

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所



博士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

以紅豆開發富含 γ -胺基丁酸機能性發酵乳之研究

Development of gamma-aminobutyric acid-enriched
functional fermented milk from adzuki beans

宋鴻宜

Hung-Yi Song

指導教授：游若箴 博士

Advisor: Roch-Chui Yu, Ph.D.

中華民國 106 年 1 月

January 2017



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

以紅豆開發富含 γ -胺丁酸機能性發酵乳之研究
Development of gamma-aminobutyric acid-enriched
functional fermented milk from adzuki beans

本論文係宋鴻宜 君 (學號：D92641007) 在國立臺灣大學食品科技研究所完成之博士學位論文，於民國 106 年 1 月 19 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

宋鴻宜 (簽名)
(指導教授)

蔡國珍

江志威

顏聰榮

馮崇良

鄭光成

黃惠宇

呂廷璋

系主任、所長

(簽名)

致 謝



在肩負職業婦女、妻子和母親的多種角色和責任下，終於完成了學位論文，感謝我的老師游若菽教授，一路以來總是用溫暖包容的心體貼指導，不吝於學業及處世上給予建議，讓我有勇氣和耐力持續精進，堅持到最後。論文初稿蒙蔡國珍副校長、潘崇良教授、顏聽榮教授、丘志威特聘教授、黃惠宇教授及鄭光成副教授悉心斧正，受教良多。特別感念先師黃國榮教授在專科時，引領我進入食品微生物的領域，以及謝謝丘志威教授於碩士班求學期間嚴父般的要求以及如沐春風的呵護，開啟我科學研究的視野與邏輯思考的能力；臺灣大學葉安義教授、沈立言教授、潘敏雄教授、宜蘭大學吳柏青校長、陳淑德主任、馮臨惠教授、陳時欣教授、中興大學吳宏達教授、盧訓教授、橘之鄉的枝漫老爹和美芳老師、農糧署陳建斌署長、林傳琦組長及黃怡仁副分署長等許多師長的關心與鼓勵，令我感銘於心。

身為食科所 R204 的資深學姐，謝謝啓豪、怡君、智強、星榜、雅鈞、麗華、小 P、小蒲、國輝等親切可愛的學伴們，陪我走過做實驗的歲月，與大家一同學習，心也變得年輕許多。感謝盈樟學長總是在緊要關頭，如即時雨般帶來甘露，這些關懷是漫長求學生涯中最甜美的點綴，建立的情誼結成豐碩的果實，滋養我的心靈。

在工作、家庭與學業的多方考驗下，感謝外子孟嶽總是給予寬容與支持，悉心分擔家務及照顧孩子的責任，在遇到挫折和困境時，陪伴我度過難關，更謝謝父母從小到大對我無私的付出、栽培與教導，同時將此論文獻予舍妹鴻欣，妳的離開留給全家最不捨的思念，不論何時何地，家人永遠是我最大的依靠。

時值初春，乍暖還寒，完成了人生中重要的學習與試鍊，如同草木即將綻出新芽，並帶著滿滿的能量迎向陽光。「為學日精、為道日損」~未來我將帶著謙卑、堅毅的態度，以及在臺大學習的點點滴滴，繼續秉持對工作的熱忱與使命感，面對更多新的開始及挑戰。

中文摘要



γ -胺基丁酸(GABA)是一種廣泛分佈於自然界的非蛋白質胺基酸，為中樞神經系統最主要的神經傳導抑制劑，並具有多種生理功能。天然食物中 γ -胺基丁酸含量很低，利用微生物開發富含 GABA 之機能性食品具消費市場潛力。本研究以產自屏東縣萬丹鄉之高雄 8 號國產紅豆(*Vigna angularis*)為原料，評估不同前處理條件對提高紅豆中 γ -胺基丁酸含量之影響，進一步以不同益生菌接種於紅豆乳中，篩選最適生產 GABA 之益生菌株，並調整培養基最適化條件，以開發兼具益生菌及 GABA 雙重功效之機能性紅豆發酵乳。研究結果顯示，生鮮紅豆中的 GABA 含量為 6.81 mg/100g DW，經 37°C 下浸泡 8 小時後，GABA 含量增加至 90.21 mg/100g DW，比未經處理的紅豆提高 13 倍，總酚含量由 14.85 mg GAE/g DW 增加至 18.04 mg GAE/g DW，惟浸泡處理不利於花青素穩定作用致花青素含量降低；將紅豆於 37°C 浸泡 8 小時後，再經 -20°C 低溫冷凍 48 小時再於室溫解凍 24 小時，GABA 含量較浸泡處理後高出 70%，花青素含量及總酚含量卻減少 47% 及 51%，顯示浸泡後再經冷凍、解凍提高 GABA 含量效果有限。將紅豆添加 5 倍水於 37°C 浸泡 8 小時後磨漿，添加 5% 脫脂奶粉製成紅豆乳，接種 *Lactobacillus rhamnosus* GG 發酵 36 小時，GABA 含量從 0.05 mg/mL 增加到 0.44 mg/mL，達到最高值，花青素含量比未發酵前增加 2.88 倍，總酚含量提高約 40%；運用反應曲面法分析接種 *Lb. rhamnosus* GG 之紅豆乳最適培養條件，結果顯示紅豆乳基質中添加半乳糖、麩胺酸鈉和吡哆醇均會提高 GABA 產量，其分別可使 GABA 產量增加 23~38%、24~68% 及 8~36%。紅豆乳接種 *Lb. rhamnosus* GG 生產 GABA 之最適培養條件為添加半乳糖 1.44%，麩胺酸鈉 2.27% 和吡哆醇 0.20%，在最佳培養條件下，發酵紅豆乳中 GABA 的生成量為 1.12 mg/ml，比未發酵前增加了 22.4 倍，經感官品評試驗，調整發酵紅豆乳糖酸比為 16，在甜度、酸度及整體接受度上均具較高的品評分數，製成之紅豆發酵乳於 4°C 儲存 15 天 GABA 含量可維持 1.26 mg/mL，乳酸菌數為 log 9.42 cfu/ml，產品除可以富含 γ -胺基丁酸為訴求外，並兼具菌生菌功效，可作為消費者每日補充 GABA 的食物來源。

關鍵字： γ -胺基丁酸、*Lactobacillus rhamnosus* GG、紅豆、反應曲面法

Abstract



Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid widely distributed in nature, and is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous which provides several physiological functions. Development of functional foods rich in GABA through microbial fermentation has a potential in the consumer market. This study was used the domestic adzuki beans (*Vigna angularis*) variety Kaohsiung No.8 that produced from Wandan Township as the material to evaluate the effect of different pretreatment conditions on the GABA accumulation, and further inoculate different probiotics in the adzuki bean milk to select the suitable probiotic strain for GABA production. This study also adjusts the optimum conditions for the culture media and develops functional fermented adzuki bean milk that carries both the GABA and probiotics. The GABA content in raw adzuki beans was 6.81 mg/100g DW. After soaking at 37°C for 8 hours, the GABA content in the adzuki beans increased to 90.21 mg/100g DW, which was 13-fold higher than non-treated adzuki beans. The total phenolic acid content was increased from 14.85mg GAE/g DW to 18.04mg GAE/g DW, the soaking treatment was not favorable to stabilization of the anthocyanins that the content of anthocyanins was decreased. The GABA content of adzuki bean freezing at -20°C for 48 hours and thawing at room temperature for 48 hours after soaking at 37°C for 8 hours was increased 70% higher than that of un-freezing beans. The anthocyanin and total phenolic content of adzuki beans after freezing and thawing treatment was decreased 47% and 51% respectively, which indicated that the effect of freezing and unfreezing treatment after soaking treatment on raising the content of GABA was limited. The adzuki beans was added 5 folds water and soaked at 37°C for 8 hours, homogenized into thick liquid and added 5% skimmed milk powder to make adzuki bean milk. Adzuki bean milk inoculated with *Lactobacillus rhamnosus* GG increased GABA content from 0.05 mg/mL to 0.44 mg/mL after 36 hours of fermentation, which showed the greatest elevation in this study. The anthocyanin content was increased 2.88-fold and the total phenolic content was increased 40% than un-fermented adzuki bean milk. Further, the optimal cultural condition to adzuki bean milk inoculated with *Lb. rhamnosus* GG to improve the GABA content by response surface methodology (RSM). The results showed that GABA content was dependent on the addition of galactose, monosodium glutamate and pyridoxine with

which the increasing ratios of GABA was 23~38%, 24~68%, and 8~36%, respectively. The optimal culture condition for GABA production of adzuki bean milk was addition of galactose 1.44%, monosodium glutamate 2.27%, and pyridoxine 0.20%. Under the optimal cultural condition, the GABA content of fermented adzuki bean milk was 1.12 mg/ml, increased 22.4 folds higher than that of the unfermented adzuki bean milk. The acid-sugar ratio of fermented adzuki bean milk was adjusted to 16 by sensory evaluation had higher score on sweetness, acidity and overall acceptance of the fermented adzuki bean milk. After 15 days of storage at 4°C, the GABA content of fermented adzuki bean milk was remained 1.26 mg/ml and the lactic acid bacteria number was maintained at log 9.42 cfu/ml. The fermented adzuki bean milk was contained both in GABA and probiotic that suitable for consumers as a daily supplement as suggested.

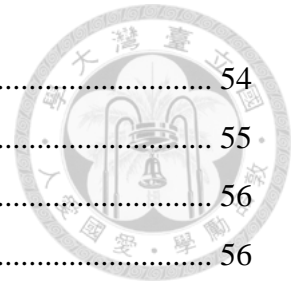
Keywords:

Gamma-aminobutyric acid (GABA), *Lactobacillus rhamnosus* GG, adzuki beans, response surface methodology(RSM)

目 錄



致謝.....	II
中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	IX
第一章 文獻回顧.....	1
壹、紅豆.....	1
一、紅豆簡介.....	1
二、紅豆營養成份與機能性.....	3
三、紅豆加工及應用.....	8
貳、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid).....	9
一、 γ -氨基丁酸性質.....	9
二、 γ -氨基丁酸代謝.....	9
三、 γ -氨基丁酸機能性.....	9
四、提高天然食物中 γ -氨基丁酸之方法.....	16
參、益生菌.....	23
一、益生菌之定義.....	23
二、益生菌的特性.....	23
三、益生菌的功能.....	25
四、益生菌之應用.....	28
參考文獻.....	33
第二章 加工前處理條件對紅豆中 γ -氨基丁酸含量之影響.....	45
壹、前言.....	45
貳、材料與方法.....	47
一、實驗架構.....	47
二、實驗材料.....	47
三、實驗方法.....	49
參、結果與討論.....	54



一、 浸泡條件對紅豆水分含量之影響.....	54
二、 浸泡條件對紅豆生菌數之影響.....	55
三、 浸泡條件對紅豆浸泡液 pH 值之影響.....	56
四、 浸泡條件對紅豆花青素含量之影響.....	56
五、 浸泡條件對紅豆總酚含量之影響.....	57
六、 浸泡條件對紅豆 GABA 含量及 GAD 活性之影響.....	58
七、 冷凍解凍對紅豆花青素含量之影響.....	60
八、 冷凍解凍對紅豆總酚含量之影響.....	61
九、 冷凍解凍對紅豆 GABA 含量及 GAD 活性之影響.....	62
十、 紅豆組成分分析.....	64
肆、 結論.....	65
參考文獻.....	81
第三章 益生菌對紅豆發酵乳 γ-胺基丁酸之影響.....	86
壹、 前言.....	86
貳、 材料與方法.....	88
一、 實驗架構.....	88
二、 實驗材料.....	88
三、 實驗方法.....	90
參、 結果與討論.....	95
一、 篩選最適生產含 GABA 紅豆發酵乳之益生菌株.....	95
二、 生產高含量 γ -胺基丁酸之紅豆發酵乳基質配方調整.....	99
三、 發酵紅豆乳官能品評.....	104
四、 發酵紅豆乳儲存試驗.....	105
肆、 結論.....	107
第四章 綜合結論.....	109
參考文獻.....	136
附錄：Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk. (The article has been accepted for published in J Food Drug Anal .).....	141

圖目錄



圖 1.1. γ - 胺基丁酸代謝路徑及與其他新陳代謝路徑之關係.....	10
圖 1.2. 益生菌消費和健康益處.....	25
圖 2.1. 胺基酸 PITC 衍生反應圖.....	71
圖 2.2. 實驗架構.....	72
圖 2.3. 浸泡溫度及時間對紅豆水分含量之影響.....	73
圖 2.4. 浸泡溫度及時間對紅豆生菌數含量之影響.....	74
圖 2.5. 紅豆於不同溫度浸泡之浸泡液 pH 值變化.....	75
圖 2.6. 浸泡溫度及時間對紅豆花青素含量之影響.....	76
圖 2.7. 浸泡溫度及時間對紅豆總酚含量之影響.....	77
圖 2.8. 冷凍及解凍處理對紅豆花青素含量之影響.....	78
圖 2.9. 冷凍及解凍處理對紅豆總酚含量之影響.....	79
圖 2.10. 冷凍及解凍處理對紅豆麩胺酸脫羧酶活性之影響.....	80
圖 3.1. 實驗架構 I	125
圖 3.2. 實驗架構 II	126
圖 3.3. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳 pH 值之影響.....	127
圖 3.4. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳可滴定酸度之影響.....	128
圖 3.5. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳益生菌數之影響.....	129
圖 3.6. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳花青素含量之影響.....	130
圖 3.7. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳總酚含量之影響.....	131
圖 3.8. 發酵紅豆乳 GABA 生成量之反應曲面圖.....	132
圖 3.9. 不同糖酸比之發酵紅豆乳感官品評值.....	133
圖 3.10. 紅豆發酵乳儲存期間 pH 值、可滴定酸度及益生菌數之變化.....	134
圖 3.11. 紅豆發酵乳儲存期間 GABA 及 GAD 活性之變化.....	135

表目錄



表 1.1. 於 2011~2015 年國內紅豆生產面積、產量及價格.....	2
表 1.2. 紅豆之主要營養成份.....	4
表 1.3. 紅豆粗萃取物之個別多酚化合物含量.....	6
表 1.4. GABA 在動物及人體試驗的生理功能.....	12
表 1.5. 植物中 GABA 累積之壓力相關動力學.....	17
表 1.6. 不同種子在經過 0-4 天發芽後 GABA 的含量.....	19
表 1.7. 益生菌定義的演變.....	24
表 1.8. 商業應用之益生菌株.....	31
表 1.9. 不同益生菌生產 GABA 的應用.....	32
表 2.1. 用於高壓液相層析法及毛細管電泳分析之主要胺基酸衍生劑.....	66
表 2.2. 浸泡溫度及時間對紅豆 GABA 含量之影響.....	67
表 2.3. 浸泡溫度及時間對紅豆麩胺酸脫羧酶活性之影響.....	68
表 2.4. 冷凍及解凍處理對紅豆 GABA 含量之影響.....	69
表 2.5. 紅豆組成分分析.....	70
表 3.1. 全球市場中可見之益生菌乳製品案例.....	111
表 3.2. 三變數-三階層反應曲面設計之操作條件變數及階層.....	112
表 3.3. 紅豆乳基質配方三因子三階層之中心旋轉組合設計.....	113
表 3.4. 發酵紅豆乳喜好性品評表.....	114
表 3.5. 紅豆乳接種不同益生菌株對 GABA 含量之影響.....	116
表 3.6. 紅豆乳接種不同益生菌株對 GAD 活性之影響.....	117
表 3.7. 碳源對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響.....	118
表 3.8. 氮源對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響.....	129

表 3.9. 分別添加吡哆醇、硫酸鎂及氯化鈣對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響.....	120
表 3.10. 依反應曲面法設計之紅豆乳發酵後之 GABA 含量.....	121
表 3.11. 反應曲面法設計之發酵紅豆乳 GABA 含量之變方分析.....	122
表 3.12. 各因子對依反應曲面法設計之條件下紅豆乳 GABA 含量之顯著性分 析.....	123
表 3.13. 紅豆發酵乳與市售發酵乳基本性質.....	124



第一章 文獻回顧

壹、紅豆

一、紅豆簡介

紅豆(學名：*Vigna angularis* 或 *Phaseolus angularis* Wight)為 Leguminosae 科 *Phaseolus* 屬，英文名為 adzuki bean, small bean 或 red bean，古名赤菽，又名小豆、赤小豆，為一年生豆科植物，原產於中國喜馬拉雅山一帶，主要栽培區域於中國大陸、印度、朝鮮半島、日本及台灣等東亞地區；而歐美地區栽培甚少(周與吳，2003)。臺灣地區種植紅豆早期多分佈在山地零星栽培，民國 50 年前後在屏東縣利用稻田秋冬裡作試栽成功後，才發展為經濟性作物(陳，2009)。根據行政院農業委員會統計(行政院農業委員會，2016a)，全臺近五年紅豆平均種植面積約 6,034 公頃，平均產量約每公頃 1,956 公斤，平均每年總產量約 11,718 公噸，每公斤約 65.23 元(表 1.1.)。近五年平均每年進口紅豆約 2,923 公噸，每公斤約 33.58 元(財政部關務署，2015)，進口紅豆雖然價格低，但品質差，加工應用性不佳。

紅豆為短日照植物，亞熱帶地區可行秋冬裡作栽培，生育期雖短，但莢果成熟較為整齊一致，產量及品質均較春夏栽培者為佳，因此國內紅豆栽培以秋冬裡作為主，在 9 月下旬至 10 月上旬期間種植，約 3 個月左右在 12 月下旬起即可開始採收，經曬乾及包裝後，其供應期集中於 1 月至 3 月(黃，2003)；國產紅豆主要產區為屏東縣(萬丹鄉、屏東市)約占全國種植面積 75%，高雄市(大寮區、美濃)約占全國種植面積 24.8%，雲嘉南及其他地區僅占約 0.2%(羅，2016)，由於氣候適宜，排水良好，生產的紅豆皮薄、豆粒飽滿有光澤、易熟，品質佳、風味獨特，煮起來鬆軟，口感非常好，其用途以加工製餡為主，約占總產量之百分 50%，鮮食居次，約占總產量之 20%，少部份製成紅豆餡外銷，年產值約 7 億元以上(行政院農業委員會，2016b)。

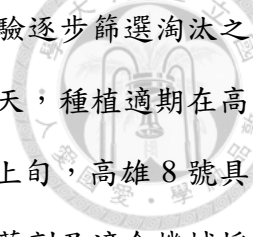
行政院農業委員會高雄區農業改良場自民國 57 年從事紅豆品種改良工作，先後育成了 9 個優良的非基因改造之紅豆品種，國內栽種以高雄 8 號及高雄 9 號為

表 1.1. 於 2011~2015 年國內紅豆生產面積、產量及價格

Table 1.1. Planted area, production and price of domestic adzuki bean during 2011~2015

年度	種植面積 (公頃)	產量 (公斤/公頃)	國內總產量 (公噸/年)	價格 (元/公斤)
100	5,601	2,053	11,498	70.06
101	6,904	1,550	10,698	48.18
102	5,693	2,083	11,858	60.11
103	5,884	2,000	11,769	70.46
104	6,089	2,096	12,765	63.82
5年平均	6,034	1,956	11,718	62.53

(行政院農業委員會，2016a)



主：「高雄 8 號」係於民國 79 年開始進行雜交，歷經各級試驗逐步篩選淘汰之後，於 91 年 1 月 25 日通過審查命名，其生育期約需 82 至 87 天，種植適期在高屏地區為 9 月下旬至 10 月中旬，嘉南地區為 9 月中旬至 10 月上旬，高雄 8 號具有產量高、穩定性佳、種粒鮮紅、種皮薄、硬粒少、不需使用落葉劑及適合機械採收之優良特性，適合省工栽培及加工製餡，其顆粒外觀較高雄 9 號小，但烹調後甜度與香氣足夠，受到加工業者及消費者歡迎(陳與周，2003)。

二、紅豆營養成份與機能性

神農本草綱目中記載紅豆「氣味甘酸、平、無毒，主治下水腫、排癰腫膿血、消渴止瀉、利小便、治熱毒、散惡血、除煩滿、通氣健脾胃、令人美食，甚治腳氣」，明白指出紅豆具有治療水腫、排除膿血、生津、止瀉、利尿、消腫、解毒保健脾胃及治療腳氣病之效果，是醫食同源之保健食品。

由現代營養學角度來看，紅豆富含各種營養成份(表1.2.)，每100 g紅豆熱量約329大卡，鐵含量為7.7 mg(衛生福利部，2015)，遠高於黃豆、綠豆、黑豆等其他豆類，常吃紅豆可補充鐵質、改善貧血，為習知女性補血食品；紅豆亦含有鋅(3.2 mg/100g)，當孩童因缺乏鋅造成食慾不佳時，吃紅豆可幫助開胃及提升食慾，紅豆中的鉀(1,172 mg/100g)具有利尿消腫之功效，維生素B₁(0.43 mg/100g)則有助治療輕微腳氣病。此外，紅豆含有多種胺基酸，在胺基酸組成中，以麩胺酸含量最高(3,728 mg/100g)，而天門冬胺酸(2,469 mg/100g)、白胺酸(1,668 mg/100g)、離胺酸(1,590 mg/100g)及精胺酸(1,541 mg/100g)含量亦十分豐富。

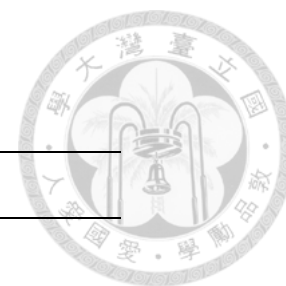
除了豐富的營養成份之外，紅豆具有抗氧化力，在細胞或動物試驗中具有降血壓、降低血清三酸甘油酯濃度、預防白髮及抗紫外線傷害等效果，相關研究結果如下：

(一) 抗氧化作用

研究顯示，紅豆具有極佳的抗氧化活性，不同部位清除 DPPH 自由基(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)的能力亦不相同，全豆約為 77.39 μ mol TE/g，子葉

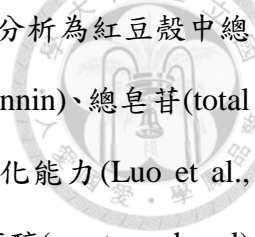
表 1.2. 紅豆之主要營養成份

Table 1.2. The main nutritional components of adzuki beans



營養成份	每 100 公克含量
總碳水化合物	60.8 g
粗脂肪	0.7 g
粗蛋白	21.8 g
水解胺基酸	
天門冬胺酸(Asp)	2469 mg
酥胺酸(Thr)	750 mg
絲胺酸(Ser)	1082 mg
麩胺酸(Glu)	3728 mg
纈胺酸(Val)	1063 mg
異白胺酸(Ile)	884 mg
白胺酸(Leu)	1668 mg
苯丙胺酸(Phe)	1170 mg
離胺酸(Lys)	1590 mg
精胺酸(Arg)	1541 mg
膳食纖維	18.5 g
維生素	
維生素B1	0.43 mg
維生素B2	0.16 mg
菸鹼素	1.99 mg
維生素B6	0.42 mg
維生素C	1.6 mg
礦物質	
鈉	2 mg
鉀	1172 mg
鈣	95 mg
鎂	170 mg
磷	451 mg
鐵	7.7 mg
鋅	3.2 mg

(衛生福利部，2015)



約為 5.49 $\mu\text{mol TE/g}$ ，紅豆殼則可達到 560.4 $\mu\text{mol TE/g}$ ，經分析為紅豆殼中總酚(total phenolics)、總黃酮(total flavonoid)、縮合單寧(condensed tannin)、總皂苷(total saponin)等成分之濃度高於全豆及子葉，而表現出較高的抗氧化能力(Luo et al., 2016)。濃度 0.5 mg/mL 的紅豆熱水萃取物與 0.5 mg/mL α -生育醇(α -tocopherol)具相同程度之抗氧化能力，同時紅豆熱水萃取物在還原力、清除 DPPH 及螯合亞鐵離子的能力亦優於丙酮、甲醇、乙醇萃取物，其抗氧化力作用為含有多酚類化合物所致(Wu et al., 2002)。將紅豆以丙酮萃取後其粗萃物以 HPLC-PAD(High performance Liquid Chromatography with photoiode array detector)區分，再以 HPLC-MS 分析並定義多酚組成，發現兒茶素(catechin)、表兒茶酚葡萄糖苷(epicatechin glucoside)、槲皮素葡萄糖苷(quercetin glucoside)、楊梅黃酮(myricetin)和原花青素二聚體(procyanidin dimers)是紅豆中主要的多酚化合物，兒茶酸(protocatechuic acid)為主要的酚酸(表 1.3.)，顯示上述多酚類物質為造成紅豆具有抗氧化能力(Amarowicz et al., 2008)。學者比較紅豆中多酚化合物對抗氧化力的貢獻，發現紅豆的抗氧化活性與總多酚含量呈顯著正相關，其中清除 DPPH 能力和總多酚含量相關性最高($r = 0.945, P < 0.01$)(Lee et al., 2015)。

(二) 降血壓作用

將紅豆以研磨機破碎後再經80%乙醇萃取、離心、濃縮上清液並凍乾以得到紅豆萃取物，以該紅豆萃取物0.8%餵食自發性高血壓鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)可顯著降低舒張壓以及心臟和腎臟中巨噬細胞的浸潤作用，且餵食紅豆萃取物的SHR其心臟和腎臟中被NADPH刺激的超氧陰離子含量亦減少(Sato et al., 2008)。紅豆醇溶蛋白區分物(prolamin fraction)中的胜肽具有極佳的血管收縮素抑制劑活性(ACE inhibitory activity)($IC_{50} = 0.17 \text{ mg/mL}$)，具有抗血高壓特性而對人體有益(Durak et al., 2013)。攝取含1.0%紅豆種皮的SHR與對照組相比，可降低主動脈血管生成的超氧陰離子(O_2^-)數量及 NADPH氧化酶 p47亞基的 messenger RNA 表現，減輕高血壓症狀發生期間血管氧化壓力和刺激，而達到改善高血壓症狀之

表 1.3. 紅豆粗萃取物之個別多酚化合物含量

Table 1.3. Content of individual phenolic compounds in adzuki bean crude extract

Compounds	Peak/compound*	Content(μ g/g)
Protocatechuic acid	1	67.6 \pm 4.01
Protocatechuic aldehyde	3	7.71 \pm 0.62
<i>trans-p</i> -Coumaric acid	18	31.3 \pm 1.96
<i>trans-p</i> -Coumaroyl malic acid	10	4.57 \pm 0.69
Epicatechin	17	25.7 \pm 2.06
Epigallocatechin gallate	13	0.14 \pm 0.02
Epicatechin glucoside	6	159.0 \pm 8.31
Catechin glucoside	2	688.0 \pm 35.6
Quercetin	29	36.2 \pm 1.54
Quercetin rutinoside	24	38.2 \pm 1.52
Quercetin galactoside	25	46.9 \pm 5.87
Quercetin glucoside	26	181.0 \pm 9.14
Quercetin arabinoglucoside	22	42.8 \pm 4.23
Dihydroquercetin	21	1.15 \pm 0.07
Dihydroquercetin hexose (1)	11	0.54 \pm 0.02
Dihydroquercetin hexose (2)	12	0.48 \pm 0.05
Dihydroquercetin derivative	7	1.35 \pm 0.06
Myricetin rhamnoside	23	212.0 \pm 9.85
Kaempferol rutinoside	27	38.2 \pm 1.52
Tetrahydroxydihydrochalcone glycoside	15	0.55 \pm 0.08
Procyanidin gallate	14	12.4 \pm 1.06
Procyanidin dimer (1)	4	213.0 \pm 13.2
Procyanidin dimer (2)	16	15.9 \pm 1.56
Procyanidin dimer (3)	19	25.3 \pm 1.53
Procyanidin dimer (4)	28	16.0 \pm 0.89
Procyanidin trimer (1)	8	41.8 \pm 1.11
Procyanidin trimer (2)	9	42.4 \pm 1.09

(Amarowicz et al., 2008)



效果(Mukai et al., 2011)。

(三) 降低三酸甘油酯作用

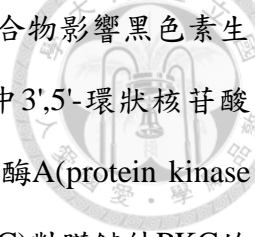
將紅豆加水煮沸得到之紅豆汁，以150 g/day的濃度提供健康女性受試者於經期中飲用，發現飲用紅豆汁的受試者其血液中三酸甘油酯度可降低15.4%~17.9%，體外試驗結果亦發現紅豆汁可抑制胰臟脂解酶(pancreatic lipase activity)活性達29.2%~56.9%，作者推論紅豆降低血中三酸甘油酯的機制與抑制脂解酶活性的表現有關，參照漢方的建議量於經期中飲用紅豆汁對於預防高脂血症有益(Maruyama et al., 2008)。紅豆泥加工副產品紅豆水乾燥後所得萃取物，含有約16%的多酚類，以紅豆水萃取物餵食高脂肪飲食的大鼠，可改善其體內脂質代謝，使肝臟和糞便中脂質累積顯著減少，體外試驗亦顯示，紅豆水萃取物具抑制人體脂肪細胞三酸甘油酯累積、抑制甘油磷酸脫氫酶活性和發炎反應之效果(Kitano-Okada et al., 2012)。

(四) 抑制餐後血糖濃度增加

將紅豆熱水萃取物經過Diaion HP-20管柱層析後之區分物復溶於40%乙醇，於細胞試驗中具抑制小鼠小腸細胞中 α -澱粉酶(α -amylase)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)、麥芽糖酶(maltase)、蔗糖酶(sucrose)及異麥芽糖酶(isomaltose)活性，減少葡萄糖產生之效果，將紅豆乙醇萃取物餵食正常小鼠及誘導糖尿病模式大鼠(STZ-induced diabetic rat)可經由抑制雙糖的作用降低餐後血糖濃度(Itoh et al., 2004)。以鏈脲佐菌素(Streptozotocin)誘導大鼠產生糖尿病，連續28天餵食40公克/公斤的紅豆萃取物，其肝臟中葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose-6 phosphase)的表現顯著低於控制，並激活腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)及絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶(AKT)磷酸化，具有改善葡萄糖耐受性的潛力(Sato et al., 2015)。

(五) 預防白髮及抗紫外線傷害

紅豆熱水萃取區分物可刺激B16-BL6 melanoma之黑色素生成，使黑色素含量增加175%卻不會抑制細胞生長，進一步餵食C3H/HeJ Jcl鼠12週後，其毛色會變



黑，使用色差儀測量b值顯著高於控制組，此為紅豆中之多酚化合物影響黑色素生成所致，作者亦發現紅豆熱水萃取物所含之多酚可增加細胞中3',5'-環狀核苷酸(cyclic adenosine-3',5'-monophosphate, cAMP)的含量及蛋白質激酶A(protein kinase A, PKA)活性，及刺激蛋白質激酶C(cytosolic protein kinase C, PKC)對膜鍵結PKC的移位作用，達到抵抗紫外線傷害之效果(Itoh et al., 2005)。

三、紅豆加工及應用

紅豆是糕餅加工常用的原料，一般可製成豆餡、蜜紅豆、紅豆湯、羊羹及紅豆冰棒，但大多數的紅豆產品仍以加工製餡為主約佔50%，鮮食佔了20%，紅豆冰棒佔15%，其餘約佔15%(黃，2003)。前述加工產品仍屬於傳統食品加工產業，未能有效提高紅豆之商品價值，陳和李(2006)曾以國產紅豆為原料，取代黃豆作為發酵基質，成功生產普林值低且具預防高血壓功效之紅豆納豆產品。2014年業者開發罐裝紅豆水產品，以「吃原貌、吃省時、吃天然」三項訴求，成功打開消費市場，創下年營業額2億元業績，每年使用紅豆近5,000公噸(郭，2014)。目前國內紅豆除鮮食及加工製餡，及將製餡副產品開發為紅豆水外，加工應用性並不廣泛，若能使用生物轉換方法提昇紅豆潛在之機能成份，研發製成保健食品，將有助提高紅豆商品價值及競爭力。



貳、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)

一、 γ -氨基丁酸性質

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, 簡稱 GABA) 分子式為 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 為具有四個碳的非蛋白質胺基酸，在 γ -碳上接有一胺基(amino group)，以游離形式存在於多數原核及真核生物器官中，GABA 分子量為 103.12 g/mole，極易溶於水、不溶於正丁醇及乙酸乙酯，耐高溫(區，2002)，在結構上為可彎曲的分子，於溶液中可呈現多種形態，如類似脯胺酸(proline)的環狀結構，GABA 為同時具有正電荷和負電荷的兩性離子(zwitterionic)，pKa 值為 4.03 及 10.56 (Shelp et al., 1999)。

二、 γ -氨基丁酸代謝

γ -氨基丁酸為檸檬酸循環(Tricarboxylic acid cycle; Krebs cycle)支線之中間產物，當生物體代謝產生 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate)，透過轉胺酶作用形成麩胺酸(glutamate)，再經由一連串酵素作用轉換成琥珀酸(succinate)，此為 γ -氨基丁酸分路(GABA shunt)(圖 1.1.)，此分路的第一個步驟是直接將麩胺酸經由麩胺酸脫羧酶(glutamate decarboxylase，簡稱 GAD；EC 4.1.1.15)進行 α 脫羧作用形成 GABA(Shelp et al., 1999)，而後 GABA 可被 GABA 轉胺酶(GABA transaminase，簡稱 GABA-T；EC2.6.1.19)作用，形成琥珀半醛酸(succinic semialdehyde，簡稱 SSA)，進一步由琥珀半醛酸脫氫酶(succinic semialdehyde dehydrogenase，簡稱 SSADH；EC 1.2.1.16)之不可逆反應催化成 succinate 再回到 Krebs cycle；在 γ -氨基丁酸分路中，麩胺酸脫羧酶是形成 GABA 的主要關鍵酵素(區，2002)。

三、 γ -氨基丁酸機能性

γ -氨基丁酸最早於西元 1950 年自哺乳動物的小腦皮質、脊髓和視網膜之萃取液中發現(Roberts and Frankel, 1950)，為中樞神經系統最主要的神經傳導抑制劑(Wong et al., 2003)，具有神經細胞突觸後抑制作用，可透過突觸後膜過極化(hyperpolarization)、減少離子內流、降低細胞代謝及氧消耗等機制，使突觸後神

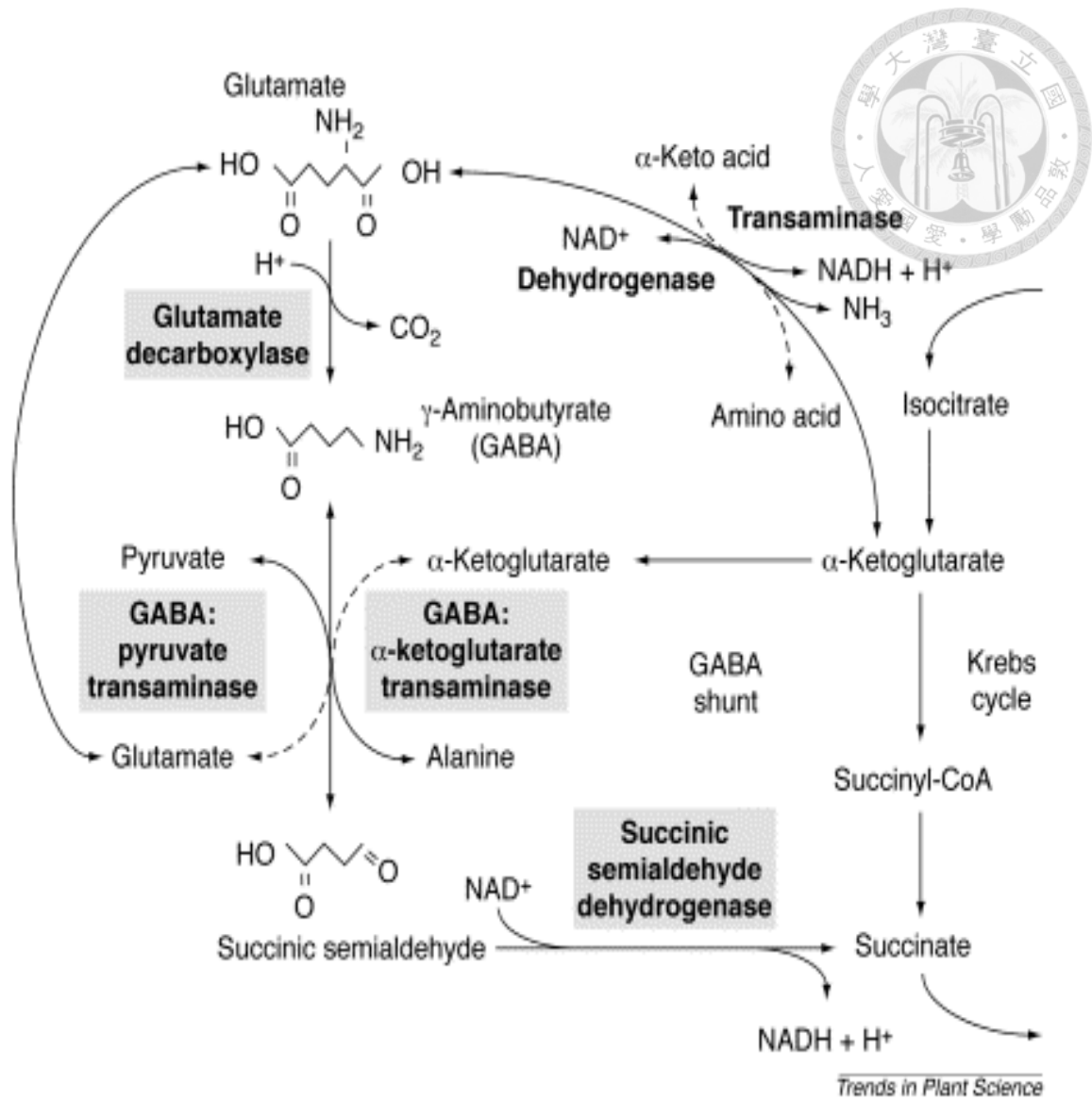
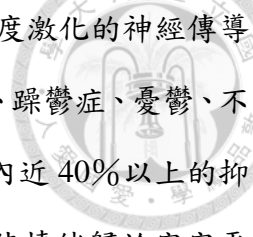


圖 1.1. γ -氨基丁酸代謝路徑及與其他新陳代謝路徑之關係。

Fig 1.1. The gamma-aminobutyric acid shunt and its relationship to other metabolic pathways.

