

嘉南藥理大學專題研究計畫  
研究成果報告

計畫編號：CN10324

計畫名稱：牛樟芝與中草藥生物轉化之生技保健食品開發計畫

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：李冠漢

子計畫主持人：

中華民國 104 年 03 月 06 日

# 目 錄

一、研究摘要	-----	2
二、簡介	-----	3
三、研究材料與方法	-----	8
四、研發成果	-----	10
五、參考文獻	-----	11



## 一、 研究摘要

利用微生物的酵素系統對於中草藥萃取物的天然成份進行生物轉化(biotransformation)作用，並配合各式活性分析的篩選平台及化學成份分析，可尋找出具有生物活性的新化合物成份，再應用於開發新穎性的生技保健食品。牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣本土特有種的食藥用真菌，其主要成份為多醣體(polysaccharides)及三萜類(triterpenoids)，先前研究指出牛樟芝子實體或菌絲體萃取物具有廣泛的生理活性，包括保肝、抗氧化、抗發炎、抑制 B 型肝炎病毒、抗腫瘤及導致癌細胞凋亡等功效。本研究藉牛樟芝菌絲體液態深層培養來醱酵中草藥複方的混合性萃取物(由華昌製藥生化科技股份有限公司提供)，乃利用牛樟芝菌絲體的酵素系統對中草藥萃取物的成份進行生物轉化作用，培養的同時加上特定的可增加真菌性二次代謝物合成的誘導劑或促進劑，進而使醱酵產物的三萜類產量提昇，可作為開發生技保健食品的利基。



## 二、簡介

目前牛樟芝的產學界研究可分為：(1)牛樟樹段木子實體培養、(2)菌絲體固態培養及(3)液體深層發酵培養，其中固態培養的缺點在於無法量產，牛樟樹段木子實體培養及菌絲體固態培養生產之牛樟芝子實體及固態菌絲體無法短時間大量生產，以提供萃取三萜類的原料來源，亦無法配合生產大量的多醣體。而液態培養的缺點在於牛樟芝菌絲體液體深層發酵培養雖然可以有效的產生大量的多醣體，但卻無法大量合成具有生理功效的三萜類化合物。有鑑於目前市場上現行培養方法，子實體三萜類與大量多醣體無法兼得的情況下，本實驗室與華昌製藥廠股份有限公司合作提出此創新研究計畫，本計畫之目的將藉著改變培養條件進而改善並提高牛樟芝液態培養發酵中的三萜類含量與種類，同時可生產大量多醣體。對於增進牛樟芝相關保健產品的功效及產能，無疑是往前邁進了一大步。坊間有許多相關的機能性食品或保健食品市場佔有率逐年提升，真菌類的保健食品也漸漸增加，如牛樟芝、桑黃、靈芝及冬蟲夏草等。經由現代的科學研究發現，大部分的藥用真菌富含結構特殊的多醣體及特別的三萜類化合物等成分。真菌性三萜類化合物由研究文獻指出其生理活性具有以下幾種：(1)抗過敏、(2)抗組織胺、(3)抗發炎(anti-inflammation)、(4)抑制肝細胞增殖作用、(5)調節腫瘤的活性、(6)活化神經細胞的再生能力、(7)清除自由基及(8)具有降低血壓的特性。因此，這些食藥用真菌具有很好的發展潛能，已成為新產品開發之寶庫，研究的地位也快速提升。其中目前又以價格昂貴的台灣特有種食藥用真菌牛樟芝最受矚目，故冀望可更進一步利用牛樟芝液體深層發酵培養生產富含多醣體及三萜類之原料，用以開發成更具商業價值之機能性保健產品。

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)在民間有樟菇、牛樟菇或紅樟菇等名稱，為台灣特有種的藥用真菌，只寄生於牛樟樹(*Cinnamomum kanehirai*)



