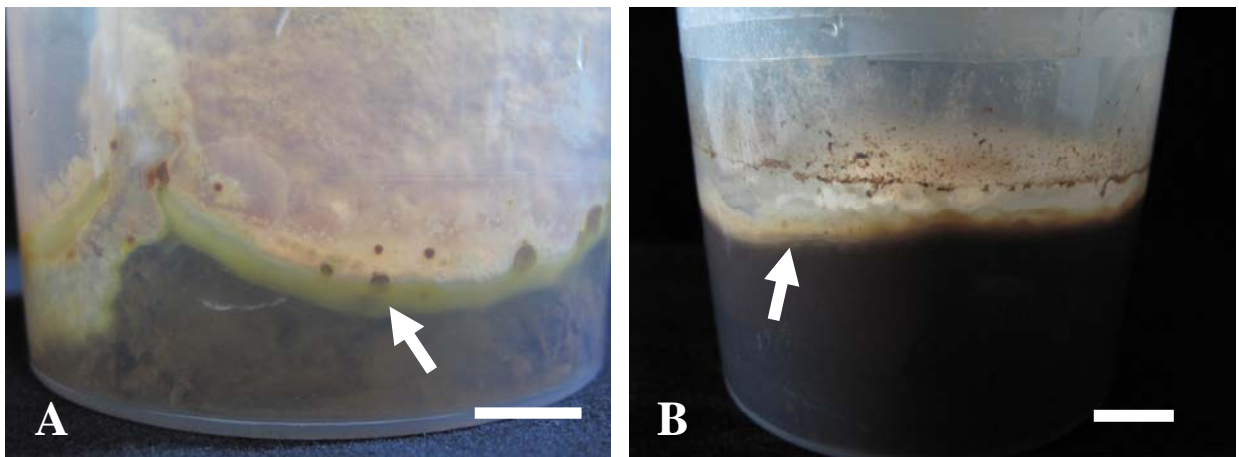


圖 10. 生長於二種不同形態牛樟介質上的菌絲增長快速，接觸容器邊緣時可見其具有較厚的菌絲體(箭頭)。(A)仿木塊介質，(B)木塊介質，Bar = 2.0 cm。

(III) 樟芝之形態觀察

我們在繼代培養的菌絲表面觀察到扣子體(clamp connection)的形成(圖 11A)，這個構造代表菌絲體已經具備生殖菌絲，並有形成子實體的準備。同時在牛樟及樟樹木塊介質培養的菌絲表面觀察到若干結構發生變異的區域，初始時見到在橘紅色菌絲體表面有多數細小圓孔狀的塌陷(圖 11B)，這種圓孔形塌陷的區域並會持續擴大範圍(圖 11C, D)，在撰寫本報告時(培養 8 個月)，最大的圓孔形群聚塌限區域已擴大到約 12 cm²，未來會產生何種變化，以及它是否代表樟芝生長進入階段性的轉變期(子實體形成階段)，我們需持續追蹤觀察。這種菌絲體結構的變化在相思樹木塊介質培養基上尚未觀察到。除此之外我們在相思樹及牛樟仿木塊介質上觀察到另外一種不同結構，一種圓球體具絨毛狀外觀的組織從菌絲內部突出表面生長，且顏色從淡灰色逐漸轉呈橘紅色(圖 11 E, F)，這種結構在仿木塊介質的側邊及頂部均有出現，是否具有樟芝子實體發育上特殊的意義，我們也在持續觀察中。