(Shelp et al., 1999)



經元處於保護性抑制狀態(郭等, 2003), 近代醫學研究證實, 過度激化的神經傳導訊息是引起現代人身心不適的主要原因, 造成癲癇、痙攣、抽搐、躁鬱症、憂鬱、不安、失眠、憤怒、焦慮等症狀(區, 2002), GABA 參與了生物體內近 40% 以上的抑制性神經傳導作用, 可舒緩或抑制過度興奮的神經訊息傳導, 使情緒歸於安定平和, GABA 亦被公認為腦中最安全的神經鎮靜劑, 當其含量濃度足夠時, 人的神經系統便可以安定沈穩下來, 若濃度不足, 則會有許多身心不適症產生(區, 2002)。GABA 已知具有多種生理作用(表 1.4.) (Diana et al., 2014), 有關 GABA 機能性之研究成果, 歸納如下:

(一) 降血壓作用

學者早期發現 GABA 具有抑制狗、兔子、豬、貓等動物血壓上升之功效, 補充適量 GABA 可使試驗動物血壓下降 20% (Stanton, 1963); 以 0.5 mg/kg GABA 餵食自發性高血壓鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR), 攝食 GABA 4~8 小時後收縮壓可降低 20.8~22.8 mmHg, GABA 對於 SHR 之降血壓作用可持續 24 小時, 而對於正常血壓之 Wistar-Kyoto 大鼠而言, 攝食 GABA 並不會造成血壓的下降(Hayakawa et al., 2002)。輕度高血壓的成人補充富含 GABA 的白米(GABA 16.8 mg/day), 經過 8 週後, 其晨間測得血壓顯著低於攝食安慰劑的組別, 顯示補充 GABA 有助延遲或預防早發型高血壓(Nishimura et al., 2016); 另高血壓病患每天攝取 3 包佳葉龍茶(約含 18 mg GABA)可有效降低血壓, 不會有不適的症狀, 多數受試者認為飲用佳葉龍茶變得比較不易疲勞且舒適(區, 2002)。

(二) 預防癲癇及老人痴呆症

癲癇的發作與中樞神經傳導物質有密切關係, 研究發現癲癇及罹患帕金森氏症患者腦脊髓液中的 GABA 濃度顯著低於健康成人(Nandhu et al., 2011), 人腦中的 GABA 雖可藉由 GABA shunt 脫羧得到, 但年齡增長或精神壓力增加, 會使腦中 GABA 的累積困難(陳與李, 2006)。飲用富含 GABA 之普洱茶葉能夠降低 FVB/NJNarl 品系小鼠在誘導癲癇模式下對神經細胞 PC12 所造成之氧化壓力傷害,

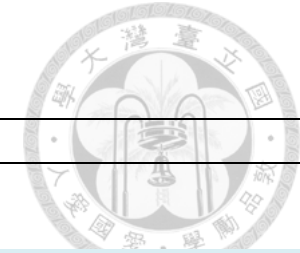


表 1.4. GABA 在動物及人體試驗的生理功能

Table 1.4. Physiological functions of GABA tested on animals and humans

Physiological function	Specific function	Reference
Neurotransmission	Inhibitory neurotransmitter	Battaglioli et al, 2003 DeFeudis, 1981
Blood pressure regulator	Potent hypotensive agent	Abe et al, 1995;Aoki et al,2003;Hayakawa et al, 2004;Inoue et al, 2003;Joye et al, 2011;Kajimoto et al, 2004;Matsubara et al, 2002;Noguchi et al, 2007;Pouliot-Mathieu et al, 2013;Sasaki et al, 2006;Shimada et al, 2009;Tsai et al, 2013;Yamakoshi et al, 2007;Yang et al, 2012;Yoshimura et al, 2010;Wang et al, 2010;Watanabe et al, 2003
Brain diseases	Action on neurological disorders	Okada et al, 2000;Seidl et al, 2001;Wong et al, 2003;Streeter et al, 2007
	Enhances memory	Kayahara and Sugiura, 2001
Psychiatric diseases	Action on mood disorders	Bjork et al, 2001;Krystal et al, 2002
	Relaxing effect	Wong et al., 2003
	Action on sleeplessness	Okada et al., 2000
	Antidepression	Krystal et al, 2002;Okada et al, 2000
	Prevention and treatment of alcoholism	Bjork et al, 2001;Oh et al, 2003a
Vital organs	Action on chronic kidney disease	Sasaki et al, 2006;Sun, 2004
	Activates liver function	Sun, 2004
	Improves visual function	Leventhal et al., 2003
	Increases rate secretion protein in brain	Tujioka et al., 2009
Immune system	Enhances immunity	Abdou et al., 2006

(Cont'd on next page)



表 1.4.(續) GABA 在動物及人體試驗的生理功能

Table 1.4. Physiological functions of GABA tested on animals and humans

Physiological function	Specific function	Reference
Protective against cancer	Delays and/or inhibits cancer cells proliferation	Kleinrok et al, 1998;Minuk, 2000; Opolski et al, 2000
	Stimulatory action on cancer cells apoptosis	Oh and Oh, 2004
	Potent tumour suppressor	Schuller et al., 2008
Cell regulator	Keeps cell volume homeostasis	Warskulat et al., 2004
	Anti-inflammation and fibroblast cell proliferation	Han et al., 2007
	Synthesis of hyaluronic acid	Ito et al., 2007
	Enhances the rate of dermal fibroblasts	Ito et al., 2007
	Quorum sensing signal cell-to-cell	Chevrot et al., 2006
Protector of CVD	Reduces inflammation in rheumatoid arthritis	Kelly and Saravanan, 2008
	Attenuates the metabolic response to ischemic incidence	Abel and McCandless, 1992
	Preventer of obesity	Imam et al., 2014
Respiratory diseases	Control in asthma	Xu and Xia, 1999
	Control on breathing	Kazemi and Hoop, 1991
Hormonal regulator	Increases growth hormone	Tujioka et al., 2009
	Regulation of hormone secretion	Parkash and Kaur, 2007
	Regulation of progesterone	Rapkin, 1999
	Regulation of thyroid hormone	Wiens and Trudeau, 2006
	Potent secretor of insulin	Adeghate et al., 2002
	Preventer of obesity	Xie et al., 2014

(Cont'd from p12) (Diana et al., 2014)

並降低腦部脂質過氧化之形成及腦部細胞凋亡之情況(葉，民 100)。

(三) 放鬆效果

以健康成年人為對象，比較攝取 GABA 對腦波的影響，結果顯示，喝下含 100mg GABA 飲用水的受試組，其腦中 α 波(8Hz~13Hz，代表腦部放鬆狀態)測定值顯著低於對照組，直接證實了 GABA 對人的放鬆效果(Abdou et al., 2006)。受試者食用含 28 毫克 GABA 的巧克力 15 分鐘後，進行算術測試，由心電圖變化及唾液中嗜鉻蛋白 A(chromogranin A，CgA)的濃度變化結果顯示，攝取含 GABA 巧克力具有減輕心理壓力的作用(Nakamura et al., 2009)。動物試驗結果亦顯示，攝食含 GABA 發酵物的老鼠，於浸水壓力試驗中血中 IgG 濃度與對照組相比亦未顯著減少，代表老鼠血液中 IgG 濃度在受到壓力時仍未被抑制，證實攝食 GABA 具抗壓的作用(堀江，2006)。

(四) 改善更年期障礙

臨床試驗發現，患有更年期障礙的病患每天補充 9 公克胚芽米粉末(約含有 26mg GABA)，持續補充 16 週後對於 65% 以上的患者遇到更年期障礙之症狀具緩解效果，同時亦改善因更年期導致的失眠(岡田，2001)。更年期所產生的自律神經失調、情緒障礙或精神焦慮、憂鬱等症狀是由於腦中 GABA 流失或減少造成，透過口服方式補充富含 GABA 的糙米粉，可改善神經傳導抑制作用失調狀況，減少更年期發生之不安、焦慮等症狀(梶本，1998)。

(五) 預防衰老

於年齡 26-32 歲之老年恆河猴(換算人類年齡約為 78-96 歲)腦神經中直接以注射方式施予 GABA，可使老年猴恢復辨別線條、方位和移動體方向的能力，並可讓細胞活性恢復至 7-9 歲青壯期的能力，此效果主要是因為 GABA 可去除腦細胞中的活性氧，調節腦神經細胞機能而達到抗老化的效果(Leventhal et al., 2003)；GABA 能支配腦血管神經，調節腦循環，將 GABA 以腹腔注射方式施予腦缺血所導致血管性痴呆的大鼠，可增加其海馬迴 GABA 受體表達，改善學習記憶功能(丁與艾，2012)。

(六) 促進生長激素分泌

生長激素(growth hormone，GH)是一種胜肽型激素，在人體中發揮骨骼肌生成維持、刺激肌肉和軟骨蛋白合成、利用脂肪酸和幫助細胞內胺基酸攝取等重要功

能，GABA 可以透過干擾與 GH 分泌有關的生長激素（例如：多巴胺），達到促進 GH 分泌的效果，連續 4 天口服補充 3g GABA 可使血漿中 GH 濃度顯著提升 (Powers, 2012)。

（七） 增加免疫系統機能

GABA 對免疫細胞有許多影響，包括可激活或抑制細胞因子分泌，修飾細胞增殖，甚至可以影響細胞的遷移，動物試驗發現口服 GABA 可以調節類風溼性關節炎小鼠的發炎反應(Jin et al., 2013)；由人體壓力負荷實驗結果顯示，有懼高症的受試者在服用 GABA 後走過高度 54 公尺的長吊橋，不論在起始點和一次往返過程中測量其唾液 Ig A 的含量均未減少，而未服用 GABA 的對照組唾液之 Ig A 濃度在走至吊橋中即顯著下降，顯示 GABA 可以抑制面對壓力時免疫系統機能的降低 (Abdou et al., 2006)。

（八） 抗癌作用

研究顯示，GABA 可以延緩或抑制乳腺癌、結腸癌及肝癌等多種癌細胞的侵襲及轉移(Diana et al., 2014)；學者使用老鼠白血病細胞(mouse leukemia L1210 cells)、人類急性淋巴白血病細胞(human acute lymphoblastic leukemia Molt4 cells)及人類子宮頸癌細胞(human cervical cancer HeLa cells)為標的，探討含 GABA 之發芽糙米萃取物對癌細胞增生的影響，發現 GABA 濃度愈高之發芽糙米萃取物降低癌細胞之存活率的效果愈好，顯示 GABA 濃度與癌細胞的存活有顯著負相關(Oh and Oh, 2004)。

（九） 預防慢性酒精中毒傷害

以發芽糙米萃取物與酒精一同餵食 Balb/c 鼠 4 週，其血清及肝臟中高密度脂蛋白膽固醇(high density lipoprotein cholesterol)對總膽固醇(total cholesterol)的濃度顯著高於餵食酒精的對照組，顯示 GABA 可降低酒精吸收及新陳代謝速率，攝食發芽糙米萃取物的 Balb/c 鼠亦可顯著抑制因酒精造成肝臟和血清中 γ -GTP、AST 和 ALT 酵素活性的增加，而達到預防酒精誘導慢性肝臟傷害的效果(Oh et al., 2003)。小鼠連續灌胃富含 GABA 水牛乳的酸奶(GABA 含量 3.6 g/L)7 天後禁食 12 小時，再灌胃酒精濃度 56% 的白酒，與灌胃一般水牛乳及灌胃生理食鹽水的空白對照組相比，其酒精反射消失時間最長，反射恢復時間最短，證明攝取 GABA 具有預防酒精中毒及醒酒的效果(謝等, 2015)。體外試驗也顯示，GABA 與乙醇共存



時，可解除對神經細胞的毒性作用(丁與艾，2012)。

(十) 預防肥胖

給予高脂肪飲食之 C57Bl6/J 鼠，在飼料中添加富含 GABA 之發芽糙米萃取物後，8 週後分析腹部脂肪百分比顯著低於只攝取高脂肪飲食對照組 16%，且血清中三酸甘油酯、總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇(Low density lipoprotein cholesterol)亦明顯降低(Oh et al., 2005)。經高脂肪飲食誘導產生肥胖的小鼠，飲用含 GABA 的水後，可調節甲狀腺及甲狀腺激素的氧化壓力及功能，達到減輕體重並預防肥胖的效果(Xie et al., 2014)。

四、提高天然食物中 γ -胺基丁酸之方法

穀物、蔬菜、水果、菇和海藻等天然食物中均含有 GABA，其中以穀物中米胚芽、大麥芽和大豆芽中含量較高，分別為 389 nmol/g、326 nmol/g 和 302 nmol/g，在蔬菜中以菠菜 GABA 含量最高，有 414 nmol/g，栗子中的 GABA 含量為 188 nmol/g(操等，2008)，經過換算，這些天然食物之 GABA 含量在 0.019~0.042 mg/g 間，以日常攝取量而言，與達到生理功效之需要量相去甚遠。在天然食物中有效強化 GABA 的方法，包括利用外在條件改變對植物組織進行刺激，在麩胺酸脫羧酶(GAD)作用下，代謝麩胺酸生成 GABA，或利用微生物發酵進行生物轉換，分述如下：

(一) 壓力刺激

研究發現，酸化、機械傷害、冷衝擊、缺氧、加熱等壓力條件，均可刺激植物中 GABA 的累積(表 1.5.)，在正常情況下，植物體中 GABA 含量約為 0.03~0.2 μ mol/g，當植物受到壓力刺激時，GABA 含量可提高 1.3~100 倍(Kinnersley and Turano, 2000)。

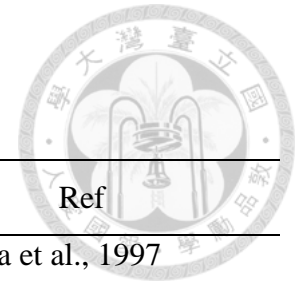
在植物中，pH 調節有助於 GABA 的累積，在適當 pH 值條件下，麩胺酸脫羧酶(GAD)藉由細胞質中氫離子或鈣離子的增加而被活化(Diana et al., 2014)，酸性環境可有助 GABA 的累積，在植物系統中 GAD 活性在 pH 5.8 可達最高(Kinnersley and Turano, 2000)；以丁酸處理蘆筍葉肉細胞，降低細胞質 pH 值，在 15 秒內可使 GABA 含量提高 2~3 倍，若將環境中 pH 值提高，除了使麩胺酸脫羧酶活性下降外，亦有利於 GABA-T(最適 pH 值 8.9)進行轉胺作用而將 GABA 代謝成 SSA(Crawford et al., 1994)。

表 1.5. 植物中 GABA 累積之壓力相關動力學

Table 1.5. Stress-related kinetics of GABA accumulation in plants

Plant	Stress	GABA % of control ^a	Time	Ref
Asparagus cells	Cold (10°C)	200	15 min	Cholewa et al., 1997
Sesame	Heat (50°C)	21	2 h	Bor et al., 2009
Shoots of <i>Arabidopsis thaliana</i>	Salt	1400	4 d	Renault et al., 2010
Foxtail Millet	Salt	141	48 h	Bai et al., 2013
Asparagus cells	Acidosis	300	15 s	Crawford et al., 1994
Wheat	Anoxia	120	2 h	Youn et al., 2011
Rice bran byproduct	Anoxia	1700	5 h	Kim et al., 2015
Soybean	Anoxia, cold (-18°C)	1420	42 h	Yang et al., 2015
Tartary buckwheat	Anoxia	210	2 d	Guo et al., 2016
Soybean leaves	Mechanical damage	1800	1 min	Ramputh and Bown, 1996

^a For each stress the time to reach the greatest reported GABA accumulation relative to unstressed controls has been shown.



植物受到機械刺激時，細胞物質被破壞，使得細胞內鈣離子及氫離子濃度增加，在短時間內刺激麩胺酸脫羧酶活性，並可使 GABA 含量急遽提高 18~27 倍 (Ramputh and Bown, 1996; Wallace et al., 1984)。

低溫環境亦有利於 GABA 的蓄積，天門冬的葉肉細胞在環境溫度由 20°C 下降至 1°C 時，GABA 含量自 2.7 nmol/10⁶ cell 提高至 5.6 nmol/10⁶ cell，增加 2 倍以上 (Cholewa et al., 1997)；大豆浸泡後去除多餘水分，再經過 -4°C、-20°C 及 -32°C 冷凍及 30°C 解凍，其 GABA 含量與完全未處理之對照組相比，可增加 27.3 倍，隨冷凍溫度降低及解凍時間增加，GABA 含量相對提高，乾燥後之 GABA 大豆可用來製備豆奶、醬油、豆腐、豆渣、酸奶等機能性食品 (Kwon et al., 2007)。發芽的大豆種子於 -18°C 冷凍 12 小時，放置於密封的聚乙烯袋，再解凍 6 小時，可使 GABA 含量提高 7.21 倍，冷凍、解凍的過程，加速基質催化作用，而促進 GABA 累積 (Yang et al., 2015)。

缺氧條件下因植物粒線體氧化磷酸化作用減弱，還原電位增高，而使得 SSADH 催化 SSA 的反應減少，利於 GABA 累積 (顧與蔣，2002)，將芥藍菜置於充氮的乙烯袋中 12 小時，GABA 含量可提高約 3 倍 (Hattori et al., 2001)。環境溫度提高有利於 GABA 生成並可加快其生產速率，以佳葉龍茶而言，處理溫度控制在 30~40°C 經 4~6 小時即可使 GABA 達到最高產量，而溫度愈低，其反應時間要拉長才能顯著增加 GABA 的含量 (區，2002)。

植物種子在浸泡過程，環境中水份含量提高，有助活化其細胞質中 Glutamate decarboxylase 活性，提升 GABA 含量 (Shelp et al., 1999)；大豆添加 10 倍水於 10~40°C 浸泡，可提高 GABA 含量，尤其於 40°C 浸泡 8 小時後可使大豆 GABA 含量由 70 μ g/g 提高至 768.1 μ g/g，增加 10 倍以上，若再延長浸泡時間，GABA 含量並不會隨浸泡時間延長呈比例增加 (Kwon et al., 2007)。種子浸泡同時也會啟動種子發芽，經過一連串的生化反應，將大分子分解並經由呼吸作用釋放能量，以進行生長所需的各種代謝，當能量大量被消耗，澱粉、蛋白質、脂質等大分子會被分解，而蛋白質被活化的酵素水解後會產生大量胺基酸，其中包括麩胺酸 (操等，2008)，由於提高了 GABA shunt 基質濃度而促進 GABA 生成。豌豆、扁豆及四季豆經過發芽處理 6 天，可使 GABA 由無提高至 1.04 mg/g、0.32 mg/g、0.44 mg/g，發芽過程中是否避光對於 GABA 的產量未有顯著影響 (Kuo et al., 2004)；不

同品種的扁豆經過發芽 5 天，GABA 含量亦可提高至 2 倍(Rozan et al., 2001)；西瓜子、南瓜子、絲瓜子、葵瓜子、冬瓜子及糙米在經過發芽 0-3 天後，GABA 含量可以提高 2.5~50 倍(表 1.6.)(傅，2005)。

在壓力刺激植物累積 GABA 過程中，適當的添加物有助提高 GABA 產量；添加鈣離子(Ca^{2+})在植物體中可與鈣受體蛋白(Calmodulin, CaM)結合，刺激 CAD 活性而提高 GABA 的含量(Kinnersley and Turano, 2000)，於米胚芽磷酸緩衝液中，添加氯化鈣，當添加之鈣離子濃度與麩胺酸濃度比達到 20 mmol/mol 時，可使 GABA 產量提高 30%(張等，2004)。麩胺酸是合成 GABA 的主要原料，當麩胺酸濃度增加，便提高了 GAD 作用的基質濃度，刺激 GAD 活性，有助於將麩胺酸催化為 GABA(Kinnersley and Turano, 2000)。芥藍菜葉浸泡於含 3% 的麩胺酸水溶液中 4 小時，可使 GABA 增加約 8 倍(Hattori et al., 2001)，小米發芽過程中添加 1.5 mg/mL 麩胺酸、2.5 mM 氯化鈣或 50 μ M Pyridoxal-5-phosphate (PLP)，均可使 GABA 產量顯著提高，以反應曲面法計算，添加 1.2 mg/mL 麩胺酸、50 μ M PLP 及 2.5 mM 氯化鈣，可使 GABA 含量提高至 42.9 mg/100g (Bai et al., 2009)。

(二) 微生物轉換

細菌、酵母和黴菌等微生物均具有生成 GABA 的能力，微生物中 GAD 的活性與 GABA 形成速率及耐酸(H^+)機制有關，微生物轉換 GABA 主要有二條路徑，(1) 在培養基中加入麩胺酸，透過微生物發酵生產 GABA；(2) 透過微生物酵素或細胞轉化麩胺酸生成 GABA(梁等，2013)。學者利用基因工程開發 *Escherichia coli* GADK10 細胞，具有高 GAD 活性，可自麩胺酸中大量生產純度高達 99% 的 GABA，1 公克的乾菌體細胞可製造 23~25 公克的 GABA (Plokhov et al., 2000)。*Aspergillus oryzae* 亦具有高 GAD 活性，於含有麩胺酸的培養基中進行液態培養可之快速生產 GABA，其生產速率為 0.9g/g *Aspergillus mycelium*/hr (Tsuchiya et al., 2002)。利用大腸桿菌生產 GABA 純度雖高，但對於人體食用上有安全性上之疑慮，以 *Aspergillus oryzae* 生產 GABA，必需經過透析分離才能得到純度高之終產品，增加了加工製造上的不便，在食品應用上仍有其限制。為了突破微生物轉換法提高食品 GABA 含量的限制，近期研究透過習用於食品發酵、安全性較高的菌種來提高天然食物中 GABA 含量；大豆接種 *Rhizopus microsporus var. oligosporus* 並在厭氧條件下培養製成天貝(Tempeh)，可提高產品 GABA 含量，與一般傳統發酵製天貝

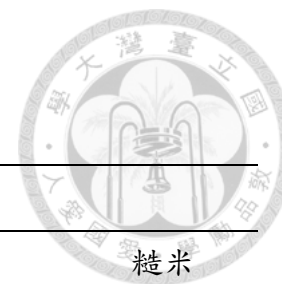


表 1.6. 不同種子在經過 0-4 天發芽後 GABA 的含量

Table 1.6. The GABA content of various seeds after germination 0-4 days

發芽時間 (天)	GABA(mg/100g dry material)							
	西瓜子	南瓜子	絲瓜子	葵瓜子	冬瓜子	橘子籽	檸檬籽	糙米
0	3.2	2.3	0	3.4	0	0	0	6.5
1	56.3	11.2	3.4	18.9	2.3	6.7	3.4	16.7
2	104.0	24.5	4.4	31.2	4.2	22.8	18.3	
3	165.3	34.5	6.5	56.7	5.1	45.6	32.3	

(傅，2005)

相比，其 GABA 含量可增加 3 倍(Aoki et al., 2003)；接種黴菌發酵之豆豉亦含有較高含量的 GABA，約 0.10 mg/g~3.45 mg/g，主要是由於大豆中所含麩胺酸經過微生物發酵作用轉換為 GABA(蔣等，2007)。由於天貝於國內食用並不普及，豆豉於日常生活中食用量少，無法供應適量且足夠 GABA，開發可經常食用之富含 GABA 飲品應較符合消費者需求。

將蕃茄處理物調整糖度為 3~5%接種 *Lb. breves* IFO3345 在 25~42°C 下培養 12~48 小時，可使 GABA 含量提高 3~5 倍，該蕃茄發酵物可作為健康食品直接飲用(Monma and Hayakawa, 2007)。由泡菜中分離出 *Lb. breves* GABA100，接種於添加 2% 麩胺酸的黑覆盆莓果汁中發酵 12~15 天，可使 GABA 含量提高 10 倍以上，達到 18.8~27.6 mg/mL(Kim et al., 2009)。蔬果汁添加 3% 麩胺酸、1% 檸檬酸及 1.5% 酒精，接種 *Enterococcus avium* 於 30°C 發酵 48 小時，可使 GABA 由 33.3 mg/100ml 提高至 1070 mg/100ml (Sugiyama, 2007)。日本的蒸餾酒精飲料中含有許多游離麩胺酸，經過 *Lb. breves* IFO-12005 發酵後可轉換為 GABA (Dhakal et al., 2012)。

近年 GABA 的優點漸被消費市場重視，需求量也大幅提高，全球 GABA 產品每年產量約 6 達萬公噸(梁等，2013)，但各國對 GABA 能否直接添加於食品之規定各不相同。美國食品藥品管理局(Food and Drug Administration, FDA)根據毒理學實驗指出，食品中直接添加 GABA 是安全的，其允許使用範圍包括飲料、咖啡、茶和口香糖等，但不允許添加於嬰兒食品、肉製品或含肉產品；歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)允許在食物中直接添加 GABA，每日攝取上限訂為 550 毫克，但要求業者以人體實驗佐證其宣稱之功能特性；中國大陸衛生部規定，GABA 可添加於飲料、可可、巧克力及其飲料、糖果、焙烤食品和膨化食品，但嬰兒食品中不得添加(梁等，2013)。我國衛生福利部公告「glutathion、citicoline、GABA 及 rutin」皆尚未准許為食品原料或食品添加物，(衛生福利部，2012)，故無法透過在製程中直接添加 GABA 以達到機能性訴求，採用微生物轉換方式應為開發富含 GABA 之機能性食品較適合的方式。

調查發現，益生菌為 1997 至 2007 年間日本醫生針對兒童腸胃炎治療，使用頻率最高的處方製劑，其使用率由 30.6%，增加至 63.3%，相對減少開立抗生素的頻率(Kita et al., 2010)。日本在 1988 至 1998 年間，已開發 1,700 多種益生菌產品，1999 年益生菌產品年營業額約 14 億美元，到了 2003 年增加到 19 億美元，歐

洲市場 2006 年益生菌產品的年營業額約 15 億美元，約佔整個食品消費市場的 1% (陳等, 2016)。預估 2014 年至 2020 年全球益生菌市場年平均複合成長率(Compound annual growth rate, CAGR)將可達 7.4%，至 2020 年時其規模可達 960 億美元，其中食品飲料市場的規模最大，另膳食補充劑及動物飼料亦將有顯著增長，消費者對機能食品飲料的需求不斷增加(食品工業發展研究所, 2016)。以紅豆為原料，經益生菌發酵開發機能性飲品，將有助提高紅豆的利用價值。

參、益生菌



一、 益生菌之定義

益生菌又稱原生保健性菌種(probiotics)，衍生自希臘語，意思是”for life”，目前常見定義如表 1.7.(Chatterjee et al., 2011)，益生菌最早於 1965 年由 Lilly 及 Stillwell 提出，表示某一原生動物產生的可促使另一原生動物生長的物質(Lilly and Stillwell, 1965)，而後 Fuller(1991)將其重新定義為可透過改善宿主腸內菌相平衡，對宿主發揮有益健康作用之活菌補給物，此定義說明益生菌應該為「活的微生物」，1992 年學者將益生菌廣泛定義為凡應用至人類或其他動物，藉由改善腸內微生物相平衡，有益於宿主的活菌，不論是單一或混合菌株均可視為益生菌(Havenaar and Huis, 1992)；Salminen 等人於 1996 年提出另一定義，不限定益生菌一定為活菌，凡是可促進主健康之微生物或該微生物組成份皆可稱作益生菌 (Salminen et al.,1996)；FAO/WHO 於 2001 年對益生菌的定義則明確指出，益生菌為活的微生物，當攝取足夠量時可給予宿主健康的益處。

二、 益生菌的特性

益生菌為一種不可消化的食物成分，經由選擇性刺激腸道有益菌(如雙叉桿菌及乳桿菌等)生長繁殖或促進其代謝功能，達到改善宿主健康的效果(Gupta and Garg, 2009)。並非所有經食物攝入的活微生物都是益生菌，益生菌需具備包括安全性、機能性及技術性等 3 項條件，其中，在安全性方面需考量(一)使用於人體之益生菌應源自於人類；(二)可自健康成年人腸胃道中分離該菌；(三)過去研究中未曾被發現具病原性；(四)不會對膽鹽進行去共軛作用；(五)不具抵抗抗生菌之基因；在機能性方面則需符合下列條件(一)耐酸性並耐人體胃液；(二)耐膽鹽；(三)可附著於腸胃道上皮表面並定殖；(四)具免疫刺激性但不具促發炎影響；(五)對 *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* 及 *Clostridium difficile* 等病原菌具有抗性；(六)進入人體腸道後能對宿主產生有效作用；最後，在加工技術上，益生菌必需(一)具良好的感官性質；(二)抗噬菌體；(三)在加工製程中保持存活和穩定；(四)產品貯存期間具穩定性(Hoerr and Bostwick, 2000;Saarela et al., 2000)。

常使用於益生菌產品之微生物主要分成四大類，包括：(一)產乳酸菌：如乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)、雙叉桿菌屬(*Bifidobacterium*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)；

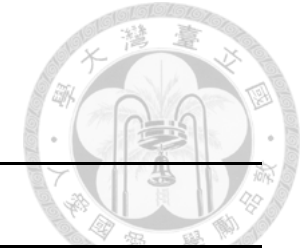


表 1.7. 益生菌定義的演變

Table 1.7. Evolution in definition of probiotics

Greek Mythology	Mythological reference	Meaning "For life"
1907	Elie Matchnikoff	Introduced concept of probiotic in his book on prolongation of life
1953	Kollath	"Probiotics" was first introduced
1965	Lilley and Stilwell	Substances secreted by one micro-organism which stimulates the growth of another and thus was considered as antonym the term antibiotic
1974	Parker	Organisms and substances which contribute to intestinal microbial balance
1991	Fuller	A live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance
1992	Havenaar R	A viable mono- or mixed-culture of microorganisms which applied to animal or man, beneficially affects the host by improving the properties of the indigenous microflora
1996	Salminen	Alive microbial culture or cultured dairy product which beneficially influences the health and nutrition of the host
1996	Chaafsma	Oral probiotics are living micro-organisms which upon ingestion in certain numbers exert health effects beyond inherent basic nutrition
1998	Guarner	Living micro-organisms, which upon ingestion in certain numbers, exert health effects beyond inherent basic nutrition
2001	FAO/WHO	Probiotics are defined as living micro-organisms, principally bacteria, that are safe for human consumption and, when ingested in sufficient quantities, have beneficial effects on human health, beyond basic nutrition
2001	Jurgen Schrezenmeir	A preparation of or a product containing viable, defined micro-organisms in sufficient numbers, which alter the microflora (by implantation or colonization) in a compartment of the host and by that exert beneficial health effects in this host
2003	Reid G.	Viable micro-organisms the confer health benefit when administered insufficient doses

(Chatterjee et al., 2011)



(二) 不產乳酸型菌：如桿菌屬(*Bacillus*)、丙酸桿菌屬(*Propionibacterium*)；(三)非致病性酵母：如酵母菌屬(*Saccharomyces*)；(四)無芽孢或無鞭毛的桿菌或球桿菌(Rad et al., 2012)。

三、 益生菌的功能

自 1908 年 Metchnikoff 提出攝食發酵乳製品可有效增加腸道內有益菌數量，至今益生菌已被證實具有增進人體健康、提高食品營養價值及治療疾病等功效。益生菌消費和健康益處(Tripathi and Giri, 2014)如圖 1.2.，目前廣泛研究之功能如下：

(一)維持腸道菌相之平衡

益生菌生長代謝時所產生之有機酸、過氧化氫及細菌素，可降低腸道 pH 值，抑制病原菌及腐敗菌生長，且有機酸可促進腸道蠕動，移除害菌及減少有害物接觸腸道上皮細胞的時間，維持菌相平衡，益生菌更可與病原菌競爭營養源及吸附定殖位置，以防止致病菌定殖於腸道中(Arunachalam, 1999; Crittenden et al., 2003)。以 *Lactobacillus plantarum* 治療腸躁症病人，4 週後發現腹痛與脹氣情形有所改善，且病人的糞便(84%)與直腸黏膜(34%)發現有 *Lb. plantarum* 存在，益生菌可抑制上皮細胞凋亡(apoptosis)，維持腸道黏膜完整性，減少因腸道通透度增加伴隨而來的異常免疫反應(謝與蕭，2013)。

(二)提高食品營養價值

腸道中的益生菌可合成多種維生素，如維生素 B 群、維生素 K 及葉酸供人體利用(Crittenden et al., 2003)；部分天然發酵食品中分離出的益生菌，包括分離自義大利臘腸中的 *Lb. plantarum* SM 39、分離自日本豆腐中的 *Lb. plantarum* CN-49 和 *Lactobacillus helveticus* CD 6，以及自發酵乳中分離的、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 可透過蝶啶代謝支路(Pterin branches)及對氨基苯甲酸代謝支路(p-aminobenzoate branches)二個路徑來合成葉酸(何等，2015)。大豆經 *Streptococcus thermophilus* ST5、*Lb. helveticus* R0052 或 *Bifidobacterium longum* R017 發酵，可提高維生素 B₁ (thiamine)及維生素 B₆ (pyridoxine)濃度，通常存在於人體腸道中的 *Lactobacillus reuteri* 是第一個可以產生近似標準維生素 B₁₂ (cobalamin)化合物吸收光譜的乳酸菌，具部分滿足人體維生素 B₁₂ 需求的能力(LeBlanc et al., 2013)。此外，雙叉桿菌具有水解蛋白質的能力，會使游離胺基酸含量增加，並提

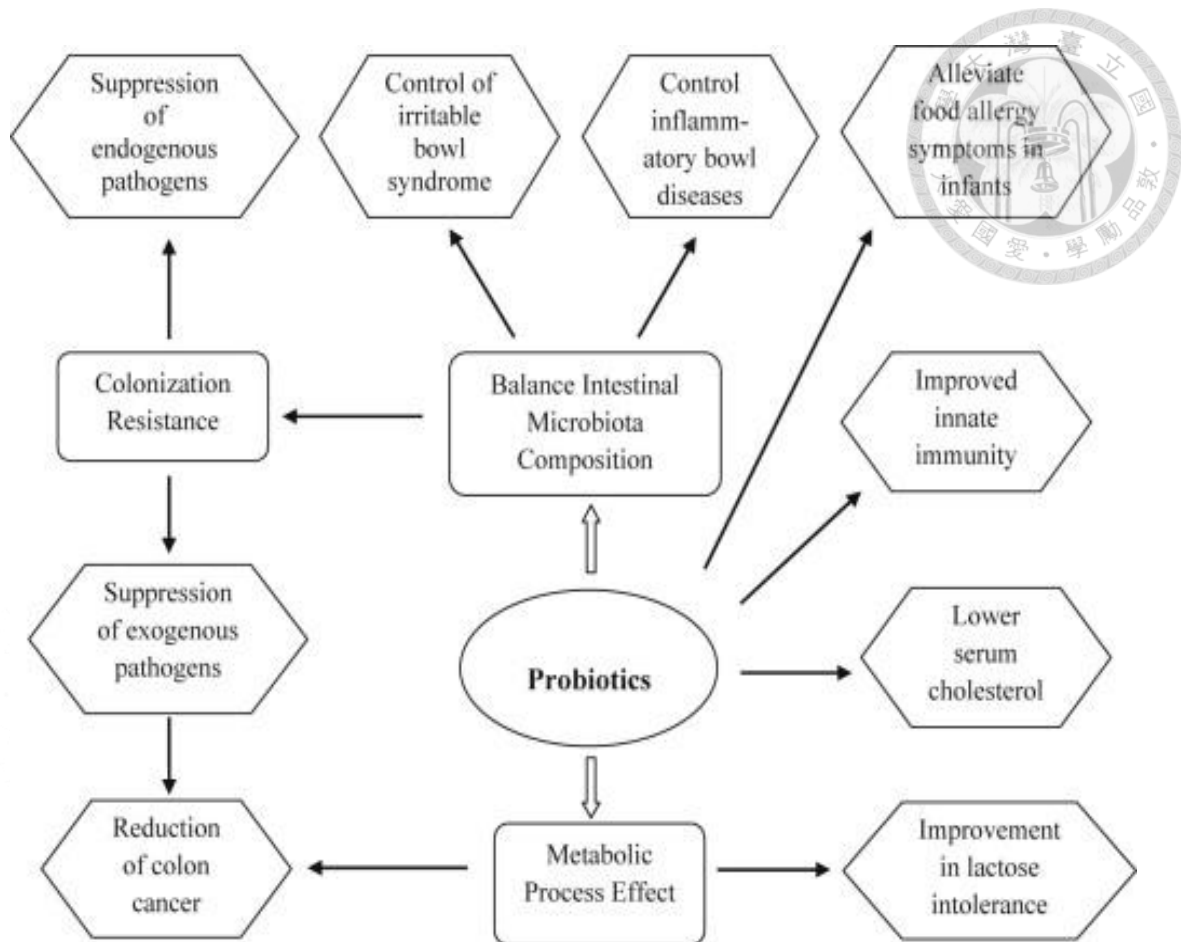


圖 1.2. 攝食益生菌的健康益處。

Fig. 1.2. Probiotics consumption and health benefits.

(Tripathi and Giri, 2014)



高蛋白質消化率，益生菌生長過程所產生之短鏈脂肪酸亦會促進鈣、磷、鐵的吸收利用(Arunachalam, 1999)。

(三)預防腹瀉

由 *Escherichia coli*、*Salmonella*、*Campylobacter*、*Shigella* 等病原菌引起之腹瀉係透過破壞腸道菌相平衡，使病原菌於腸胃道變成優勢菌而造成，補充 *Lactobacillus casei* Shirota 可提高上皮細胞對病原菌的抵抗能力，雙叉桿菌亦可取代病原菌於成為優勢菌，抑制病原菌生長，減少腐敗病代謝物產生，促進宿主健康(Black et al., 1989; Ericsson, 2003; Saavedra et al., 1994)。研究發現，*Saccharomyces boulardii*、*Lb. acidophilus*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. casei* 及 *Bifidobacterium bifidum* 等益生菌，可有效預防因抗生素濫用、菌株毒性增加及缺乏有效控制措施所造成之困難梭狀桿菌相關腹瀉(*Clostridium difficile* associated diarrhea, CDAD)，使用混合菌株的效果更好(易等, 2016)。經分析 26 組臨床研究，計 7,957 名受試者之隨機對照試驗結果顯示，服用益生菌可顯著降低約 60.5% CDAD 發生的風險，益生菌使用於成人、兒童及住院病患可降低 CDAD 發生風險分別為 59.5%、65.9%及 61% (Lau et al., 2016)。

(四)改善乳糖不耐症

含有益生菌之乳製品可先行將乳品中的乳糖發酵，產生乳糖酶(lactase)，並維持其活性於腸道中作用，以改善因胃腸炎等腸導疾病造成之 β -galactosidase 活性不足，減緩乳糖不耐症之症狀(Jiang et al., 1996; Mustapha et al., 1997)。針對攝食含乳糖食物後具腹瀉、腹部絞痛、嘔吐、腸胃脹氣等乳糖不耐症狀之受試者，連續 4 週給予含有 *Lb. acidophilus* DDS-1 之商業產品，與攝取麥芽糊精之安慰劑相比，明顯降低由乳糖引起的腹瀉、腹痛、嘔吐等症狀(Pakdaman et al., 2016)。

(五)改善便秘

益生菌發酵時會產生有機酸，可刺激腸道蠕動並提高糞便中的水份含量，使便秘患者可以減緩症狀，正常排便(Tanaka and Shimosaka, 1982)。老年便秘患者口服益生菌制劑 28 天，受試者腸胃道症狀顯著降低，糞便性狀獲得改善，治療有效率可達 73.5%(譚, 2014)。

(六)降低膽固醇作用

腸道中的益生菌可將肝臟中的膽固醇進行分解形成去結合型式膽鹽，與膽固

醇產生共沈澱，促其由糞便排出體外，同時亦會促使血液中膽固醇進入肝臟形成膽鹽，而降低血膽固醇的濃度(Klaver and Van Der Meer, 1993)，益生菌的細胞膜可與膽固醇鍵結，甚至可將吸附的膽固醇進行同化作用，益生菌降低膽固醇的機制包括造成膽汁的去共軛作用 (deconjugation)、使膽固醇與益生菌細胞表面結合、去共軛膽汁與膽固醇共沈澱，以及將膽固醇轉化為前列腺素(coprostanol)等(Ishimwe et al., 2015)。

(七)強化免疫力及改善過敏

益生菌能提昇多種免疫作用，包括活化噬細胞、淋巴細胞及產生抗體；臨床證實 *Lb. casei* Shirota 可誘導 Th0 (T helper 0 cell)變異成 Th1 (T helper 1 cell)，活化細胞免疫系統，抑制腫瘤生成，並降低引發過敏反應之 IgE 含量(Hosono et al., 2002)。

許多過敏性疾病起因於 Th1 與 Th2 免疫反應不平衡，其中，對過敏原之反應較偏向 Th2 之免疫反應引起，益生菌或益生菌之發酵食品可增加 IFN- α 及 IFN- γ 的表現量，誘發 Th1 免疫反應，抑制 Th2 免疫反應，並降低 IgE 產生(Cross et al., 2001)； *Lb. casei* Shirota 可調節過敏性鼻炎患者之免疫反應，使 IgG 提高，IgE 下降，並可減緩過敏性鼻炎之症狀(Ivory et al., 2008)。

(八)抗腫瘤

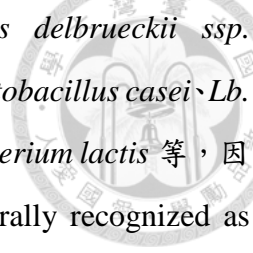
益生菌可改變腸胃道菌相分佈，降低腸道中具基因毒性、致癌性及促進腫瘤產物生成的有害菌，誘導細胞激素 INF- γ 、IL-1 以增加宿主免疫反應(Boirivant and Strober, 2007)，益生菌中之雙叉桿菌亦被證實具有還原力、螯合亞鐵離子能力、清除活性氧物質等抗氧化活性(許, 2004)，研究指出，乳酸菌細胞壁、胞內液或熱致死菌體均具有抑制癌細胞增生之能力(Kim et al., 2002)。

(九)控制體重

口服益生菌有助於膽酸在腸道中對脂肪的降解作用，使動物不易吸收脂肪而變得苗條(Martin et al., 2008)，在飲食用添加 *Lactobacillus paracasei* ST11 可降低高脂飲食之小鼠肥胖的機率，透過影響小鼠的自主神經作用，增加脂肪分解及白色與棕色脂肪組織活動，而減輕體重和腹部脂肪含量(Tanida et al., 2008)。

四、 益生菌之應用

雖然許多的微生物都被視為具有成為益生菌的潛力，但在商業量產上，使用最廣泛的益生菌以乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)及雙叉桿菌屬 (*Bifidobacterium*) 二大類



為主(表 1.8.)，包括了 *Lb. acidophilus*、*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus johnsoni*、*Lactobacillus casei*、*Lb. rhamnosus*、*Lactococcus lactis*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium lactis* 等，因為這些菌株具長期安全使用的歷史，並被認為是 GRAS (generally recognized as safe)，同時也是人體腸道中主要存在的菌屬(Tripathi and Giri, 2014)，而被大量運用於產製機能性發酵產品。過去幾十年中，全球消費市場出現超過 500 多種益生菌產品，產品品項不斷增加中，由穀物、水果和蔬菜(包括果汁、零嘴、截切水果)及肉製品發酵製成的益生菌產品逐漸被學界及消費者重視(S. Gupta and Abu-Ghannam, 2012; Kołozyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Rouhi et al., 2013)。