的腐朽樹幹的中空內壁上(1)。牛樟芝在分類學的地位是屬於真菌界(*Fungi*)、擔子菌門(*Basidiomycota*)、擔子菌亞門(*Basidiomycotina*)、同擔子菌綱(*Homobasidiomycetes*)、無褶菌目(*Aphyllphorales*)、多孔菌科(*Polyporaceae*)、薄孔菌屬(*Antrodia*)。牛樟芝在台灣民間的認知上具有解宿醉、解毒、治療腹痛，甚至可改善癌症及其他慢性病等功能。先前的研究指出牛樟芝菌絲體或子實體萃取物具有很廣泛的生理作用，包括保護肝臟(5)、抗氧化(3, 4)、抗發炎(6, 7)、抗 B 型肝炎病毒(2)、抑制腫瘤(9)以及導致癌細胞產生細胞凋亡(8, 10, 11, 12, 13, 14)等功效。

牛樟芝的生理活性成分包括有多醣體(polysaccharides)、三萜類(triterpenoids)、腺苷(adenosine)、超氧歧化酵素(superoxide dismutase)、麥角固醇(ergosterol)、維生素 B(vitamin B)、氨基酸(amino acid)、核酸、木質素(lignin)、凝集素(lectin)等。目前已知牛樟芝的主要有效成份為多醣體及三萜類，黃(15)指出，從牛樟芝液態深層發酵液中，可萃取出 14.3% 的多醣體，其組成以葡萄糖、木糖(xylose)和甘露糖(mannose)為主，其分子量大約在 11,000 Dalton 左右，而水萃取物及鹼萃取物中所含之多醣體其分子量則大約在 760,000 Dalton 左右，兩者中皆含有葡萄糖、木糖、半乳糖和醛糖酸等單糖，屬複雜性多醣體。經光譜分析後，證實皆含有具生理功能的  $\beta$ -D-葡聚糖( $\beta$ -D-glucans)。

牛樟芝子實體萃取物的成份分析，經由文獻發表的研究結果發現，牛樟芝二次代謝物大多為倍半萜類(sesquiterpene)、三萜類(triterpenoids)、固醇類(steroids)、酚類(phenyl)及二酚類(biphenyl)等化合物(16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23)。牛樟芝三萜類的研究大都集中在來自於子實體的三萜類，這些從牛樟芝子實體所純化出來的三萜類化合物主要區分為兩大類型，分別為 ergostane 型三萜類(ergostane-type triterpenoids)與 lanostane 型三萜類(lanostane-type triterpenoids)。1991 年楊(16)從牛樟芝子實體發現以 ergostane 為骨架的三種新的三萜類化合物(包



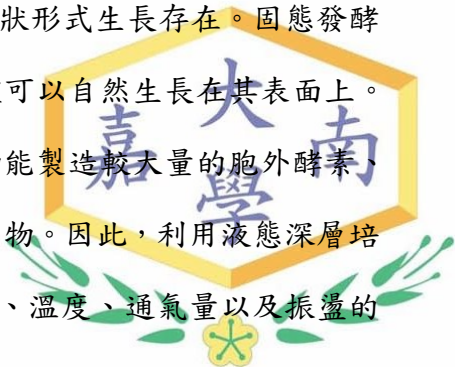
括 zhankuic acid A、zhankuic acid B、zhankuic acid C)；另外從牛樟芝菌絲體發現五種三萜類化合物(包括 zhankuic acid D、zhankuic acid E、15 $\alpha$ -acetyl-dehydro-sulphurenicacid、dehydroeburicoic acid、dehydrosulphurenic acid)。1995 年 Chiang 等人(17)以甲醇萃取牛樟芝子實體，萃取液中發現 sesquiterpene lactone、phenyl 和 diphenyl 類的化合物；1995 年 Cherng 等人(19)在牛樟芝子實體的甲醇萃取液中發現以 ergostone 為骨架的三種新的三萜類化合物(antcin A、antcin B、antcin C)及以 lanostane 為骨架的兩種三萜類化合物；1996 年 Cherng 等人(20)從牛樟芝子實體又發現以 ergostone 為骨架的四種新的三萜類化合物(antcin E、antcin F、methyl antcinates G、methyl antcinates H)；1996 年 Yang 等人(21)從牛樟芝子實體中發現以 ergostone 為骨架的兩種三萜類化合物(zhankuic acid D、zhankuic acid E)和以 lanostane 為骨架的三種三萜類化合物。2003 年 Shen 等人(24)在牛樟芝子實體的萃取物中分離出十六種三萜類化合物，其分別是 3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid、antcin K、dehydroeburicoic acid、eburicoic acid、methyl antcinate B、methyl antcinate H、zhankuic acid A、zhankuic acid B、dehydrosulphurenic acid、sulphurenic acid、15 $\alpha$ -acetyl-dehydrosulphurenic acid, versisponic acid D、zhankuic acid C、versisponic acid D 和 2,2',5,5'-tetramethoxy-3,4,3',4'-bis(methylenedioxy)-6,6'-dimethylbiphenyl、sulphurenic acid。

