

發明專利說明書

※申請案號：

※申請日期：

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

以樟芝菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法及含彼之組成物

二、申請人：共 人

指定為應受送達人

三、發明人：

◎專利代理人：

四、聲明事項

主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

主張專利法第二十六條微生物：

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存

五、中文發明摘要：

本發明係有關一種 γ -胺基丁酸的製備方法，且特別者，以僅生長於台灣特有物種牛樟樹(*Cinnamomum kanehirae*)樹心內的菇類-樟芝(*Antrodia camphorate*或*Antrodia cinnamomea*)-之菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法，其包括以液體發酵培養法培養樟芝菌絲體，將經分離出且冷凍乾燥之樟芝菌絲體用水性及/或有機溶劑萃取而得含 γ -胺基丁酸之物質。本發明更有關於一種組成物，其包括按上述製備環二肽之方法製備成的含 γ -胺基丁酸物質及醫藥上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。

六、英文發明摘要：

This invention relates to a method for producing γ -aminobutyric acid, and in particular, to a method for producing γ -aminobutyric acid with *Antrodia camphorate* mycelium or *Antrodia cinnamomea* mycelium, a kind of fungi, which grow in inner side of *Cinnamomum kanehirae*, a kind of tree, which is only seen in Taiwan. The method includes cultivating *Antrodia camphorate* mycelium with liquid fermentation culture; isolating and drying *Antrodia camphorate* mycelium; then extracting with aqueous or organic solvent in order to obtain a substance comprising γ -aminobutyric acid. The invention also relates to a material composed of said substance and a medicine or food acceptable adjuvant, diluent or excipient

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

本發明係有關一種 γ -胺基丁酸之製備方法，且特別者，以僅生長於台灣特有物種牛樟樹(Cinnamomum kanehirae)樹心內的菇類-樟芝(*Antrodia camphorata*或*Antrodia cinnamomea*)-之菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法。本發明亦有關於上述製備 γ -胺基丁酸之方法製備成的含 γ -胺基丁酸物質。本發明更有關於一種組成物，其包括按上述製備環二脒之方法製備成的含 γ -胺基丁酸物質及醫藥上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。

先前技術說明

樟芝又名牛樟菇、樟菰、樟窟內菰，台灣有稱陰陽對口菇。樟芝子實體屬多年生，具有強烈沖鼻的樟樹香氣，此與一般靈芝類有很大的差異，其外型呈板狀或鐘狀。板狀型態者，面為橘紅(黃)色，整面全有菌孔，板底層有淺黃白色的木栓質，藉此木栓質附著在牛樟樹中空心材內壁上生長。鐘狀型態者，子實層(鐘面)亦呈橘(黃)色，充滿菌孔(4~5個菌孔/毫米)，內有孢子味極苦，新鮮時為橘紅色，之後會成為橘褐色或褐色，鐘體則呈暗綠褐色的皮殼。以顯微鏡觀察其擔孢子，其型態為平滑無色之透明微彎柱形。

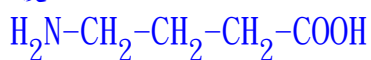
樟芝目前已經可以用發酵法大量生產其菌絲體。在樟芝菌絲體之發酵過程中發現亦有此類 γ -胺基丁酸類物質產生。根據此項發現，乃提出一種以樟芝菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法。

圖式之簡略說明

圖一為顯示出樟芝菌絲體發酵培養時間與 γ -胺基丁酸產量的關係之圖解。

綜上所述，本發明提出一種以樟芝菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法，其包括以液體發酵培養法培養樟芝菌絲體，將經分離出且冷凍乾燥之樟芝菌絲體用水性及/或有機溶劑萃取而得含 γ -胺基丁酸物質。

γ -胺基丁酸(GABA)是由穀胺酸經由穀胺酸脫羧酶催化脫羧基化而成之非蛋白質構成性胺基酸。



γ -胺基丁酸除了具有降血壓之功效外，還具備控制胰臟。腸胃道和腎臟髓質等部份的內皮細胞激素分泌之功效。

於本發明以樟芝菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法一具體實例中所用的樟芝菌株為購自新竹食品工業發展研究所菌種中心的*Antrodia camphorata* CCRC 35398，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar (PDA))(購自美國Difco公司)斜面培養基培養及保存。