以益生開發機能性食品擁有廣大的消費市場，其產值已佔據全世界機能性食品市場的 65%，並且不斷增長，美國具益生菌之機能性食品產值已超過 750 億美元(Holzappel and Schillinger, 2002)，在歐洲、日本及澳洲市場中，改善腸胃道功能之 probiotics 及 prebiotics 產品同樣為機能性食品消費市場之主力(Saarela et al., 2002)。在美國，益生菌以食品、膳食補充劑或藥品之形式作為有益健康之補充劑，含益生菌之食品包含了乳酪、嬰兒配方食品及果汁(Sanders, 2003)。發酵乳製品除含有益菌外，尚有維生素 B 群及鈣等營養成份，加上適於日常飲食天天飲用，故為補充益生菌之良好來源。近十餘年來，乳酸菌產業在台灣蓬勃發展，以發酵乳為例，年產值由新台幣 20 餘億元增加至 70 餘億元，若加上其他應用產品，乳酸菌相關產品之產值已超過新台幣 100 億元，但台灣地區民眾飲用發酵乳之每人平均量，仍低於日本及歐美，故具機能性之乳酸發酵飲料仍有很大之發展空間(廖, 2007)。

益生菌為公認安全的微生物，廣泛被運用於製作發酵乳品、蔬菜、乳酪等加工食品，研究發現，部分益生菌具有 GAD 活性，可催化 L-麩胺酸或麩胺酸鈉進行 α -脫羧作用產生 GABA (Li et al., 2016)，近年以益生菌發酵產生 GABA 之相關研究如表 1.9。這些益生菌株分別自韓國泡菜、發酵肉品或果汁中篩選而來，自泰國 Kung-Som (以海蝦、糖、鹽製成之傳統發酵食品) 分離出 *Lactobacillus futsaii* CS3 接種於 MRS 培養基(de Man, Rogosa and Sharpe)，於 37°C 培養 108 小時，可產生約 11,000 mg/l GABA (Sanchart et al., 2016)。自胡蘿蔔汁分離的 *Leuconostoc mesenteroides* SM 與自韓國泡菜分離之 *Lb. plantarum* 於水芹汁中共發酵，可產生 10,000 mg/l GABA (Kwon et al., 2016)。魚腸道中分離之 *Lb. brevis* FPA 3709 接種於

黑豆奶，經 20°C 培養 72 小時，可使 GABA 含量達 6,120 mg/l (Ko et al., 2013)。不同菌株產生 GABA 的能力各有差異，透過篩選適合之益生菌接種於食品原料進行發酵，可生產同時含益生菌及 GABA 之雙機能保健食品，並符合現代人重視天然、原態的消費需求。

本研究以產自屏東縣萬丹鄉之高雄 8 號國產紅豆為原料，評估不同前處理條件對提高紅豆中 γ -胺基丁酸含量之影響，進一步以不同益生菌接種於紅豆乳中，篩選最適生產 GABA 之益生菌株，並調整培養基最適化條件，以開發兼具益生菌及 GABA 雙重功效之機能性紅豆發酵乳。

表 1.8. 商業應用之益生菌株表

Table 1. 8. List of probiotic strains used in commercial applications

Source/product	Strain
Chr. Hansen	<i>Lb. acidophilus</i> LA1/LA5
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb12
	<i>Lb. paracasei</i> CRL431
	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb12
Danisco	<i>Lb. acidophilus</i> NCFMs
	<i>Lb. acidophilus</i> La
	<i>Lb. paracasei</i> Lpc
	<i>B. lactis</i> HOWARUTM/BI
DSM Food Specialties	<i>Lb. acidophilus</i> LAFTIs L10
	<i>B. lactis</i> LAFTIs B94
	<i>Lb. paracasei</i> LAFTIs L26
Nestle	<i>Lb. johnsonii</i> La1
Snow Brand Milk	<i>Lb. acidophilus</i> SBT-20621 Products Co. Ltd.
	<i>B. longum</i> SBT-29281
Institute Rosell	<i>Lb. rhamnosus</i> R0011
	<i>Lb. acidophilus</i> R0052
Yakult	<i>Lb. casei</i> Shirota
	<i>B. breve</i> strain Yaku
Foneterra	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)
	<i>Lb. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
Probi AB	<i>Lb. plantarum</i> 299V
	<i>Lb. rhamnosus</i> 271
Danone	<i>Lb. casei</i> Immunitas
	<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)
Essum AB	<i>Lb. rhamnosus</i> LB21
	<i>Lc. lactis</i> L1A
Biogaia	<i>Lb. reuteri</i> SD2112
Morinaga Milk Industry Co. Ltd.	<i>B. longum</i> BB536
Lacteol Laboratory	<i>Lb. acidophilus</i> LB
Medipharm	<i>Lb. paracasei</i> F19

(Tripathi and Giri, 2014)

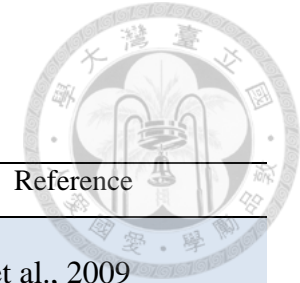


表 1.9. 不同益生菌生產 GABA 的應用

Table 1.9. Application of GABA produced by different probiotics


Probiotics	Isolation source	Culture medium	GABA production	Reference
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Chinese cabbage/ Kimchi	Brown rice juice, skim milk, and germinated soybean juice	7200 mg/l	Lu et al., 2009
<i>Lactobacillus brevis</i> GABA100	NP	MSG	13,000 mg/l	Kim et al., 2009
<i>Lactobacillus brevis</i> FPA 3709	Fish	Black soybean milk	6,120 mg/l	Ko et al., 2013
<i>Lactobacillus brevis</i> BJ20	Kimchi	Seaweeds and rice flour	2,465 mg/l	Lee et al., 2010
<i>Lactobacillus futsaii</i> CS3	Thai fermented shrimp product	MRS broth	11,000 mg/l	Sanchart et al., 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i> DW12	Fermented foods	Red seaweed	4,000 mg/l	Ratanaburee et al., 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i> K154	Kimchi	MRS broth	155 mg/l	Park et al., 2014
<i>Lactobacillus plantarum</i> DM5	Traditional fermented beverage	MRS broth	1,000 mg/l	Das and Goyal, 2015
<i>Lactobacillus plantarum</i> M-6	Chinese fermented food	MRS broth	537 mg/l	Li et al., 2016
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SM and <i>Lactobacillus plantarum</i> K154	Carrot juice / Kimchi	Water dropwort	10,000 mg/l	Kwon et al., 2016
<i>Streptococcus thermophiles</i> APC151	Digestive tract of fish	Skim milk	2,000 mg/l	Linares et al., 2016
<i>Pediococcus pentosaceus</i> HN8 and <i>Lactobacillus namurensis</i> NH2	Fermented meats	Fermented ground pork (Nham)	4,051 mg/kg	Ratanaburee et al., 2013

NP: Not provided.

參考文獻



- 丁一、艾華，2012。 γ -氨基丁酸與人體健康的關係。中國臨床保健雜誌 15(1)，100-103。
- 行政院農業委員會，2016a。農業統計年報。2016年12月8日取自行政院農業委員會，<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。
- 行政院農業委員會，2016b。農業知識入口網-紅豆主題館。2016年12月15日取自農業知識入口網，<https://kmweb.coa.gov.tw/subject/mp.asp?mp=409>。
- 何樹芬、李曉然、柳陳堅，2015。乳酸菌合成葉酸的研究進展。微生物通報 42(10)，1994-2001。
- 易婷、陶柯衡、焦亞娟、劉海鴻、傅思武，2016。益生菌制劑在防治艱難梭菌相關性腹瀉上的應用及前景。中國微生物學雜誌 28(8)，984-987。
- 周國隆、吳詩都，2003。紅豆不同落葉型品種間各生育期落葉性之研究。高雄區農業改良場研究彙報 14(3)，24-38。
- 食品工業發展研究所，2016。全球益生菌市場 2020 年將達 960 億美元。2016 年 11 月 30 日取自食品工業發展研究所食品產業知識庫，http://203.72.130.7/FIKB_Report_News_Detail.aspx?BulletinID=30000986。
- 區少梅，2002。吃 GABA 降血壓。元氣齋出版社，臺北市。
- 堀江健二、東口伸二、橫越英彥，2006。「含 GABA 之麩胺酸發酵物」的免疫效果及對心理健康的影響。食品資訊 215，64-67。
- 梁恒宇、鄧立康、林海龍、李頌、張丹，2013。新資源食品 - γ -氨基丁酸 (GABA) 的研究進展。食品研究與開發 34(15)，119-123。
- 許雅鈞，2004。雙叉桿菌胞內物對活性氧之抗致突變性與抗氧化性。臺灣大學食品科技研究所碩士學位論文，臺北市。
- 財政部關務署，2015。統計資料庫查詢系統。2016年12月17日取自財政部關務署，<https://portal.sw.nat.gov.tw/APGA/GA03>。
- 郭子苓，2014。一年熱賣近 2 億、紅豆水暴紅秘密。商業週刊 1404，73-84。
- 郭曉娜、朱永義、朱科學，2003。生物體內 γ - 氨基丁酸的研究。氨基酸和生物資源 25(2)，70-72。
- 陳正敏、李穎宏，2006。紅豆納豆產品加工。高雄區農情月刊 105，4-6。

- 
- 陳玉如，2009。臺灣紅豆產業現況。高雄區農業專訊 70，12-13。
- 陳玉如、周國隆，2003。紅豆新品種高雄 8 號之育成。高雄區農業改良場研究彙報 14(2)，10-28。
- 陳慶源、黃崇真、邱雪惠、廖啟成，2007。乳酸菌之保健功效與產品開發。農業生技產業季刊 11，60-68。
- 傅以中，2005。從蔬果種子發芽過程中量產高 γ -胺基丁酸(GABA)加工新產品的開發及其相關製備技術。行政院農業委員會農糧署 94 年度科技計畫研究報告。
- 黃培訓，2003。紅豆產銷經濟分析。農政與農情 131，67-74。
- 葉雲彰，2011。普洱茶保護神經細胞抗癲癇功能與機轉。元培科技大學生物技術研究所碩士學位論文，新竹市。
- 廖啟成，2007。乳酸菌產業研發服務能量之建構。益生菌之益生機制與應用研討會，臺灣乳酸菌協會，臺北市。
- 操家璇、李玉萍、熊向源、葉軍、劉華，2008。 γ -氨基丁酸在開發功能性食品中的應用。河北農業科學 12(11)，52-54。
- 張暉、姚惠源、徐永，2004。米胚芽酶法制備 γ -氨基丁酸的研究。食品科技 8，82-84。
- 蔣立文、周傳云、夏菠、李宗軍，2007。幾種發酵豆製品中 γ -氨基丁酸含量的初步測定。中國釀造 26(4)，62-64。
- 衛生福利部，2012。食品衛生管理法解釋彙編。衛生福利部，臺北市。
- 衛生福利部，2015。食品營養成份資料庫。民 105 年 12 月 1 日，取自，<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=284>。
- 羅文冠，2016。國產非基改紅豆搖籃 - 高雄區農業改良場。高雄區農情月刊 227，3。
- 謝芳、楊承劍、唐艷、農皓如、楊小梅、曾慶坤，2015。含 γ -氨基丁酸水牛酸奶對 SHR 大鼠血壓、血脂及小鼠醉酒的影响。中國釀造 34(9)，97-100。
- 謝昌成、蕭雅尤，2013。益生菌在腸躁症上的應用。家庭醫學與基層醫療 28(2)，43-47。
- 鄭躍杰、黃志華，2011。正確認識、評價和使用益生菌藥物。中國實用兒科雜誌 26(1)，24-26。
- 陳忠秀、李嘉文、趙揚、袁杰利、劉黨生，2016。益生菌的應用現狀和發展前景。中

國微生物學雜誌 28(4), 493-496。

譚彬, 2014。益生菌對老年功能性便秘患者的臨床研究。中外醫學研究 12(2), 136-137。

顧振新、蔣振暉, 2002。食品原料中 γ -氨基丁酸 (GABA) 形成機理及富集技術。食品與發酵工業 28(10), 65-69。

岡田忠司, 2001。GABA 富化コメ胚芽の生理機能。食品と開發 36(6), 7-9。

梶本修身, 1998。富化 γ -アミノ酪酸経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果。大阪外国語大学論集 19, 151-158。

Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., Yokogoshi, H., 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors* 26(3), 201-208.

Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Troszynska, A., 2008. Antioxidant activity of extract of adzuki bean and its fractions. *Journal of food lipids* 15(1), 119-136.

Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., Fujimoto, K., 2003. The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of gamma-aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(5), 1018-1023.

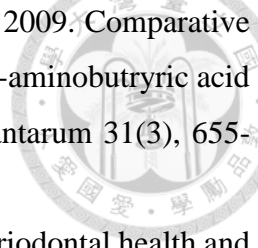
Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition research* 19(10), 1559-1597.

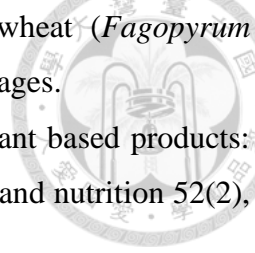
Bai, Q., Chai, M., Gu, Z., Cao, X., Li, Y., Liu, K., 2009. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica L.*) during germination. *Food Chemistry* 116(1), 152-157.

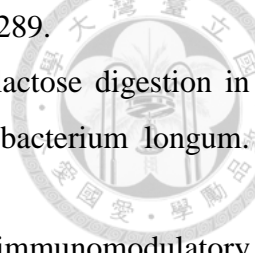
Bai, Q., Yang, R., Zhang, L., Gu, Z., 2013. Salt stress induces accumulation of gamma-aminobutyric acid in germinated foxtail millet (*Setaria italica L.*). *Cereal Chem* 90(2), 145-149.

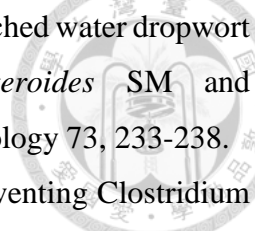
Black, F. T., Andersen, P. L., Ørskov, J., Ørskov, F., Gaarslev, K., Laulund, S. 1989. Prophylactic efficacy of *Lactobacilli* on traveler's diarrhea. In R. Steffen, H. Lobel, J. Haworth, D. J. Bradley (Eds.), *Travel Medicine: Proceedings of the First Conference on International Travel Medicine, Zürich, Switzerland*, 333-335.

Boirivant, M., Strober, W., 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology* 23(6), 679-692.

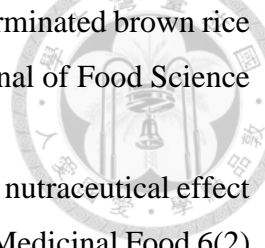
- 
- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yilmaz, O., Ozdemir, F., Turkan, I., 2009. Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum L.*). *Acta physiologiae plantarum* 31(3), 655-659.
- Chatterjee, A., Bhattacharya, H., Kandwal, A., 2011. Probiotics in periodontal health and disease. *Journal of Indian society of periodontology* 15(1), 23-28.
- Cholewa, E., Bown, A. W., Cholewinski, A. J., Shelp, B. J., Snedden, W. A., 1997. Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^+ . *Canadian journal of botany* 75(3), 375-382.
- Crawford, L. A., Bown, A. W., Breitzkreuz, K. E., Guinel, F. C., 1994 . The synthesis of [gamma]-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiology* 104(3), 865-871.
- Crittenden, R., Martinez, N., Playne, M., 2003. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80(3), 217-222.
- Cross, M., Stevenson, L., Gill, H., 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *International immunopharmacology* 1(5), 891-901.
- Das, D., & Goyal, A., 2015. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology* 61(1), 263-268.
- Dhakar, R., Bajpai, V. K., Baek, K.H., 2012. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4), 1230-1241.
- Diana, M., Quílez, J., Rafecas, M. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods* 10, 407-420.
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., Świeca, M., 2013. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry* 141(3), 2177-2183.
- Ericsson, C. D., 2003. Travellers' diarrhoea. *International journal of antimicrobial agents* 21(2), 116-124.
- Fuller, R., 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* 32(4), 439.
- Guo, Y., Zhu, Y., Chen, C., Chen, X., 2016. Effects of aeration treatment on γ -

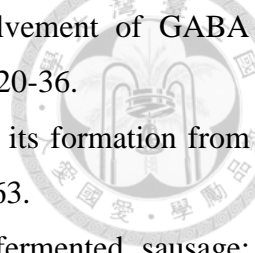
- 
- aminobutyric acid accumulation in germinated tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). Journal of Chemistry 2016. Article ID 4576758, 9 pages.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N., 2012. Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. Critical reviews in food science and nutrition 52(2), 183-199.
- Gupta, V., Garg, R., 2009. Probiotics. Indian journal of medical microbiology 27(3), 202.
- Hattori, T., Takagaki, K. T. S. C. L., Tsusaki, S. T. S. C. L., 2001. Food using gamma-aminobutyric acid-enriched cruciferous plant. Europe Patent, EP1082911 A2.
- Havenaar, R., & Huis, J. H., 1992. Probiotics: a general view. In The Lactic Acid Bacteria Volume 1, 151-170.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kamata, K., 2002. Mechanism underlying γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. European Journal of Pharmacology 438(1-2), 107-113.
- Hoerr, R. A., & Bostwick, E. F., 2000. Bioactive proteins and probiotic bacteria: modulators of nutritional health. Nutrition 16(7), 711-713.
- Holzappel, W. H., & Schillinger, U., 2002. Introduction to pre-and probiotics. Food Research International 35(2), 109-116.
- Hosono, A., Otani, H., Yasui, H., Watanuki, M., 2002. Impact of fermented milk on human health: cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. Animal Science Journal 73(4), 241-256.
- Ishimwe, N., Daliri, E. B., Lee, B. H., Fang, F., Du, G., 2015. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. Molecular nutrition food research 59(1), 94-105.
- Itoh, T., Kita, N., Kurokawa, Y., Kobayashi, M., Horio, F., Furuichi, Y., 2004. Suppressive effect of a hot water extract of adzuki Beans (*Vigna angularis*) on hyperglycemia after sucrose loading in mice and diabetic rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 68, 2421-2426.
- Itoh, T., Umekawa, H., Furuichi, Y., 2005. Potential ability of hot water adzuki (*Vigna angularis*) extracts to inhibit the adhesion, invasion, and metastasis of murine B₁₆ melanoma cells. Biosci Biotechnol Biochem 69(3), 448-454.
- Ivory, K., Chambers, S., Pin, C., Prieto, E., Arques, J., Nicoletti, C., 2008. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in

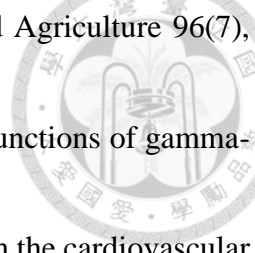
- 
- allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy* 38(8), 1282-1289.
- Jiang, T., Mustapha, A., Savaiano, D. A., 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science* 79(5), 750-757.
- Jin, Z., Mendu, S. K., Birnir, B., 2013. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids* 45(1) , 87-94.
- Kim, J. Y., Woo, H. J., Kim, Y.-S., Lee, H. J., 2002. Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnology Letters* 24(17), 1431-1436.
- Kim, J., Lee, M., Ji, G., Lee, Y., Hwang, K., 2009. Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology* 130(1), 12-16.
- Kim, H. S., Lee, E. J., Lim, S. T., Han, J. A., 2015. Self-enhancement of GABA in rice bran using various stress treatments. *Food chemistry* 172, 657-662.
- Kinnersley, A. M., Turano, F. J., 2000. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19(6), 479-509.
- Kita, F., Shibata, Y., Yorifuji, T., Nakahata, T., Kawakami, J., Kawakami, K., 2010. Prescription trends for treatment of paediatric gastroenteritis at a Japanese hospital between 1997 and 2007. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 35(1), 87-92.
- Klaver, F., Van Der Meer, R., 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4), 1120-1124.
- Ko, C. Y., Lin, H. T. V., Tsai, G. J., 2013. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry* 48(4), 559-568.
- Kołożyn-Krajewska, D., Dolatowski, Z. J., 2012. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry* 47(12), 1761-1772.
- Kuo, Y.H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C., 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry* 86(4), 537-545.
- Kwon, S., Park, H. W., Sohn, K., Kim, K., 2007. Method for enhancing the content of soybean seed gamma-aminobutyric acid. US Patents, US20070202202 A1.

- 
- Kwon, S. Y., Garcia, C. V., Song, Y. C., Lee, S. P., 2016. GABA-enriched water dropwort produced by co-fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* SM and *Lactobacillus plantarum* K154. *LWT-Food Science and Technology* 73, 233-238.
- Lau, C. S., Chamberlain, R. S., 2016. Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *International journal of general medicine* 9, 27-34.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M., 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology* 24(2), 160-168.
- Lee, B. J., Kim, J. S., Kang, Y. M., Lim, J. H., Kim, Y. M., Lee, M. S., Jeong, M. H., Ann, C. B., Je, J. Y. 2010. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry* 122(1), 271-276.
- Lee, L. S., Choi, E. J., Kim, C. H., Sung, J. M., Kim, Y. B., Kum, J. S., Park, J. D., 2015. Antioxidant properties of different parts of red and black adzuki Beans. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 44(8), 1150-1156.
- Leventhal, A. G., Wang, Y., Pu, M., Zhou, Y., Ma, Y., 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300(5620), 812-815.
- Li, W., Wei, M., Wu, J., Rui, X., Dong, M., 2016. Novel fermented chickpea milk with enhanced level of γ -aminobutyric acid and neuroprotective effect on PC12 cells. *Peer J* 4, 2292-2301.
- Lilly, D. M., Stillwell, R. H., 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147(3659), 747-748.
- Linares, D. M., O'Callaghan, T. F., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Stanton, C. 2016. *Streptococcus thermophilus* APC151 Strain Is Suitable for the Manufacture of Naturally GABA-Enriched Bioactive Yogurt. *Frontiers in Microbiology* 7, 1876-1885
- Luo, J., Cai, W., Wu, T., Xu, B., 2016. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities. *Food Chemistry* 201, 350-360.
- Lu, X., Xie, C., Gu, Z., 2009. Optimisation of fermentative parameters for GABA

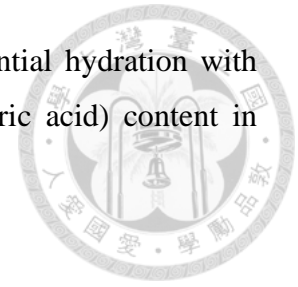
- enrichment by *Lactococcus lactis*. Czech Journal of Food Sciences 27(6), 433-442.
- Martin, F. P. J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I. K., Lundstedt, T., Lek, P., Rezzi, S., Ramadan, Z., Bladeren, P., Fay, L. B., 2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. Molecular systems biology 4(1), 157.
- Maruyama, C., Araki, R., Kawamura, M., Kondo, N., Kigawa, M., Kawai, Y., Takanami, Y., Miyashita, K., Shimomitsu, T., 2008. Azuki bean juice lowers serum triglyceride concentrations in healthy young women. J Clin Biochem Nutr 43(1), 19-25.
- Monma, G., Hayakawa, K., 2007. Production method of food and beverage products with high content of gamma-aminobutyric acid and food and beverage products with high content of gamma-aminobutyric acid. US Patents, US20070048353 A1.
- Mukai, Y., Sato, S., 2011. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. The Journal of Nutritional Biochemistry 22(1), 16-21.
- Mustapha, A., Jiang, T., Savaiano, D. A., 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science 80(8), 1537-1545.
- Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T., Yokogoshi, H., 2009. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with γ -aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. International Journal of Food Sciences and Nutrition 60(sup5), 106-113.
- Nandhu, M. S., Paul, J., Kuruvila, K. P., Abraham, P. M., Antony, S., Paulose, C. S., 2011. Glutamate and NMDA receptors activation leads to cerebellar dysfunction and impaired motor coordination in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rat: functional recovery with bone marrow cells, serotonin and GABA. Molecular and cellular biochemistry 353(1-2), 47-57.
- Nishimura, M., Yoshida, S. I., Haramoto, M., Mizuno, H., Fukuda, T., Kagami-Katsuyama, H., Tanaka, A., Ohkawara, T., Sato, Y., Nishihira, J., 2016. Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure. Journal of Traditional and Complementary Medicine 6(1), 66-71.
- Oh, C., Oh, S., 2004. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. J Med Food 7(1), 19-23.

- 
- Oh, S., Moon, Y., Soh, J., Cha, Y., 2005. Effect of water extract of germinated brown rice on adiposity and obesity indices in mice fed a high fat diet. *Journal of Food Science and Nutrition* 10(3), 251-257.
- Oh, S., Soh, J., Cha, Y., 2003. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of Medicinal Food* 6(2), 115-121.
- Pakdaman, M. N., Udani, J. K., Molina, J. P., Shahani, M., 2016. The effects of the DDS-1 strain of lactobacillus on symptomatic relief for lactose intolerance-a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutrition journal* 15(1), 56.
- Park, S. Y., Lee, J. W., Lim, S. D., 2014. The probiotic characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K154 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology* 23(6), 1951-1957.
- Plokhov, A. Y., Gusyatiner, M., Yampolskaya, T., Kaluzhsky, V., Sukhareva, B., Schulga, A., 2000. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 88(1-3), 257-265.
- Powers, M., 2012. GABA supplementation and growth hormone response. *Acute Topics in Sport Nutrition* 59, 36-46.
- Rad, A. H., Mehrabany, E. V., Alipoor, B., Mehrabany, L. V., Javadi, M., 2012. Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition* 28(7/8), 733-736.
- Ramputh, A. I., Bown, A. W., 1996. Rapid gamma-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiology* 111(4), 1349-1352.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Penjamras, P., Chaiyasut, C., 2011. Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(3), 1-1.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Sukhoom, A., 2013. Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International journal of food microbiology* 167(2), 170-176.
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., Deleu,

- 
- C., 2010. The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC plant biology* 10(1), 20-36.
- Roberts, E., Frankel, S., 1950. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 187(1), 55-63.
- Rouhi, M., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., 2013. Probiotic fermented sausage: viability of probiotic microorganisms and sensory characteristics. *Critical reviews in food science and nutrition* 53(4), 331-348.
- Rozan, P., Kuo, Y.H., Lambein, F., 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry*, 58(2), 281-289.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78(1), 99-117.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84(3), 197-215.
- Saavedra, J. M., Bauman, N., Perman, J., Yolken, R., Oung, I., 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The lancet* 344(8929), 1046-1049.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., 1996. Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 53-56.
- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., Maneerat, S., 2016. Technological and safety properties of newly isolated GABA - producing *Lactobacillus futsaii* strains. *Journal of applied microbiology* 121(3), 734-745.
- Sanders, M. E., 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews* 61(3), 91-99.
- Sato, S., Mukai, Y., Yamate, J., Kato, J., Kurasaki, M., Hatai, A. and Sagai, M., 2008. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35, 43-49.
- Sato, S., Mukai, Y., Kataoka, S., Kurasaki, M., 2015. Azuki bean (*Vigna angularis*) extract stimulates the phosphorylation of AMP-activated protein kinase in HepG2

- 
- cells and diabetic rat liver. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(7), 2312-2318.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4(11), 446-452.
- Stanton, H. C., 1963. Mode of action of gamma amino butyric acid on the cardiovascular system. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 143, 195-204.
- Sugiyama, M., 2007. Method of producing gaba-containing fermented product. World patent, WO2007052806 A8.
- Tanaka, R., Shimosaka, K., 1982. Investigation of the stool frequency in elderly who are bed ridden and its improvements by ingesting bifidus yogurt. *Nihon Ronen Igakkai zasshi. Japanese journal of geriatrics* 19(6), 577-582.
- Tanida, M., Shen, J., Maeda, K., Horii, Y., Yamano, T., Fukushima, Y., Nagai, K., 2008. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. *Obesity research and clinical practice* 2(3), 159-169.
- Ting Wong, C. G., Bottiglieri, T., Snead, O. C., 2003. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology* 54(S6), S3-S12.
- Tripathi, M. K., Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9, 225-241.
- Tsuchiya, K., Nishimura, K., Iwahara, M., 2002. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Aspergillus oryzae* and the separation of GABA using electric dialysis. *Journal of the Brewing Society of Japan* 97, 878-882.
- Wallace, W., Secor, J., Schrader, L. E., 1984. Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiology* 75(1), 170-175.
- Wu, M., Chou, L., Wang, L., 2002. Antioxidant activities of azuki beans (*Vigna angularis*) and pods. *The Chinese Agricultural Chemical Society* 4(2), 74-81.
- Xie, Z., Xia, S., Le, G. W., 2014. Gamma-aminobutyric acid improves oxidative stress and function of the thyroid in high-fat diet fed mice. *Journal of Functional Foods* 8, 76-86.
- Yang, R., Feng, L., Wang, S., Yu, N., Gu, Z., 2015. Accumulation of γ -aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 2090-2096.

Youn, Y. S., Park, J. K., Jang, H. D., Rhee, Y. W., 2011. Sequential hydration with anaerobic and heat treatment increases GABA (γ -aminobutyric acid) content in wheat. *Food Chemistry* 129(4), 1631-1635.



第二章 加工前處理條件對紅豆中 γ -胺基丁酸含量之影響

壹、前言

臺灣生產的紅豆是高屏地區秋冬裡作作物，主要由行政院農業委員會高雄區農業改良場進行育種改良、栽培技術精進研發及推廣輔導，市場主流品種包括「高雄8號」、「高雄9號」及「高雄10號」，皆具備種皮薄、籽粒大、外觀顏色鮮紅、香氣濃，口感綿密風味佳等特性，適合製餡及整粒加工(行政院農業委員會，2016)。紅豆種皮質地硬，含大量碳水化合物、脂肪含量較少，在加工過程中多會經浸泡步驟使種皮軟化，以縮短蒸煮時間。

浸泡是豆科植物加工製程的第一步，透過測定烹調時間、蛋白質變性程度及澱粉糊化作用程度瞭解種子水合作用並管理最終品質，提高浸泡溫度是減少浸泡時間促進水合作用常用的方法(Piergiovanni, 2011)，浸泡溫度會影響豆類GABA的生成量，大豆於30°C浸泡4小時，吸水率可達100%，植物種子浸泡後，水份含量提高也刺激發芽作用，浸泡過程中控制溫度及時間，可有效活化麩胺酸脫羧酶(Glutamic acid decarboxylase, GAD)及二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)，使GABA含量急速增加(Guo et al., 2011)。糙米在35°C浸泡1-5小時，GABA含量會提高2倍以上，儲存在糙米中的蛋白質在浸泡過程中因吸收水份，活化酵素系統而分解產生麩胺酸，同時GAD亦被活化將麩胺酸經脫羧作用轉變為GABA (Komatsuzaki et al., 2007)；劉等人(2005)將改良後之巨胚水稻W025於室溫下浸水1小時，其胚芽的GABA含量會提高5倍，隨浸水時間延長，GABA含量增高，浸水16小時後GABA增加幅度則趨於平緩。苦蕎於34°C浸泡20小時，其GABA含量可達到 168.5 μ g/g，比18°C浸泡之試驗組，GABA含量提高了1.19倍 (郭等，2013)。綜上而論，不同植物種子於浸泡後均可有效提高GABA含量，但隨著浸泡溫度、浸泡時間增加，不同種子可達最高GABA產量的時間亦有所不同。

將大豆浸泡後去除多餘水分，再經過 -4°C、-20°C及 -32°C冷凍及解凍，大豆中GABA含量與完全未處理之對照組相比，可增加27.3倍，乾燥後之GABA大豆可用來製備豆奶、醬油、豆腐、豆渣、酸奶等機能性食品(Kwon et al., 2007)。經厭氧處理的大豆豆芽，於 -18°C冷凍12小時，置於密封的聚乙烯袋中再經 25°C解凍6小時，其GABA含量為未經冷凍、解凍大豆豆芽的 7.21倍，冷凍處理利於在短時間內提高DAO活性，解凍過程中GAD和DAO透過與基質麩胺酸及聚胺接觸，提高GABA

含量(Yang et al., 2015)。比較不同冷凍和解凍條件對於馬鈴薯GABA含量的影響，於-24°C冷凍馬鈴薯2小時，可使GABA含量較未冷凍處理前提升2.24倍，於-68°C冷凍處理馬鈴薯，其GABA含量反而較-24°C冷凍之處理組減少約12%(白等, 2015)。紅豆加工前先經浸泡有助種皮軟化並縮短蒸煮時間，低溫刺激及解凍過程又有助於GABA累積，若能在紅豆加工前期先進行適度前處理，應可有效提昇紅豆原料中GABA的含量。

γ -胺基丁酸屬非蛋白質胺基酸，對紫外光、螢光不具敏感性，不易直接檢測，文獻中提及胺基酸之測定方法有酵素法、離子交換層析法、電泳比色法、氣相層析法、毛細管電泳法、液相層析法及胺基酸分析儀測定，在準確度上以酵素法和高效能液相層析(High performance liquid chromatography, HPLC)法效果較好，時效上則為比色法和酵素法較佳，另外，胺基酸分析儀準確度、靈敏度高、操作簡單、重覆性好，但儀器設備昂貴且不適合大批樣品快速分析(陳, 2006)。以HPLC分析胺基酸，需先經過衍生反應將胺基酸反應成具有UV-VIS或螢光吸光性的衍生物，以利偵測分析，常用的衍生劑如表2.1所示。使用鄰苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)可在短時間內與巯基乙醇(mercaptoethanol)反應，形成衍生物(OPA-MPA-amine)可吸收螢光和紫外光，衍生處理時間僅需3分鐘，分析時間約7分鐘，簡單快速、靈敏度高、回收率也高，可用以測定粳米、牛奶及糖果中GABA含量，但衍生物較不穩定(章, 2012)。本研究中所使用的衍生劑為異硫氰酸苯酯(Phenylisothiocyanate, PITC)，PITC又稱EDMAN reagent，最早用於蛋白質序列分析，而後廣泛用於胺基酸分析，它可與一級及二級胺基酸反應，形成苯胺硫甲醯基(phenylthiocarbamyl, PTC)衍生物(圖2.1)，於紫外光254nm有最大吸收波長，PTC-胺基酸結構穩定，於室溫下可放置1天，若乾燥後置於冷凍則可貯存更久(Aristoy and Toldrá, 2004)，Kuo et al.(2004)利用PITC衍生法比較豌豆、扁豆及四季豆中胺基酸及GABA的含量，PITC衍生法亦可分析小米中GABA含量及麩胺酸脫羧酶活性(Bai et al., 2009)，可知PITC衍生法為食品成份分析中廣泛採用之柱前衍生法。

本研究利用臺灣南部主要紅豆產區萬丹鄉生產之高雄8號紅豆為原料，以不同條件進行浸泡處理及冷衝擊刺激，採用PITC衍生法測定GABA含量及GAD活性，並比較不同前處理條件對於花青素含量及總酚含量之影響，以篩選出可促進紅豆GABA累積之最適前處理條件，作為未來製成紅豆乳發酵之基質。



貳、材料與方法

一、實驗架構

本研究主要探討高雄 8 號紅豆在不同溫度下浸泡對水份含量、生菌數、花青素含量、總酚含量、GABA 含量及 GAD 活性之影響，並進一步經冷凍、解凍過程對花青素含量、總酚含量、GABA 含量、GAD 活性之影響，研究架構如圖 2.2. 所示。將紅豆清洗後加入 5 倍重量之自來水(w/w)置於血清瓶中，分別於 4°C、25°C 及 37°C 浸泡 2-60 小時，並於浸泡期間定時取樣，分析浸泡後紅豆之水份含量、生菌數、花青素含量、總酚含量、GABA 含量及 GAD 活性，得到最適浸泡條件。以最適條件浸泡後之紅豆再經過 -4°C 及 -20°C 冷凍及室溫解凍處理，探討低溫及解凍對 GABA 累積之影響。

二、實驗材料

(一) 原料：

高雄8號紅豆採用購自屏東縣萬丹鄉農會。

(二) 試藥：

1. Gamma amino butyric acid (GABA), Triethylamine (TEA), HCl, Methanol, Phenylisothiocyanate (PITC), β -ercaptoethanol, pyridoxal 5'-phosphate (PLP)購自Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
2. Folin-Ciocalteu reagent：購自Merck, Darmstadt, Germany.
3. Total dietary fiber assay kit：購自 Megazyme Inc. Wicklow, Ireland.
4. Acetonitrile(HPLC-grade)購自J.T Backer Inc. Phillipsburg, NJ, U.S.A.
5. Ethanol：試藥級，純度 95%，購自景明公司，臺北市，臺灣。
6. 液態氮：購自臺灣大學化學系。

(三) 培養基：

7. Plate count agar(PCA)、peptone：購自Alpha Biosciences, Inc. Baltimore, MD, U.S.A.

(四) 試驗設備及器材

1. 無菌操作台：Laminar Flow, Model TH-420, Tsao Hsin Enterprise Co. LTD., Taipei, Taiwan.
2. 恆溫培養箱：LM-570, Yite precisin Machinery Co. Ltd., Taichung, Taiwan.