先前的文獻研究報告指出三萜類化合物普遍存在於植物及果實中，已發現具有一些生理調節功能，包括抗發炎、保護肝臟、止痛、抗微生物、抗黴菌、抑制病毒、免疫調節及滋養頭髮等生理作用；已用來預防及治療肝炎、寄生蟲和原蟲感染、抗腫瘤細胞以及上述的功能作用(25)。三萜類化合物除了上述的生理功能以外，許多文獻報告指出，三萜類化合物還具有具有抗氧化(26)、毒殺癌細胞(27)、抑制脂肪細胞分化(28, 29)、抗 EB 病毒(Epstein-Barr Virus)導致的癌化(30, 31)、降血壓(32)、對抗 HIV(33, 34)



或抑制 5 $\alpha$ -還原酶(35, 36)等生理活性。目前在牛樟芝三萜類化合物之生理活性方面的研究，指出牛樟芝的數種三萜類化合物均具有抗發炎的能力，包括 zhankuic acid、antcin K、antrocaphin A and B、dehydroeburicoic acid、eburicol 以及 ibuproden 等(7, 37)。牛樟芝三萜類化合物中的 zhankuic acid A 及 zhankuic acid C 對於 P388 淋巴癌細胞具有細胞毒殺作用，而 zhankuic acid A 及 zhankuic acid B 具有抗膽鹼作用(anticholinergic)及抗血清素作用(antiserotonergic)的生理活性(38)。至於其他的牛樟芝三萜類化合物成分則因含量較少而沒有進行生理活性分析。

食藥用真菌培養是過去這十幾年發展迅速的醱酵生物技術產業，主要目的是利用液態深層培養發酵技術，可以大量生產用作保健食品的菌絲體或其他具有生理活性的藥用成份。牛樟芝與牛樟樹目前是保育類物種，因此牛樟芝子實體的取得是違法行為，牛樟芝子實體或菌絲體進行人工培養是市場需求所造就的趨勢，牛樟芝的人工培養方法目前主要分成兩種方式即固態培養及液態培養，固態培養是為了獲得類似牛樟芝子實體形狀的菌絲體；而液態培養為深層發酵培養。所謂的菌絲體深層液態培養(mycelial submerged culture)就是將菌絲體培養於液體培養基中，給予足夠的氧氣而振盪培養，使菌絲體大量生長及繁殖，進而積累液態培養基中的有效物質及成份。而選擇一個適當的培養基以滿足菌絲體生長所需是非常重要的，以最適當的培養條件，在短期時間內與有限空間下，得到最高之產量的菌絲體或具功效性的二次代謝物，整個人工培養過程易於控制而不容易污染。食藥用液態真菌深層培養的最大特色在於發酵過程中並不會產生子實體，而產生的是菌絲體，以近似橢圓球狀形式生長存在。固態發酵則是使用固態物質當作生長基楚，使得菌絲體可以自然生長在其表面上。與液態深層發酵相比，使用固態培養，微生物能製造較大量的胞外酵素、胞外多醣體或其他具有生理活性的二次代謝產物。因此，利用液態深層培養以固定成份之液態培養基，在適當的 pH 值、溫度、通氣量以及振盪的