(IV) 不同介質培養牛樟芝成分分析

在不同培養時間(包含 3 及 6 個月)下所培育的對照組樟芝(圖 12A、B)及木質介質上生長的牛樟芝樣本(圖 13 及 14)，其 HPLC 分析結果都檢

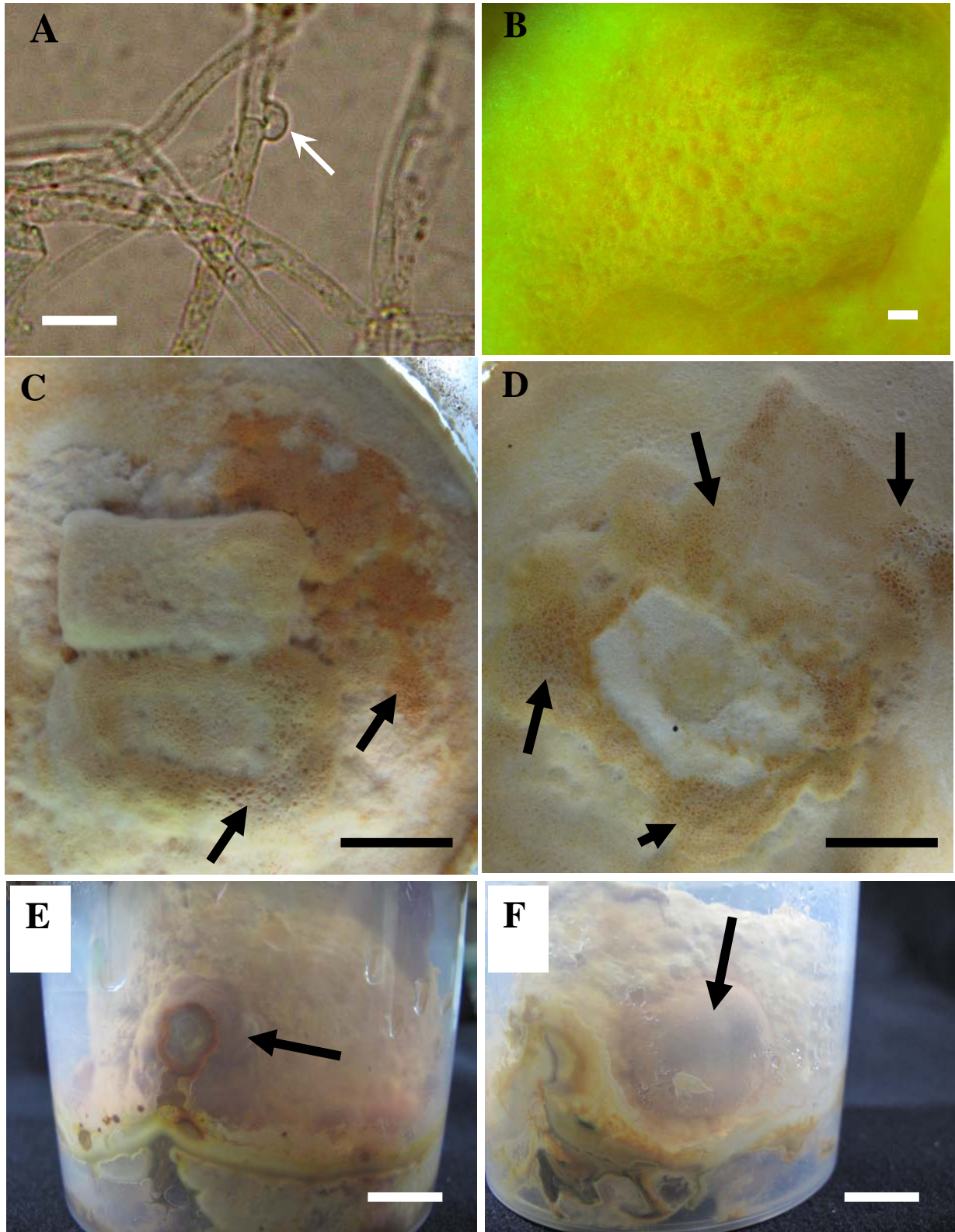


圖 11. 牛樟芝培育不同階段發育觀察紀錄。(A)在繼代培養的菌絲體中觀察到扣子體的出現(箭頭)，Bar = 0.01 mm。(B)以牛樟木塊介質培養 5-6 週的樟芝菌絲表層出現小孔狀塌陷。多孔塌陷的區域在(C)牛樟木塊介質及(D)樟樹木塊介質上持續擴大，Bars = 1.0 cm。(E)相思樹仿木塊及(F)牛樟仿木塊介質上另出現圓球形具絨毛狀外觀之組織，從培養的菌絲底層內部突出於表面生長，Bars = 2.0 cm。

測到 5 種穩定出現的三萜類，經與表 2 中之標準品比對之後，鑑定為去氫齒孔酸 [dehydroeburicoic acid (2)]，15 α -乙醯去氫硫色多孔菌酸 [15 α -acetyldehydro sulphurenic acid (3)]，3 β ,15 α -二羥羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21 酸 [3 β ,15 α -dihydroxylanosta 7,9(11),24-triene-21-oicacid (4)]，去氫硫色多孔菌酸 [dehydrosulphurenic acid (6)] 以及硫色多孔菌酸 [sulphurenic acid (8)]，這 5 種三萜類的穩定出現，幾乎可以被認定為本研究培養物中所含三萜類的主要背景成分，其中又以 (2) 及 (4) 二種成分在大部分受測樣本的 HPLC 分析圖譜中所呈現的訊號最強，代表其為主要成分。