此菌絲體之大量培養係利用液態深層培養方法連續培養，離心採收並乾燥而得。培養條件可為例如溫度為30°C，接種之菌數為培養基含量之1.0%，連續培養七天。培養基可為，例如，具有下面的組成者：每公升去離子水中含有蔗糖：20克； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:3克； MgSO_4 :3克； RH_2PO_4 :3

克；檸檬酸：0.5克；酵母萃取物：5克；培養液之pH值調整在5.5。

要從菌絲體萃取出所欲物質可為技藝中已知者，例如在陳彥霖，”科學與技術”第32卷，第12期，(2000)中所述者從紅麴萃取者，其中發現只有用水萃取才有效果。

將此乾燥菌絲體用水性溶劑例如水，鹼性水溶液或水和極性有機溶劑的混合物，其中該極性有機溶劑可為醇類例如甲醇，乙醇，異丙醇，等，或用有機溶劑例如甲醇、氯仿、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、丁醇等予以萃取，視需要在回流條件下進行，並離心收集萃取液。將菌絲體與液體分開之方法可採用習知技術，例如離心，過濾，沉著(settling)，傾析

(decantation)，等。於本發明一較佳實施例中，係採用離心法，使用習用的離心機，例如歐式離心脫水機，如可得自瑞典ALFALAVAL公司之Decater NX418 S；以3200 rpm(4000xg)離心即分離出菌絲體和澄清液。

將上述包括萃取和分離的諸步驟重複數次後，將合併萃取液濃縮即得含 γ -胺基丁酸物質。

本發明製備 γ -胺基丁酸之方法可視情況更包括將此含 γ -胺基丁酸物質進一步純化，例如以層析術如離子交換層析術或氧化矽管柱層析術分離所欲成分，及以胺基酸自動分析儀鑑定及定量該化合物。

本發明亦提出一種按上述製備 γ -胺基丁酸之方法製備成的含 γ -胺基丁酸物質。

本發明更提出一種組成物，其包括按上述製備環二脒之方法製備成的含 γ -胺基丁酸物質及醫藥上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。

本發明要以下面的實施例予以示範闡明，但本發明不受彼等實施例所限制。

實施例1：樟芝菌絲體菌絲體之培養

1. 生產菌株

樟芝(*Antrodia camphorata*) CCRC35398購自新竹食品工業發展研究所菌種中心，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂(potato dextrose agar(PDA))(購自美國Difco公司)斜面培養基培養及保存。

2. 菌絲體之培養

利用液態深層培養方法連續培養七天，溫度為30°C，接種之菌數為培養基含量之1.0%，培養基之組成如下：每公升去離子水中含有蔗糖：20克； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:3克； MgSO_4 :3克； RH_2PO_4 :3克；檸檬酸：0.5克；酵母萃取物：5克；培養液之pH值調整在5.5。

實施例2：用水萃取

用水在80°C，萃取1小時，然後分離出萃取液，可重複萃取數次，將萃取液合併冷凍乾燥處理(-40°C, 4小時；40°C, 24小時)。

實施例3： γ -胺基丁酸之鑑定

1. 菌絲體 γ -胺基丁酸之鑑定

取2克經冷凍乾燥之樟芝菌絲體，加入10毫升2%之5-硫酸基柳酸(5-Sulfosalicylic acid)震盪萃取，並以0.45 μm 過濾膜過濾之，再取1毫升濾液以胺基酸自動分析儀分離並與標準品比對鑑定及定量分析。

圖一顯示出樟芝菌絲體發酵培養時間與 γ -胺基丁酸產量的關係。可以看出 γ -胺基丁酸產量隨著發酵培養時間而遞增到第12天才趨緩。

2. 萃取濃縮物 γ -胺基丁酸含量之測定

將所分離出的諸區分物濃縮物溶於10毫升2%之5-硫酸基柳酸中，並以0.45 μm 過濾膜過濾之，再取1毫升濾液案上述胺基酸自動分析儀分析及定量。如圖1中所示者，本發明方法所得含 γ -胺基丁酸物質的 γ -胺基丁酸含量可以高達1870 ppm，比傳統紅麴製得物的250~1000ppm(陳彥霖，上述)遠較為高。