條件下，進行微生物的大量發酵培養，以製造生物質量(biomass)或其他具有生理活性的代謝物(一般有效成份是二次代謝物)，是非常值得推廣應用於保健食品產業。

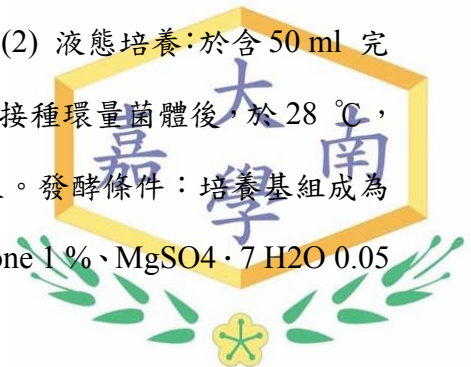




### 三、研究材料與方法

本計畫將以：(1)本實驗室所擁有的牛樟芝菌絲體液態深層培養醱酵技術，搭配由(2)華昌製藥生化科技股份有限公司多年研究成果所提供的中草藥複方之混合性萃取液進行生物轉化作用，培養的同時加上特定的可增加真菌性二次代謝物合成且無毒性的誘導劑(例如：真菌與昆蟲間交互作用的調節劑)或促進劑(例如：二次代謝物相關基因之轉錄增強劑)，在短時間內誘發並增加的三萜類化合物的合成，且生產的三萜類經由本實驗室已建立的生物活性分析篩選平台進行測試，尋找出可能具有生理功效的活性成份。本研究藉著液態培養基的特殊配方，進而生產具功效的三萜類化合物。本計畫將利用牛樟芝菌絲體液態醱酵技術的培養方法在短時間內增加三萜類化合物的產量及種類，爾後經萃取、分離純化的三萜類成份，隨即進行各式的活性評估及化學成份分析，並建立成份分析時的活性指標成份，作為日後牛樟芝菌絲體液態醱酵製程生產之指標化合物，所得富含多醣體及三萜類之整體醱酵產物將運用為生技保健食品之原物料，後續的相關保健產品則由華昌製藥生化科技股份有限公司進行應用開發。

1. 牛樟芝菌株：本研究實驗所使用之牛樟芝菌株包括 BCRC 35396 及 BCRC 35398(購自食品工業發展研究所生物資源保存暨研究中心的牛樟芝標準菌株)等 3 個菌株。
2. 牛樟芝菌株培養：(1) 固態培養：將樟芝菌絲體培養於平面盤中，(培養基組成為 Malt extract 2%、Glucose 2%、Bacto-peptone 0.1%、Agar 2%) 放置於 26°C 恆溫箱中靜置培養 20 至 30 天。(2) 液態培養：於含 50 ml 完全培養基之 250 ml 三角錐形瓶中，接入一接種環量菌體後，於 28 °C，105 rpm 振盪培養槽中，振盪培養 7~10 天。發酵條件：培養基組成為 (Glucose 2%、Malt extract 2%、Bacto-peptone 1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05



%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 %、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 %)，攪拌速度為 105 rpm，溫度 28 °C，pH 值於接菌前調整為 5.5，於迴轉式振盪恆溫箱培養一週。(3) 誘發培養：於液態培養過程中，約培養 3~4 天後，添加植物性或真菌性三萜類成份、牛樟樹幼枝嫩葉萃取物或誘導劑進行共同培養，可以有效提昇牛樟芝菌絲體深層培養發酵液中二次代謝物（三萜類）之產量。

3. 牛樟芝總三萜類萃取及分析方法：(1) 牛樟芝總三萜類萃取方法：參考 Chen 等人(1999) (39)及 Chang 等人(2006) (40)之分析方法。牛樟芝液態深層發酵濾液先以 50%乙醇萃取，再以六層紗布過濾後之濾液，於 45 °C 下烘乾 48 小時，取 1 g 樣品，10 ml 99.5%乙醇萃取 24 小時，減壓濃縮後以 2 ml DMSO 回溶，獲得牛樟芝總三萜類，以進行細胞存活率實驗及三萜類化合物之 HPLC 分析。(2) 牛樟芝總三萜類化合物分析：參考 Chyr 及 Shiao (1991) (41)之分析方法。



#### 四、研發成果

1. 完成建立以牛樟芝液態培養菌絲體醱酵中草藥複方混和性萃取出物之三角瓶最佳醱酵方法及條件。
2. 完成之尋找中草藥複方混和性萃取出物所使用的最佳添加方式、配方與比例。
3. 完成建立以牛樟芝液態培養菌絲體醱酵中草藥複方混和性萃取出物之 5 公升醱酵槽最佳醱酵方法及條件，並完成此計畫之研發技術轉移予華昌製藥廠股份有限公司。
4. 完成牛樟芝菌絲體醱酵中草藥萃取出物後生物轉化產物之 LC/MS 化學成份分析方法。
5. 確立具生物活性之轉化產物與其醱酵培養之最佳生產方法的對應關係。