- 
3. 蒸餾水製作裝置：Distillation unit, Buchi, Model 315, Flawil, Switzerland.
 4. 去離子水製作裝置：Millipore Co., Medford, MA, U.S.A.
 5. 旋轉式減壓濃縮機：BUCHI 011, Buchi, Switzerland.
 6. 咖啡磨豆機：百靈-KSM2 購自全國電子，臺北，臺灣。
 7. 無菌過濾膜：0.22 μ m PVDF filter購自 Millipore SA, Molsheim, France.
 8. 酸鹼測定計：Microcomputer pH vision 6071, Jenco Electronics Ltd., Michigan, U.S.A.
 9. 灰化爐：ELF 10/14, Carbolite Furnaces, Sheffield, England.
 10. 氮蒸餾器：B323, Buchi, Flawil, Switzerland.
 11. 針筒：Syringr，特浦公司，高雄，台灣。
 12. 離心式真空濃縮機：Model SVC100H, Savant Co., Farmingdale, NY, U.S.A.
 13. 粗纖維萃取器：A200, Ankom Technology, New York, U.S.A.
 14. 均質機：Votex Mixer Genie 2, Scientific Induipment Co., Bohemia, New York, U.S.A.
 15. 冷凍乾燥機：Free Zone 18L Freeze Dry System with purge valve, Labconco Co., Cansas City, Missouri, U.S.A.
 16. 離心機：Universal 320R, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Germany.
 17. 分析天平：Electronic balance ER-180A, A&D Co., Bohemia, New York; U.S.A.
 18. 水浴槽：Hotech-810, Hotech instrument Corp., New Taipei City, Taiwan.
 19. 烘箱：FD-115, WTC Binder, Germany.，矽新科技公司，臺北，臺灣。
 20. 分光光度計：Unicam Co., Model HE ISO，矽新科技公司，臺北，臺灣。
 21. 高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)
 - (1)分析管柱(Analytical column)：Phenomenex 00G-4375E C₁₈, 4 micron(250×4.6mm I.D.)
 - (2)移動相溶劑輸出系統(Solvent delivery system)
 - Degassing system, Model DG-2410, Sanwa Tsusho Co., Tokyo, Japan.
 - Hplc pump(880-PU, Jasco., Tokyo, Japan.
 - Solvent mixing module(880-30, Jasco Co., Tokyo, Japan)
 - (3)紫外光檢測器(UV970, Jasco Co., Tokyo, Japan)
 - (4)資料擇取處理系統(Data processor)：EC2000 data system 1.0，立行公司，臺



北，台灣。

三、實驗方法

(一) 紅豆前處理

紅豆以目視法去除破碎顆粒後，以自來水清洗3次，瀝乾，置於玻璃瓶並加蓋，添加5倍自來水(w/w)分別於4℃、25℃及37℃浸泡2、4、8、12、24、30、36、48及60小時，並定時取樣分析紅豆之水分含量、生菌數、花青素含量、GABA含量、GAD活性及浸泡液pH值，篩選提升紅豆GABA含量之最適浸泡條件。

(二) 紅豆之冷凍解凍處理

參考Kwon等(2007)之方法並改變冷凍及解凍溫度，將經過最適浸泡條件處理過之紅豆，瀝乾水份後放入PE袋密封(液態氮處理組放於紗袋中)，分別置於-4℃、-20℃冰箱及液態氮中進行冷凍12、24、48小時，再於室溫下解凍0、12、24小時，取樣分析紅豆之GABA含量及GAD活性，篩選可增加紅豆GABA含量之最適冷凍、解凍條件。

(三) 紅豆生菌數測定

依CNS 10890號食品微生物之檢驗法-生菌數之檢驗。取浸泡後之紅豆25 g，於無菌操作台中加入含225g已滅菌0.1%peptone稀釋液的均質瓶中，以均質機攪拌2分鐘，成為10倍稀釋液，將稀釋液進行連續稀釋後，以倒皿培養法將溶解並降溫之plate count agar與檢體液混合均勻，待培養基凝固後於37℃培養2天，記錄其菌數。

(四) 紅豆花青素測定(Padmavati et al., 1997)

待測紅豆樣品先經冷凍乾燥，取0.5 g凍燥之紅豆粉末，加入1% HCl/methanol(MeOH)，於暗室下萃取60分鐘，再經12000 g轉速離心15分鐘，以分光光度計測定在530 nm及657 nm之吸光值，除以吸光係數 $\epsilon = 31.6 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，計算花青素含量。

花青素含量($\mu\text{mole/g}$) = $(A_{530} - 0.33 \times A_{657}) \div 31.6 \times \text{MeOH毫升數} \div \text{重量(g)}$

(五) 紅豆總酚含量測定(Wu et al., 2012)

凍乾紅豆粉末與50% ethanol以1:10比例混合，於4℃下攪拌60分鐘，以12000 g轉速離心15分鐘，取上清液經0.45 μm 濾膜過濾，即為紅豆濾



液。

紅豆濾液5ml與Folin-Ciocalteu reagent 5ml 振盪混合後，靜置3分鐘，加入 10% Na_2CO_3 5ml，間歇混合1小時，以分光光度計檢測 735nm之吸光值，以gallic acid作為標準曲線，換算每公克紅豆(乾重)所含沒食子酸(gallic acid)毫克數。

(六) 紅豆GABA含量測定(陳，2006)

1. 樣品製備：浸泡後之紅豆樣品瀝乾後，進行冷凍乾燥並以咖啡磨豆機磨成粉狀，取 1g紅豆凍乾粉加10倍(w/w)的70%乙醇於4°C下萃取1天、2小時及1小時後，於4°C離心30分鐘，合併收集三次萃取所得上清液，經減壓濃縮後製成10 ml分析樣品，保存於-20°C(Rozan et al., 2001)。

2. PITC衍生劑配製

衍生劑A：將TEA、methanol與去離子水以2：1：1(v/v)之比例於抽氣櫃中混合均勻，置於-20°C貯存備用。

衍生劑B：PITC、去離子水、TEA與methanol以 1：1：1：7(v/v)比例於抽氣櫃中混合均勻，置於-20°C貯備用。

3. 取20 μl 樣品液進行真空乾燥，加入衍生劑A 20 μl 混合均勻後立即真空乾燥，以去除衍生劑。
4. 繼續加入30 μl 衍生劑B於室溫下作用20分鐘，真空乾燥，去除衍生劑。
5. 衍生後之樣品溶於 200 μl 動相(0.1M ammonium acetate)中，以 0.22 μm 濾膜過濾後進行HPLC分析。
6. 分析條件(Kuo et al., 2004)

動相A：0.1 M ammonium acetate。

動相B：0.1 M ammonium acetate、acetonitrile與methanol以44：46：10(v/v)比例於抽氣櫃中混合均勻。

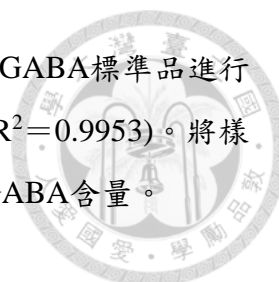
動相A及B混合後以glacial acetic acid調整pH值至6.5。

移動相梯度：動相A 100%-0%，動相B 0%-100%。

動相流速：1.0 ml/min。

分析時間：50分鐘。

檢測器波長：UV 254 nm。



7. 取0、5、10、15、20、25、30、35 μ l濃度為 0.2 mg/mL的GABA標準品進行衍生化並以上述條件分析，並依積分面積作成標準曲線($R^2=0.9953$)。將樣品液分析後之積分面積以標準曲線回推計算出樣品中的GABA含量。

(七) 紅豆GAD活性測定

將浸泡後之紅豆瀝乾，並以乾淨毛巾拭乾表面，取 1 公克紅豆先以研鉢粗磨後，再添加 5ml potassium phosphate buffer (1/15 M, pH5.8, 含有 2 mM β -ercaptoethanol, 2mM EDTA 及 0.2mM PLP) 於冰浴中充份均質，均質物以 12000 g 離心 30 min，可得粗麩胺酸脫羧酶萃取液。取 2 ml 粗酵素液加 1 ml 基質(1% glutamate, pH 5.8)，於 40 $^{\circ}$ C 反應 2 小時，再置於沸水浴中反應 5 分鐘使酵素失活，經 0.45 μ l 濾膜過濾，經 PITC 衍生以 HPLC 分析 GABA 含量，換算為酵素活性單位 U，其定義為在 40 $^{\circ}$ C 下每小時可產生 1 μ mol GABA 之活性(Zhang et al., 2007)。

(八) 紅豆組成份分析:將紅豆冷凍乾燥後，以磨豆機磨成粉狀，進行組成份分析。

1. 水份：以AOAC(1993)分析方法測定。

精秤1.0000 g紅豆置入已秤重且事先乾燥達恆重之坩鍋中，再將坩鍋加蓋放入烘箱以 105 $^{\circ}$ C 乾燥 24 小時。取出坩鍋置於乾燥皿中，待溫度降至室溫秤其重量，直到恆重為止，此時減去的重量即為水分含量。

$$\text{水分(\%)} = 100 \times (W_1 - W_2) / (W_1 - W_0)$$

W_0 ：坩鍋恆重(克)

W_1 ：坩鍋 + 樣品重量(克)

W_2 ： W_1 乾燥至恆重的重量(克)

2. 粗脂肪含量：依AOAC(1993)分析方法測定。

將圓底燒瓶置於烘箱中，經 105 $^{\circ}$ C 烘乾後恆重，秤其重量(X_1)，取適量樣品(重量： S)放入圓筒濾紙內，加一層薄脫脂棉，放入98 $^{\circ}$ C烘箱2~3小時，除去水份，將圓筒濾紙放入萃取器中，加入約200 ml之乙醚，於60 $^{\circ}$ C熱水浴中迴流萃取16小時，取下冷凝管，將圓底燒瓶於於98 $^{\circ}$ C烘箱烘乾至恆重 X_2 。

$$\text{粗脂肪(g/100g)} = [(X_2 - X_1) / S] \times 100$$

3. 粗蛋白質：依AOAC(1993)分析方法測定。

取適量樣品於分解瓶中，加入 2 g K₂SO₄、40 mg CuSO₄ 及 2 ml H₂SO₄，加入沸石加熱分解，直至分解液為無色澄清，繼續加熱1小時，取出冷卻，在未產生沈澱以前，再加入少量蒸餾水混合均勻後進行蒸餾，分解中加入飽和 NaOH混合液，接受器中加入5 ml H₃BO₃飽和溶液，以水蒸氣蒸出氮收集於 H₃BO₃和溶液中，用已標定之 0.02 N HCl溶液滴定。以不添加樣品之滴定值作為空白樣品(blank)。

$$\text{粗蛋白 (g / 100g)} = [(\text{HCl (sample) 滴定ml數} - \text{HCl (Blank) 滴定ml數}) \times F \times 0.00028 \times 6.25 / \text{樣品重(g)}] \times 100$$

F：0.2 N HCl溶液的力價

0.00028：相當於1 ml 0.02 N HCl可滴定之氮量(g)

6.25：含氮係數

4. 灰分含量：依AOAC(1993)分析方法測定。

坩鍋與上蓋洗淨後置於 105°C 烘箱中烘乾，取出置於乾燥皿內冷卻並秤重量為 X₁，精秤紅豆 1g於坩鍋中秤重為X₂，置於灰化爐中，於550°C灰化至樣品成白色或灰白色粉末狀(約需8小時，若灰化不完全，則先取出坩鍋冷卻，加少許蒸餾水潤濕，再繼續灰化至完全)。灰化完全後，使其溫度下降至 100~200°C左右，取出坩鍋，置乾燥器內冷卻，並秤重(X₃)。

$$\text{灰分(g/100 g)} = [(X_3 - X_1) / (X_2 - X_1)] \times 100$$

5. 膳食纖維含量：依AOAC(1993)分析方法測定。

精稱 1.000 ± 0.005 g 樣品，加入fibre assay kit(Megazyme Inc.)套組所附之 MES-TRIS 緩衝液40 mL，再加入 heat-stable a-amylase 50 μl攪拌，蓋上鋁箔後置於 95-100°C水浴震盪 35分鐘。取出冷卻至 60°C，加入 protease 100 μl，於60°C水浴震盪 30分鐘後，加入 5 mL 0.561N HCl 攪拌，並以 NaOH或HCl調整pH 值至4.1~4.8，最後加入 200 μl amyloglucosidase 於樣品中並低速攪拌，再次放入 60°C水浴震盪 30 分鐘，經過抽氣過濾後得到濾液及濾渣。

- (1) 非水溶性膳食纖維(insoluble dietary fiber, IDF)：以預灰化及秤重過裝有砂澡土之坩鍋接收濾渣，經95% 乙醇及丙酮清洗濾渣，並於103°C烘箱烘乾、冷卻、秤重，另測定濾渣中粗蛋白質及灰分含量，將前述濾渣重

量扣除粗蛋白質及灰分含量，為非水溶性膳食纖維含量。

- (2) 水溶性膳食纖維(soluble dietary fiber, SDF)：濾液部分加入4倍濾液重量之 95%乙醇 (60°C)，靜置1小時沉降可性膳食纖維，過濾，以 78%乙醇、95%乙醇、丙酮淋洗後，於103°C烘箱烘乾、冷卻、秤重，另扣除其粗蛋白質及灰分含量，為水溶性膳食纖維含量。
- (3) 將非水溶性膳食纖維含量(insoluble dietary fiber, IDF)加上水溶性膳食纖維含量(soluble dietary fiber, SDF)即為總膳食纖維含量。

6. 總碳水化合物含量：

總碳水化合物 (%) = 100 - 粗脂肪(g/100g) - 粗蛋白(g/100g) - 總膳食纖維含量 (g/100g) - 灰分(g/100g)

(九) 統計分析

各試驗均重複三次，所得之數據以平均值與標準偏差表示，使用SAS套裝軟體(Statistical Analysis System 9.4版, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)進行統計分析，並以鄧肯氏多變域測驗法(Duncan's new multiple range test)進行各試驗組之平均差異顯著分析，當 $p < 0.05$ 時表示各試驗組間具顯著差異。

參、結果與討論

一、浸泡條件對紅豆水分含量之影響

未經任何浸泡處理之生鮮紅豆的水分含量為 13.84%，將紅豆添加 5 倍自來水後置於 4°C、25°C 及 37°C 浸泡 2~60 小時測得水分含量如圖 2.3。在相同溫度條件下浸泡紅豆，浸泡時間增加，水分含量隨之提高，紅豆浸泡 2 小時後水分含量會提高至 16.7 %~21.8 %，於 25°C 或 37°C 浸泡 4 小時後水分含量呈線性增加，當浸泡時間超過 12 小時後趨於平緩，未隨浸泡時間增加而有顯著差異 ($p < 0.05$)，而在 4°C 浸泡的紅豆水分含量則是在浸泡 4~30 小時間呈線性增加，浸泡時間超過 30 小時後趨於平緩。比較不同溫度浸泡紅豆所測得水分含量結果顯示，於 25°C 及 37°C 浸泡之紅豆，水分含量顯著高於 4°C 浸泡之處理組 ($p < 0.05$)，於 25°C 或 37°C 浸泡 12 小時後，紅豆水分含量已高於 60%，且種皮呈現破裂之外觀，於 4°C、25°C 或 37°C 浸泡紅豆 60 小時，水分含量分別可高達 69.1%、72.2% 及 73.5%。

長砂等(2005)將紅豆於 10~60°C 環境下浸泡，發現可以將紅豆的吸水過程分成二個時期，分別為初期吸水期間及減率吸水期間，其分界約在水分含量 60% 左右，浸泡過的紅豆水分含量低於 60% 時，水分含量會隨浸泡時間延長而呈線性增加，當浸泡一段時間，紅豆水分含量超過 60% 後，就進入減率吸水期，水分含量隨時間增加之幅度趨於平緩。於 34°C 浸泡苦蕎，其吸水率顯著高於在 18°C 及 24°C 浸泡的處理組，較高溫度能提高苦蕎吸水速度及吸水率，快速促進苦蕎種子發芽產生 GABA(郭等，2013)。本研究結果發現，紅豆於 25°C 或 37°C 浸泡 12 小時後，水分含量超過 60%，進入減率吸水期，水分含量未再大幅增加於 25°C 及 37°C 浸泡之紅豆，在較低溫度(4°C)浸泡之紅豆，水分含量於浸泡 24 小時後亦開始呈現微幅增加的趨勢，與長砂等人之研究結果相符，其分界點亦在水分含量 60% 左右。具正常大小胚芽的 *Nipponbare* 品種糙米於 35°C 浸泡 24 小時，水分含量約達 35%~36%，具巨胚之 *Haiminori* 品種糙米於 35°C 浸泡 2 小時水分含量即超過 35%，浸泡 24 小時後水分含量高達 43.6%。以生糙米而言，經過浸泡造成原料水分含量增高至 35%~50%，易導致黴菌及細菌滋生(Komatsuzaki et al., 2007)，本研究將紅豆浸泡之過程發現，於 25°C 及 37°C 浸泡 12 小時以上之紅豆，水面上已浮現大量泡沫，應為黴菌及細菌滋生所



致，並伴隨有不良氣味產生，不利於後續加工利用。

二、浸泡條件對紅豆生菌數之影響

紅豆經過自來水清洗3次後，生菌數約為1.30 log cfu/g，浸泡過程中隨紅豆生菌數會隨時間增加而呈現略微上昇的趨勢，當浸泡溫度愈高，所測得生菌數含量亦顯著較高，於4°C、25°C及37°C浸泡60小時之紅豆生菌數可分別達到3.4 log cfu/g、8.9 log cfu/g及11.1 log cfu/g(圖2.4.)。除了浸泡4小時的處理組之外，於37°C浸泡之紅豆生菌數含量均顯著高於25°C浸泡之處理組 ($p < 0.05$)，紅豆於25°C浸泡12小時後，生菌數即超過 5 log cfu/g，在37°C浸泡12小時的紅豆，生菌數更超過 7 log cfu/g，種皮已開始破裂並出現酸味。

豆類在浸泡過程中會有多種微生物生長，包括乳酸桿菌、大腸桿菌群和酵母菌，浸泡溫度會影響出現的菌相，將蠶豆、豌豆、雞豆和大豆於 20°C 浸泡，除大腸桿菌群和酵母菌外，並檢測出*Lb. casei*及*Staphylococcus epidermidis*，於30°C 浸泡則測得*Lb. casei*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus dysgalactiae*和*Staphylococcus epidermidis*，這些菌相主要來自原料中的微生物，在浸泡過程中開始發酵，並造成腐敗(Ashenafi and Busse, 1991)。

本研究為提高紅豆GABA產量，並利於後續加工應用，將紅豆於不同溫度及時間下浸泡，長時間浸泡易因微生物的生長造成植物種子的腐敗，學者研究發現，植物種子在浸泡前或浸泡過程中經過滅菌處理可減少長時間浸泡引起微生物滋生所造成的腐敗，Bai等人(2009)將小米種子於浸泡前先經 1%次氯酸鈉溶液浸泡30分鐘進行表面殺菌，再經長時間浸泡，以避免發生腐敗。糙米浸泡前先經 70%酒精清洗1分鐘再使用含 1.2%有效氯之次氯酸鈉處理 5分鐘可減少細菌污染(Liu et al., 2005)；此外，糙米浸泡前以超音波對種子進行表層清洗，浸泡過程中結合 0.6 ppm O₃與循環水的紫外線滅菌流程，可有效控制浸泡水之總生菌數(洪，2006)，在粳米浸泡前先使用電解的酸性水或鹼性水進行沖洗，亦有助控制浸泡過程之細菌生長(張等，2006)；上述方法中，直接使用殺菌劑浸泡，易造成殺菌劑於原料表面殘留，有安全上的疑慮，使用超音波、紫外線滅菌或電解水雖不致有殘留問題，但會增加生產成本。

依據衛生福利部(2012)食品類衛生標準，對於需經調理(包括清洗、去皮、加熱、煮熟等)始可供食用之一般食品儘限定不得有腐敗、不良變色、異

臭、異味、污染、發霉或含有異物、寄生蟲，未明定其微生物限量。在本研究的試驗組中，紅豆於4°C浸泡60小時測得生菌數含量不致有食品安全疑慮，於25°C及37°C浸泡8小時，生菌數約可維持 5 log cfu/g以下，浸泡時間超過8小時，則生菌數偏高，不適加工。由於本研究使用原料紅豆於浸泡等前處理後，尚需製成紅豆乳，再經高溫殺菌及接種益生菌發酵，綜合安全性及成本之考量，於浸泡過程中不再另外採行殺菌措施。

三、浸泡條件對紅豆浸泡液 pH 值之影響

不同溫度浸泡處理對紅豆浸泡液pH值之改變情形如圖2.5。結果顯示，浸泡溫度愈高，浸泡時間愈長，pH值下降幅度愈多；紅豆浸泡處理前，浸泡液pH值約為7.3，於4°C、25°C及37°C浸泡紅豆60小時，浸泡液pH值分別下降至5.5、4.3及4.1。將紅豆於37°C浸泡8小時，浸泡液pH值下降至5.8，於25°C浸泡24小時，浸泡液pH值亦可降至5.9，於4°C浸泡紅豆，其浸泡液pH值下降幅度較緩，在浸泡30小時後降至5.8，浸泡60小時後pH值仍維持於5.5左右。

劉等(2015)將大豆以3倍體積水浸泡後，於室溫(約25°C)浸泡12小時，每3小時取浸泡液測菌落總數，並依菌落形態和鏡檢結果進行分離純化，鑑定浸泡液中主要存在微生物包括*Empedobacter brevis*、*Enterobacter aerogenes*及*Lc. lactis*，將前三株菌分別接種於豆漿中，會於培養9小時後使pH值顯著下降，且黏度增加，由於微生物生長使脂肪分解成脂肪酸，以及使碳水化合物分解成有機酸，使豆漿pH值下降。

由於本研究在浸泡前並未採行殺菌措施，紅豆採收後接觸之微生物及浸泡用水所含微生物，於浸泡過程中易大量繁殖，再加上紅豆提供澱粉、蛋白質等營養成分，促進微生物生長，並將大分子的澱粉、蛋白質降解，造成pH值下降。

四、浸泡條件對紅豆花青素含量之影響

紅豆於不同溫度下浸泡不同時間對花青素含量之影響如圖 2.6。未經任何浸泡處理的紅豆原料，其花青素含量為 1.13 $\mu\text{mole/g}$ ，於 4°C、25°C 及 37°C 浸泡紅豆，其花青素含量皆隨浸泡時間延長而減少，其中又以在 37°C 浸泡之紅豆，其花青素含量下降幅度最大，在相同浸泡時間下，37°C 浸泡之紅豆花青素含量與在 4°C 及 25°C 浸泡的紅豆相比顯著較低($p < 0.05$)，於 4°C 及 25°C 浸泡 4

小時之紅豆，花青素含量與未經浸泡的紅豆相比並無顯著差異($P > 0.05$)，浸泡超過 8 小時之後，於 25°C 浸泡之紅豆花青素含量顯著低於 4°C 浸泡的紅豆($P < 0.05$)，於 4°C、25°C 及 37°C 浸泡 8 小時之紅豆花青素含量分別為 1.10 $\mu\text{mole/g}$ 、1.06 $\mu\text{mole/g}$ 及 0.85 $\mu\text{mole/g}$ ，花青素含量較未經浸泡處理之紅豆減少約 2.7%、6.2% 及 24.8%。

儲存條件會影響紅豆花青素含量，在室溫或 4°C 條件下儲存高雄 6 號、高雄 7 號紅豆，隨著貯存時間增加，花青素含量有增加之趨勢，高雄 8 號紅豆花青素含量於室溫下隨貯存時間增加則無明顯之改變(陳等，2008)。植物種子的有色外膜含有豐富的花青素，花青素為水溶性天然色素，在加工應用上容易受到 pH 值、溫度、氧氣、醣類及金屬離子等影響而發生降解(Amarowicz and Pegg, 2008)，浸泡過程可能使得部分花青素溶出，加上紅豆浸泡過程中啟動種子發芽，酵素作用也可能導致紅豆中的花青素降解而使得花青素含量降低。

五、浸泡條件對紅豆總酚含量之影響

浸泡條件對紅豆總酚含量的影響如圖 2.7。未經浸泡處理的紅豆總酚含量為 14.85 mg GAE/g DW，於 37°C 浸泡紅豆，總酚含量於第 2 個小時開始顯著增加($P < 0.05$)，並在浸泡 8 小時時達到最高值 18.04 mg GAE/g DW，較未經浸泡紅豆增加約 21.5%，直至浸泡 30 小時後顯著下降，於 37°C 浸泡 60 小時之紅豆，其總酚含量與未經浸泡紅豆並無顯著差異($p > 0.05$)；於 4°C 及 25°C 浸泡紅豆 2~24 小時，在相同浸泡時間下，總酚含量顯著低於 37°C 浸泡的紅豆。於 4°C 環境下，紅豆浸泡 36 小時，總酚含量達 15.26 mg GAE/g DW，在 25°C 環境下，紅豆浸泡 24 小時，總酚含量達 16.86 mg GAE/g DW。

未經加水浸泡儲存紅豆，總酚含量會隨儲存時間增加而下降，於室溫儲存 6 個月，高雄 8 號紅豆總酚由 16.43 mg/g, as gallic acid 下降至 13.19 mg/g, as gallic acid (陳等，2008)，減少約 20%。在水分存在下，則出現不同結果，大豆、白鳳豆、綠豆、花生在提供充分水分條件下，經過 5 天發芽後，總酚含量可增加 2 倍以上，花生發芽期間會生成大量白藜蘆醇(resveratrol)，大豆發芽過程中主要生成的酚類是黃酮類(flavonoids)，綠豆、紅豆、黑豆及白鳳豆發芽生成之酚類以酚酸(phenolic acids)為主(Khang et al., 2016)。紅豆在 25°C 浸泡 24 小時，期間每 2 小時換一次水，再於 25°C、100% RH 環境下發芽 12 小時，總

酚含量增加 52.75%，發芽 24 小時之總酚含量較 12 小時的處理組再增加 27.83 % (羅與王，2015)。加工條件對豆類中存在的酚類化合物形態有很大影響，浸泡是豆腐、豆漿等豆類食品的生產中的必要步驟，有助脫殼和後續研磨加工，在豆類浸泡過程中，一部分糖基化合物(glycosilated compounds)水解成為其配糖基(aglycones)，進一步合成酚類化合物，豆類經過浸泡有利於提升其酚類化合物含量(María Landete et al., 2015)。

本研究將紅豆經浸泡處理可提高總酚含量，與前述研究結果相似，紅豆於 37°C 浸泡 8 小時，總酚含量增加 21.5%，顯示紅豆浸泡過程中進行代謝，並活化種子內的酵素作用，產生大量熱量和新的化合物，其中也包括酚酸類化合物 (Khang et al., 2016)。

六、浸泡條件對紅豆 GABA 含量及 GAD 活性之影響

紅豆於不同溫度下浸泡，其 GABA 含量變化如表 2.2。於 4°C 下浸泡，紅豆 GABA 含量會隨浸泡時間延長而增加，浸泡 48 小時可使紅豆 GABA 含量提高至 68.17 mg/100g，將浸泡時間增加至 60 小時，GABA 含量並不會顯著提高；紅豆於 25°C 浸泡 36 小時，GABA 含量可達 73.90 mg/100 g，延長浸泡時間至 48 小時以上，反而使 GABA 含量下降；於 37°C 浸泡之紅豆，浸泡 8 小時 GABA 含量即可達 90.27 mg/100 g，遠高於 25°C 及 4°C 浸泡之所有處理組，將浸泡時間延長至 24 小時，GABA 含量更增加至 93.35 mg/100 g，而後呈現下降的趨勢。

植物種子中 GABA 的含量受 GAD 活性影響，GAD 主要位於細胞質中，其活性受到細胞環境 pH 調節，在正常發育條件下，植物中的 GAD 活性較低，當細胞處於大於正常生理 pH 環境下，GAD 之 C 端的鈣調素結合結構區(calmodulin binding domain, CMBD)可與攜鈣蛋白(Calmodulin)緊密結合，調控其活性，進而促進 GABA 生合成(Gut et al., 2009)，GAD 最適 pH 值約為 5.8 (Johnson et al., 1990)，當植物細胞質之 pH 值降低時有助提高 GAD 活性，但在合成 GABA 過程中，需消耗 1 個質子並會提高 pH 值，若能維持環境 pH 值於微酸性時有利於 GABA 生成(Kinnersley and Turano, 2000)，另一方面，在 GABA shunt 中， γ -胺基丁酸轉胺酶(GABA transaminase)之最適 pH 為 8.9，降低細胞質的 pH 值可抑制轉胺作用消耗 GABA 之反應(陳，2006)。

另一方面，種子在浸泡過程中受到微生物生長影響，分解醣類及蛋白

質，對環境pH值造成改變，而影響GAD活性及提升GABA的能力。以水浸泡糙米胚芽，累積GABA最適合之溫度為40°C，最適合pH為5.5，將浸泡液pH提高，會使GABA累積停止或變緩(Saikusa, et al., 1994)，降低細胞質pH可提高蘆筍葉肉及甘筍細胞懸浮液中GABA含量，在15秒內可使GABA增加2-3倍(Crawford, Bown, Breitzkreuz, & Guinel, 1994)。對照本研究紅豆浸泡液pH值分析結果，紅豆於37°C浸泡8小時、於25°C浸泡24小時或於4°C浸泡30小時，環境pH值較有利於GABA累積。

綠豆經過浸泡24小時，GABA含量可提高6倍，綠豆中的儲存蛋白質開始部分分解，並活化GAD將分解所得的麩胺酸轉換成GABA(Tiansawang et al., 2014)；大豆種子_在10~40°C條件下浸泡，GABA含量在30~40°C增加幅度為最高，隨浸泡時間延長，GABA含量隨之增加，但浸泡時間超過12小時後，GABA含量呈現些微下降，顯示將浸泡時間拉長，GABA含量並不會呈比例增加(Kwon et al., 2007)；糙米於35°C浸泡3小時後，GABA含量可提高3倍，將浸泡時間延長至4小時後，GABA含量反而下降(Komatsuzaki et al., 2007)；高溫浸泡有利於提升苦蕎中GABA含量，以34°C浸泡苦蕎20小時，所生成GABA含量較18°C浸泡的苦蕎高出1.19倍(郭等，2013)；將不同品種泰國米於40°C浸泡1小時，GABA增加速率高於浸泡2~4小時之處理組，其指出浸泡初期，米胚芽中GABA的快速累積是因為大量消耗麩胺酸所致，當環境中存在愈多麩胺酸，GABA產量愈多(Varayanond et al., 2005)。本研究發現，提高浸泡溫度，紅豆可產生較多GABA，與前人研究結果相符，於37°C浸泡8小時可產生GABA約90.27 mg/100g，較未經浸泡處理的紅豆，增加GABA含量約13倍，顯示加工前先經適當條件浸泡可有效提高紅豆中GABA含量。

不同溫度浸泡紅豆對GAD活性的影響如表 2.3。在相同浸泡時間條件下，浸泡溫度愈高，測得GAD活性亦愈高，紅豆於37°C環境浸泡8小時，GAD活性可達59.5 U g⁻¹ DW，浸泡時間拉長至24小時後，GAD活性開始下降；將紅豆於25°C環境下浸泡，第36小時所測得之GAD活性最高(59.5 U g⁻¹ DW)，浸泡時間再延長，則GAD活性呈現下降趨勢；將紅豆於較低溫度下(4°C)浸泡，其GAD活性隨處理時間延長而提高，直至浸泡48小時後下降。

GAD活性主要受麩胺酸的可利用性影響，酵母的GAD活性隨基質(麩胺酸)

濃度的增加而呈線性增加，糙米胚芽的GAD活性取決於基質濃度，並在麩胺酸濃度50-100 mM時，GAD活性達到最高(Bai et al., 2009)；一般細胞內GABA的主要生合成途徑是將L-麩胺酸(L-glutamic acid; Glu) 經細胞質中的麩胺酸脫羧酶及及輔酶(pyridoxal-5-phosphate; PLP) ，進行 α -脫羧作用而生成，紅豆發芽過程中麩胺酸受到GAD活性上升而轉化成GABA的速率增加，因此造成其濃度的下降及GABA含量的上升(鄒等，2012)。比較本研究中紅豆於不同溫度條件下浸泡時間對GABA產量及GAD活性的影響，發現在37°C環境下，GAD活性在浸泡前8小時呈現線性增加，而後平緩，甚至在浸泡36小時後小幅下降，與GABA含量在浸泡2-8小時急速增加，8-24小時趨於和緩，而後漸漸減少之趨勢相符，25°C及4°C浸泡的試驗組亦呈現類似的情形，可知紅豆在浸泡過程中GABA的產生與GAD活性有緊密連結。

綜上而論，於37°C浸泡紅豆對提高GABA含量之效果顯著優於在25°C及4°C下浸泡之紅豆，所需提高GABA含量的前處理時間最短，故選擇以37°C作為浸泡紅豆之最適溫度條件；浸泡過程對GAD活性的影響趨勢與GABA生成量相似，於37°C環境浸泡紅豆24小時，GAD活性可達最高(61.48 U g⁻¹ DW)，GABA含量可由6.81 mg/100 g 提高至93.35 mg/100 g，增加約13.7倍，然而在此條件下生菌數卻也高達7.8 × 10⁸cfu/g，並出現酸敗味，在不經任何殺菌劑或殺菌手段處理下，實難直接進行再加工，若將浸泡時間縮短為8小時，則GABA產量仍有90.27 mg/100 g，麩胺酸脫羧酶活性為59.47 U g⁻¹ DW，而生菌數僅有2.7 × 10⁵cfu/g，無異味出現，較適合作為後續加工使用，故本研究選擇將紅豆浸泡於37°C、8小時作為最適浸泡條件並進行下一階段之試驗。

七、冷凍解凍對紅豆花青素含量之影響

紅豆於37°C環境下浸泡8小時測得花青素含量為0.85 μmole/g，進一步置於-4°C、-20°C或液態氮冷凍12~48小時，花青素含量分別下降20.0%~31.8%、7.1~23.5%及2.4%~20%(圖2.8.)，以液態氮冷凍12小時的紅豆，花青素含量維持0.83 μmole/g，與未冷凍前紅豆花青素含量無顯著差異($p > 0.05$)；經37°C浸泡處理的紅豆於液態氮冷凍，其花青素含量優於-20°C冷凍之紅豆，於-4°C冷凍之紅豆花青素含量最低。將冷凍後的紅豆於室溫下解凍12-24小時，花青素含量均呈現下降趨勢，解凍時間愈長，花青素含量下降愈多，其

中經過-4°C 冷凍 48 小時再於室溫解凍 24 小時的紅豆，花青素含量僅有 0.42 $\mu\text{mole/g}$ ，較未經冷凍解凍處理的紅豆，花青素含量減少了 50.6%。

草莓以液態氮冷凍 6 個月再經 20°C 解凍 20 小時或微波解凍 5 分鐘，其原花青素(proanthocyanidins)和花青素會降解，經過抗壞血酸預處理，可保留 3.9~27.5%的花青素，使用液態氮冷凍保存併用抗壞血酸預處理，其花青素幾乎可以被保留(Oszmiański et al., 2009)。低於-20°C 以下急速冷凍能在短時間內通過最大冰晶生成帶(zone of maximum ice crystal formation)，形成小的冰晶，對食物結構有較小的物理損傷，提供品質優勢(James et al., 2015)，相較之下-4°C 冷凍，處於最大冰晶生成帶溫度範圍，容易形成大冰晶而破壞花青素結構，本研究中經液態氮冷凍之紅豆可以保留較多花青素，與前人研究結果相符，顯示冷凍處理溫度愈低，花青素保留效果愈好，應與冷凍過程中冰晶形成大小有關。

八、冷凍解凍對紅豆總酚含量之影響

紅豆於 37°C 浸泡 8 小時測得總酚含量為 18.04 mg GAE/ g DW，進一步置於-4°C、-20°C 或液態氮冷凍 12~48 小時，總酚含量分別下降 19.0%~44.0%、8.8~39.9%及 6.4%~18.8%，顯示冷凍處理使紅豆總酚含量顯著降低($p < 0.05$)，其中以液態氮冷凍之紅豆總酚含量減少幅度最少，-20°C 冷凍處理次之，以-4°C 冷凍紅豆測得之總酚含量下降幅度最多，經冷凍 48 小時後總酚含量僅有 9.94 mg GAE/ g DW (圖 2.9.)。將冷凍處理的紅豆於室溫下解凍 12~24 小時，總酚含量會進一步減少，解凍時間愈長，總酚含量下降愈多，於-4°C 冷凍 48 小時再於室溫解凍 24 小時的紅豆，總酚含量僅有 8.37 mg GAE/ g DW，較未經冷凍解凍處理的紅豆，總酚含量減少了 53.6 %。

新鮮覆盆莓採收後以液態氮處理 15 分鐘，以聚乙烯袋密封再置於-20°C 冷凍儲存 12 個月，總酚含量未有顯著改變，依品種不同，冷凍處理後總酚含量微幅增加 5~13%，環境特徵、收穫週期、栽培變異性及果實成熟度都會影響果實在冷凍過程中總酚含量的變化(de Ancos et al., 2000)；甘藍葉於-20°C 冷凍 48 小時，再於室溫解凍 4 小時，總酚含量並不受冷凍及解凍過程影響而下降(Kaulmann et al., 2016)，草莓經液態氮冷凍 6 個月再經 20°C 解凍 20 小時或微波解凍 5 分鐘，依品種不同，其多酚含量損失率約 4.5~33.6%，較傳統冷凍保存有較高的保留率(Oszmiański et al., 2009)。本研究中紅豆經浸泡後，再於不

同條件下冷凍解凍處理，其總酚含量變化趨勢與花青素含量相似，隨冷凍及解凍時間增加呈現下降趨勢，與前人研究結果略有不同，推測應為蔬果與紅豆原料性質不同所造成之差異，蔬果原料中含較高糖質成分及抗壞血酸，在冷凍過程中對於酚類化合物有保護作用，而本研究所採用之紅豆所含抗壞血酸及其具冷凍保護作用之糖質成分低於蔬果原料，故在冷凍過程中因冰晶形成造成酚類化合物的氧化或降解致使總酚含量下降。

九、冷凍解凍對紅豆 GABA 含量及 GAD 活性之影響

將紅豆於 37°C 浸泡 8 小時後瀝乾，再置於 -4°C、-20°C 或液態氮冷凍 12~24 小時再經解凍處理，GABA 含量變化如表 2.4。紅豆經浸泡後，再置於 -4°C 及 -20°C 冷凍處理可以顯著提高 GABA 含量 ($p < 0.05$)，冷凍時間愈長，GABA 含量隨之增加；經液態氮處理之紅豆，與未經冷凍之浸泡紅豆相比 GABA 含量卻未有顯著提昇，僅有 89.99 mg/100 g~90.17 mg/100 g，所有經過冷凍的處理組中，以 -20°C 冷凍 48 小時之紅豆 GABA 含量增加最多，達 118.92 mg/100 g，置於 -4°C 冷凍之紅豆次之，經 48 小時處理，GABA 含量增加至 138.39 mg/100 g。冷凍過之紅豆於室溫下再經解凍，對於 GABA 含量提高亦有顯著效果，且解凍 24 小時之處理組 GABA 累積量高於解凍 12 小時之處理組，經解凍 24 小時可使 GABA 含量較未解凍前增加 10.8~37.8%，浸泡過之紅豆經 -20°C 冷凍 48 小時再於室溫解凍 24 小時，GABA 含量由 118.92 mg/100 g 提高至 154.51 mg/100 g，為所有經解凍處理組中為最高；-4°C 冷凍之紅豆於室溫解凍 24 小時後，GABA 含量為 138.39 mg/100 g，略低於 -20°C 冷凍之處理組；以液態氮冷凍之紅豆，經室溫解凍 12 小時對 GABA 含量並無顯著影響，將解凍時間延長至 24 小時，GABA 含量小幅增加至 114.95 mg/100 g，遠不及 -4°C 及 -20°C 冷凍再置於室溫解凍之紅豆。

浸泡後之紅豆再經冷凍處理，可提高 GAD 活性(圖 2.10.)，於 -20°C 冷凍處理之紅豆的 GAD 活性顯著高於 -4°C 冷凍處理組，而冷凍時間愈長，GAD 活性亦相對提高，經 -20°C 冷凍 48 小時之紅豆，GAD 活性可提昇至 79.22 U g⁻¹ DW，惟經液態氮處理之紅豆，GAD 活性反而急速下降至低於 30 U g⁻¹ DW，延長冷凍時間，GAD 活性並未能有效提昇 ($p > 0.05$)。冷凍後之紅豆再於室溫解凍，可促進 GAD 活性增加，在 0~24 小時解凍過程中，延長解凍時間有助提

高 GAD 活性，於 37°C 浸泡紅豆 8 小時，再經 -20°C 冷凍 48 小時後，於室溫解凍 24 小時，可使 GAD 活性提高至 101.66 U g⁻¹ DW；解凍處理對於經液態氮冷凍之紅豆的 GAD 活性亦有提昇的效果，解凍 24 小時之 GAD 活性顯著高於未解凍及解凍 12 小時的處理組，但相較於其他處理組，其酵素活仍低，只有 44.99 U g⁻¹ DW。

冷凍過程對細胞質造成冷衝擊提昇胞內 Ca²⁺的濃度，此時游離鈣離子與攜鈣蛋白 calmodulin(CaM)結合成 Ca²⁺/CaM，活化 GAD 並促進 GABA 的累積 (Kinnersley and Turano, 2000)。大麥及小麥於 -3°C 冷凍，GABA 含量由 0.023 μmol/g 增加至 0.385 μmol/g，於 -8°C 冷凍 GABA 含量增加為 0.688 μmol/g，GAD 活性受 Ca²⁺/CaM 調節，溫度愈低時 Ca²⁺的匯集效應愈明顯，於 -3°C 冷凍時，冰晶形成量少，而在 -8°C 環境下冷凍，植物種皮內已形成大量冰晶，顯著提昇胞內 Ca²⁺的濃度而有利於 GABA 的累積 (Mazzucotelli et al., 2006)。大豆經過 15°C 浸泡 8 小時後，再分別置於 -4°C、-20°C 及 -32°C 冷凍處理，及於 20°C 及 30°C 環境中解凍，發現降低冷凍溫度及提高解凍溫度有利於 GABA 累積，於 -32°C 冷凍再於 20°C 解凍 24 小時，可使 GABA 含量由 643.7 μg/g 提高至 1914 μg/g，增加近 3 倍 (Kwon et al., 2007)。

本研究之結果亦顯示紅豆浸泡後，再進行冷凍及解凍處理有助提升 GABA 含量；冷凍溫度愈低，累積的 GABA 含量隨之增加，惟使用液態氮冷凍紅豆，在未解凍前，其 GABA 含量並未顯著提昇，對照 GAD 活性分析結果 (圖 2.10.) 可知，將紅豆置於液態氮冷凍，GAD 活性驟降。液態氮為 -196°C 之極低溫液體，經液態氮處理之食品會快速形成許多直徑 1~2 μm 的小冰晶，與 -25°C 冷凍處理所形成 100~300 μm 之大冰晶不同，將食品浸泡於液態氮中，與置於 -25°C 或 -75°C 冷凍處理組相比，酵素活性明顯降低，故短時間的極低溫處理對食品的穩定性是有利的 (Rahman, 2007)。經液態氮處理再解凍 24 小時之紅豆 GAD 活性及 GABA 含量雖略為提高，但仍未達 -20°C 冷凍處理組之水準，顯示以液態氮處理之紅豆在細胞質形成小冰晶對於胞內 Ca²⁺的濃縮作用不如 -20°C 冷凍得到較大冰晶之處理組，減弱 GAD 活性調節作用，且液態氮亦導致酵素活性大量減少，而降低了 GAD 催化生成 GABA 的能力，後續的解凍處理因溫度回昇，啟動酵素活化作用，回復殘餘 GAD 活性，使 GABA 生成量略為提高。

十、紅豆組成分分析

紅豆原料組成分分析結果如表2.5.，粗蛋白質、粗脂肪、灰分及總膳食纖維含量以乾重表示。產自萬丹鄉之紅豆水分含量為13.85%，與產自巴西南部的紅豆(水分含量約為13.07%)差異不大，高於產自泰國的紅豆(水份含量11.57%)。紅豆主要成分以碳水化合物為主，含量約為52.64%，較產自巴西的紅豆低(碳水化合物含量約62.26%)，與產自泰國的紅豆相去不遠(59.08%)；粗蛋白質含量19.58 g/100 g，高於產自巴西(粗蛋白質含量20.30 g/100 g)與泰國(粗蛋白質含量19.91 g/100 g)的紅豆，灰分含量4.86 g/100 g，較產自泰國及巴西的紅豆略低(Gohara et al., 2016; Sai-Ut et al., 2009)，本研究與前人文獻中豆類中組成分的差異應為栽培品種與生長條件不同所致(Sai-Ut et al., 2009)。

紅豆經於37°C 浸泡8小時後，除了水分含量顯著提高($p < 0.05$)、粗蛋白質含量顯著減少($p > 0.05$)外，其餘粗脂肪、灰分、膳食纖維及碳水化合物含量與未經浸泡之紅豆相比，均無顯著差異($p > 0.05$)。浸泡會促進豆類種子內儲藏蛋白分解，以利提供發芽作用所需營養源(Barampama and Simard, 1995)，本研究中紅豆經過37°C、浸泡8小時，粗蛋白質含量顯著下降之原因，應為在水分存在下，微生物繁殖及酵素系統活化，使蛋白質降解為游離胺基酸造成。

肆、 結論

- 一、 紅豆經清洗後添加 5 倍重量自來水，於 4°C、25°C、37°C 浸泡 2~60 小時以篩選 GABA 生成量最高之前處理條件，其中，於 37°C 浸泡 8 小時之紅豆 GABA 含量由 6.81 mg/100 g 增加至 90.27 mg/100 g，較完全未經浸漬處理紅豆提高約 13 倍，GAD 活性由 4.4 U g⁻¹ DW 提昇至 59.6 U g⁻¹ DW，水份含量由 13.8 % 增加至 47.3%，生菌數由 1.30 log cfu/g 增加至 5.44 log cfu/g，紅豆浸泡液 pH 值由 7.3 下降至 5.8，花青素含量由 1.13 μmole/g 下降至 0.85 μmole/g，總酚含量由 14.85 mg GAE/g DW 提高至 18.04 mg GAE/g DW，顯示在高於室溫條件下浸泡，有助活化紅豆中的 GAD，進而提高紅豆之 GABA 含量，浸泡過程中種子的代謝作用，也促進酚類化合物形成，而提高總酚含量，惟浸泡過程，並不利於花青素的穩定作用，造成經過浸泡之紅豆，花青素含量下降。
- 二、 於 37°C 浸泡 8 小時之紅豆，再經 -20°C 低溫冷凍 48 小時並於室溫解凍 24 小時，GABA 含量可增加至 154.51 mg/100 g，較完全未經任何處理之新鮮紅豆高出約 22.7 倍，與浸泡處理後未經冷凍解凍之紅豆相比，僅提高 1.7 倍，冷凍解凍過程使紅豆中花青素含量及總酚含量大幅下降。
- 三、 經浸泡過之紅豆再經冷凍處理，製程中需消耗大量能源，且冷凍、解凍處理尚需延長加工時間達 72 小時，卻僅能將紅豆中 GABA 含量提高 1.7 倍，實不符大量生產之經濟效益，本研究選擇將紅豆於 37°C 浸泡 8 小時後，不經冷凍及解凍流程，直接製備成紅豆乳，接種不同益生菌，以探討益生菌發酵作用對提升紅豆乳 γ -胺基丁酸之影響。

表 2. 1. 用於高壓液相層析法及毛細管電泳分析之主要胺基酸衍生劑
Table 2.1. Major amino acid derivative reagents for HPLC and CZE separations

Reagent	Availability of commercial kit	Detection	Detection Pre-/post-separation	Separation technique
Nihydrin ^a	No	Vis	Post-	CEC/TLC
Fluorescamine	No	Fl	Pre- Post-	RP-HPLC CEC
PITC	Yes	UV ^b	Pre-	RP-HPLC CZE
Dabsyl-Cl	Yes	Vis	Pre-	RP-HPLC
Dabsyl-Cl	Yes	Fl/UV	Pre-	RP-HPLC CZE
F-MOC	Yes	Fl	Pre-	RP-HPLC
OPA ^a	Yes	Fl/UV ^b	Pre- Post-	RP-HPLC CZE CEC
OPA/F-Moc	Yes	Fl	Pre-	RP-HPLC
AQC	Yes	Fl ^b	Pre-	RP-HPLC
BQCA	No	LIF	Pre-	CZE

^aIt was also been used for the quantitation of total amino acids without separation.