另外我們在部分樣本 HPLC 分析圖譜的前 10 分鐘，檢測到類似樟芝酸 C [zhankuic acid C (7)] 及牛樟芝甾 K [antcin K (12)] 等 2 種三萜類的訊號，經查閱文獻後得知，這二種三萜類為牛樟芝子實體所專有的成分(表 2)，但是這 2 種三萜類在本研究所培養的樟芝中並沒有穩定的出現。大

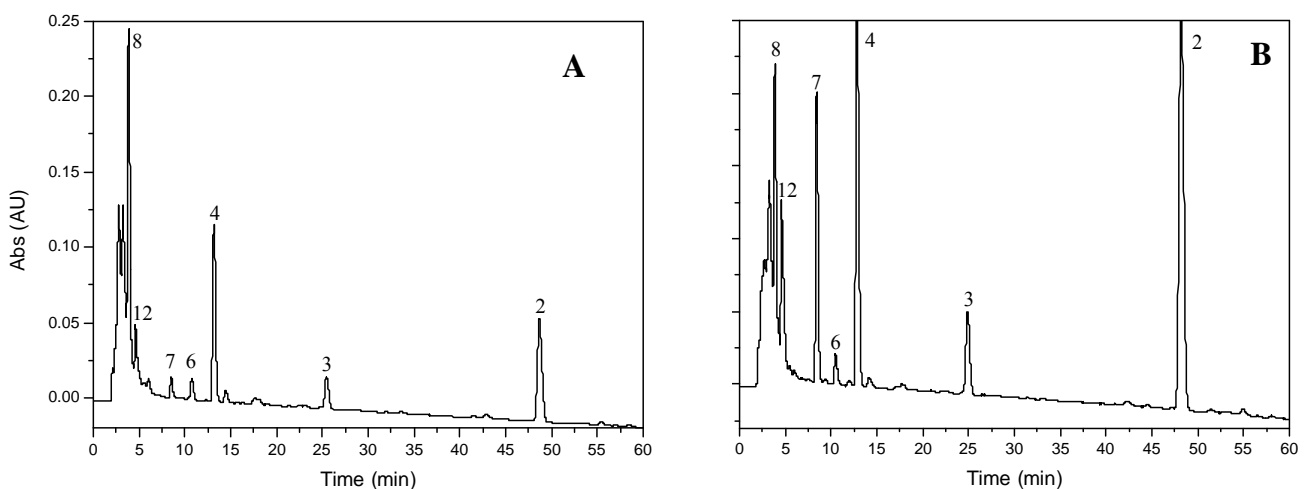


圖 12. 在固化營養液上(對照組)經不同培養時間育成之樟芝樣本經 HPLC 分析之圖譜。(A)3 個月，(B)6 個月。圖譜中標示柱峰(peak)之數字請參閱表 2。

表 2. 牛樟芝子實體中所含有之三萜類成份(Y.M. Tzeng, personal communication)

中文名	英文名 ¹⁾	Retention time (min)	報導亦存在於菌絲體之文獻 ²⁾
牛樟芝甲酯 B	methyl antcinate B (1)	31.8	a
去氫齒孔酸	dehydroeburicoic acid (2)	49.1	a, b, c
15 α -乙酰去氫 硫色多孔菌酸	15 α -acetyldehydro-sulphurenic acid (3)	25.2	a, b
3 β , 15 α -二羥羊毛甾-7, 9 (11), 24-三烯-21 酸	3 β , 15 α -dihydroxylanosta-7, 9(11), 4-triene-21-oic-acid (4)	12.6	d
牛樟芝甾 B 或 樟芝酸	antcin B or zhankuic acid A (5)	15.8	
去氫硫色多孔菌酸	dehydrosulphurenic acid (6)	10.5(main) 12.6, 13.6, 15.4(minor)	a, b, c
樟芝酸 C	zhankuic acid C (7)	9.0	
硫色多孔菌酸	sulphurenic acid (8)	3.9	c,
牛樟芝甾 A	antcin A (9)	23.5	
牛樟芝甾 C	antcin C (10)	8.9(main) 9.3 (minor)	
牛樟芝甲酯 A	methyl antcinate A (11)	43.2	
牛樟芝甾 K	antcin K (12)	4.1	

¹⁾括號內三萜類數字編號亦相同用於標示本報告 HPLC 圖譜中分析物柱峰(peak)。

²⁾a: (楊書威, 1990); b: (陳建甫, 2008); c: (Chang *et al.* 2011); d: Y.M. Tzeng, personal communication。