十、申請專利範圍：

1. 一種從樟芝(*Antrodia camphorata*)菌絲體製備 γ -胺基丁酸之方法，其包括以下步驟：步驟一，以液體發酵培養法培養樟芝菌絲體，係於30°C下連續培養七天，接種之菌數為培養基含量之1%，培養基之組成為：每公升去離子水中含有蔗糖20克； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3克； MgSO_4 3克； KH_2PO_4 3克；檸檬酸0.5克；酵母萃取物5克；培養液pH為5.5；步驟二，將培養出之菌絲體離心採收，並乾燥處理；步驟三，經分離出且冷凍乾燥之樟芝菌絲體用水性及/或有機溶劑萃取，並分離萃取液而得含 γ -胺基丁酸之物質。

2. 如申請專利範圍第1項之製備 γ -胺基丁酸之方法，其更包括將該含 γ -胺基丁酸之物質以層析術純化收集。

3. 如申請專利範圍第1項之製備 γ -胺基丁酸之方法，其中所用的水性溶劑為水，鹼性水溶液，或水與極性有機溶劑之混合物。

4. 如申請專利範圍第1項之製備 γ -胺基丁酸之方法，其中所用的有機溶劑為甲醇、氯仿、二氯甲烷、正己烷、丁醇或乙酸乙酯，或彼等之混合物。

十一、圖式：

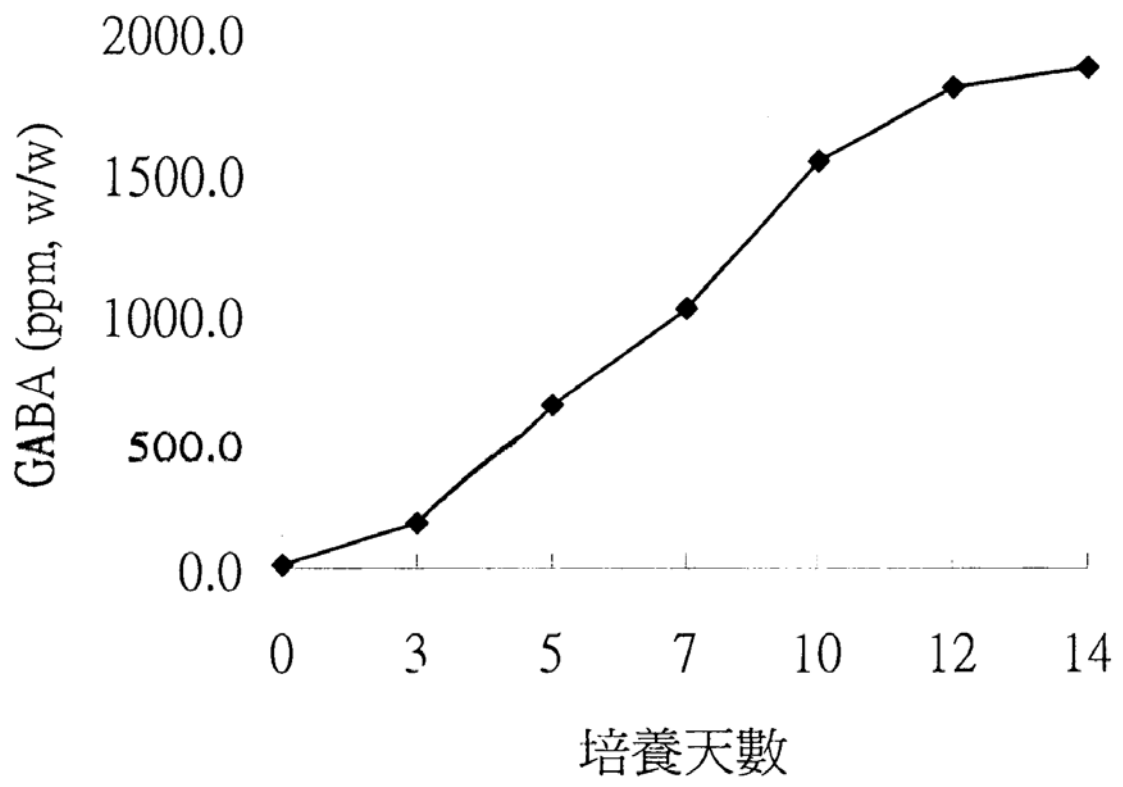


圖 一