^bAlso susceptible to electrochemical detection.

PITC: Phenylisothiocyanate

Dabsyl-Cl:4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride

Dansyl-Cl:1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride

F-MOC: 9-Fluorenylmethyl chloroformate

OPA: *o*-phthaldialdehyde

AQC: 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidy carbamate

BQCA: 3-benzoyl-2-quinolinecarboxaldehyde

RP-HPLC: Reversed-phase high-performance liquid chromatography

CEC: cation-exchange chromatography

CZE: capillary zone electrophoresis

TLC: thin-layer chromatography

IP: ion paired

Fl: fluorescence detection

Vis: visible detection

UV: ultraviolet detection

LIF:laser induced fluorescence detection

(Aristory and Toldrá, 2004)

表 2.2. 浸泡溫度及時間對紅豆 GABA 含量之影響

Table 2.2. Effect of soaking temperature and time on GABA content of adzuki beans

Soaking time(hr)	GABA content(mg/100g adzuki bean) ¹		
	4°C	25°C	37°C
2	16.67±1.05 ^{B,f2}	20.52±1.17 ^{A,f}	21.85±1.52 ^{A,g}
4	18.52±0.60 ^{C,f}	27.01±1.48 ^{B,e}	62.11±1.83 ^{A,f}
8	24.57±1.13 ^{C,e}	43.25±0.46 ^{B,d}	90.27±0.78 ^{A,b}
12	34.45±3.57 ^{C,d}	63.98±2.25 ^{B,c}	91.34±1.07 ^{A,ab}
24	58.48±0.85 ^{C,c}	67.16±1.55 ^{B,bc}	93.35±0.97 ^{A,a}
30	64.65±1.54 ^{C,b}	68.80±1.50 ^{B,b}	88.67±1.04 ^{A,b}
36	64.85±1.45 ^{C,b}	73.90±2.60 ^{B,a}	83.40±1.57 ^{A,d}
48	68.17±1.41 ^{B,a}	68.10±1.64 ^{B,b}	85.81±1.58 ^{A,c}
60	69.60±0.50 ^{A,a}	66.85±2.68 ^{A,bc}	70.92±3.00 ^{A,e}

¹GABA content of unsoaking adzuki beans:6.81±0.83 mg/100 g adzuki bean.

²Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different uppercase letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

表 2.3. 浸泡溫度及時間對紅豆麩胺酸脫羧酶活性之影響

Table 2.3. Effect of soaking temperature and time on GAD activity of adzuki beans

Soaking time(hr)	GAD activity(U g ⁻¹ DW) ¹		
	4°C	25°C	37°C
2	11.12±1.11 ^{B,f2}	13.32±0.76 ^{Af}	14.19±0.99 ^{Ag}
4	12.87±1.03 ^{C,f}	17.54±1.15 ^{Be}	39.66±1.37 ^{Af}
8	17.22±1.14 ^{C,e}	28.77±0.93 ^{B,d}	59.48±1.22 ^{A,ab}
12	22.23±1.54 ^{C,d}	41.97±1.42 ^{B,c}	59.73±1.39 ^{A,ab}
24	37.98±1.46 ^{C,c}	44.39±1.08 ^{B,b}	61.49±1.06 ^{A,a}
30	41.71±1.54 ^{C,b}	44.64±1.02 ^{B,b}	57.79±1.02 ^{A,bc}
36	42.78±1.01 ^{C,ab}	47.98±1.69 ^{B,a}	53.92±1.02 ^{A,d}
48	44.60±1.27 ^{B,a}	44.19±1.06 ^{B,bc}	55.98±1.59 ^{A,cd}
60	37.27±0.93 ^{B,c}	43.59±2.02 ^{A,bc}	46.06±1.94 ^{A,e}

¹GAD activity of unsoaking adzuki beans : 4.34±0.08 U g⁻¹ DW.

²Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different uppercase letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

表 2.4. 冷凍及解凍處理對紅豆 GABA 含量之影響

Table 2.4. Effect of freezing and thawing conditions on GABA content of adzuki beans

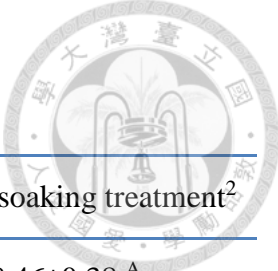
Freezing temperature	Freezing time (h)	GABA content (mg/100g adzuki bean)		
		No thawing	Thawing for 12 hours	Thawing for 24 hours
-4°C	12	96.56±1.60 ^{B,e}	99.26±5.93 ^{B,d}	106.98±3.94 ^{A,e}
	24	104.59±2.88 ^{C,d}	117.11±5.07 ^{Bc}	132.41±5.69 ^{A,c}
	48	113.06±1.33 ^{C,b}	119.34±4.93 ^{B,bc}	138.39±2.64 ^{A,c}
-20°C	12	101.16±2.84 ^{B,d}	119.79±8.26 ^{A,bc}	124.98±5.33 ^{A,d}
	24	106.47±3.25 ^{C,c}	127.19±3.18 ^{B,ab}	146.74±4.90 ^{A,b}
	48	118.92±2.50 ^{C,a}	135.19±4.78 ^{B,a}	154.51±4.15 ^{A,a}
Liquid nitrogen	12	89.99±1.42 ^{B,f}	90.99±2.22 ^{B,d}	107.91±4.12 ^{A,e}
	24	90.70±0.97 ^{B,f}	92.76±2.58 ^{B,d}	108.31±1.42 ^{A,e}
	48	90.17±1.27 ^{B,f}	91.60±1.67 ^{B,d}	114.95±4.80 ^{A,e}

¹GABA content of soaking adzuki beans without freezing and thawing treatment:90.27±0.78 mg/100 g adzuki bean.

²Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different uppercase letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

表 2.5. 紅豆組成成分分析

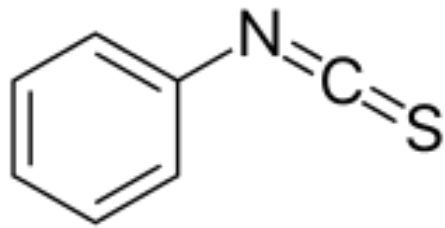
Table 2.5. Proximate composition of adzuki beans



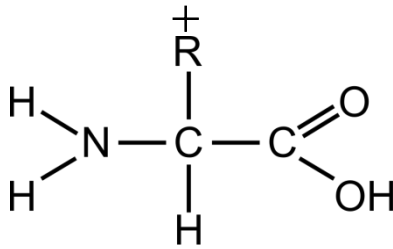
Constituent	Raw beans ¹	After soaking treatment ²
Crude protein(g/100g DW)	19.58±0.52 ^B	18.46±0.38 ^A
Crude fat(g/100g DW)	1.16±0.15 ^A	1.14±0.13 ^A
Crude ash(g/100g DW)	4.86±0.37 ^A	4.94±0.42 ^A
Total dietary fiber(g/100g DW)	21.75±0.81 ^A	21.51±0.36 ^A
Soluble dietary fiber(g/100g DW)	19.82±0.74 ^A	19.64±0.46 ^A
Insoluble dietary fiber(g/100g DW)	1.93±0.11 ^A	1.86±0.10 ^A
Carbohydrate(g/100g DW)	52.64±1.40 ^A	53.96±0.64 ^A

¹Each value represents mean \pm SD (n = 3). Means with different uppercase letters within the same row are significantly different (p < 0.05).

²Soaking treatment: adzuki beans were soaked in five-fold weight of water (w/w) at 37°C for 8 h.

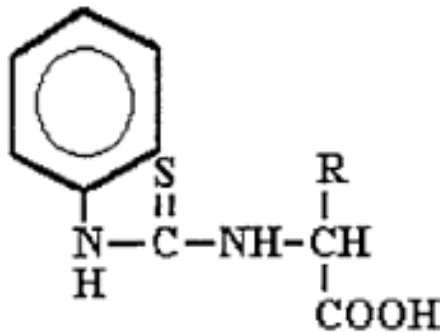


Phenylisothiocyanate, PITC



Amino acid

Alkaline pH



PTC- amino acid

圖 2.1. 胺基酸 PITC 衍生反應圖。

Fig. 2.1. Amino acid derived with phenylisocyanate.

(Sherwood, 2000)

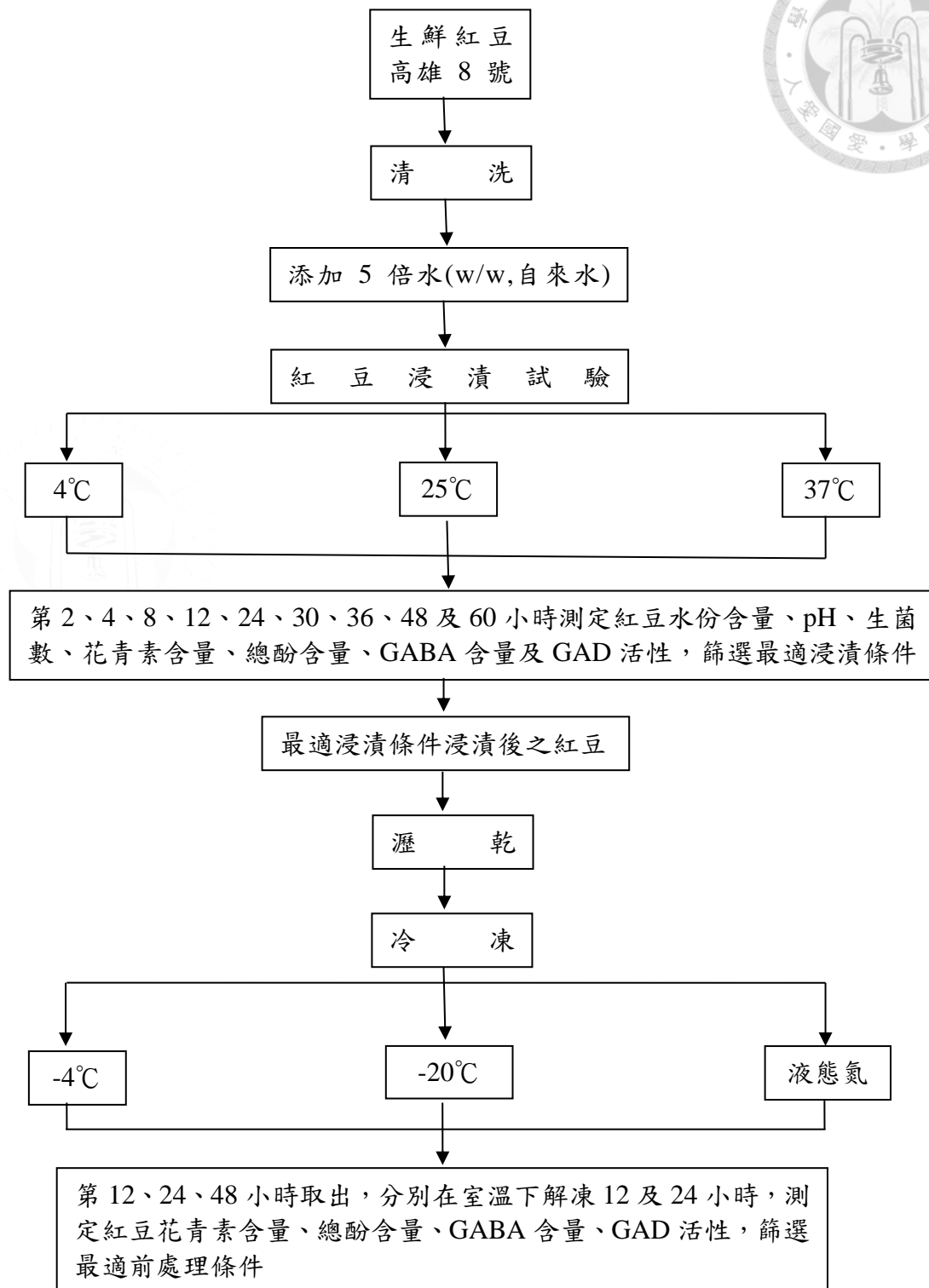


圖 2.2. 實驗架構。

Fig. 2.2. The framework of the study.

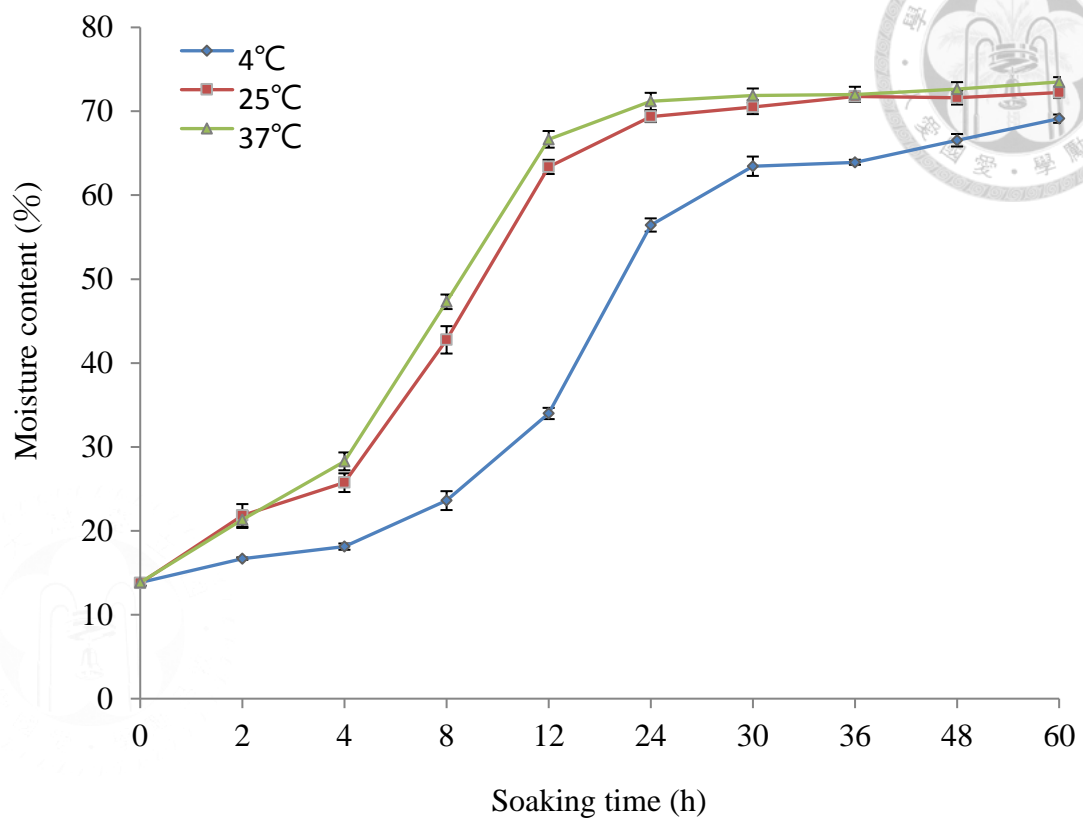


圖 2.3. 浸泡溫度及時間對紅豆水分含量之影響。

Fig. 2.3. Effects of soaking temperature and time on moisture content in adzuki beans.

Each value represents mean \pm SD (n = 3).

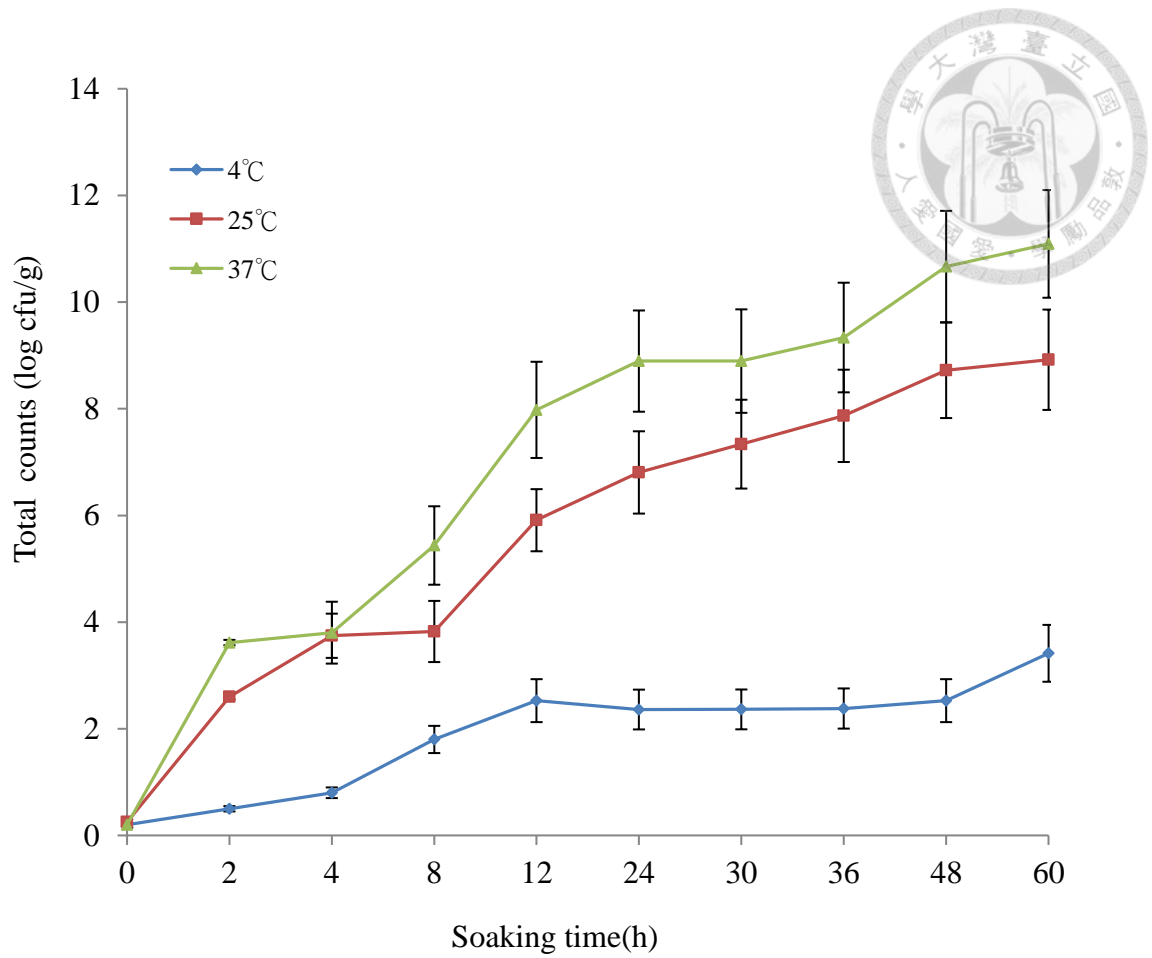


圖 2.4. 浸泡溫度及時間對紅豆生菌數含量之影響。

Fig. 2.4. Effects of soaking temperature and time on total counts of adzuki beans. Each value represents mean \pm SD (n = 3).

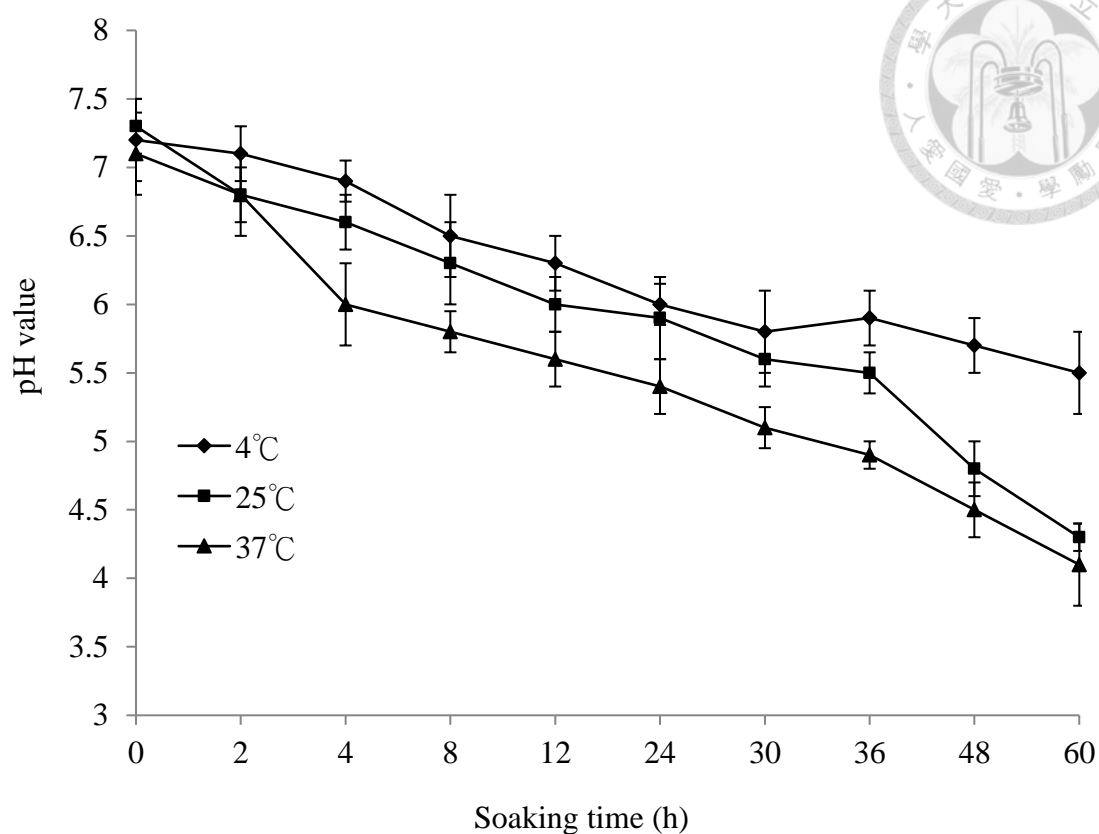


圖 2.5. 紅豆於不同溫度浸泡之浸泡液 pH 值變化。

Fig. 2.5. Effects of different soaking temperature and time for adzuki beans on pH values of soaking solution. Each value represents mean \pm SD (n = 3).

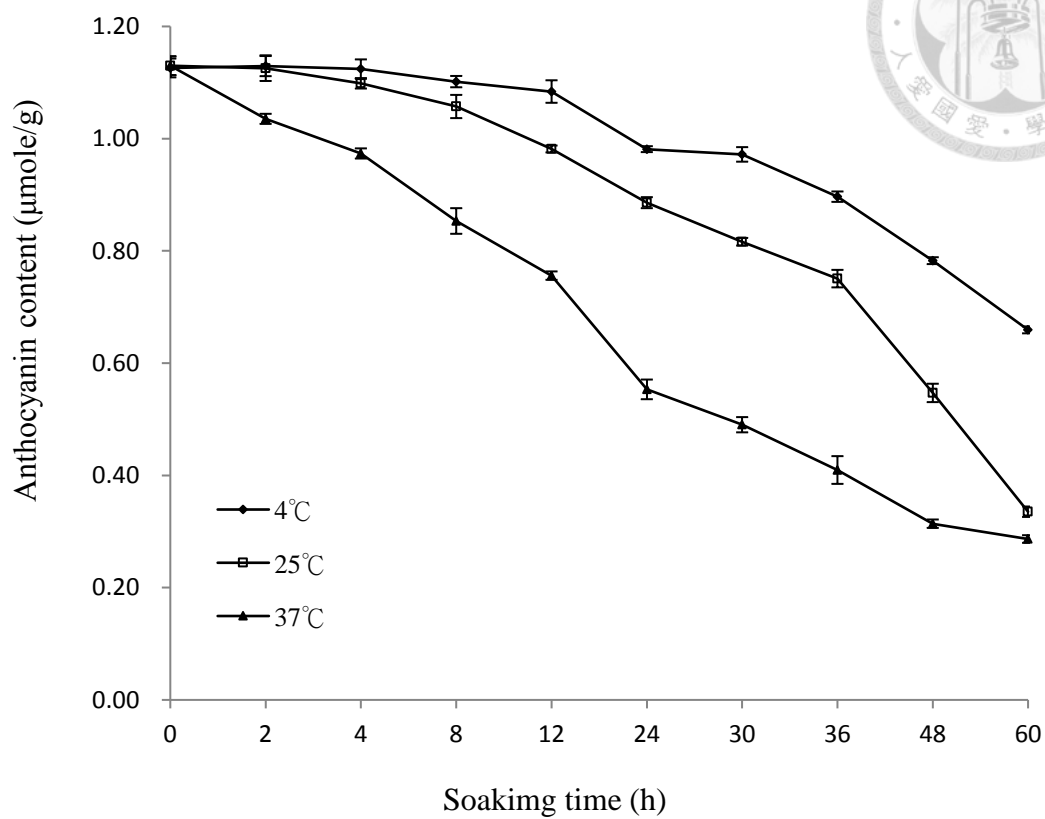


圖 2.6. 浸泡溫度及時間對紅豆花青素含量之影響。

Fig. 2.6. Effects of soaking temperature and time on anthocyanin content in adzuki beans.

Each value represents mean \pm SD (n = 3).

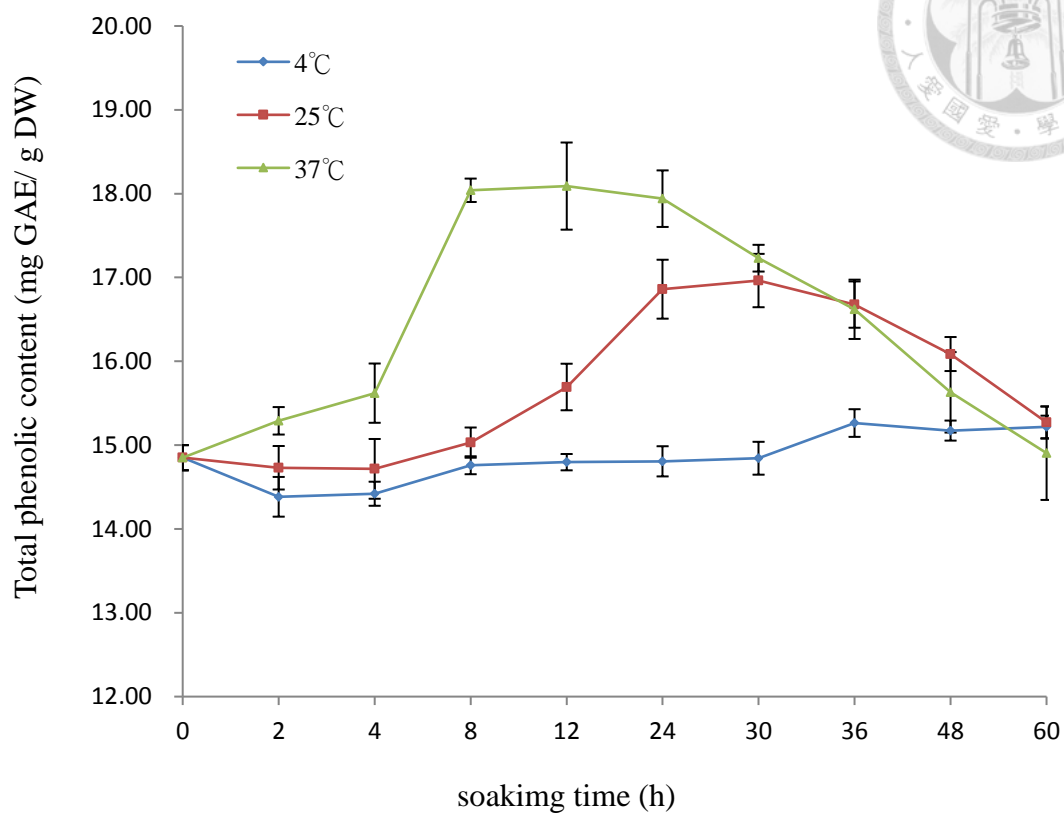


圖 2.7. 浸泡溫度及時間對紅豆總酚含量之影響。

Fig. 2.7. Effect of soaking temperature and time on total phenolic content in adzuki beans. Each value represents mean \pm SD (n = 3).

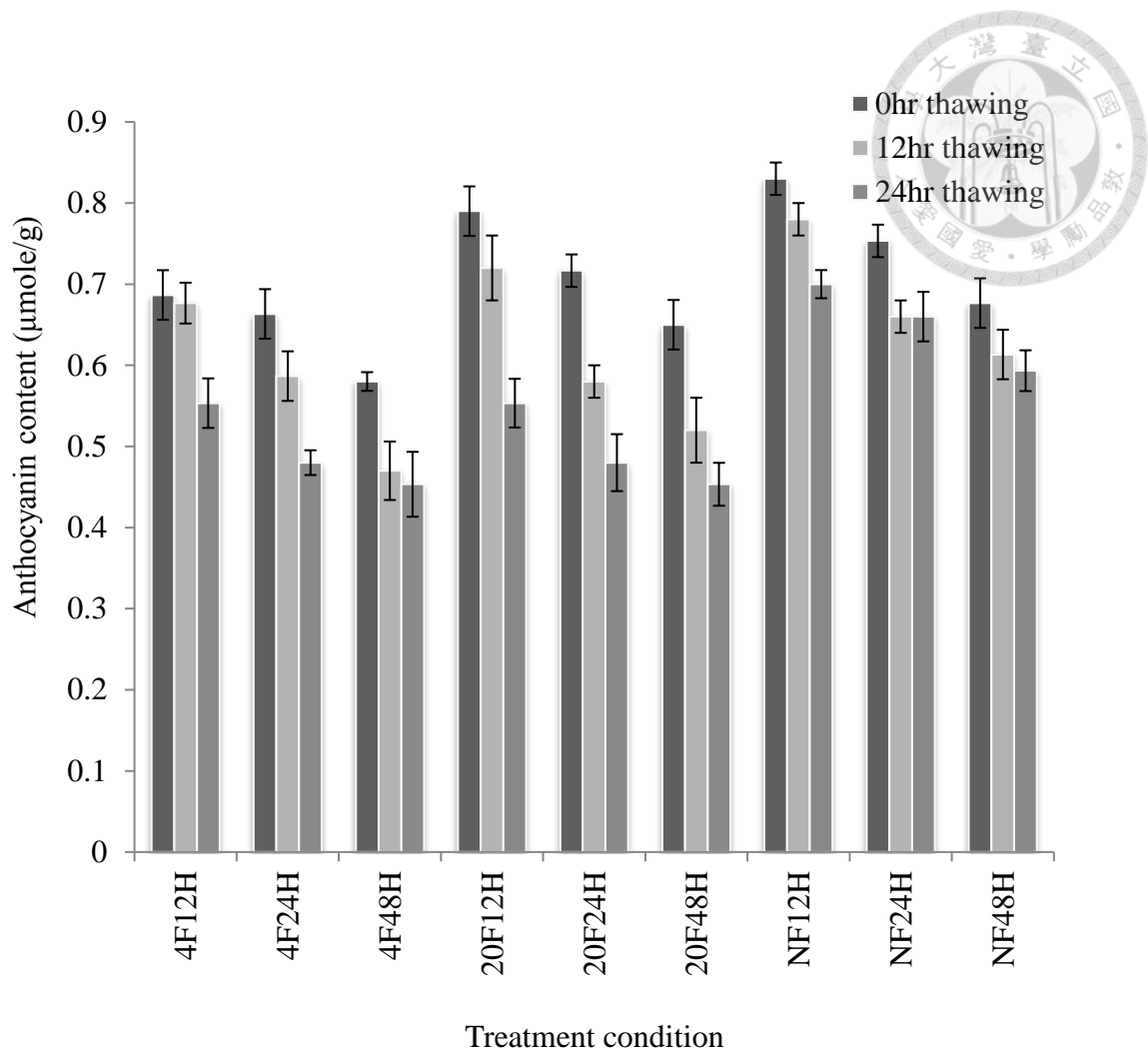


圖 2.8. 冷凍及解凍處理對紅豆花青素含量之影響。

Fig 2.8. Effects of freezing and thawing conditions on anthocyanin content of adzuki beans.

*4F12H : freezing temperature at -4°C for 12 h; 4F24H: freezing temperature at -4°C for 24 h; 4F48H : freezing temperature at -4°C for 48 h; 20F12H : freezing temperature at -20°C for 12h; 20F24H : freezing temperature at -20°C for 24 h; 20F48H:freezing temperature at -20°C for 48 h; NF12H: freezing in liquid nitrogen for 12 h; NF24H: freezing in liquid nitrogen for 24 h; NF48H: freezing in liquid nitrogen for 48 h.

*Anthocyanin content of soaking adzuki beans without freezing and thawing treatment: $0.85 \pm 0.03 \mu\text{mole/g}$.

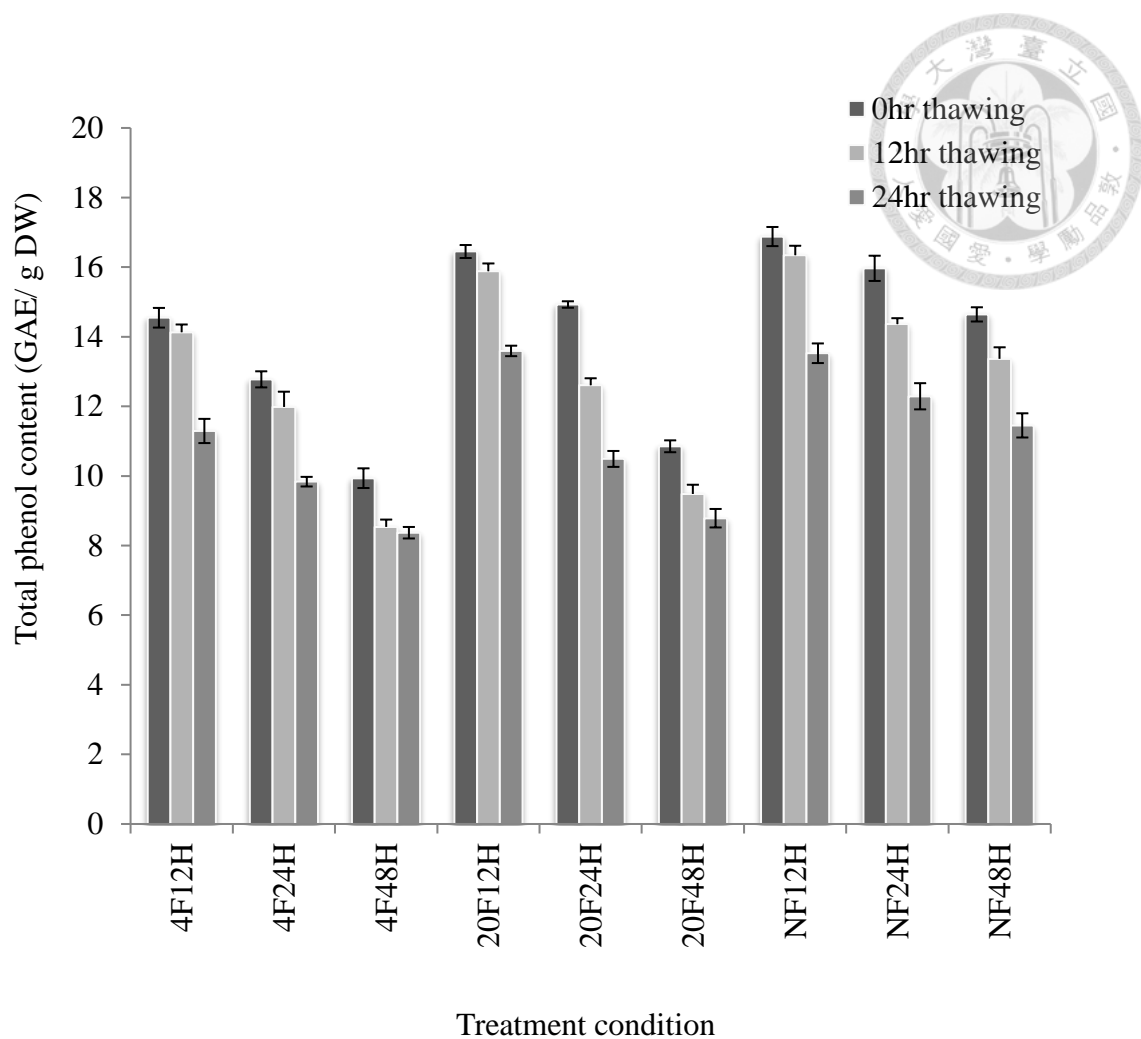


圖 2.9. 冷凍及解凍處理對紅豆總酚含量之影響。

Fig 2.9. Effect of freezing and thawing conditions on total phenol content of adzuki beans.