致上在 3 個月的培養物中，成分(7)常見出現在以牛樟樹及樟樹木質介質所培養的樟芝中，而相思樹介質所培養的樟芝中沒有出現(僅相思樹仿木塊介質培養者出現微量訊號；圖 13 I)。在培養 6 個月的樣本中，成分(7)

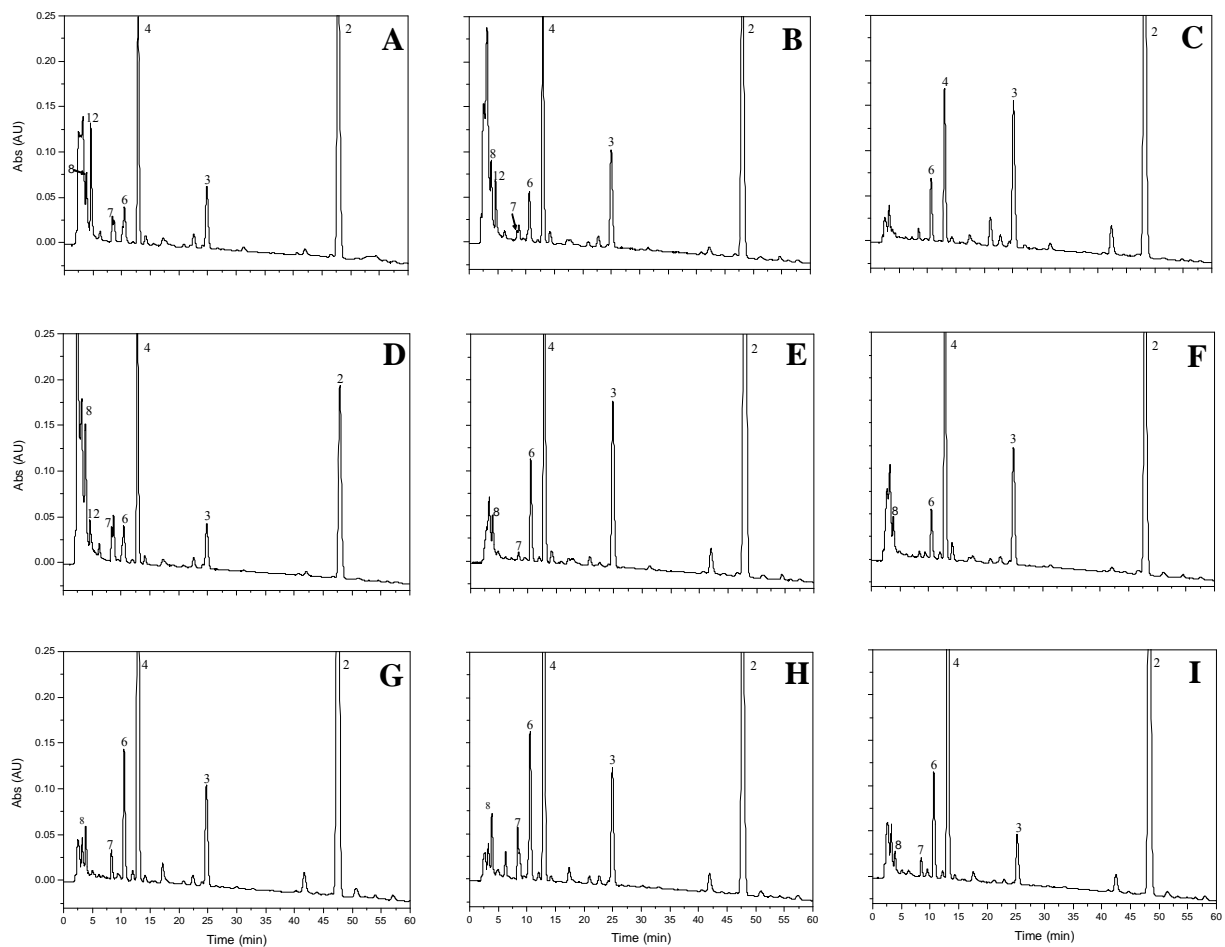


圖 13. 本研究以不同培樹種及形態之介質培養樟芝 3 個月後經 HPLC 分析其成分之結果。(A)(B)(C)為椴木介質，(D)(E)(F)為木塊介質，(G)(H)(I)為仿木塊介質。(A)(D)(G)為牛樟樹，(B)(E)(H)為樟樹，(C)(F)(I)為相思樹。