## 五、參考文獻

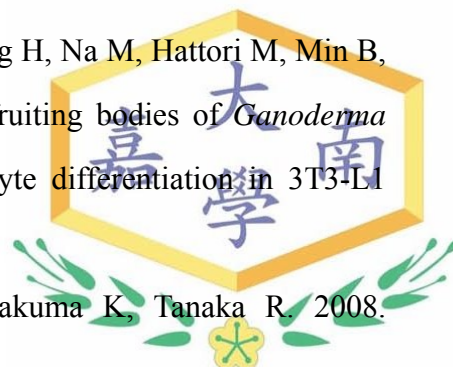
1. Chang TT, Chou WN. 1995. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. Mycol Res. 99: 756-758.
2. Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, Lu MK. 2002. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. FEMS Microbiol Lett. 209 (1): 63-67.
3. Song TY, Yen GC. 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. J Agric Food Chem. 50 (11): 3322-3327.
4. Hseu YC, Chang WC, Hseu YT, Lee CY, Yech YJ, Chen PC, Chen JY, Yang HL. 2002. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. Life Sci. 71 (4): 469-482.
5. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. J Agric Food Chem. 51 (11): 3302-3308.
6. Shen YC, Chou CJ, Wang YH, Chen CF, Chou YC, Lu MK. 2004. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. FEMS Microbiol Lett. 231 (1): 137-143.
7. Shen YC, Wang YH, Chou YC, Chen CF, Lin LC, Chang TT, Tien JH, Chou CJ. 2004. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhanhuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. Planta Med. 70 (4): 310-314.
8. Hseu YC, Yang HL, Lai YC, Lin JG, Chen GW, Chang YH. 2004. Induction of apoptosis by *Antrodia camphorata* in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. Nutr Cancer. 48 (2): 189-197.
9. Liu JJ, Huang TS, Hsu ML, Chen CC, Lin WS, Lu FJ, Chang WH. 2004. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. Toxicol Appl Pharmacol. 201 (2):



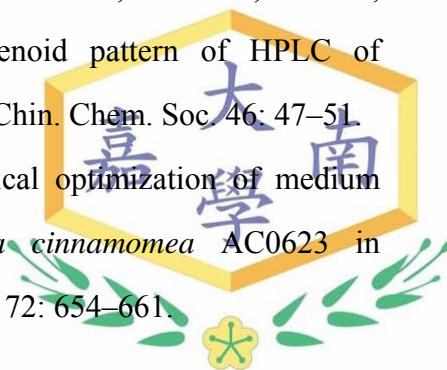
- 186-193.
10. Hsu YL, Kuo YC, Kuo PL, Ng LT, Kuo YH, Lin CC. 2005. Apoptotic effects of extract from *Antrodia camphorata* fruiting bodies in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 221 (1): 77-89.
  11. Song TY, Hsu SL, Yen GC. 2005. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by mycelia of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Ethnopharmacol.* 100 (1-2): 158-167.
  12. Kuo PL, Hsu YL, Cho CY, Ng LT, Kuo YH, Lin CC. 2006. Apoptotic effects of *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract are mediated through calcium and calpain-dependent pathways in Hep 3B cells. *Food Chem Toxicol.* 44:1316-1326.
  13. Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, Hseu TH, Kuo CT, Hseu YC. 2006. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Lett.* 231:215-227.
  14. Hseu YC, Chen SC, Tsai PC, Chen CS, Lu FJ, Chang NW, Yang HL. 2007. Inhibition of cyclooxygenase-2 and induction of apoptosis in estrogen-nonresponsive breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Food Chem Toxicol.* 45:1107-1115.
  15. 黃鈴娟. 2000. 樟芝與姬松茸之抗氧化性質及其多醣組成分析. 中興大學食品科學研究所碩士論文.
  16. 楊書威. 1991. 中藥樟芝活性成分之研究. 台灣大學藥學研究所碩士論文.
  17. Chiang HC, Wu DP, Cherng IH, Ueng CH. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 39: 613-616.
  18. Wu, DP, Chiang HC. 1995. Constituents of *Antrodia cinnamomea*. *Journal of the Chinese Chemical Society.* 42: 797-800.
  19. Cherng IH, Chiang HC, Cheng MC, Wang Y. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *J. Nat. Prod.* 58: 365-371.
  20. Cherng IH, Wu DP, Chiang HC. 1996. Triterpenoides from *Antrodia*