*4F12H : freezing temperature at -4°C for 12 h; 4F24H: freezing temperature at -4°C for 24 h; 4F48H : freezing temperature at -4°C for 48 h; 20F12H : freezing temperature at -20°C for 12h; 20F24H : freezing temperature at -20°C for 24 h; 20F48H:freezing temperature at -20°C for 48 h; NF12H: freezing in liquid nitrogen for 12 h; NF24H: freezing in liquid nitrogen for 24 h; NF48H: freezing in liquid nitrogen for 48 h.

*Total phenol content of soaking adzuki beans without freezing and thawing treatment :

$18.04 \pm 0.14 \mu\text{mole/g}$.

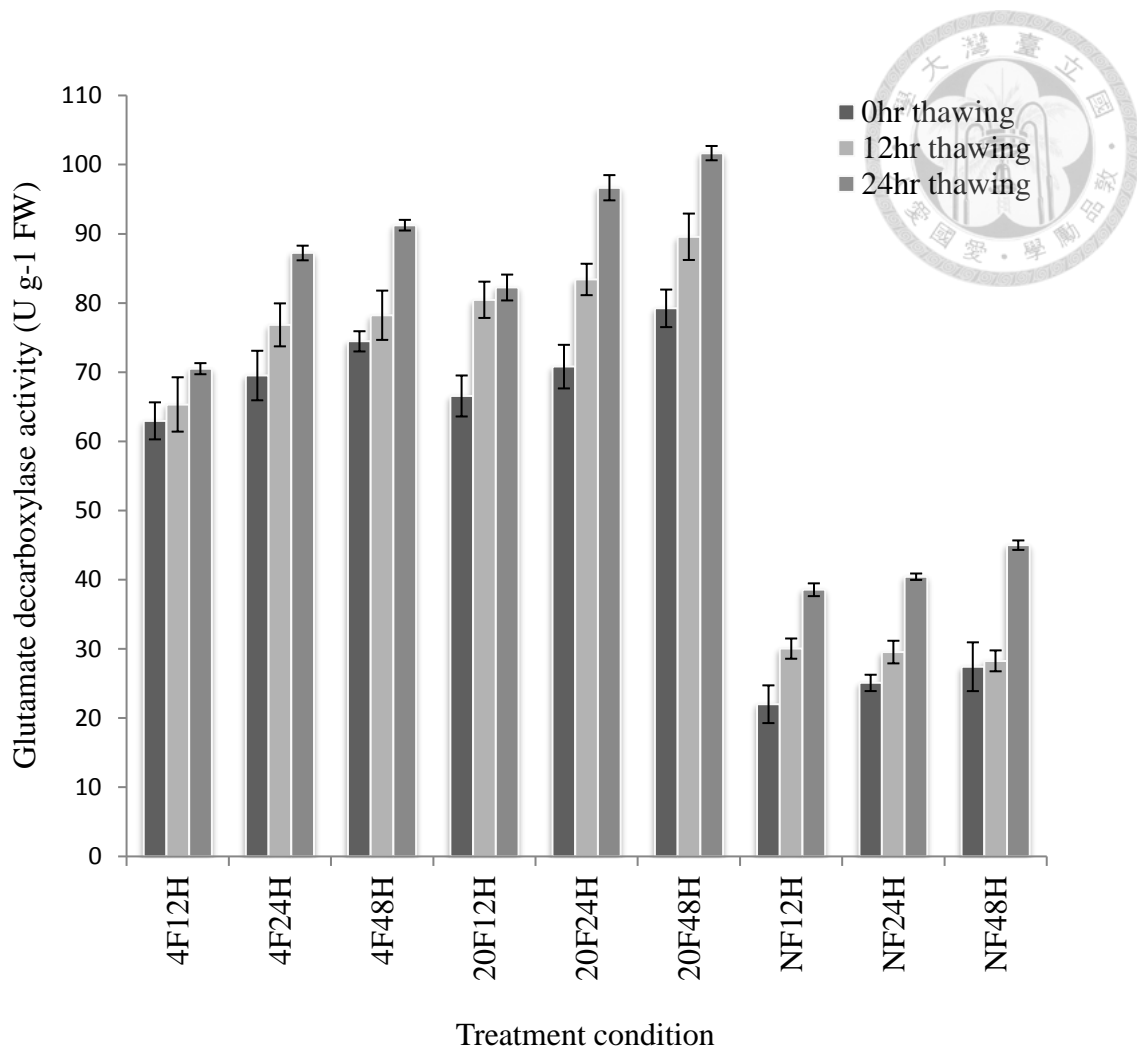


圖 2.10. 冷凍及解凍處理對紅豆麩胺酸脫羧酶活性之影響。

Table 2.10. Effect of freezing and thawing conditions on glutamate carboxylase of adzuki beans.


*4F12H : freezing temperature at -4°C for 12 h; 4F24H: freezing temperature at -4°C for 24 h; 4F48H : freezing temperature at -4°C for 48 h; 20F12H : freezing temperature at -20°C for 12h; 20F24H : freezing temperature at -20°C for 24 h; 20F48H:freezing temperature at -20°C for 48 h; NF12H: freezing in liquid nitrogen for 12 h; NF24H: freezing in liquid nitrogen for 24 h; NF48H: freezing in liquid nitrogen for 48 h.

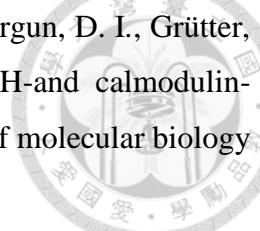
*GAD activity of soaking adzuki beans without freezing and thawing treatment : $59.48 \pm 1.22 \text{ U g}^{-1} \text{ DW}$.

參考文獻



- 白青云、嚴煌倩、陳遷遷、吳佑、趙希榮、趙立，2015。冷脅迫處理對馬鈴薯富集 γ -氨基丁酸的影響。食品科技 40(4)，82-87。
- 衛生福利部，2012。一般食品衛生標準。2016年12月10日，取自，<https://consumer.fda.gov.tw/Law/Detail.aspx?nodeID=518&lawid=93>
- 行政院農業委員會，2016。農業知識入口網-紅豆主題館。2016年12月15日，取自，<https://kmweb.coa.gov.tw/subject/mp.asp?mp=409>。
- 羅羽洵、王倩，2015。發芽和蒸煮處理對4種常見豆類的酚類物質和抗氧化活性的影響。金陵科技學院學報 31(4)，61-66。
- 洪建龍，2006。發芽糙米產製過程中微生物調控及其發酵生理活性產物之探討。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所博士學位論文，臺北市。
- 郭元新、張成孜、程兵、李鳳霞、葉華，2013。苦蕎浸泡過程中 GABA，黃酮的富集其他生理指標的變化。安徽科技學院學報 29(2)，29-33。
- 章立渝，2012。超高效液相色譜法測定食品中的 γ -氨基丁酸。食品工業 33(8)，161-163。
- 陳玉如、周國隆、張憲榮，2008。紅豆品種改良。高雄區農業改良場年報(96年度)，40-47。
- 陳筱慧，2006。利用 HPLC 方法檢測發芽種子，發芽玄米，加碼茶，以及市售 GABA 膠囊中 GABA 含量。中興大學食品暨應用生物科技學系碩士學位論文，臺中市。
- 衛生福利部，2007。一般食品類衛生標準。2016年10月2日，取自，<http://www.fda.gov.tw/tc/newsContent.aspx?id=1747&chk=ccf6f667-bf94-4018-8ba6-759aea940ee1¶m=pn%3D188%26cid%3D3%26chk%3D46552e96-810a-42c3-83e1-bd5e42344633#.WGkI0FN94mk>
- 鄒梅君、梁志弘、何志剛、江文德，2012。紅豆與大豆發芽過程中形成 γ -胺基丁酸之研究。臺灣農業化學與食品科學 50(4)，217-226。
- 劉玲瓏、江玲、劉世家、周時榮、張文偉、王春明，2005。巨胚水稻 W025 糙米浸水後 γ -氨基丁酸含量變化的研究。作物學報 31(10)，1265-1270。
- 劉麗莎、彭義交、鮑魯生、田旭、田曉蓮、白潔、李玉美、郭宏，2015。大豆浸泡

- 
- 過程中腐敗微生物對豆漿品質的影響。食品科學 36(14), 161-164。
- 張燕、魯戰會、李里特、李永玉、李金顯、朱韶娟, 2006。殺菌劑對發芽糙米富集 γ -氨基丁酸的影響。食品科技 31(5), 94-97。
- 長砂太藏、田川彰男、小川幸春、飯本光雄 (2005)。アズキおよびダイズの吸水速度と体積変化。日本食品科学工学会誌, 52(12), 頁 566-571。
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(10), 865-878.
- A.O.A.C. 1993. *Official Methods of Analysis*. 14th Edition, Association of Official Analytical Chemist, USA.
- Aristory, M. C., Toldrá, F., 2004. Amino Acid. In *Hand book of food analysis*. Nollet, L. M.(Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. chap 5, 83-93.
- Ashenafi, M., Busse, M., 1991. The microflora of soak water during tempeh production from various beans. *Journal of Applied Bacteriology* 70(4), 334-338.
- Bai, Q., Chai, M., Gu, Z., Cao, X., Li, Y., Liu, K., 2009. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination. *Food Chemistry* 116(1), 152-157.
- Barampama, Z., Simard, R. E., 1995. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods for Human Nutrition* 48(4), 349-365.
- Crawford, L. A., Bown, A. W., Breitkreuz, K. E., Guinel, F. C., 1994. The synthesis of [gamma]-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *plant physiology*, 104(3), 865-871.
- de Ancos, B., González, E. M., Cano, M. P., 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(10), 4565-4570.
- Gohara, A. K., Souza, A. H. P. d., Gomes, S. T. M., Souza, N. E. d., Visentainer, J. V., Matsushita, M., 2016. Nutritional and bioactive compounds of adzuki beans cultivars using chemometric approach. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(1), 104-113.
- Guo, Y., Chen, H., Song, Y., Gu, Z., 2011. Effects of soaking and aeration treatment on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated soybean (*Glycine max* L.). *European Food Research and Technology* 232(5), 787-795.

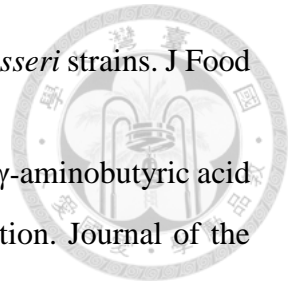
- 
- Gut, H., Dominici, P., Pilati, S., Astegno, A., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., Grütter, M.G., Capitani, G., 2009. A common structural basis for pH-and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *Journal of molecular biology* 392(2), 334-351.
- James, C., Purnell, G., James, S. J., 2015. A Review of Novel and innovative food freezing technologies. *Food and Bioprocess Technology* 8(8), 1616-1634.
- Johnson, B. S., Singh, N. K., Cherry, J. H., Locy, R. D., 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea. *Phytochemistry* 46(1), 39-44.
- Kaulmann, A., André, C. M., Schneider, Y. J., Hoffmann, L., Bohn, T., 2016. Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. *Food Chemistry* 197, 325-332.
- Khang, D. T., Dung, T. N., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., 2016. Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods* 5(2), 27.
- Kinnersley, A. M., Turano, F. J., 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19(6), 479-509.
- Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., Kimura, T., 2007. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering* 78(2), 556-560.
- Kuo, Y.H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C., 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry* 86(4), 537-545.
- Kwon, S., Park, H. W., Sohn, K., Kim, K., 2007. Method for enhancing the content of soybean seed gamma-Aminobutyric acid. US Patent, US20070202202 A1.
- María Landete, J., Hernández, T., Robredo, S., Duenas, M., de las Rivas, B., Estrella, I., Munoz, R., 2015. Effect of soaking and fermentation on content of phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit) and mung beans (*Vigna radiata* [L] Wilczek). *International journal of food sciences and nutrition* 66(2), 203-209.
- Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L., & Forlani, G., 2006. Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *Journal of Experimental Botany* 57(14), 3755-3766.
- Liu, L., Zhai, H., Wan, J.M., 2005. Accumulation of γ -aminobutyric acid in giant-embryo rice grain in relation to glutamate decarboxylase activity and its gene expression

- during water soaking. *Cereal Chemistry* 82(2), 191-196.
- Narayan, V. S., Nair, P., 1990. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29(2), 367-375.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Kolniak, J., 2009. Effect of l-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze-thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries. *LWT-Food Science and Technology* 42(2), 581-586.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V., Reddy, A. R., 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* 46(3), 499-502.
- Piergiovanni, A. R., 2011. Kinetic of water adsorption in common bean: considerations on the suitability of peleg's model for describing bean hydration. *Journal of Food Processing and Preservation* 35, 447-452.
- Rahman, M. S., 2007. *Handbook of food preservation*. Boca Raton, Florida, CRC press. USA.
- Rozan, P., Kuo, Y.-H., Lambein, F., 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry* 58(2), 281-289.
- Sai-Ut, S., Ketnawa, S., Chaiwut, P., Rawdkuen, S., 2009. Biochemical and functional properties of proteins from red kidney, navy and adzuki beans. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2(4), 493-504.
- Saikusa, T., Horino, T., Mori, Y., 1994. Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(5), 1122-1125.
- Sherwood, R. A., 2000. Amino acid measurement in body fluids using PITC derivatives. In *Amino Acid Analysis Protocols*. C. Cooper, N. Packer, K. Williams (Eds.), NJ: Humana Press, Totowa. 169-175
- Tiansawang, K., Luangpituksa, P., Varayanond, W., Hansawasdi, C., 2014. GABA (gamma-aminobutyric acid) production of mung bean (*phaseolus aureus*) during germination and the cooking effect. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 21(4), 307-314.
- Varayanond, W., Tuntrakul, P., Surojanametakul, V., Watanasiritham, L., Luxiang, W., 2005. Effect of water soaking on gamma-aminobutyric acid (GABA) in germ of different Thai rice varieties. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)* 39, 411-415.
- Wu, T. Y., Tsai, C. C., Hwang, Y. T., Chiu, T. H., 2012. Effect of antioxidant activity and functional properties of Chingshey purple sweet potato fermented milk by

Lactobacillus acidophilus, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. gasseri* strains. *J Food Sci* 77(1), M2-8.

Yang, R., Feng, L., Wang, S., Yu, N., Gu, Z., 2015. Accumulation of γ -aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation. *Journal of the science of food and agriculture* 96, 2090-2096.

Zhang, H., Yao, H.-y., Chen, F., Wang, X., 2007. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. *Food Chemistry* 101(4), 1670-1676.



第三章 益生菌對紅豆發酵乳 γ -氨基丁酸之影響

壹、前言

現代人生活忙碌造成壓力大，飲食不正常，使得富含 GABA 之機能性食品的需求日益增加；儘管 GABA 存在於許多蔬菜、水果中，但其含量很低，只有約 0.03 to 2.00 $\mu\text{mol/g}$ (Kim et al., 2009)。消費者重視機能性食品中 GABA 的來源，對食品中天然存在 GABA 的喜好更勝於直接添加化學合成的 GABA，發酵有助於降低食物的成本、提升口感與味道，並使食物更具吸引力，同時發酵過程也有助於提升食物中 GABA 含量，透過使用有益微生物發酵生產強化 GABA 的產品，是研發食物中天然產生 GABA 不可或缺的過程(Dhakal et al., 2012)。自普洱茶分離之 *Streptomyces bacillaris* R9 及 *Streptomyces cinereus* Y11 可使新鮮茶葉在發酵 180 天後 GABA 含量提高 5.7 及 4.7 倍(Jeng et al., 2007)，存在於米麴中的 *Aspergillus oryzae* 亦被發現帶有 glutamate decarboxylase encoding-gene(*gad A*)可提高 GAD 活性並產生 GABA (Kato et al., 2002)，大豆接種 *Rhizopus microsporus var. oligosporus* IFO 32002 及 IFO 32003 製成天貝後可使 GABA 含量顯著增加數十倍(Aoki et al., 2003)。紅麴菌(*Monascus*) 在製麴過程中會產生蛋白質分解(protease)將米中蛋白質分解產生麩胺酸，而後由紅麴菌所產生的 GAD 將麩胺酸經脫羧作用生成 GABA (Tsuji, 1992)。上述微生物均具有較高 GAD 活性，可提高發酵製品中 GABA 之能力，卻仍受限於菌種特性及發酵食品種類而無法廣泛使用。

近年研究開始利用乳酸菌接種於蔬果汁中開發富含 GABA 之產品，由於發酵蔬果汁可天天飲用，利於消費者隨時補充，並有效增加購買頻率，提昇產品之商業價值。黑覆盆莓果汁接種分離自韓國泡菜(kimchi)之乳酸菌 *Lb. brevis* GABA100，經 30 $^{\circ}\text{C}$ 發酵 12 天可使 GABA 含量增加約 12 倍(Kim et al., 2009)；蕃茄汁或蕃茄泥接種 *Lb. brevis* IFO3960，可有效使麩胺酸轉化為 GABA，轉化效率達 87%(Monma and Hayakawa, 2007)；蔬果汁接種 *Enterococcus avium* G15 及 1% 酒粕後可使 GABA 含量提高 4 倍(Sugiyama, 2012)；使用 *Lc. lactis* 做為製造 cheese 之 starter，亦可提高 cheese 中之 GABA 含量(Nomura et al., 1998)；由傳統發酵食品分離所得之乳酸菌中，發現 *Lb. paracasei* 具有高 GAD 活性，可在發酵過程中產生 GABA (Komatsuzaki et al., 2005)；然而利用乳酸菌生產富含 GABA 機能性食品的應用，主要的研究仍關

注於極少數菌種，如 *Lb. brevis*、*Lc. lactis*、*B. longum* 等(Kim et al., 2009; Monma and Hayakawa, 2007; Nomura et al., 1998)，並未關注其他益生菌種可能存在之高 GAD 活性。因此，本研究參考 Özer and Kirmaci (2010)研究選擇習用於商業益生菌乳飲料的菌株(表 3.1.)，評估不同益生菌於紅豆乳中生長之 GAD 活性及對 GABA 產量的影響，嘗試以富含麩胺酸之紅豆乳利用生物轉換方法生產同時具有 GABA 及益生菌雙重功效之機能性發酵紅豆乳。

營養組成及培養條件會影響微生物產生 GABA 的表現，特別是添加碳源、氮源及其他添加物可影響 GABA 產生量(Dhakal et al., 2012)，花生乳中添加 1.5% (w/v) 麥芽糖、1% (w/v) 胰化蛋白及 0.1% (w/v) 維生素 B₆ 後，接種 *Lb. brevis* BCRC 12310 與 *B. longum* BCRC 14661，於 30°C 下混合發酵 48 小時，可產生 20.88 mg/100 ml GABA，為未發酵花生乳之 22.4 倍(張，2007)。具益生性的乳酸菌於生長對數期供給足夠碳源將有利於生長(Heller, 2001)，本研究探討於紅豆乳中調整不同碳源、氮源及添加吡哆醇、硫酸鎂、氯化鈉對於益生菌 GABA 提昇之效果，並進一步使用反應曲面法(Response surface methodology, RSM)篩選出最適紅豆乳基質配方。

反應曲面法於 1951 年由 Box 及 Wilson 開發，而後被廣泛利用，MacDonald 及 Bly 於 1963 年利用此方法分析蛋糕酥油中乳化劑之最適添加量，Nielsen 等人於 1972 年將此方法用於蛋白質變性之研究，而後學者便將此法用於探討數個因子組合產生之反應值獲得最適效果之組合條件(Gacula et al., 2009)。反應曲面法近期已成功使用於許多使 GABA 生產條件最適化的研究(Shan et al., 2015)，本研究利用統計學上的中心混層設計(Central composite design)探討發酵紅豆乳基質碳源、氮源及其他添加物之最適添加量，以發酵產生 GABA 含量的變化，利用反應曲面法加以分析，配合反應曲面圖，以求得最適化之發酵紅豆乳基質配方。

貳、材料與方法



一、實驗架構

本研究將經過最適浸泡條件(37°C 浸泡 8 小時)處理後之紅豆，經研磨、添加奶粉後製成紅豆乳基質，分別接種常用於發酵乳製品之益生菌，分析益生菌發酵紅豆乳之 pH 值、有機酸、GABA 含量、GAD 活性、花青素含量及總酚含量，篩選適合作為機能性發酵紅豆乳之最適菌種；而後再透過調整紅豆乳基質之碳源、氮源及鹽類組成，提高最適菌種於發酵紅豆乳中之 GABA 產量；最後以最適益生菌接種於最適紅豆乳基質配方中，得到富含 GABA 之機能性發酵乳製品，並進行配方調整，製成適於飲用之產品，研究架構如圖 3.1.及 3.2.所示。

二、實驗材料

(一) 原料：

1. 採用購自萬丹鄉農會之高雄8號紅豆。
2. 脫脂奶粉購自 Scharlau Chemie S.A. Barelona. Spain.

(二) 試驗菌株

Bifidobacterium infantis BCRC14602、*Bifidobacterium adolescentis* BCRC14606、*Bifidobacterium bifidum* BCRC14615、*Bifidobacterium longum* BCRC14634、*Bifidobacterium breve* BCRC 11846、*Lactobacillus rhamnosus* GG BCRC16000、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BCRC 10696、*Lactobacillus plantarum* BCRC11697、*Lactobacillus acidophilus* BCRC 14079、*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* BCRC14085 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(新竹，臺灣)；*Lactococcus lactis* Lab5 由需源生技公司提供(桃園市，臺灣)；*Bifidobacterium lactis* Bb-12 來自 Chr. Hansen 菌種公司(崑崙國際股份有限公司代理，高雄市，臺灣)。

(三) 試藥：

1. Gamma amino butyric acid(GABA), Triethylamine(TEA), HCl, Methanol, Phenylisothiocyanate (PITC), β -ercaptoethanol, pyridoxal 5'-phosphate (PLP), fructose, galactose, maltose, galactose, monosodium glutamate, pyridoxine, magnesium chloride, calcium chloride購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.



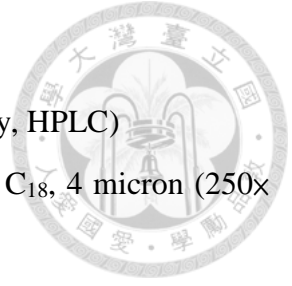
2. Folin-Ciocalteu reagent購自Merck, Darmstadt, Germany.
3. Acetonitrile(HPLC-grade)購自J.T Baker Inc. Phillipsburg, New Jersey, U.S.A.
4. Soytone 及 Soy protein isolate 購自 Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland, U.S.A.

(四) 培養基：

1. Plate count agar(PCA)購自 Alpha Biosciences, Inc. Baltimore, Maryland, U.S.A.
2. Peptone購自 Alpha Biosciences, Inc. Maryland, U.S.A.
3. MRS broth 購自 Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland, U.S.A.

(五) 試驗設備及器材

1. 無菌操作台：Laminar Flow, Model TH-420, Tsao Hsin Enterprise Co. LTD., Taipei, Taiwan.
2. 恆溫培養箱：LM-570, Yite precisin Machinery Co. Ltd., Taichung, Taiwan.
3. 蒸餾水製作裝置：Distillation unit, Buchi, Model 315, Flawil, Switzerland.
4. 去離子水製作裝置：Millipore Co., Medford, Maryland, U.S.A.
5. 旋轉式減壓濃縮機：BUCHI 011, Buchi, Switzerland.
6. 無菌過濾膜：0.22 μ m PVDF filter購自 Millipore SA, Molsheim, France.
7. 酸鹼測定計：Microcomputer pH vision 6071, Jenco Electronics Ltd., Michigan, U.S.A.
8. 灰化爐：ELF 10/14, Carbolite Furnaces, Sheffield, England.
9. 氮蒸餾器：B323, Buchi, Flawil, Switzerland.
10. 針筒：Syringr，特浦公司，高雄，台灣。
11. 離心式真空濃縮機：Model SVC100H, Savant Co., New York, U.S.A.
12. 冷凍乾燥機：Free Zone 18L Freeze Dry System with purge valve, Labconco Co., Cansas City, Missouri, U.S.A.
13. 均質機：Votex Mixer Genie 2, Scientific Induipment Co., Bohemia, New York, U.S.A.
14. 離心機：Universal 320R, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Germany.
15. 分析天平：Electronic balance ER-180A, A&D Co., Bohemia, New York; U.S.A.
16. 分光光度計：Unicam Co., Model HE ISO，矽新科技公司，臺北，臺灣。



17. 糖度計：Hand refractometer N1, ATAGO Co., Japan.

18. 高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)

(1)分析管柱(A analytical column)：Phenomenex 00G-4375E C₁₈, 4 micron (250×4.6 mm I.D.)

(2)移動相溶劑輸出系統(Solvent delivery system)

Degassing system, Model DG-2410, Sanwa Tsusho Co., Tokyo, Japan.

Hplc pump(880-PU, Jasco., Tokyo, Japan.

Solvent mixing module(880-30, Jasco Co., Tokyo, Japan.)

(3)紫外光檢測器(UV970, Jasco Co., Tokyo, Japan.)

(4)資料擇取處理系統(Data processor)：EC2000 data system 1.0，立行公司，臺北，台灣。

三、實驗方法

(一) 紅豆乳基質製備

紅豆用自來水清洗3次，添加5倍水(w/v)於37°C培養箱內浸泡8小時，將紅豆及浸泡液以果汁機磨漿，經棉布過濾2次，於沸水浴中隔水加熱30分鐘使紅豆乳預糊化，再加入5%脫脂奶粉(w/v)，充份攪拌並混合均勻後，裝入血清瓶置於90°C水浴1小時，為發酵紅豆奶基質。

(二) 益生菌活化

將貯存於-80°C之冷凍益生菌株取出，接種1%菌液至MRS broth中，於37°C、5% CO₂之厭氧培養箱內培養24小時，並經過第二次活化(subculture)得到活化菌液，其乳酸菌數約為10⁸cfu/ml。

(三) 最適益生菌篩選

將紅豆奶基質回溫至30°C，接種1%(v/v)已活化之益生菌液，置於37°C、5%CO₂之厭氧培養箱內，培養6-60小時，並定時取出測定pH值、可滴定酸、乳酸菌數、花青素、總酚含量、GABA含量及GAD活性，篩選GABA產量最高之乳酸菌(張，2007)。

(四) 確認紅豆發酵乳基質最適配方

1. 最適碳源

紅豆乳基質分別加入0.5%、1%、1.5%、2.0%(w/v)之

glucose、fructose、maltose、galactose，再經90°C水浴1小時殺菌，接種1% *Lb. rhamnosus* GG BCRC16000於37°C 5%CO₂之厭氧培養箱培養36小時，測定其GABA含量及GAD活性，篩選最適碳源條件。



2. 最適氮源

紅豆乳基質分別加入1%、2%、4%、6% (w/v)之soytone peptone、soy protein isolate及glutamate，再經90°C水浴1小時殺菌，接種1% *Lb. rhamnosus* GG BCRC16000於37°C 5%CO₂之厭氧培養箱培養36小時，測定其GABA含量及GAD活性，篩選最適氮源條件。

3. 添加吡哆醇、硫酸鎂及氯化鈣

紅豆乳基質分別加入0.1%、0.2%、0.3%、0.5% (w/v)之magnesium sulfate、calcium chloride再經90°C水浴小時殺菌，另外，pyridoxine與紅豆乳基質分開滅菌後才添加，接種1% *Lb. rhamnosus* GG BCRC16000，於37°C、5% CO₂之厭氧培養箱培養36小時，測定其GABA含量及麩胺酸脫羧酶活性。

(五) 反應曲面法設計

以*Lb. rhamnosus* GG BCRC16000為試驗菌株，在試驗設計中最適碳源、最適氮源及鹽類最適添加條件作為實驗組合，以100ml紅豆奶基質為固定量，添加1%、1.5%、2% galactose為X₁，1%、2%、3% glutamate為X₂，0.1%、0.2%、0.3% pyridoxine為X₃，以Box及Behnken進行三因子三階層之中心混層設計(Central composition design)，試驗因子及其階層如表3.2，試驗共15次，如表3.3所示，於37°C、5% CO₂之厭氧培養箱培養36小時。

試驗後分析各組合之GABA產量及GAD活性，所得結果再以SAS(Statistic Analysis System)套裝軟體中RESRGR(Response Surface Regression)程式進行反應曲面分析(Giovanni, 1983)，以碳源(galactose)濃度(X₁)、氮源(monosodium glutamate)濃度(X₂)與吡哆醇(pyridoxine)濃度(X₃)為條件變數因子，以GABA含量作為反應曲面法之反應值Y₁與Y₂，假設反應值(response, Y)為三因子之數學函數，則 $Y = f(X_1, X_2, X_3)$ ，求出三變數二次多項數：

其中X₁=galactose濃度

X₂=monosodium glutamate濃度



X_3 =pyridoxine濃度

$$Y=a_0+a_1X_1+a_2X_2+a_3X_3+a_{12}X_1X_2+a_{13}X_1X_3+a_{23}X_2X_3+a_{11}X_1^2+a_{22}X_2^2+a_{33}X_3^2$$

其中 a_i 表示各項之迴歸係數。利用SAS軟體進行分析及Design-Expert軟體進行繪圖。

(六) 發酵紅豆乳pH值測定

取20ml發酵紅豆乳置於燒杯中，放入已校正之酸鹼度計電極，直接讀取測得之pH值。

(七) 發酵紅豆乳可滴定酸測定(AOAC,2000)

取1 ml發酵紅豆乳，加入10 ml蒸餾水稀釋，以0.1N NaOH溶液滴定至pH值達8.5，記錄所滴定之NaOH體積，並依下列公式換算成以乳酸計算之可滴定酸度(%)。

$$\text{Lactic acid}(\%)=(N \times f \times V \times 0.09 / v) \times 100$$

N：NaOH濃度 f：以0.1N HCL標準酸校正之力價

V：NaOH之滴定體積(ml) v：樣品之體積(ml)

(八) 發酵紅豆乳益生菌數測定

取1ml發酵紅豆乳以0.1% peptone water連續稀釋後，取釋當稀釋倍數之稀釋液1ml，以倒皿培養法將溶解並降溫之MRS agar與檢體液混合均勻，待培養基凝固後於37°C、5%CO₂之厭氧培養箱培養2天，記錄其菌數。

(九) 發酵紅豆乳花青素含量測定(Padmavati et al., 1997)

發酵紅豆乳經冷凍乾燥後，取約0.5g凍乾紅豆乳粉末，加入1% HCl/methanol (MeOH)，於暗室下萃取60分鐘，再經12000 g 轉速離心15分鐘，以分光光度計測定在530 nm及657 nm之吸光值，除以吸光係數 $\epsilon = 31.6 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，計算花青素含量。

$$\text{花青素含量}(\mu\text{mole/g})=(A_{530}-0.33 \times A_{657}) \div 31.6 \times \text{MeOH毫升數} \div \text{重量(g)}$$

(十) 發酵紅豆乳總酚含量測定(Wu et al., 2012)

發酵紅豆乳經冷凍乾燥後，凍乾紅豆乳粉末與 50% ethanol以1：10比例混合，於4°C下攪拌60分鐘，以12000 g轉速離心15分鐘，取上清液經0.45 μm 濾膜過濾，即為紅豆乳濾液。

紅豆乳濾液5ml與Folin-Ciocalteu reagent 5ml 振盪混合後，靜置3分鐘，加

入 10% Na₂CO₃ 5 ml，間歇混合1小時，以分光光度計檢測735 nm之吸光值，以 gallic acid作為標準曲線，換算每公克發酵紅豆乳(乾重)所含gallic acid毫克數。

(十一) 發酵紅豆乳GABA含量測定

1. 樣品製備：將發酵紅豆乳定時取出並經冷凍乾燥，取0.1g紅豆凍乾粉加10倍的70%(v/v)乙醇於2°C超音波震盪萃取10分鐘，離心收集上清液，沈澱物再加10倍的70%(v/v)乙醇以超音波進行第二次萃取及離心，合併二次萃取所得之上清液於45°C以下減壓濃縮至乾，並以0.1M ammonium acetate回溶並定量至10ml，經0.22 μm濾膜過濾即可得γ-胺基丁酸萃取液(張，2007)。

2. PITC衍生劑配製

衍生劑A：將TEA、methanol與去離子水以2：1：1(v/v)之比例於抽氣櫃中混合均勻，置於-20°C貯存備用。

衍生劑B：PITC、去離子水、TEA與methanol以1：1：1：7(v/v)比例於抽氣櫃中混合均勻，置於-20°C貯備用。

3. 取20 μl樣品液進行真空乾燥，加入衍生劑A 20 μl 混合均勻後立即真空乾燥，以去除衍生劑。
4. 繼續加入30 μl衍生劑B於室溫下作用20分鐘，真空乾燥，去除衍生劑。
5. 衍生後之樣品溶於200 μl動相(0.1M ammonium acetate)中，以0.22μm 濾膜過濾後進行HPLC分析。

6. 分析條件 (Kuo et al., 2004)

動相A：0.1 M ammonium acetate。

動相B：0.1 M ammonium acetate、acetonitrile 與 methanol以44：46：10 (v/v)比例於抽氣櫃中混合均勻。

動相A及B混合後以glacial acetic acid調整pH值至6.5。

移動相梯度：動相A 100%-0%，動相B 0%-100%

動相流速：1.0 ml/min

分析時間：50分鐘

檢測器波長：UV 254 nm。

7. 取0、5、10、15、20、25、30、35 μl濃度為0.2 mg/mL的標準品進行衍生化並以上述條件分析，並依積分面積作成標準曲線(R²=0.9912)。將樣品液分析後



之積分面積以標準曲線回推計算出樣品中的GABA含量。

(十二) 發酵紅豆乳GAD活性測定(Huang et al., 2007)

取 1 ml 發酵乳與 2 ml 基質溶液(含有 10 mmol/L 麩胺酸鈉之 0.2 mol/L NaHPO₄-citricacid buffer)於 40°C 水浴 60 分鐘,反應結束後以沸水浴 5 分鐘終止酵素反應,將反應液離心,取上清液分析 GABA 含量,酵素活性(U)之定義為 40°C 下每小時基質溶液產生 1 μmol GABA 之活性。

(十三) 發酵紅豆乳官能品評

將1%已活化之*Lb. rhamnosus* GG接種於添加1.44% galactose、2.27% glutamate 及 0.20% pyridoxine之紅豆乳基質中,於37°C、5%CO₂之厭氧培養箱內培養36小時後取出,測量可滴定酸度含量,以75%蔗糖糖漿調整其糖酸比為13、14、15、16、17,經均質後,冷藏使溫度降至4°C,進行喜好性品評試驗,品評員包括臺灣大學食品科技研究所之學生及18歲以上之成人計25名,以及經濟部智慧財產局滿18歲以上之職員計25名,共50名。每位品評員需同時品評上述五種樣品,品評樣品更動時需用冷開水漱口,品評項目包括色澤(color)、甜度(sweetness)、酸度(acidity)、香味(flavor)、質地(texture)及整體喜好性(overall acceptance)等,採七分制品評法,7分表示最喜歡,1分表示最不喜歡,將品評結果填寫於品評表(表3.4)。

糖酸比 = 可滴定酸度 ÷ 糖度 (Brix[°])

(十四) 發酵紅豆乳儲存試驗

將接種1% *Lb. rhamnosus* GG 於37°C發酵36小時,並調整糖酸比為16之發酵紅豆乳裝於玻璃瓶中,於7°C冷藏庫儲存15天,分別於第3、6、9、12及第15天測定,評估冷藏儲存對發酵紅豆乳pH值、可滴定酸度、乳酸菌數、GABA含量及GAD活性的影響。

(十五) 統計分析

各試驗均重複三次,所得之數據以平均值與標準偏差表示,使用SAS套裝軟體(Statistical Analysis System 9.ed)進行統計分析,以鄧肯氏多變域測驗法(Duncan's new multiple range test)進行各試驗組之差異分析,當 $p < 0.05$ 時表示各試驗組間具顯著差異。

參、結果與討論



一、篩選最適生產含 GABA 紅豆發酵乳之益生菌株

(一) 不同益生菌株發酵對紅豆乳pH值、可滴定酸及乳酸菌數之影響

紅豆經過37°C浸泡8小時後，經磨漿、過濾、預糊化，再添加脫脂奶粉製成紅豆乳基質，再分別接種12株商業製品中常見之益生菌，於37°C、5% CO₂培養箱中發酵6-60小時，測得紅豆發酵乳之pH值、可滴定酸、乳酸菌數變化如圖3.3。

結果顯示，未發酵之紅豆乳基質pH值為6.30，經益生菌發酵6-36小時，紅豆發酵乳pH值隨發酵時間增加而呈現直線下降趨勢，至發酵30小時後下降幅度減緩，其中*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*與*B. longum*在發酵6-60小時間pH值較其他乳酸菌顯著為低，經發酵60小時，pH值分別為3.40與3.44，接種其他益生菌之紅豆乳經過發酵60小時後pH值分布在3.52~3.8間；*Lb. rhamnosus* GG在發酵第6~18小時pH值僅由6.27下降至6.00，顯著高於所有處理組($p < 0.05$)，於發酵第18小時後才開始明顯下降。

不同益生菌對紅豆乳發酵過程中可滴定酸之分析結果如圖3.4，未經發酵之紅豆乳可滴定酸含量為0.21%，接種乳酸菌發酵後於第6小時開始可滴定酸含量顯著提高，於發酵第12~42小時間可滴定酸含量隨發酵時間增加而增多，其中，接種*B. longum*與*Lc. lactis* Lab5之紅豆乳可滴定酸含量在發酵第24小時後即顯著高於其他各組，直至發酵第60小時，可滴定酸含量分別達1.4%及1.3%，經其他乳酸菌發酵60小時之紅豆乳可滴定酸含量分布在1.00%~1.26%間，且各組所測得之pH值均無顯著差異；*Lb. rhamnosus* GG在發酵初期可滴定酸含量僅緩慢增加，直至發酵第30小時後才顯著增加，經發酵60小時可滴定酸含量亦可達1.24%。

在乳酸菌數的變化方面(圖3.5)，接種益生菌之紅豆乳於發酵第6小時所測得之乳酸菌數約為6.3~7.0 log cfu/ml，自發酵第6小時至第18小時乳酸菌數呈現直線增加，除*Lb. acidophilus*外，其餘接種益生菌之處理組乳酸菌數於發酵第36小時達到最高，約 9.5 log cfu/ml，經過發酵42小時，乳酸菌數開始緩慢下降；*Lb. acidophilus*在發酵第24小時乳酸菌數即可達10.1 log cfu/ml，且直至發酵36小時後才顯著下降；接種*Lb. rhamnosus* GG之紅豆乳在發酵第48及60小時乳酸菌數

顯著高於其他各組($p < 0.05$)，達 $9 \log \text{ cfu/ml}$ 。

大豆豆乳中接種 $5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ 之益生菌，於 37°C 發酵，其中接種 *Lb. rhamnosus* GG 之豆乳發酵 9.5 小時後，pH 下降至 4.5，可滴定酸亦以接種 *Lb. rhamnosus* GG 的豆乳下降幅度最快，對照發酵過程中游離胺基酸含量的變化，顯示豆奶中益生菌的生長取決於蛋白水解的能力，並導致胺基酸釋放，使得 pH 值下降，可滴定酸增加 (Li et al., 2012)。牛乳中添加 2~6% 糯米或粳米的全穀粉，再接種 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 與 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*，經過發酵 24 小時，pH 值由 6.8 下降至 4.5，活菌數由 $6 \log \text{ cfu/ml}$ 提高至 $8 \log \text{ cfu/ml}$ (Bae et al., 2011)。紫米加 5 倍水磨漿經滅菌後接種 *Lb. casei*、*Lb. acidophilus* E、*Lb. casei* 加 *Lb. bulgaricus* Lb 與 *S. thermophilus* 19987、*Lb. acidophilus* E 加 *Lb. bulgaricus* Lb 與 *S. thermophilus* 19987、*Lb. bulgaricus* Lb 與 *S. thermophilus* 19987，於 37°C 發酵 48 小時，pH 值約 3.78~3.90 之間，生長菌數約為 $8.2\sim 8.9 \log \text{ cfu/ml}$ ，可滴定酸為 0.21~0.28% (汪，2006)。經 *Monascus*-發酵之大豆萃取物 (MFSE) 添加於豆乳中，接種 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 及 *Lb. plantarum*，經發酵 24 小時後 pH 值下降至 4.18，可滴定酸含量達 1.09%，菌數達 10^8 cfu/ml ，GABA 含量亦增加至 45.5 mg/100 g DW (Pyo and Song, 2009)；於日本傳統發酵食品中篩選可促進 GABA 產生之乳酸菌 *Lb. brevis*、*Lb. plantarum* 及 *Lb. paracasei* 於 MRS 中培養約 40 小時，pH 值可降至最低，菌數在培養 48 小時達到最高 (Komatsuzaki et al., 2005)。本研究紅豆乳接種不同益生菌對 pH、乳酸菌數及可滴定酸的影響趨勢與前人研究相似，惟接種 *Lb. rhamnosus* GG 之紅豆乳 pH 值及可滴定下降幅度較少，經過發酵 36 小時 pH 值才降至 4.3，可滴定酸為 0.87%，乳酸菌數 $9.5 \log \text{ cfu/ml}$ 。