則普遍存在各個不同介質所培育的樟芝印本中(樟樹木塊介質為唯一例；圖 14 E)。此外成分(12)不論在 3 個月或 6 個月的培養物中出現的情形，均無規則可循，但偏向出現在牛樟樹培養的樟芝中(圖 13 A、B、D，圖 14A、D)。

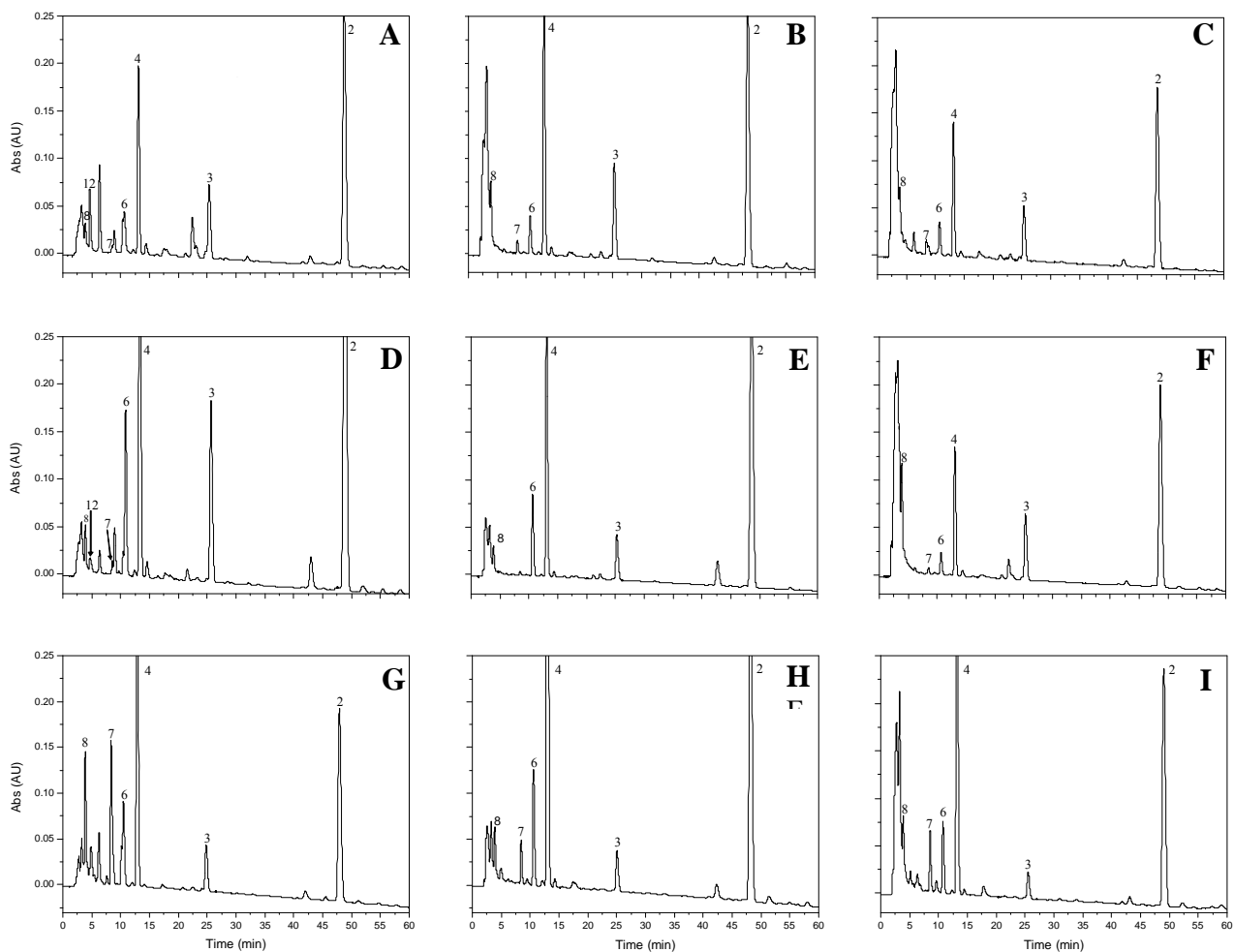


圖 14. 本研究以不同培樹種及形態之介質培養樟芝 6 個月後經 HPLC 分析其成分之結果。(A)(B)(C)為椴木介質，(D)(E)(F)為木塊介質，(G)(H)(I)為仿木塊介質。(A)(D)(G)為牛樟樹，(B)(E)(H)為樟樹，(C)(F)(I)為相思樹。