- cinnamomea*. *Phytochemistry* 41: 263-267.
21. Yang SW, Shen YC, Chen CH. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* – A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry* 41: 1389-1392.
22. Young, DS, Chiang HC, Liu LK. 1998. Identification of bioactive components in *Antrodia cinnamomea* by MS/MS via EI ionization. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 45: 123-129.
23. Huang KF, Huang WM, Chiang HC. 2001. Phenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *The Chinese Pharmaceutical Journal*. 53: 327-331.
24. Shen CC, Kuo YC, Huang RL, Lin LC, Don MJ, Chang TT, Chou CJ. 2003. New ergostane and lanostane from *Antrodia camphorata*. *J. Chinese Medicine*. 14: 247-258.
25. Dzubak P, Hajdich M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J. 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23: 394–411.
26. Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GB, Bisen PS. 2009. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol.* 10:717-742.
27. Cheng CR, Yue QX, Wu ZY, Song XY, Tao SJ, Wu XH, Xu PP, Liu X, Guan SH, Guo DA. 2010. Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 71: 1579-1585.
28. Lee I, Kim H, Youn U, Kim J, Min B, Jung H, Na M, Hattori M, Bae K. 2010. Effect of lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Planta Med.* 76: 1558-1563.
29. Lee I, Seo J, Kim J, Kim H, Youn U, Lee J, Jung H, Na M, Hattori M, Min B, Bae K. 2010. Lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on adipocyte differentiation in 3T3-L1 Cells. *J Nat Prod.* 73:172-176.
30. Taji S, Yamada T, Wada S, Tokuda H, Sakuma K, Tanaka R. 2008.



- Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity. *Eur J Med Chem.* 43: 2373-2379.
31. Akihisa T, Uchiyama E, Kikuchi T, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. 2009. Anti-tumor-promoting effects of 25-methoxyporicoic acid A and other triterpene acids from *Poria cocos*. *J Nat Prod.* 72: 1786-1792.
  32. Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 34: 3025-3028.
  33. Akihisa T, Ogihara J, Kato J, Yasukawa K, Ukiya M, Yamanouchi S, Oishi K. 2001. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Lipids.* 36: 507-512.
  34. Xu LJ, Peng ZG, Chen HS, Wang J, Xiao PG. 2010. Bioactive triterpenoids from *Kadsura heteroclita*. *Chem Biodivers.* 7: 2289-2295.
  35. Liu J, Kurashiki K, Shimizu K, Kondo R. 2006. 5 $\alpha$ -reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull.* 29: 392-395.
  36. Liu J, Kurashiki K, Shimizu K, Kondo R. 2006. Structure-activity relationship for inhibition of 5 $\alpha$ -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Bioorg Med Chem.* 14: 8654-8660.
  37. Chen JJ, Lin WJ, Liao CH, Shieh PC. 2007. Anti-inflammatory benzenoids from *Antrodia camphorata*. *J Nat Prod.* 70: 989-992.
  38. Chen CH, Yang SW. 1995. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *J. Nat Prod.* 58:1655-1661.
  39. Chen, DH, Shiou WY, Wang KC, Huang SY, Shie YT, Tsai CM, Shie JF, Chen KD. 1999. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *J. Chin. Chem. Soc.* 46: 47-51.
  40. Chang, CY, Lee CL, Pan TM. 2006. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submergedcultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 654-661.



41. Chyr R, Shiao MS. 1991. Liquid chromatographic characterization of the triterpenoid pattern in *Ganoderma lucidum* and related species. *J chromatography A*. 542: 327-336.
42. Winkler UK, Stuer W, Jaeger KE. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1986; 168: 1070-1074.