(二) 不同益生菌株發酵對紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響

接種不同益生菌株發酵對紅豆乳 GABA 含量之影響如表 3.5。紅豆乳基質在未發酵前 GABA 含量約 0.05 mg/mL，分別接種 12 株益生菌於 37°C 、5% CO_2 厭氧環境發酵 12 小時後，除接種 *B. bifidum* 之紅豆乳外，接種其餘益生菌株均可使紅豆乳 GABA 含量顯著提高 ($p < 0.05$)，於發酵第 36 小時可使 GABA 含量達到最高，將發酵時間延長卻使 GABA 含量降低。在所有益生菌中，接種 *Lb. rhamnosus* GG 之紅豆乳在發酵過程中 GABA 產量最高，明顯優於其他乳酸菌 ($p <$

0.05)，經發酵36小時GABA含量可達0.44 mg/mL，與未經發酵之紅豆乳相比，GABA含量提高約8倍，接種*B. infantis*發酵36小時之紅豆乳，GABA含量亦可達0.38mg/mL，*B. longum*對GABA含量提升效果較差，發酵36小時GABA含量僅提高至0.16 mg/mL，增加約3倍。

紅豆乳基質在未經發酵前所測得GAD活性非常低，只有約0.030 U/ml，經分別接種12株益生菌於37°C、5%CO₂厭氧環境發酵12小時後，除接種*B. lactis* Bb-12紅豆乳外，接種其餘益生菌株之紅豆乳GAD活性與未經發酵前相比均顯著提高($p < 0.05$)，經發酵36小時，可使GAD活性達到最高，而後隨發酵時間延長，GAD活性逐漸下降(表3.6)。在12株益生菌中，以接種*Lb. rhamnosus* GG之發酵紅豆乳GAD活性顯著優於其他乳酸菌($p < 0.05$)，於發酵第36小時可達0.065U/ml，與未經發酵之紅豆乳相比，GAD活性約提高2倍，延長發酵時間至48小時，GAD活性仍有0.061 U/ml，在第60小時才降至0.042 U/ml；接種*B. bifidum*、*B. lactis* Bb-12及*Lb. acidophilus*之紅豆乳於發酵期間GAD活性表現最差，發酵36小時僅有0.046~0.049U/ml，經發酵60小時GAD活性已下降至約0.028U/ml。

由馬奶酒(koumiss)中分離之*Lb. helveticus*接種至大豆乳發酵30小時，其pH值下降至4.16，可滴定酸與菌數於發酵第18~30小時急速增加，而GABA含量在第30小時達最高，約含170mg/100g DW GABA (Sun et al., 2009)；添加經*Monascus* 發酵得到的大豆萃取物於豆乳中，接種*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 及*Lb. plantarum*經發酵24小時，可使GABA含量達0.46 mg/g DW (Pyo and Song, 2009)。本研究中12株益生菌分別接種於紅豆乳基質於37°C發酵36小時可顯著提高GABA含量與GAD活性，顯示益生菌發酵過程有助於活化GAD，並促進紅豆乳中麩胺酸轉化為GABA。

研究顯示，*Lc. lactis*及*E. coli*培養過程中所產生之GABA對酸性pH環境具有抗性(Castanie-Cornet et al., 1999; Sanders et al., 1998)；由於GAD產生GABA過程中必需消耗H⁺離子，於酸性條件下可保持細胞質的pH值而促進細胞存活，含有高含量GABA及GAD活性之乳製品可利用此抗酸能力，通過消化系統並於小腸存活，發揮其益菌功效(Park and Oh, 2007; Sun et al., 2009)。本研究接種*Lb. rhamnosus* GG之發酵紅豆乳於發酵36小時之GABA產量及GAD活性最

高，對照pH值及有機酸的量測結果發現，其pH值在發酵第6~36小時均顯著高於其他處理組($p < 0.05$)，有機酸產量在發酵第12~36小時亦顯著低於其他處理組($p < 0.05$)，應與*Lb. rhamnosus* GG在發酵過程中產生大量GAD並消耗紅豆乳中H⁺離子有關，且其發酵過程中乳酸菌數含量於36小時達到9.53 log cfu/ml，繼續延長其發酵時間至60小時，乳酸菌數僅微幅下降至8.95 log cfu/ml，與接種其他乳酸菌的紅豆乳相比，乳酸菌數存活率較高，顯示*Lb. rhamnosus* GG因產生GABA，而能抵抗發酵過程中產生之酸性環境並維持細胞存活。儘管本研究所使用之12株乳酸菌都具有提高紅豆乳GABA含量的能力，但以接種*B. bifidum*、*B. lactis* Bb-12及*Lb. acidophilus*之紅豆乳在發酵期間GABA產量及GAD活性表現較差。

統計結果顯示，接種*Lb. rhamnosus* GG之發酵紅豆乳於發酵36小時可得到的GABA產量最高，故進一步調整紅豆乳基質添加之碳源、氮源及其他添加物，接種*Lb. rhamnosus* GG於37°C、CO₂培養箱中發酵36小時，以反應曲面法探討可有效提高GABA產量之紅豆乳基質配方。

(三) 不同益生菌株發酵對紅豆乳花青素含量之影響

未經發酵之紅豆乳花青素含量為 0.68 $\mu\text{mole/g}$ ，接種不同益生菌發酵 6~12 小時，隨發酵時間拉長，花青素含量呈現上升趨勢，在 12 株益生菌中，接種 *Lb. rhamnosus* GG、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgarics*、*B. breve* 及 *B. bifidum* 之紅豆乳於發酵第 30 小時，花青素含量可達 1.92~1.94 $\mu\text{mole/g}$ ，顯著高於接種其他益生菌之紅豆發酵乳($p < 0.05$)，較未發酵之紅豆乳增加近 2.9 倍，發酵時間延長至 36 小時，其花青素含量會微幅增加，但與發酵 30 小時紅豆乳之花青素含量相比，並無顯著差異($P > 0.05$)，經過發酵 42 小時後紅豆發酵乳花青素含量開始呈現下降趨勢(圖 3.6)。紅豆乳分別接種不同益生菌，經過 37°C、60 小時發酵後，花青素含量仍有 1.51~1.82 $\mu\text{mole/g}$ ，顯著高於未經發酵之紅豆乳($p < 0.05$)。

環境中的pH值是影響食品發酵重要的環境參數之一，其與微生物發酵過程中植物化學物質的結構變化有關，許多研究顯示花青素在低pH值下較為穩定(Hur et al., 2014)，紫甘薯蒸熟後與等比例水均質，加入10%的脫脂奶粉後滅菌製成紫甘薯乳，花青素含量約為5 $\mu\text{mole}/100\text{ g}$ ，分別接種*Lb. acidophilus*、*Lb.*

gasseri、*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*，於37°C發酵24小時後，花青素含量增加至16.8~17.5 $\mu\text{mole}/100\text{ g}$ ，顯著高於未經發酵的紫甘薯乳($P < 0.01$)，這是因為發酵過程中有機酸含量增加，pH值降低，提供酸性及有利於花色苷以flavylium cation形式存在的穩定環境(Wu et al., 2012)。黑豆烹煮後接種*Bacillus natto*於37°C發酵36小時，其花青素含量較發酵前提高約1.73倍，發酵時間延長至48小時，花青素含量增加2.46倍，發酵過程中產生的 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)有助花青素合成(Hu et al., 2010)。本研究對照接種益生菌後pH值與花青素的變化情形，發現接種*Lb. rhamnosus* GG、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*B. breve*及*B. bifidum*之紅豆乳，於發酵過程中pH值接近4.2時，花青素含量較高，推測應為酸性環境及益生菌代謝作用造成。


(四) 不同益生菌株發酵對紅豆乳總酚含量之影響

未經發酵之紅豆乳總酚含量約為10.79 mg GAE/g DW，接種不同益生菌於37°C、5% CO₂環境發酵，隨發酵時間拉長，總酚含量呈現上升趨勢，並在發酵30小時後，趨於和緩(圖3.7)。在12株益生菌中，接種*Lb. plantarum*及*B. breve*紅豆乳於發酵第36小時，總酚含量達15.72~15.86 $\mu\text{mole}/\text{g}$ ，顯著高於接種其他益生菌之紅豆發酵乳($p < 0.05$)，較未發酵之紅豆乳總酚含量提高約31.4~47.0%，接種*Lb. plantarum*及*B. breve*紅豆乳發酵時間延長至60小時，紅豆乳總酚含量雖會增加，與發酵48小時時相比卻不具顯著差異($P > 0.01$)。

豆乳接種商業化Kefir菌(含*S. lactis*、*S. cremoris*、*S. diacetylactis*、*Lb. plantarum*、*Lb. casei*、*S. fragilis*、和*Lc. cremoris*等益生菌)於室溫發酵40小時，總酚含量由232 $\mu\text{g CAE}/\text{ml}$ 增加至418 $\mu\text{g CAE}/\text{ml}$ ，提高約80%，但經過48小時發酵後，發酵豆乳總酚含量反而減少77%(McCue and Shetty, 2005)；紅豆蒸煮殺菌後接種納豆菌及乳酸菌進行固態發酵，經發酵後總酚含量顯著高於未發酵紅豆(張，2012)；在濃度為4%的紅豆乳中接種*Lb. delveburekiis* sp. *lactis*於37°C培養96小時，總酚含量較未發酵前增加18%(董，2013)。本研究12株益生菌在發酵過程中均會提升紅豆乳之總酚含量，可能是由於乳酸菌發酵活化酵素作用，降解大分子形成酚酸所致。

二、生產高含量 γ -氨基丁酸之紅豆發酵乳基質配方調整

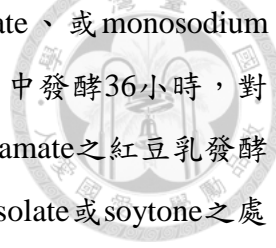
(一) 最適碳源



紅豆乳基質分別添加0.5%~2%之葡萄糖、果糖、麥芽糖及半乳糖，接種*Lb. rhamnosus* GG後於37°C、5%CO₂環境發酵36小時，測得之GABA含量及GAD活性如表3.7。紅豆乳添加半乳糖作為碳源，接種*Lb. rhamnosus* GG發酵後，GABA產量隨半乳糖濃度增加而提高，其中添加1.5%及2%半乳糖之紅豆乳發酵後之GABA含量可達0.61 mg/mL及0.62 mg/mL，顯著高於其他處理組($p < 0.05$)；添加葡萄糖及麥芽糖之紅豆乳，發酵過程中GABA含量並未隨碳源添加濃度提高而有顯著改變($p > 0.05$)，添加果糖之紅豆乳在碳源添加濃度需超過1.5%，GABA含量才明顯提昇($p < 0.05$)。發酵紅豆乳之GAD活性結果亦顯示，添加1.5%及2%半乳糖之紅豆乳發酵後測得之GAD活性達0.075及0.077 U/ml，顯著高於其他處理組($p < 0.05$)，添加葡萄糖或麥芽糖之紅豆乳GAD活性，並未因添加碳源濃度改變而有顯著差異($P > 0.05$)。

不同微生物種類能夠利用碳水化合物的差別很大，對於可產生高GAD活性之大腸桿菌而言，添加1 g/dl葡萄糖可使GAD活性明顯提高，但添加麥芽糖、乳糖及蔗糖則無此效果(Yang et al., 2008)。馮等(2008)由泡菜、酸奶、豆豉浸泡汁及醬菜汁中篩選出可生產較多GABA之乳酸菌株*Lb. brevis*，於發酵培養基中分別添加1%葡萄糖、乳糖、麥芽糖及半乳糖，結果發現添加蔗糖及乳糖對於促進*Lb. brevis*生產GABA具明顯效果，半乳糖及麥芽糖表現較差；在MRS培養基中添加4%麥芽糖，接種*Lb. brevis* K203於37°C發酵72小時，可使GABA含量提高16%(Binh et al., 2014)。本研究所使用之*Lb. rhamnosus* GG屬革蘭氏陽性菌，不能利用乳糖，可利用半乳糖、葡萄糖、果糖、麥芽糖等。*Lb. rhamnosus* GG可透過二個路徑降解半乳糖，一為Leloir pathway，可將半乳糖轉換為葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate)，另一路徑為tagatose-6-phosphate pathway，將半乳糖轉化為甘油醛-3-磷酸(glyceraldehyde-3-phosphate)和二羥丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)，提高對碳源的利用性(Koskenniemi, 2012)，也許可用來解釋本研究中添加半乳糖之紅豆乳基質，接種*Lb. rhamnosus* GG發酵後可產生較多GABA的原因。綜上而論，於紅豆發酵乳中添加半乳糖，對於提高GABA產量及GAD活性增加效果明顯優於葡萄糖、果糖及麥芽糖，添加1.5%或2%半乳糖於紅豆乳基質發酵後之GABA產量可達最高，但二組間並無顯著差異($P > 0.05$)。

(二)最適氮源



紅豆乳基質添加1%~6%之soytone、soy protein isolate、或monosodium glutamate接種*Lb. rhamnosus* GG後於37°C、5% CO₂培養箱中發酵36小時，對GABA含量及GAD活性影響如表3.8。添加monosodium glutamate之紅豆乳發酵後之GABA含量及GAD活性之表現均優於添加soy protein isolate或soytone之處理組($p < 0.05$)，且添加2% monosodium glutamate之紅豆乳發酵後GABA含量可達0.64 mg/mL，將濃度提高至4%-6%對GABA產量並無顯著提昇($p < 0.05$)；添加soy protein isolate對發酵紅豆乳GABA含量或GAD活性均無顯著改變($p > 0.05$)，即使將濃度提高也無差異，而添加2% soytone可使發酵紅豆乳GABA含量略為提高至0.47 mg/mL，但與未添加氮源之紅豆乳相比，GABA含量並無顯著差異($p < 0.05$)。

添1%不同氮源花生乳接種*Lb. brevis*及*B. longum*於30°C下發酵48小時，其中添加monosodium glutamate與tryptone之試驗組提高發酵花生乳GABA含量之效果明顯高於添加soy protein isolate，且添加麩胺酸鈉之花生乳於發酵36小時增加量為最大，tryptone在發酵過程中須慢慢進入代謝循環，故其於發酵初期對GABA含量之增加效果不如monosodium glutamate(張，2007)；將*Lb. brevis*接種於加酵母粉、蛋白、胰蛋白胨、牛肉膏於發酵培養基中，發現添加10 g/L蛋白胨對提高GABA含量之效果最好，對於GAD有誘導作用(馮等，2008)；Monosodium glutamate可透過水合作用產生GABA合成所需基質Na⁺及L-麩胺酸，進而透過GABA shunt形成GABA(Shelp et al., 1999)。本研究結果顯示添加soytone於紅豆乳中，對於增加GABA產量的效果遠不及monosodium glutamate，由GABA shunt可知glutamate為合成GABA之主原料，當glutamate濃度提高，可調節GAD活性進而促進GABA生成；於添加glutamate之MRS broth中接種*Lb. paracasei* NFRI7451可使GABA含量提高，但當glutamate濃度超過500mM，細胞生長反而會被強烈抑制(Komatsuzaki et al., 2005)，在MRS broth中添加低濃度(0~20 g/l)monosodium glutamate，接種*Lc. lactis*，可提高GABA產量(Lu et al., 2009)。本研究添加monosodium glutamate可藉由基質濃度提昇而刺激GAD活性增加，與soy protein isolate及soytone需經消化代謝後才被乳酸菌利用之路徑相比，對提高GABA產量之效果明顯較好，添加2% glutamate之紅豆乳發酵後GABA含量約可提高46%，將glutamate濃度提高，GABA含量未再顯著增加($p > 0.05$)。

(三) 添加吡哆醇、硫酸鎂及氯化鈣

紅豆乳基質分別添加0.1%~0.5% magnesium sulfate、calcium chloride及pyridoxine對GABA含量及GAD活性之影響如表3.9。添加0.2%~0.5%pyridoxine之紅豆乳於發酵36小時後GABA產量及GAD活性顯著高於添加magnesium sulfate及calcium chloride的組別($p < 0.05$)，添加0.2% pyridoxine即可使紅豆發酵乳GABA含量提高至0.60 mg/mL，將pyridoxine添加量提高，GABA含量並未顯著增加($P > 0.05$)。在紅豆乳中添加0.2% magnesium sulfate可使GABA含量提高18.6%，添加濃度提高至0.5%，反而使GABA含量下降；添加calcium chloride雖然也可使紅豆乳GABA含量增加，添加0.3% calcium chloride只使GABA含量提高11.4%，與不額外添加營養源之紅豆乳相比，並無顯著差異($P > 0.05$)，在紅豆乳中添加calcium chloride，其GAD活性並未受添加濃度影響而有顯著差異。

催化GABA生成之酵素GAD是一種吡哆醛酵素(Pyridoxal enzyme)，因此pyridoxal phosphate(PLP)為GAD作用之主要輔因子(Kang et al., 2002; Tong et al., 2002)，添加pyridoxal phosphate可使乳酸菌*Lb. paracasei* NFRI7451發酵生成之GABA含量增加(Komatsuzaki et al., 2005)，維生素B₆為pyridoxal phosphate之前趨物，於米糠培養液中添加維生素B₆亦可有效促進GABA形成(張，2008)。另一方面，當環境中的鈣濃度提高，與鈣結合蛋白(calmodulin)作用會活化GAD活性進而增加GABA產量，但此活化作用必需在鈣離子與鈣結合蛋白同時存在才有效果，鈣離子或calmodulin單獨存在均無法達到此效果(Kinnersley and Turano, 2000)，過去已有學者於酵母菌產生之GAD中發現鈣結合蛋白之鍵結部位，有利於GABA生成，本研究於紅豆奶中添加calcium chloride卻無法顯著提高GABA產量，推測應該為*Lb. rhamnosus* GG未具相對應之鈣結合蛋白鍵結部位有關。自*Lb. brevis* IFO 12005純化之GAD於培養基中添加硫酸根離子可提高其活性(Ueno et al., 1997)，可用以解釋本研究添加0.3% magnesium sulfate之紅豆發酵乳，因硫酸根離子較高使GAD活性增加而使GABA含量提高的現象，惟其效果仍不如pyridoxine。

(四) 紅豆基質最適配方

以反應曲面法三變數、三階層探討紅豆乳基質之最適配方，三變數分別為碳源添加濃度(X_1)、氮源添加濃度(X_2)及吡哆醇添加濃度(X_3)，不同培養條件下

紅豆發酵乳之 GABA 含量如表 3.10.所示，將 GABA 含量以 SAS 電腦套裝軟體中 RSREG(Response Surface Regression)程式進行反應曲面分析，以得 GABA 生成量模式之迴歸係數值；並以此求得下列之三變數二次方程式：

$$Y = -1.37 + 1.73X_1 + 0.49X_2 + 6.77X_3 + 0.01X_1X_2 - 0.15X_1X_3 + 0.38X_2X_3 - 0.60X_1^2 - 0.12X_2^2 - 18.88X_3^2$$

將結果進行變方分析如表 3.11.，變方分析(ANOVA)結果中對 GABA 含量之整體迴歸模式(Total model)之決定係數(R^2)為 0.9726，由於決定係數為迴歸模式對於試驗數據總變異值所能描述之比例，亦即迴歸模式對其所描述的試驗數據之適當程度，若 R^2 值趨近於 1，表示此迴歸模式可以適切地描述實驗數據，若 R^2 值遠低於 1，則表示此模式與各試驗值數據之總偏差相當大，其中，線性項達顯著水準($p < 0.05$)，欠合度(lack of fit)未達顯著水準($p > 0.05$)，可代表反應曲面法迴歸模式具適切性，二次方程式所建立的曲線模式適於評估最適化條件(Bezerra et al., 2008)。本研究變方分析結果， R^2 值趨近於一、線性項 P 值為 0.01 ($p < 0.05$)，且欠合度並不顯著，顯示所得之二次迴歸方程式可適切地描述紅豆乳中添加不同碳源、氮源及吡哆醇對提高乳酸菌發酵後 GABA 含量之影響，其變異大部分可由所選取之控制條件的變異解釋，可信度高。由各因子對依反應曲面法設計之各種添加成份對紅豆乳發酵過程中 GABA 產量之顯著性分析(表 3.12.)，結果顯示，不論是添加碳源、氮源或吡哆醇對提高紅豆乳 GABA 含量均為具顯著性之重要因子($p < 0.01$)。

評估紅豆乳基質最適化條件中，碳源(半乳糖)添加量中心點為 1.5%、氮源(monosodium glutamate)添加量中心點為 2%，吡哆醇(pyridoxine)添加量中心點為 0.2%，三變數三階層中心混層設計共實施 15 組試驗，1 至 12 組為各端點試驗組，13 至 15 組為實驗中心點，共重複 3 次。圖 3.11.(a)為紅豆乳添加 0.2% pyridoxine 時，半乳糖及 monosodium glutamate 添加對 GABA 生成量之影響，由反應曲面圖形來看，提高半乳糖及 monosodium glutamate 添加量有助增加 GABA 產量，當半乳糖添加量增加至 1.8%，monosodium glutamate 添加量增加至 2.8% 時，發酵紅豆乳 GABA 含量反而略為減少；將 monosodium glutamate 添加量固定為 2% 時，提高半乳糖及 pyridoxine 添加量，有助增加 GABA 產量，而當半乳糖添加量提高至 1.8% 以上，pyridoxine 添加量超過 0.25% 以上，發酵紅豆乳

GABA 含量反而下降(圖 3.11.(b))；將半乳糖添加量固定 1.5%，monosodium glutamate 及 pyridoxine 含量對 GABA 生成之影響如圖 3.11.(c)，由反應曲面圖形來看，當 monosodium glutamate 及 pyridoxine 添加量提高，紅豆乳 GABA 產量呈現增加趨勢，當 monosodium glutamate 添加量提高至 2.8% 及 pyridoxine 添加量提高至 0.25% 時，發酵紅豆乳之 GABA 產量呈現下滑趨勢。

經由 RSM 設計及 SAS 統計軟體分析，調整紅豆乳添加碳源、氮源及吡哆醇含量，以提升發酵後 GABA 產量最適化條件為添加半乳糖 1.44%、monosodium glutamate 2.27%、pyridoxine 0.20%，GABA 產量預測值為 1.14 mg/mL，以前述條件製作紅豆發酵乳基質接種；*Lb. rhamnosus* GG 於 37°C、5%CO₂ 培養 36 小時，測得 GABA 含量為 1.12 ± 0.02 mg/mL，與二次方程式計算之預測值相近。

調整發酵基質及培養條件有助提升乳酸菌發酵生成 GABA 的能力，學者廣泛應用 RSM 來確認不同因子同時存在時之最適化培養條件；使用天然來源食物作為發酵基質時，糙米汁、發芽大豆汁及水解脫脂乳以 33:58:9(v:v:v)，再添加 1% 麩胺酸鈉，有助 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 產生 GABA，生成量達 6.41 g/L，較使用 MRS 培養基添加 1% 麩胺酸鈉作為基質時，GABA 含量增加 74%(Chen et al., 2008)；利用傳統發酵乳製品中篩選出之乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* NDC75017 接種於牛乳中，經 RSM 統計發現牛乳基質中添加 80mM 麩胺酸鈉、18 μM 的 PLP 及培養溫度控制於 36°C，可使 GABA 含量達 314.56mg/100g，比未調整培養條件之發酵牛乳 GABA 含量高出 1.92 倍(Shan et al., 2015)；在牛奶中接種 *Lactobacillus plantarum* NTU 102 進行發酵，當脫脂牛奶非脂肪固形物濃度調整至 8~12%、麩胺酸鈉添加量 0.6~1%、培養溫度為 37°C 時，產生 GABA 量達 629 mg/L 較未調整培養條件前增加 27.3 倍(Tung et al., 2011)。本研究經調整培養基質中半乳糖、麩胺酸鈉及 pyridoxine 添加量，GABA 含量可由 0.44 mg/mL 提高至 1.12mg/mL，增加約 2.5 倍。

三、發酵紅豆乳官能品評

接種 1% 已活化之 *Lb. rhamnosus* GG 於添加 1.44% galactose、2.27% glutamate 及 0.20% pyridoxine 之紅豆乳基質中，經 37°C、5%CO₂ 之厭氧培養 36 小時，測定可滴定酸含量約為 0.87%，將發酵紅豆乳以 75% 蔗糖糖漿調整糖酸比分別為 13、14、15、16 及 17，經 50 位成人進行喜好性品評之結果如圖

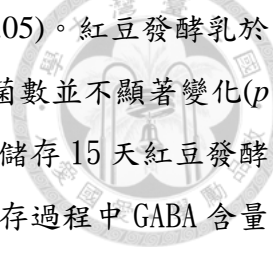
3.9。調整不同糖酸比之發酵紅豆乳在顏色(color)、香氣(aroma)及質地(texture)之消費者喜好性品評分數並無顯著差異($p < 0.05$)，而在甜度(sweetness)方面，以糖酸比 16 及 17 之紅豆發酵乳品評分數顯著優於糖酸比 13 及 14 之試驗組，在酸度(acidity)及整體接受度(overall acceptance)則以糖酸比調整為 16 及 17 之發酵紅豆乳具最高品評分數($p < 0.05$)，基於現代人重視健康，飲食少糖之需求，選擇調整紅豆發酵乳糖酸比至 16 再進行後續試驗。

吳(1999)透過調整褐藻發酵乳中糖、酸及安定劑之比例，經感官品評及離心沈澱法結果分析，發現糖含量對於發酵乳品質為影響最大之因子，其次是安定劑含量，酸味劑的影響為最小，上述因子彼此間有交互作用，但未達顯著差異，在褐藻萃取液中加入 30%固態發酵乳、10%蔗糖、0.25%複合安定劑及 0.25%複合酸味劑所得之發酵乳具最佳風味及口感，經貯存試驗後亦具有產品穩定性。以大豆和牛奶為原料，生產乳酸菌發酵豆奶飲料，透過正交實驗及感官品評，確認添加 10%蔗糖，0.1%檸檬酸及 0.04%乳酸，產品具有清新的發酵豆奶風味，整體感官品評佳(崔，2009)。發酵酸奶中為使產品品質均一化，可透過調整產品糖酸比來改善因不同原料乳來源、發酵條件所造成的差異(呂等，2006)。

本研究將紅豆乳接種 1% *Lb. rhamnosus GG* 於 37°C 發酵 36 小時測得之 pH 值 4.3，可滴定酸含量為 0.87 %，原始糖度為 11.5°Brix，原始糖酸比為 13.2，經添加蔗糖液後將糖度調整至 14°Brix，糖酸比調整至 16 可得較佳之品評值。與市售產品相比(表 3.13.)，糖度、可滴定酸及糖酸比與市售產品分析結果差異不大。

四、發酵紅豆乳儲存試驗

將接種 1% *Lb. rhamnosus GG* 於 37°C 發酵 36 小時，並調整糖酸比為 16 之發酵紅豆乳置於 4°C 儲存 3-15 天，其 pH 值、可滴定酸及乳酸菌數的變化如圖 3.10。發酵紅豆乳於 4°C 儲存前 pH 值為 4.3，可滴定酸為 0.87%，乳酸菌數為 $\log 9.56 \text{ cfu/ml}$ ，於 4°C 冷藏環境儲存 3 至 6 天，pH 值未有顯著改變($p > 0.05$)，而後隨儲存天數增加，pH 值呈現下降趨勢，惟經儲存 12 天至 15 天過程中，pH 值未再顯著降低($p < 0.05$)，於 4°C 儲存 15 天後，發酵紅豆乳 pH 值降至 4.08。發酵紅豆乳於 4°C 儲存 0-3 天，儲存 6 天後可滴定酸含量隨儲存時間延長而增加，經儲存 9 至 15 天可滴定酸含量並未再顯著提升，於 4°C 儲存 15 天可



使發酵紅豆乳可滴定酸含量較儲存前提高約 36.6 % ($p < 0.05$)。紅豆發酵乳於 4°C 儲存 3~15 天，乳酸菌數含量在 4°C 儲存 0~9 天，其乳酸菌數並不顯著變化 ($p > 0.05$)，而後隨儲存時間延長，乳酸菌數呈現下降趨勢，經儲存 15 天紅豆發酵乳乳酸菌數為 $\log 9.42$ cfu/ml。比較紅豆發酵乳在 4°C 儲存過程中 GABA 含量及 GAD 活性(圖 3.11.)發現，GABA 含量隨儲存時間增加而呈現上升趨勢，經儲存 9 天紅豆發酵乳 GABA 含量顯著高於未經儲存之發酵紅豆乳 ($p < 0.05$)，而經過儲存 15 天，紅豆發酵乳 GABA 含量可達 1.26 mg/mL，較儲存前增加約 12.5%。儲存期間發酵紅豆乳 GAD 活性的表現趨勢與 GABA 含量相似，GAD 活性隨儲存時間增加而略微提高，於 4°C 儲存 9 天對紅豆發酵乳 GAD 活性並未具顯著改變 ($p > 0.05$)，經過儲存 12 天，紅豆發酵乳 GAD 活性顯著高於未經儲存之發酵紅豆乳 ($p < 0.05$)，經過儲存 15 天，紅豆發酵乳 GAD 活性為 0.13 U/ml，較儲存前提高約 51.4 %。紫米奶接種乳酸菌後於 5°C 儲存 14 天，生菌數由 9.07~11.80 \log cfu/ml 下降至 8.27~10.61 \log cfu/ml，pH 值稍降了 0.01~0.03，可滴定酸增加 0.13~0.90%(汪宛霖，2006)；牛乳接種 *L. plantarum* PU11 發酵 48 小時，可產生 144.5 mg/kg GABA，於 4°C 儲存 40 天，其乳酸菌數未有顯著改變，後期酸化作用有限，ACE 抑制活性維持恆定，GABA 含量略為上升至 165.7 mg/kg，增加 14.67%(Nejati et al., 2013)。本研究於發酵紅豆乳儲存過程中，pH 值、可滴定酸、乳酸菌數及 GABA 含量的變化與前人研究相似，由於發酵乳低溫儲存期間，蛋白質水解酶仍具活性，將蛋白質分解成氨基酸，加上 GAD 持續將麩胺酸脫羧為 GABA，而使得 GABA 含量增加(Grønnevik, Falstad, & Narvhus, 2011)。

依據中華民國國家標準 CNS3058「發酵乳」之最低活性可食用發酵菌含量需達 10^7 cfu/g(標準檢驗局，2016)，本研究之發酵紅豆乳經儲存試驗後，符合國家標準規定。文獻指出，中度高血壓患者每日攝取 100ml 含有 10~12mg GABA 的發酵乳，經過 12 週後，收縮壓降低 17.4 mmHg，舒張壓降低 7.2 mmHg(Inoue et al., 2003)；在被動迴避測試中，小鼠補充 46.69 mg / ml 由 *Lactobacillus sakei* B2-16 生產的 GABA，有效提高小鼠長期記憶能力(Seo et al., 2012)；健康成人每日攝取 18mg GABA 即可達降血壓等相關生理功效(陳，2006)。本研究紅豆發酵乳含 GABA 1.12mg/mL，每日攝取 16 ml 即含有 18 mg GABA，同時可補充益生菌，有助擴大國產紅豆增值利用範圍，發展具多重機能性發酵紅豆乳產品。

肆、 結論

- 一、 紅豆以自來水清洗後，添加 5 倍水(w/v)於 37°C 浸泡 8 小時，連浸泡液一起均質、加入 5% 脫脂乳(w/w)殺菌後，製成紅豆乳基質，分別接種 12 株商業上習用益生菌，於 37°C、5%CO₂ 培養箱中發酵 36 小時，以接種 *Lb. rhamnosus* GG 之紅豆乳在發酵過程中 GABA 產量最高，由 0.05mg/mL 提高至 0.44mg/mL，增加約 8.8 倍，GAD 活性亦可由發酵前之 0.030 U/ml 提高至 0.065 U/m，經發酵 36 小時後 pH 值由 6.27 下降至 4.3，可滴定酸由 0.21% 增加至 0.87%，乳酸菌數達 9.35 log cfu/ml，花青素含量較未發酵前增加 2.88 倍，總酚含量提高約 40 %，
- 二、 紅豆乳基質分別添加 0.5%~2% 葡萄糖、果糖、麥芽糖或半乳糖，再接種 *Lb. rhamnosus* GG 於 37°C、5%CO₂ 培養箱發酵，以添加 1.5% 半乳糖之效果較好，GABA 含量達 0.61 mg/mL，GAD 活性達 0.075 U/ml，顯著高於添加葡萄糖、果糖、麥芽糖之紅豆乳 ($p < 0.05$)。紅豆乳基質中分別添加 1%~6% soytone、soy protein isolate 或 monosodium glutamate 再接種 *Lb. rhamnosus* GG 發酵，以添加 2% monosodium glutamate 之紅豆乳 GABA 產量及 GAD 活性優於添加 soy protein isolate 或 soytone 之處理組 ($p < 0.05$)，將 monosodium glutamate 添加濃度提高，無助於提高 GABA 產量 ($p > 0.05$)。分別添加 0.1%~0.5% magnesium sulfate、calcium chloride 及 pyridoxine 之紅豆乳經過 36 小時發酵後，顯示添加 0.2% pyridoxine 可使紅豆發酵乳 GABA 含量提高至 0.60 mg/mL，GAD 活性也提高約 21%。
- 三、 以反應曲面法探討紅豆乳基質之最適配方，以添加 1.5% 半乳糖、2% 麩胺酸鈉及 0.2% 吡哆醇為中心點，探討調整基質對紅豆發酵乳 GABA 產量之影響，結果顯示，整體迴歸模式的 R^2 為 0.9726，且欠合度並不顯著，所得之二次迴歸方程式可適切地描述紅豆乳中添加半乳糖、麩胺酸鈉及吡哆醇對提高乳酸菌發酵後 GABA 含量之影響，經 RSM 設計及 SAS 統計軟體分析得知紅豆乳中添加半乳糖 1.44%、麩胺酸鈉 2.27%、吡哆醇 0.20%，再接種 *Lb. rhamnosus* GG

進行發酵，為生產 GABA 之最適化配方條件，GABA 產量預測值為 1.14 mg/mL，經最適化配方條件進行發酵實際測得 GABA 含量為 1.12 ± 0.02 mg/mL，與預測值相近。



四、將經過調整最適化基質條件之紅豆乳接種 1% 已活化之 *Lb. rhamnosus* GG 經 37°C、5%CO₂ 之厭氧培養 36 小時，測定可滴定酸含量約為 0.87%，以蔗糖糖漿調整糖酸比至 13~17 後進行感官品評，發現不同糖酸比之發酵紅豆乳在顏色 (color)、香氣 (aroma) 及質地 (texture) 之分數並無顯著差異 ($p < 0.05$)，在甜度 (sweetness) 方面，以糖酸比 16 及 17 之紅豆發酵乳品評分數顯著較優，在酸度 (acidity) 及整體接受度 (overall acceptance) 評分值則以糖酸比為 16 及 17 之發酵紅豆乳具最高品評分數 ($p < 0.05$)。

五、使用蔗糖糖漿將發酵紅豆乳糖酸比調整至 16 再置於 4°C 儲存 3~15 天，其 pH 值呈現下降趨勢，可滴定酸含量隨儲存時間延長而增加，乳酸菌數於儲存 15 天下降至 $\log 9.42$ cfu/ml，符合中華民國國家標準「發酵乳」最低活性可食用發酵菌含量規定，且 GABA 含量仍維持 1.26 mg/mL，產品除可以富含 GABA 含量為訴求外，並兼具益生菌功效，有助提升國產紅豆加值應用。

第四章 綜合結論

紅豆經清洗後添加 5 倍水，於 37°C 浸泡 8 小時，GABA 含量可由 6.81 mg/100 g 增加至 90.27 mg/100 g，提高約 13 倍，GAD 活性由 4.4 U g⁻¹ DW 提昇至 59.5 U g⁻¹ DW，水份含量由 13.8% 增加至 47.3%，生菌數由 1.30 log cfu/g 增加至 5.44 log cfu/g，紅豆浸泡液 pH 值由 7.3 下降至 5.8，花青素含量由 1.13 μmole/g 下降至 0.85 μmole/g，總酚含量由 14.85 mg GAE/ g DW 提高至 18.04 mg GAE/ g DW，顯示在高於室溫條件下浸泡，有助活化紅豆中的 GAD，進而提高紅豆之 GABA 含量，浸泡過程中種子的代謝作用，也促進酚類化合物形成，而提高總酚含量，惟浸泡過程，並不有利於花青素的穩定作用，造成經過浸泡之紅豆，花青素含量下降。

經 37°C 浸泡 8 小時之紅豆，再經過 -20°C 低溫冷凍 48 小時並於室溫解凍 24 小時，可將 GABA 含量再提昇至 154.51 mg/100 g，較完全未經任何處理之新鮮紅豆高出約 22.7 倍，惟冷凍解凍過程會使紅豆中花青素含量及總酚含量大幅下降，考量冷凍處理製程需消耗大量能源、延長加工時間，提升 GABA 含量的效果不如預期，故發酵試驗選擇最適浸泡紅豆條件進行前處理，不再經過後段冷凍、解凍處理。

經最適條件浸泡處理之紅豆磨漿、添加脫脂奶粉製成紅豆乳基質，再分別接種 12 株商業生產常用之益生菌，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中發酵，以接種 *Lb. rhamnosus* GG 之紅豆乳 GABA 產量最高，由 0.05mg/mL 提高至 0.44mg/mL，增加約 8.8 倍，GAD 活性亦可由發酵前之 0.030 U/ml 提高至 0.065 U/ml，花青素含量較未發酵前增加 2.88 倍，總酚含量提高約 40%，pH 值由 6.27 下降至 4.3，可滴定酸度由 0.21% 增加至 0.87%，乳酸菌數達 9.35 log cfu/ml。

運用反應曲面法探討紅豆乳基質之最適配方，以添加 1.5% 半乳糖(碳源)、2% monosodium glutamate(氮源)及 0.2% pyridoxine(其他添加物)為中心點，探討調整基質對紅豆發酵乳 GABA 產量之影響，經統計分析結果，紅豆乳添加半乳糖 1.44%、麩胺酸鈉 2.27%、吡哆醇 0.20%，為 *Lb. rhamnosus* GG 發酵生產 GABA 之最適化配方條件，GABA 產量預測值為 1.14 mg/mL。

經最適化配方條件調整紅豆乳基質組成，實際發酵測得 GABA 含量為 1.12 mg/mL，與預測值相近。感官品評結果顯示，發酵紅豆乳經調整糖酸比為 16，在甜度、酸度及整體接受度皆具有較高品評分數，完成發酵基質調整及糖酸比調整之發

酵紅豆乳置於 4°C 冷藏儲存 3~15 天，GABA 含量自 1.12 mg/mL 提高至 1.26 mg/mL，且乳酸菌數符合中華民國國家標準「發酵乳」最低活性可食用發酵菌含量規定，具發展多重功效保健機能性產品之潛力。





表 3.1. 商業益生菌飲料的實例

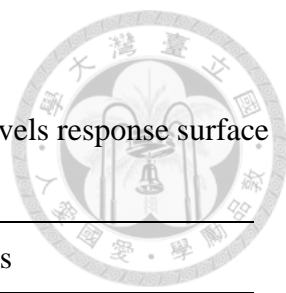
Table 3.1. Some example of commercial probiotic dairy beverages

Product	Starter organisms
Acidophilus milk	<i>Lb. acidophilus</i>
Sweet acidophilus milk	<i>Lb. acidophilus</i>
Acidophilin	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , kefir yeasts
Nu-Trish A/B	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.
Diphilus milk	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Biomild	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Cultura [®] or A/B milk	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Bifighurt [®]	<i>B. longum</i> (CKL 1969) or <i>B. longum</i> (DSM 2054)
Acidophilus buttermilk	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , subsp. <i>cremoris</i> , subsp. <i>lactisbiovar. diacetylactis</i>
Acidophilus-yeast milk	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces lactis</i>
Bifidus milk	<i>B. bifidum</i> or <i>longum</i>
Yakult	<i>Lb. casei</i> Shirota
Yakult Miru-Miru	<i>Lb. casei</i> , <i>B. bifidum</i> or <i>B. bereve</i> , <i>Lb. acidophilus</i>
A-38 fermented milk	<i>Lb. acidophilus</i> , mesophilic lactic cultures
Onaka He GG, Gefilus (Valio Ltd)	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> GG
CHAMYTO	<i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. helveticus</i>
Vitagen	<i>Lb. acidophilus</i>
Procult drink	<i>B. longum</i> BB536, <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Actimel	<i>Lb. casei</i> Immunitas [™]
AKTfit, Biola, BioAktiv, YOMO, LGG+, Yoplait360°, Kaiku Actif	<i>Lb. rhamnosus</i> GG
Gaio	<i>Lb. casei</i> F19
Verum	<i>Lb. rhamnosus</i> LB21
ProViva	<i>Lb. plantarum</i> 299v