整體來說，以不同樹種製作不同介質來培養樟芝，其已知的成分均十分類似。在比較不同培養時間的差異時，HPLC 分析圖譜顯示在培養 6 個月後(圖 14)，各樣本中出現的柱峰訊號比培養 3 個月的樣本(圖 13)稍多，不過這些新增加出來的訊號因尚未被鑑定，沒有比對的對象，因此成分未知。

最後讓我們注意到的是，樟芝在經 6 個月的培養之後，HPLC 檢測的成分似乎以牛樟樹材調製的介質所培養者較多(圖 14A、D、G)，但是這種趨勢在單一比較仿木塊介質所培養的樟芝時(圖 14G、H、I)，又不明顯。因為以仿木塊所培養的樟芝，雖取用樹種有別，但都能形成十分近似的組成分(訊號相似)，似乎樹種間之差別，在製成仿木塊之後會減少其差異。

王永興(2009)曾指出在樟樹椴木上有可能栽培牛樟芝，且在培養 6 個月後有子實體轉化發生。李明訓(2004)也曾使用相思樹木粉添加米糠製作太空包成功培育牛樟芝菌絲體並形成原基。Chang *et al.* (2011) 則以馬鈴薯葡萄糖洋菜(PDA)培養基培育出樟芝子實體，並能確認其成份與天然牛樟椴木上生長之子實體三萜類成份相同。這些研究報告均說明牛樟芝並不一定要在牛樟木材上才能生長。本研究從牛樟芝生長情形的比較上得知，與牛樟及樟樹不同屬的相思樹亦能提供相同優良的生長條件，再証諸於前述曾在樟樹及相思樹太空包上栽培樟芝的紀錄，印證以人工接種方式，是有可能以非屬牛樟的木材來培養牛樟芝，初步完成本研究第一個想要探討的問題。

牛樟芝培育過程需要較長的時間才能形成子實體，一般需為 9-12 個月，本研究在培養至 6-8 個月時發現菌絲體上若干結構上的變化，如出現多孔狀的構造(圖 11C、D)及一種柔軟具絨毛狀外觀的圓球形組織(圖 11E、F)，這是否為早期形成子實體的原始跡證，值得持續追蹤觀察。而子

實體專有的三萜類成分(7)及(12)不穩定的出現，也有可能是另一個初始的跡証，說明本研究所培養的牛樟芝正在往發育子實體的方向演進。重要的是這些跡證並沒有只出現在牛樟樹調製的栽培介質上，大大的提高了我們以非屬牛樟樹材育成牛樟芝子實體的可能性。展望未來，以本研究所獲得的資訊為基礎，我們應建立較大量的培育試驗樣本作長期觀察，以因應培養牛樟芝形成子實體所需約一年的等待期，另外也可嘗試再選用不同的樹種作為擴大取材之試驗，以作為擴大牛樟芝栽培產業之基礎研究。

IV、結論

牛樟芝菌絲體在樟樹或相思樹木質材料上生長良好，不論是比較生長速度，外觀形態與化學成分分析(5 種菌絲體中穩定存在的三萜類)尚無明顯的差別。說明了在非屬牛樟木的木質材料上，亦有相當可能可以培育牛樟芝。

目前在化學成分分析上尚無法驗證以替代樹種培養樟芝是否一樣能形成子實體，但是從菌絲形態發育的跡證顯示，在牛樟木介質上出現的發育特徵(多孔結構，絨毛狀構造)，在其他二種樹種上均有出現，說明截至目前為止(培育接近9個月)，替代樹種的表現與牛樟樹尚無差異。

V、致謝

感謝農委會林務局提供經費補助及花蓮林區管理處同仁協助牛樟樹材料之收集，謹致最高謝忱。

VI、參考文獻

- 王永興 (2009) 利用香樟木為基質栽培樟芝之研究。南台科技大學生物科技系碩士論文，94 頁。
- 呂美津 (2003) 牛樟菇子實體乙醇萃取物誘導 HL60 細胞凋亡之研究。國立屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文，64 頁。
- 李明訓 (2004) 樟芝栽培之研究。國立嘉義大學林業暨自然資源研究所碩士論文，61 頁。
- 李炫璋 (2003) 牛樟芝菌絲體之體內保肝功能評估及其熱水淬物在體外對基質金屬蛋白水解活性之影響。國立中興大學食品科學研究所碩士論文，88 頁。
- 高毓斌、黃松根、劉一新 (1999) 牛樟扦插苗造林五年後之生長表現。台灣林業科學 14(1):45-52.
- 曹巧吟 (2003) 樟芝中免疫調節蛋白的純化與其生理活性之探討。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文，117 頁。
- 陳建甫 (2008) 主動誘變轉殖系牛樟芝活性成分分析與其分子層面之研究。朝陽科技大學生化科技研究所碩士論文，88 頁。
- 楊書威(1990) 中藥樟菇活性成分之研究。國立台灣大學藥學研究所 碩士論文，174 頁。

- Chang, T.T., W.R. Wang and C.J. Chou (2011) Differentiation of mycelia and basidiomes of *Antrodia cinnamomea* using certain chemical compounds. Taiwan Journal of Forest Science 26:151-62.
- Geethangili, M. (2011) Studies on isolation, identification and analysis of bioactive constituents from *Antrodia camphorate*. [dissertation]. Taipei, Taiwan, ROC: Chaoyang Univ. of Technology. 161 p. Available from CYUT Library, etd-0128111-113254.
- Lee, I.H., R.L. Huang, C.T. Chen, H.C. Chen, W.C. Hsu and M.K. Ku (2002) *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. FEMS Microbiology Letters 209:63-67.

一、期中報告審查意見回覆表

審查意見	意見回覆
本計畫選擇樟樹、相思樹取代牛樟椴木作為培養牛樟芝之試料，建請於前言補充說明理由，使本計畫之動機與目的更明確。	已在前言中增加相關敘述，以說明研究動機及目標。
圖 7，栽培介質係由樟木調製而成，建議能將相思樹及牛樟為栽培介質者併列，俾做比較。	已將所有樹種並列在圖 8 中供參閱。
接種菌絲後，在未發生子實體之前，建議測定所增生菌絲之化學成分，與原來之菌絲體做比較，是否有任何改變。	本研究在培養三個月時進行了化學成分分析，即為比較未發生子實體前菌絲體之成分。在對照組使用固化營養液作為培養介質，可視為原來菌絲體繼代之菌種，二者相比在成分上無太大差異。
為探討牛樟芝子實體所含三萜類，是否可能有部分直接由栽培介質中而獲得，建議以經精油萃取試驗後之殘渣作為栽培介質，觀察其所增生之菌絲及子實體，並測定其化學成分加以探討。	以精油萃取後之殘渣作為介質，可以排除木材介質殘留三萜類之可能，但是仍需妥適檢測驗證。本研究在設計試驗時對照組中採用全營養液所培育之樟芝菌絲仍然能含有 5 種三萜類，應已證明菌絲生長之介質中無需提供三萜類供樟芝吸收儲存轉化，所以利用精油萃取後之殘渣作為介質培養樟芝所要了解的疑問，已獲解答。
第 4 頁，第 9 行「...相思樹及樟樹取材於校園內栽種的行道樹...」，請說明那一所學校之校園及立地環境。	相思樹及樟樹取材來源已經增加補充說明。
第 7 頁，「栽培介質的調配」，請說明牛樟芝菌絲移植於培養介質上完成接種後所需之溫度、濕度各為多少？另單位時間內增產率亦請補充說明。	溫溼度培養條件已經在文章中敘明，本研究所設定之增產率，在後來取樣稱量時發現，菌絲生長會與木屑沾黏，無法精確稱重，因此推算增產率會有誤差。我們之後改為觀察生長速度(以覆蓋介質表面所需時間是否有差異來論定)。
牛樟芝生長增重速率及 HPLC 三萜類成分組成分析，進度稍微落後，請加強辦理，並補充說明。	HPLC 分析數據已於期末報告中呈現。請委員審閱。
本計畫取代牛樟之椴木所培養之牛樟芝是否有其他副作用？請加以說明。	本項建議為日後進行推廣業務前須先進行之分析，以確保不含其他有害成分。將會視試驗之進度而定，若能養成子實體，則將逐一檢查。
建議未來能建立牛樟芝於不同介質之生長環境條件，及詳細分析各栽培介質之牛樟芝成分，並與原生牛樟芝比較其成分有無差異。	謝謝委員建議，日後將在規劃試驗計畫時，納入此意見。

二、期末報告書面審查意見回覆表

審查意見	意見回覆
英文題目建請修正與中文相符。如，樟樹(Camphor tree)、相思樹(Acacia wood)。	已改為： 以樟樹及相思樹材培養牛樟芝及其三萜類成分分析(1/2) Artificial culture of <i>Antrodia cinnamomea</i> and its triterpene analysis using Camphor and Acacia wood as growing substrates (1/2)
中英文關鍵詞排序不一。建請重修正；又，英文 Keywords 中相思樹學名寫錯：建請改為 <i>Acacia confusa</i> 。且第一個字母宜統一為大寫。英文 Keyword 中，camphor tree 應改為學名。	排序已修正。 相思樹學名已更正。 camphor tree 已改為學名。 第一字母均已大寫。
第 1 頁，文章中所列「扣子體」英文寫為「clump cells」，為何非 clamp connection? 同頁中牛樟學名寫錯：建議改為 <i>Cinnamomum kanehirai</i> , Hay. 文章中引用參考文獻作者如多位時，...et al., 應改為斜體 et al., 數字與單位間應空一格。	扣子體已改為 clamp connection。 牛樟學名改為 <i>Cinnamomum kanehirai</i> Hay.。 <i>et al.</i> 已用斜體字呈現。 數字與單位之間已增列空格。
本研究牛樟芝菌種培養係採用固態培養基法。其它方法，如半固體或液態方法是否亦可行?	牛樟菌種可以用半固體或液態方法培養，本研究考量接種時的方便性及接種量計量容易，因此採用固態培養基培養。
試驗用仿木塊製作，如何成型? 其性質又為何? 如密度...	仿木塊製作無須特殊工序，加入適當調劑混合即可。
材料與方法中應列出本研究所使用之相關材料品名與性質。	已增加相關材料品名與性質。
部分參考文獻於文章中未引用：建請刪除。	有部份文獻係在表 2 中列入引用，可能審查委員沒有注意到，這些文獻沒有出現在內文中。
請於文章中說明圖 4~6 中各 peak 為何成分?	圖中呈現的 Peak 因為沒有標準品，因此無法鑑定其為何物。因此文章中沒有說明。但與已知樟芝中所含的 12 種三萜類比對結果，均不相同。
摘要第 11 行「樟芝的化學成分逐漸增加」，建請明確說明哪一種化學成分。	因為天然物萃取之成分在沒有標準品的比對下，無法鑑定出其為何物，是否修改本句為「樟芝的化學組成分逐漸趨向複雜」。
報告書第 22 頁，” IV 討論” 建請融入結果中敘述並增加” 結論” 一項。	已將報告格式中結果與討論合併，並增加結論一段。
圖 4; 第 13 頁圖 5、圖 6 圖譜，重要的 peak 沒有敘述，建請說明，並強調三萜類的 peak 一般是在多少時間(min)所滯留者，以	滯留時間已增加在表 2 中，而 Peak 的成分為何，煩請參酌前述相似提問之回答。

利閱讀。	
作為牛樟芝培養基質材料的三種形態，在表 1 中稱為小木塊、椴木及仿木塊，但在圖 1 中則稱為小椴木及木塊。在本報告中，仿木塊以外之兩種基質形態常出現不同稱呼，應予統一使用。	用詞已在期末報告中修正及統一。
不同介質接種牛樟芝生長狀況，圖 9 為生長在椴木介質上者，而圖 10 為生長在仿木塊介質上，建議增列生長在小木塊介質上者，且註明樹種。	已在圖說中增加樹種說明。
圖 11 最好加註 A-D 係在牛樟及樟樹木塊介質上觀察到，而 E-F 則在牛樟及相思樹木塊介質上觀察到者。	已在圖說中增加樹種說明。
本報告中所述之 5 種三萜類，可否從既有之文獻上瞭解到其是否具有在保健食品或醫療用途上之指標性成分的特性。	菌絲體中 5 種三萜類經查對文獻，有如下之報告： 去氫齒孔酸殺死神經膠原瘤細胞(U87MG 及 GBM8401) — 陳先進 15 α -乙醯去氫硫色多孔菌酸 選擇性的對三種癌細胞及一種乳癌細胞(MDA-MB-231)有細胞毒性(Yeh <i>et al.</i> 2009) 硫色多孔菌酸 只對乳癌細胞(MDA-MB-231)有細胞毒性(Yeh <i>et al.</i> 2009)
本研究迄目前為止，尚未有發現子實體之形成，宜繼續長期觀察後續的發展。	研究團隊有計畫在現有基礎上大規模重製培養樣本，並長期置放培養。以便觀察子實體的發育歷程。

三、期末報告簡報審查意見回覆表

審查意見	意見回覆
無	