(Özer et al., 20)

表 3.2. 三變數-三階層反應曲面設計之操作條件變數及階層

Table 3.2. Process variables and levels in the three variables- three levels response surface design



Variable	Symbol	Coded-levels		
		-1	0	1
Galactose	X ₁	1%	1.5%	2%
Glutamate	X ₂	1%	2%	3%
Pyridoxine(vit B ₆)	X ₃	0.1%	0.2%	0.3%




表 3.3. 紅豆乳基質配方三因子三階層之中心旋轉組合設計

Table 3.3. Three variables-three levels of rotatability central composite design arrangement of adzuki bean milk

Runs	Response value			Code value		
	Galactose (%)	Glutamate (%)	Pyridoxine (%)	X ₁	X ₂	X ₃
1	2	3	0.2	1	1	0
2	2	1	0.2	1	-1	0
3	1	3	0.2	-1	1	0
4	1	1	0.2	-1	-1	0
5	2	2	0.3	1	0	1
6	2	2	0.1	1	0	-1
7	1	2	0.3	-1	0	1
8	1	2	0.1	-1	0	-1
9	1.5	3	0.3	0	1	1
10	1.5	3	0.1	0	1	-1
11	1.5	1	0.3	0	-1	1
12	1.5	1	0.1	0	-1	-1
13	1.5	2	0.2	0	0	0
14	1.5	2	0.2	0	0	0
15	1.5	2	0.2	0	0	0



表 3.4 發酵紅豆乳喜好性品評表

Table 3.4 The questionnaire of hedonic test of fermented adzuki bean milk

姓名：_____

日期：_____

性別：男 女

年齡： 20 歲以下 21~30 歲 31~40 歲 41~50 歲 51~60 歲

說明：本試驗共有 5 個樣品，請依序品評，品評後請依喜好程度於評分表勾選，每

個樣品品評完後，請先以包裝純水漱口後再品評下一個樣品。

樣品代碼 _____	非 常 不 喜 歡	不 喜 歡	有 點 不 喜 歡	不 喜 歡 也 不 討 厭	有 點 喜 歡	喜 歡	非 常 喜 歡
顏色	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
甜度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
酸度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
香氣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
質地	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
整體喜好性	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

樣品代碼 _____	非 常 不 喜 歡	不 喜 歡	有 點 不 喜 歡	不 喜 歡 也 不 討 厭	有 點 喜 歡	喜 歡	非 常 喜 歡
顏色	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
甜度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
酸度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
香氣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
質地	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
整體喜好性	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(請翻面)



樣品代碼 _____	非常 不喜 歡	不 喜 歡	有 點 不 喜 歡	不 喜 歡 也 不 討 厭	有 點 喜 歡	喜 歡	非 常 喜 歡
顏色	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
甜度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
酸度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
香氣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
質地	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
整體喜好性	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

樣品代碼 _____	非常 不喜 歡	不 喜 歡	有 點 不 喜 歡	不 喜 歡 也 不 討 厭	有 點 喜 歡	喜 歡	非 常 喜 歡
顏色	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
甜度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
酸度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
香氣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
質地	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
整體喜好性	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

樣品代碼 _____	非常 不喜 歡	不 喜 歡	有 點 不 喜 歡	不 喜 歡 也 不 討 厭	有 點 喜 歡	喜 歡	非 常 喜 歡
顏色	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
甜度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
酸度	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
香氣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
質地	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
整體喜好性	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

表 3.5. 紅豆乳接種不同益生菌株對 GABA 含量之影響

Table 3.5. Effect of GABA content in adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains

Strain	GABA content(mg/mL) ¹					
	0 h.	12 h.	24 h.	36 h.	48 h.	60 h.
<i>B. infantis</i>	0.05±0.02 ^{E,a2}	0.09±0.01 ^{D,b}	0.21±0.03 ^{C,bc}	0.38±0.02 ^{A,b}	0.31±0.04 ^{B,b}	0.12±0.04 ^{D,b}
<i>B. adolescentis</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.08±0.01 ^{BC,b}	0.10±0.01 ^{B,d}	0.30±0.03 ^{A,c}	0.29±0.03 ^{A,bc}	0.10±0.03 ^{B,bc}
<i>B. longum</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.09±0.02 ^{B,b}	0.10±0.01 ^{B,d}	0.16±0.03 ^{A,f}	0.15±0.02 ^{A,e}	0.04±0.01 ^{C,d}
<i>B. bifidum</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.06±0.01 ^{C,b}	0.12±0.03 ^{B,cd}	0.21±0.01 ^{A,ef}	0.22±0.02 ^{A,d}	0.04±0.01 ^{C,d}
<i>B. breve</i>	0.05±0.01 ^{D,a}	0.07±0.02 ^{CD,b}	0.14±0.02 ^{B,c}	0.29±0.02 ^{A,c}	0.29±0.04 ^{A,bc}	0.10±0.04 ^{C,bc}
<i>B. lactis Bb-12</i>	0.05±0.02 ^{B,a}	0.07±0.02 ^{B,a}	0.08±0.02 ^{B,f}	0.22±0.03 ^{A,de}	0.21±0.03 ^{A,d}	0.03±0.03 ^{B,e}
<i>Lb. rhamnosus GG</i>	0.05±0.01 ^{F,a}	0.15±0.02 ^{E,a}	0.28±0.03 ^{C,a}	0.44±0.02 ^{A,a}	0.38±0.02 ^{B,a}	0.20±0.02 ^{D,a}
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	0.05±0.01 ^{D,a}	0.13±0.02 ^{C,b}	0.24±0.03 ^{B,ab}	0.41±0.02 ^{A,b}	0.40±0.02 ^{A,a}	0.21±0.02 ^{B,a}
<i>Lb. plantarum</i>	0.05±0.01 ^{D,a}	0.08±0.02 ^{CD,b}	0.18±0.03 ^{B,b}	0.37±0.05 ^{A,b}	0.33±0.05 ^{A,b}	0.14±0.05 ^{BC,b}
<i>Lb. acidophilus</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.07±0.01 ^{C,b}	0.11±0.01 ^{B,cd}	0.23±0.04 ^{A,de}	0.22±0.03 ^{A,d}	0.06±0.02 ^{C,cd}
<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	0.05±0.02 ^{C,a}	0.08±0.01 ^{C,b}	0.13±0.02 ^{B,cd}	0.27±0.01 ^{A,cd}	0.24±0.02 ^{A,cd}	0.06±0.02 ^{C,cd}
<i>Lc. lactis Lab5</i>	0.05±0.01 ^{D,a}	0.08±0.02 ^{D,b}	0.19±0.03 ^{C,c}	0.31±0.03 ^{A,c}	0.25±0.09 ^{B,cd}	0.07±0.02 ^{D,de}

¹ Values are expressed as mean ± SD (n = 3).

² Means with different uppercase letters within the same row are significantly different (p < 0.05). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different (p < 0.05).

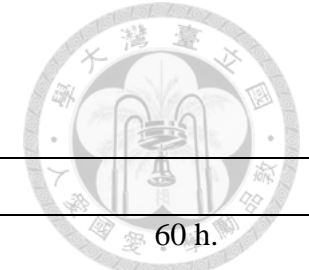


表 3.6. 紅豆乳接種不同益生菌株對 GAD 活性之影響

Table 3.6. Effect of GAD activity in adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains

Strain	GAD activity(U/ml) ¹									
	0 h.	12 h.	24 h.	36 h.	48 h.	60 h.				
<i>B. infantis</i>	0.030±0.001 ^{D,a}	0.034±0.004 ^{CD,bc}	0.048±0.001 ^{B,ab}	0.059±0.002 ^{A,bc}	0.057±0.002 ^{A,b}	0.036±0.003 ^{C,b}				
<i>B. adolescentis</i>	0.029±0.000 ^{D,a}	0.034±0.001 ^{C,bc}	0.037±0.002 ^{C,d}	0.056±0.003 ^{A,cd}	0.049±0.002 ^{B,cd}	0.034±0.002 ^{C,bc}				
<i>B. longum</i>	0.030±0.002 ^{D,a}	0.032±0.001 ^{D,c}	0.037±0.002 ^{C,d}	0.051±0.002 ^{A,ef}	0.047±0.002 ^{B,de}	0.029±0.001 ^{D,d}				
<i>B.bifidum</i>	0.029±0.002 ^{D,a}	0.034±0.001 ^{C,bc}	0.036±0.001 ^{BC,d}	0.046±0.002 ^{A,g}	0.039±0.002 ^{B,g}	0.029±0.001 ^{D,d}				
<i>B. breve</i>	0.029±0.002 ^{E,a}	0.032±0.002 ^{D,c}	0.040±0.002 ^{C,cd}	0.054±0.003 ^{A,de}	0.047±0.002 ^{B,d}	0.034±0.003 ^{D,bc}				
<i>B. lactis Bb-12</i>	0.030±0.001 ^{DE,a}	0.033±0.002 ^{CD,c}	0.036±0.002 ^{C,d}	0.049±0.002 ^{A,fg}	0.044±0.002 ^{B,ef}	0.028±0.003 ^{D,d}				
<i>Lb. rhamnosus GG</i>	0.030±0.001 ^{D,a}	0.040±0.004 ^{C,a}	0.053±0.007 ^{B,a}	0.065±0.003 ^{A,a}	0.061±0.002 ^{A,a}	0.042±0.001 ^{C,a}				
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgarics</i>	0.031±0.001 ^{F,a}	0.037±0.002 ^{E,a}	0.050±0.002 ^{C,a}	0.062±0.001 ^{A,ab}	0.057±0.001 ^{B,b}	0.043±0.002 ^{D,a}				
<i>Lb. plantarum</i>	0.030±0.002 ^{D,a}	0.033±0.003 ^{CD,c}	0.044±0.004 ^{B,bc}	0.061±0.002 ^{A,ab}	0.057±0.002 ^{A,b}	0.037±0.004 ^{C,b}				
<i>Lb. acidophilus</i>	0.029±0.000 ^{DE,a}	0.032±0.003 ^{D,c}	0.038±0.003 ^{C,dd}	0.048±0.001 ^{A,fg}	0.043±0.001 ^{B,f}	0.028±0.003 ^{E,d}				
<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	0.030±0.001 ^{D,a}	0.033±0.000 ^{D,c}	0.040±0.004 ^{C,cd}	0.058±0.002 ^{A,bcd}	0.051±0.002 ^{B,c}	0.030±0.002 ^{D,cd}				
<i>Lc. lactis Lab5</i>	0.031±0.002 ^{D,a}	0.033±0.03 ^{D,c}	0.044±0.003 ^{C,bc}	0.058±0.004 ^{A,bcd}	0.051±0.002 ^{B,c}	0.031±0.002 ^{D,cd}				

¹ Values are expressed as mean ± SD (n = 3).

² Means with different uppercase letters within the same row are significantly different (p < 0.05). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different (p < 0.05).

表 3.7. 碳源對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響

Table 3.7. Effect of carbon source on GABA content and GAD activity of adzuki bean milk

Carbon source	GABA content (mg/mL) ¹				
	0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
Glucose	0.44±0.02 ^{A,a,2}	0.46±0.02 ^{A,a,b}	0.45±0.05 ^{A,b}	0.46±0.02 ^{A,b}	0.48±0.02 ^{A,b}
Fructose	0.43±0.02 ^{B,a}	0.39±0.06 ^{B,b}	0.44±0.04 ^{B,b}	0.51±0.04 ^{A,b}	0.52±0.01 ^{A,b}
Maltose	0.43±0.03 ^{A,a}	0.44±0.04 ^{A,b}	0.48±0.28 ^{A,ab}	0.47±0.03 ^{A,b}	0.50±0.03 ^{A,b}
Galactose	0.44±0.02 ^{B,a}	0.54±0.03 ^{B,a}	0.54±0.03 ^{B,a}	0.61±0.02 ^{A,a}	0.62±0.01 ^{A,a}
Carbon source	GAD activity (U/mL)				
	0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
Glucose	0.065±0.003 ^{A,a}	0.065±0.002 ^{A,a,b}	0.065±0.002 ^{A,b}	0.063±0.002 ^{A,b}	0.064±0.001 ^{A,b}
Fructose	0.063±0.022 ^{BC,a}	0.064±0.002 ^{ABC,b}	0.062±0.003 ^{C,b}	0.067±0.004 ^{AB,b}	0.068±0.001 ^{A,b}
Maltose	0.064±0.004 ^{A,a}	0.064±0.001 ^{A,b}	0.065±0.002 ^{A,b}	0.064±0.002 ^{A,b}	0.067±0.002 ^{A,b}
Galactose	0.066±0.003 ^{C,a}	0.070±0.003 ^{BC,a}	0.070±0.001 ^{B,a}	0.075±0.001 ^{A,a}	0.077±0.002 ^{A,a}

¹. Values are expressed as mean±SD (n = 3).

². Means with different uppercase letters within the same row are significantly different (p < 0.05). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different (p < 0.05).

表 3.8. 氮源對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響

Table 3.8. Effect of nitrogen source on GABA content and GAD activity of adzuki bean milk

Nitrogen source	GABA content (mg/mL) ¹				
	0 %	1 %	2 %	4 %	6%
Soytone	0.44±0.02 ^{A,a,2}	0.42±0.02 ^{AB,b}	0.47±0.04 ^{A,b}	0.41±0.02 ^{B, b}	0.41±0.03 ^{B,b}
Soy protein isolate	0.43±0.02 ^{Aa}	0.39±0.02 ^{AB,b}	0.41±0.02 ^{AB,b}	0.42±0.02 ^{A,b}	0.38±0.02 ^{B,b}
Monosodium glutamate	0.44±0.02 ^{C,a}	0.52±0.05 ^{B,a}	0.64±0.03 ^{A,a}	0.65±0.01 ^{A,a}	0.64±0.02 ^{A,a}

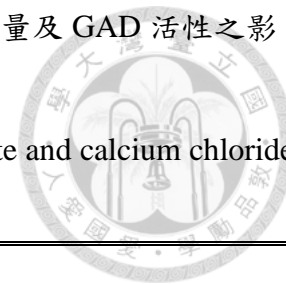
Nitrogen source	GAD activity (U/mL)				
	0 %	1 %	2 %	4 %	6%
Soytone	0.059±0.002 ^{AB,a}	0.056±0.003 ^{B,a}	0.062±0.002 ^{A,b}	0.060±0.001 ^{A, b}	0.059±0.002 ^{AB,b}
Soy protein isolate	0.059±0.002 ^{Aa}	0.057±0.001 ^{A,a}	0.059±0.002 ^{A,b}	0.060±0.002 ^{A,b}	0.057±0.001 ^{A,b}
Monosodium glutamate	0.057±0.003 ^{B,a}	0.059±0.001 ^{B,a}	0.079±0.003 ^{A,a}	0.079±0.001 ^{A,a}	0.079±0.001 ^{A,a}

¹Values are expressed as mean ± SD (n = 3).

²Means with different uppercase letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$). Means with different lowercase letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

表 3.9. 分別添加吡哆醇、硫酸鎂及氯化鈣對發酵紅豆乳 GABA 含量及 GAD 活性之影響

Table 3.9. Effect of other additional each pyridoxine, magnesium sulfate and calcium chloride on GABA content and GAD activity of adzuki bean milk



Other additives	GABA content (mg/mL) ¹				
	0 %	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.5%
Pyridoxine	0.44±0.02 ^{B,a2}	0.48±0.05 ^{B,a}	0.60±0.03 ^{A,a}	0.59±0.02 ^{A,a}	0.60±0.02 ^{A,a}
Magnesium sulfate	0.43±0.02 ^{C,a}	0.44±0.03 ^{C,a}	0.51±0.04 ^{AB,b}	0.52±0.02 ^{A,b}	0.46±0.01 ^{BC,b}
Calcium chloride	0.44±0.02 ^{A,a}	0.44±0.04 ^{A,a}	0.47±0.02 ^{A,b}	0.49±0.05 ^{A,b}	0.44±0.03 ^{A,b}

Other additives	GAD activity (U/mL)				
	0 %	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.5%
Pyridoxine	0.062±0.002 ^{B,a}	0.065±0.004 ^{B,a}	0.075±0.002 ^{A,a}	0.076±0.002 ^{A,a}	0.077±0.002 ^{A,a}
Magnesium sulfate	0.063±0.002 ^{C,a}	0.062±0.003 ^{C,a}	0.067±0.003 ^{AB,b}	0.067±0.003 ^{A,b}	0.066±0.004 ^{BC,b}
Calcium chloride	0.063±0.001 ^{A,a}	0.064±0.002 ^{A,a}	0.065±0.002 ^{A,b}	0.069±0.001 ^{A,b}	0.070±0.004 ^{A,b}

¹ Values are expressed as mean ± SD (n = 3).

² Means with different uppercase letters within the same row are significantly different (p < 0.05).

Means with different lowercase letters within the same column are significantly different (p < 0.05).

表 3.10. 依反應曲面法設計之紅豆乳發酵後之 GABA 含量

Table 3.10. GABA content of fermentation milk according to a response surface design

Trials	X ₁ Galactose (%)	X ₂ Monosodium glutamate (%)	X ₃ Pyridoxine (%)	GABA content (mg/mL)	
				Observed value	Predicted value
1	1 (2)	1 (3)	0 (0.2)	0.83±0.04	0.91
2	1 (2)	-1 (1)	0 (0.2)	0.73±0.03	0.69
3	-1 (1)	1 (3)	0 (0.2)	0.88±0.02	0.98
4	-1 (1)	-1 (1)	0 (0.2)	0.79±0.06	0.78
5	1 (2)	0 (2)	1 (0.3)	0.66±0.04	0.70
6	1 (2)	0 (2)	-1 (0.1)	0.73±0.06	0.76
7	-1 (1)	0 (2)	1 (0.3)	0.77±0.02	0.79
8	-1 (1)	0 (2)	-1 (0.1)	0.81±0.02	0.83
9	0 (1.5)	1 (3)	1 (0.3)	0.88±0.02	0.92
10	0 (1.5)	1 (3)	-1 (0.1)	0.85±0.05	0.89
11	0 (1.5)	-1 (1)	1 (0.3)	0.61±0.02	0.64
12	0 (1.5)	-1 (1)	-1 (0.1)	0.73±0.06	0.76
13	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.04±0.05	1.11
14	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.10±0.05	1.11
15	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.09±0.02	1.11

¹. GABA content of ABM without inoculation *Lb. rhamnosus* GG was 0.05 ± 0.01 mg/mL. GABA content in ABM inoculated with *Lb. rhamnosus* GG at 37°C in 5%CO₂ for 36 hr was 0.44±0.01 mg/mL

². Values are expressed as mean ± SD (n=3).

表 3. 11. 反應曲面法設計之發酵紅豆乳 GABA 含量之變方分析

Table 3.11. Analysis of variance (ANOVA) for GABA content of fermented adzuki bean milk

Source	DF ²	Sum of squares	Mean of squares ³	F-value	Prob > F
Model ¹	9	0.0300	0.9726	19.70	0.0022
Linear	3	0.0583	0.1892	11.50	0.0111
Quadratic	3	0.2355	0.7643	46.46	0.0004
Cross-product	3	0.0059	0.0191	1.16	0.4118
Total error	5	0.0085	0.0017		
Pure error	2	0.0026	0.0013		
Lack of fit	3	0.0059	0.0195	1.50	0.4240

R²=97.26%

¹ANOVA for response surface quadratic model

²Degree of freedom

³Determination coefficient

表 3.12. 各因子對依反應曲面法設計之條件下紅豆乳 GABA 含量之顯著性分析

Table 3.12. Analysis of variance showing significance of the variance on GABA content of adzuki fermented milk

	df ^a	Sum of Squares	F Value	Prob>F ^b
Galactose(X ₁)	4	0.0932	17.79	0.0066*
Monosodium glutamate(X ₂)	4	0.1042	15.42	0.0051*
Pyridoxine(X ₃)	4	0.1424	21.06	0.0025*

* Significant at 1% level

^a Degree of freedom

^b Prob > F = level of significance.

表 3.13.紅豆發酵乳與市售發酵乳基本性質

Table 3.13. Basic characteristics of adzuki bean milk and commercial fermented milk

品名	糖度°Brix	pH 值	可滴定酸度%	糖酸比
富含 GABA 之紅豆發酵乳	14	4.30	0.87	16.00
統一 AB 優酪乳	16.5	4.28	1.3	12.69
味全 ABLS 優酪乳	13	4.29	0.58	22.41
味全林鳳營優酪乳	15	4.24	0.81	18.52
統一 LP33 機能性優酪乳	13	4.23	0.90	14.44
統一瑞穗優酪乳	15	4.09	0.81	18.52
光泉晶球優酪乳	18	3.90	0.88	20.45



圖 3.1 實驗架構 I。

Fig. 3.1 The framework of the study I.

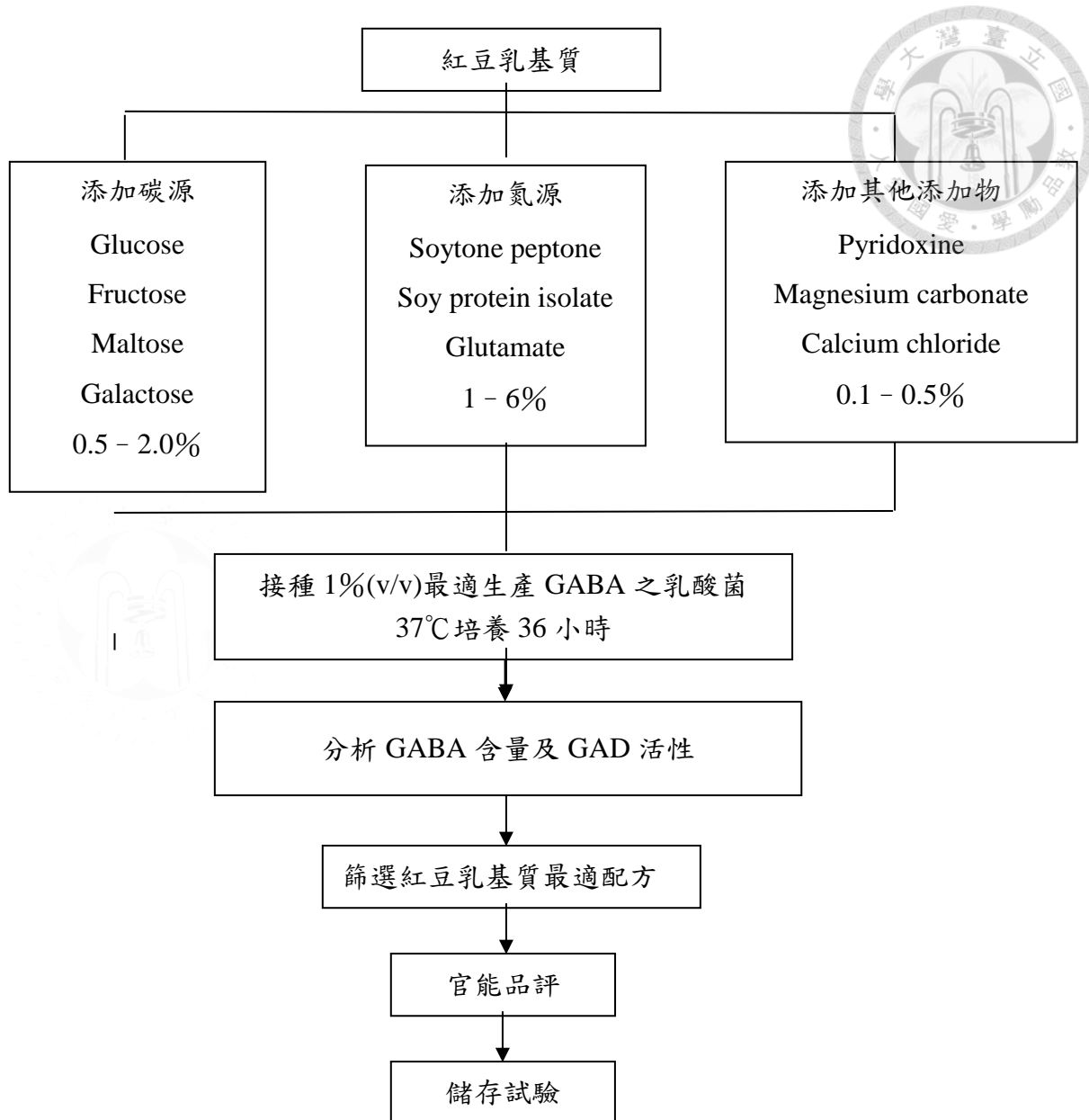
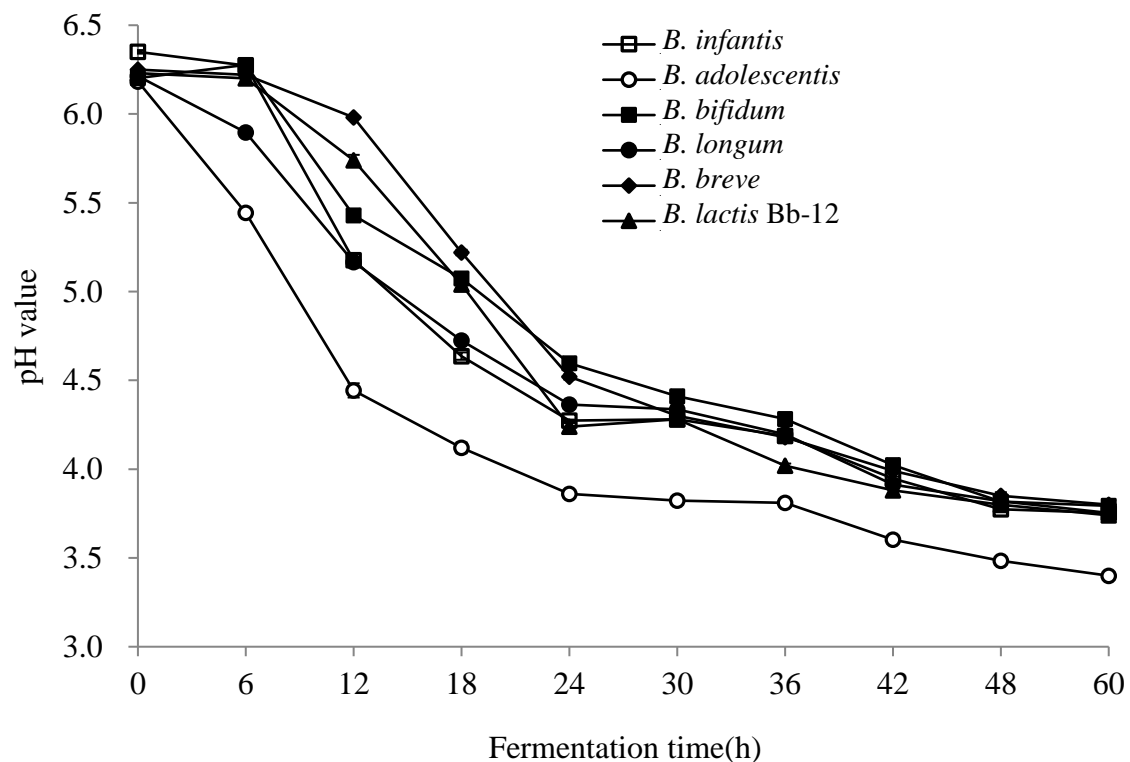
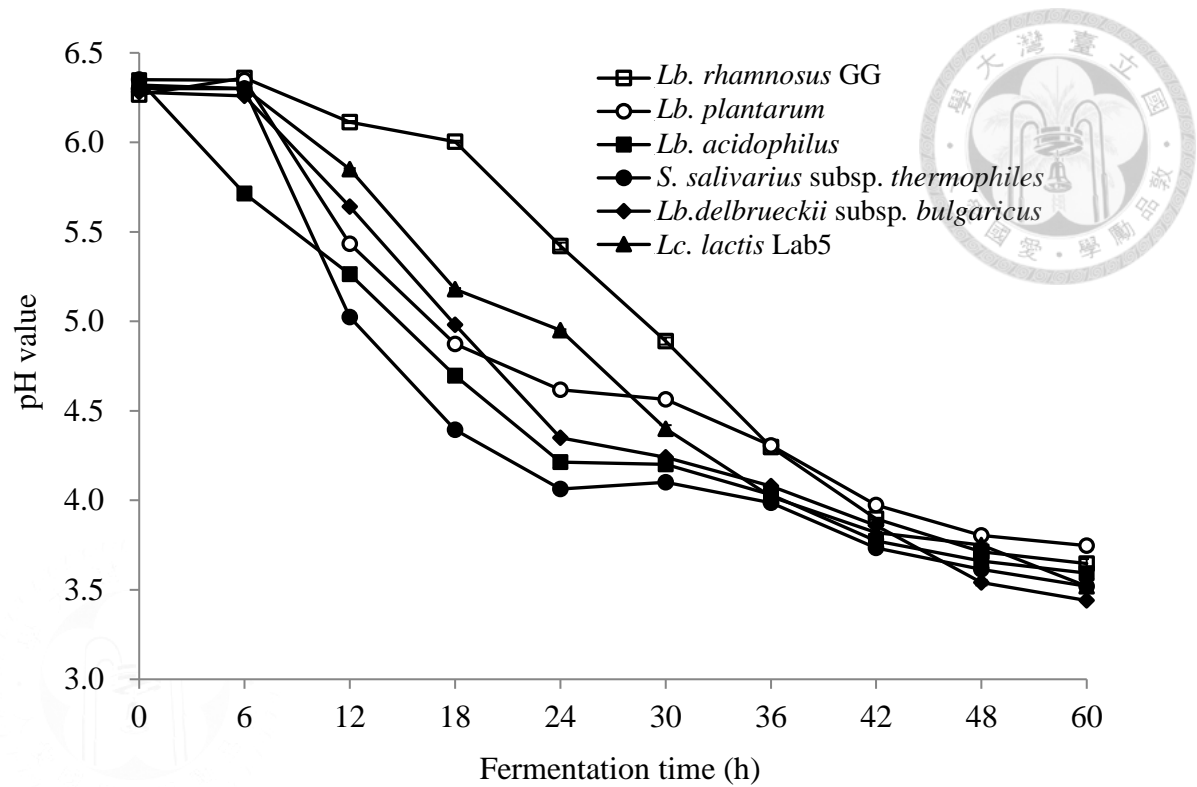


圖 3.2. 實驗架構 II。

Fig. 3.2. The framework of the study II.



圖

3.3. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳 pH 值之影響。

Fig. 3.3..Effect of fermentation on pH value for adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains.Values are expressed as mean \pm SD (n = 3).

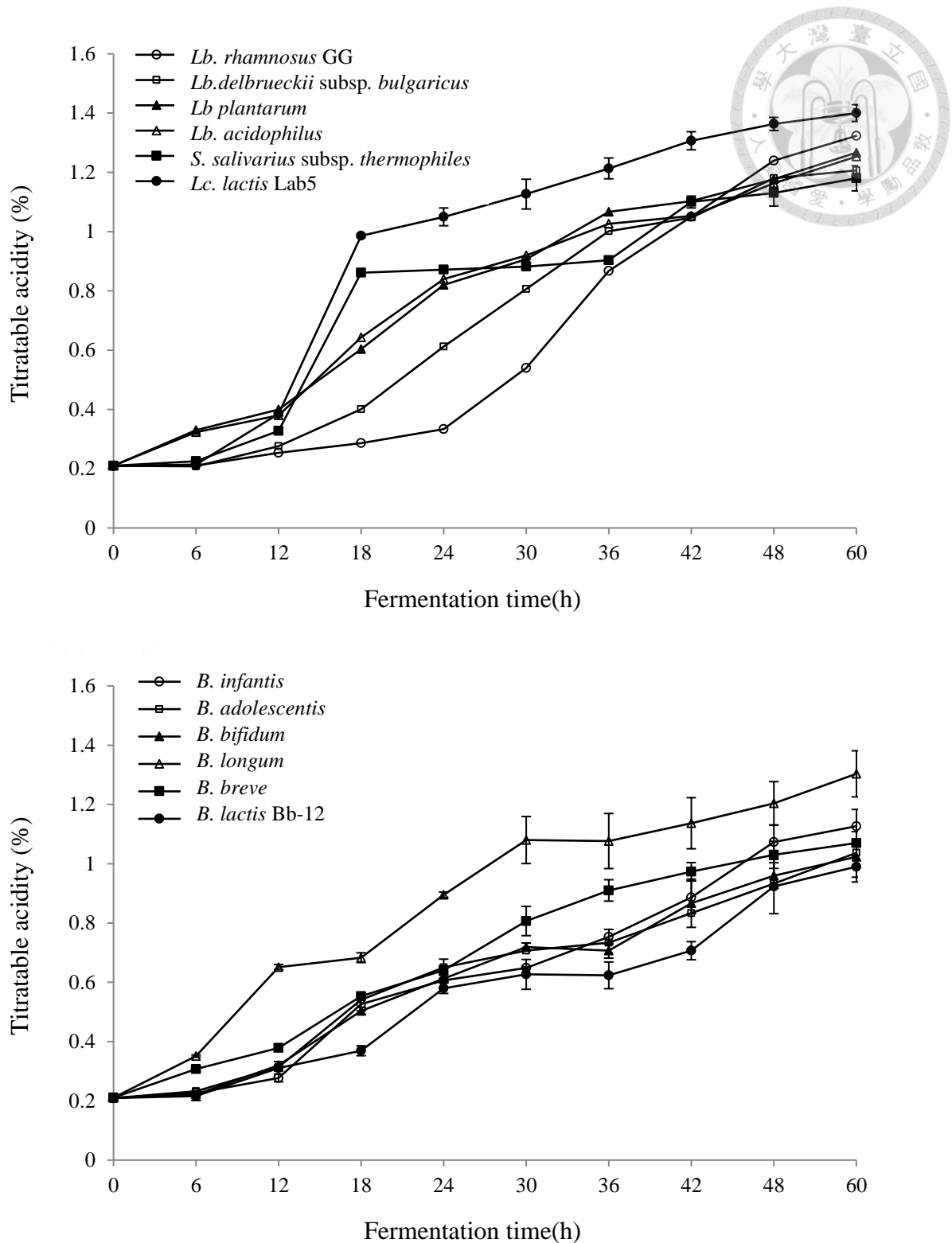


圖 3.4. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳可滴定酸度之影響。

Fig 3.4. Effect of fermentation on titratable acidity for adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains. Values are expressed as mean \pm SD(n = 3).

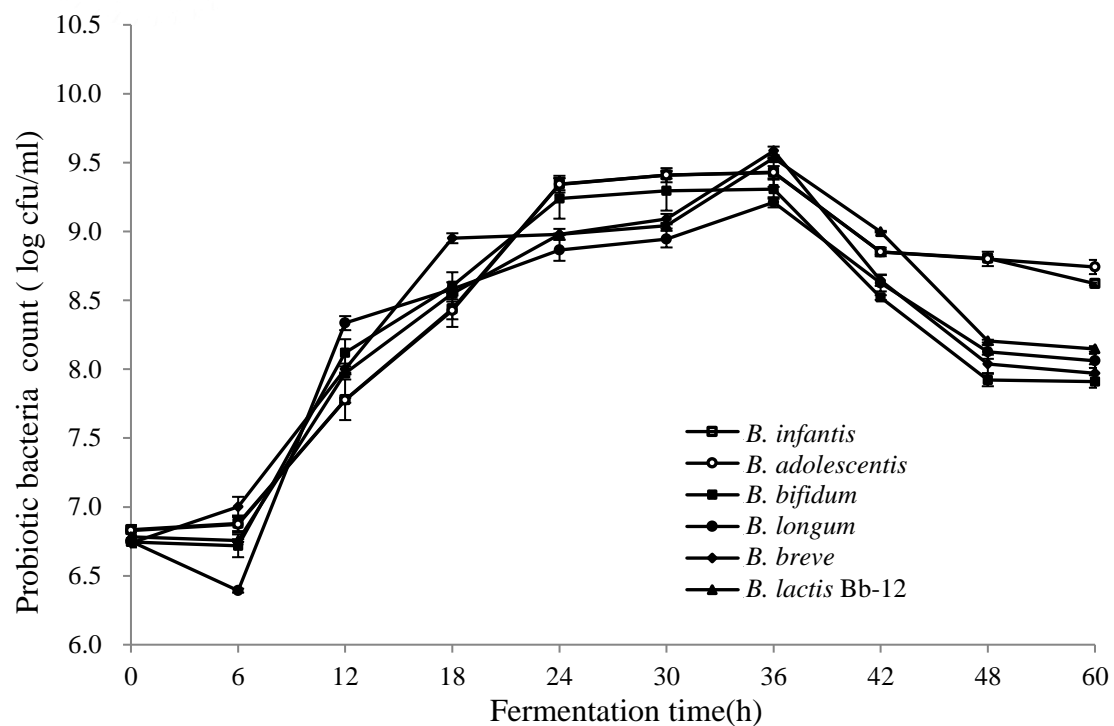
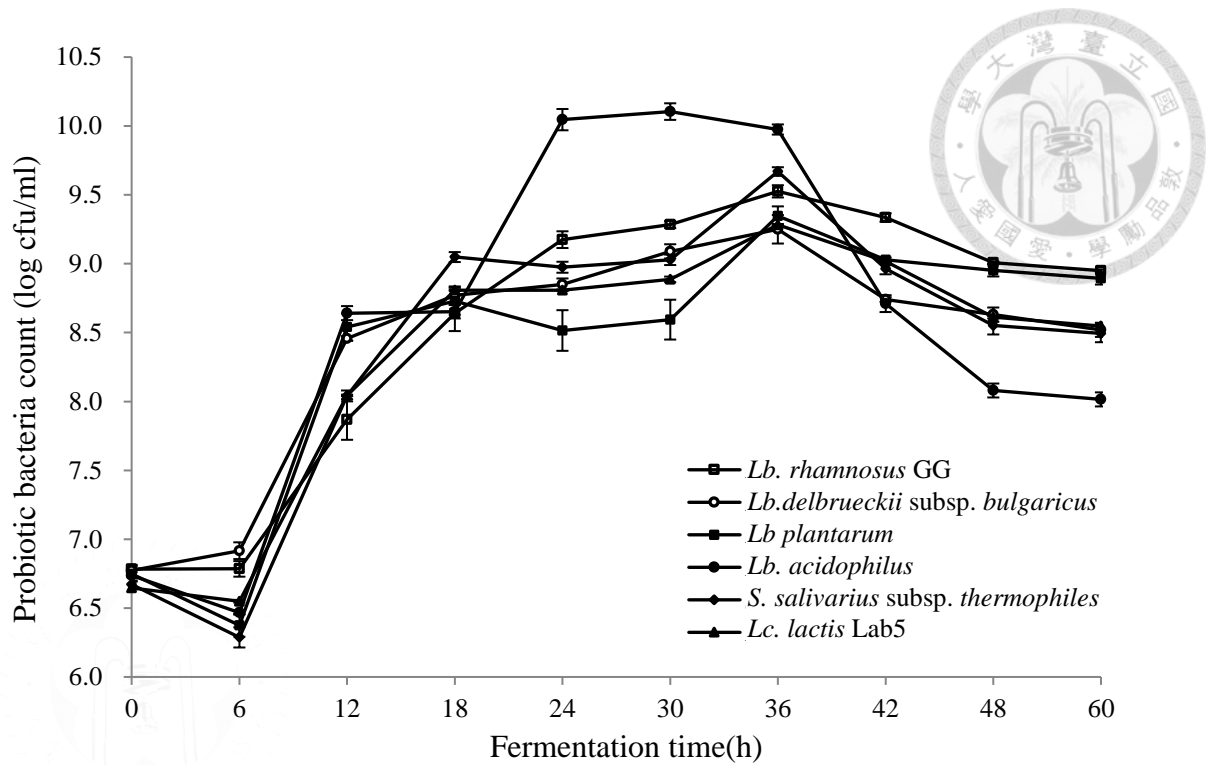


圖 3.5.不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳益生菌數之影響

Fig. 3.5. Effect of fermentation on probiotic bacteria count for adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains. Values are expressed as mean \pm SD(n = 3).

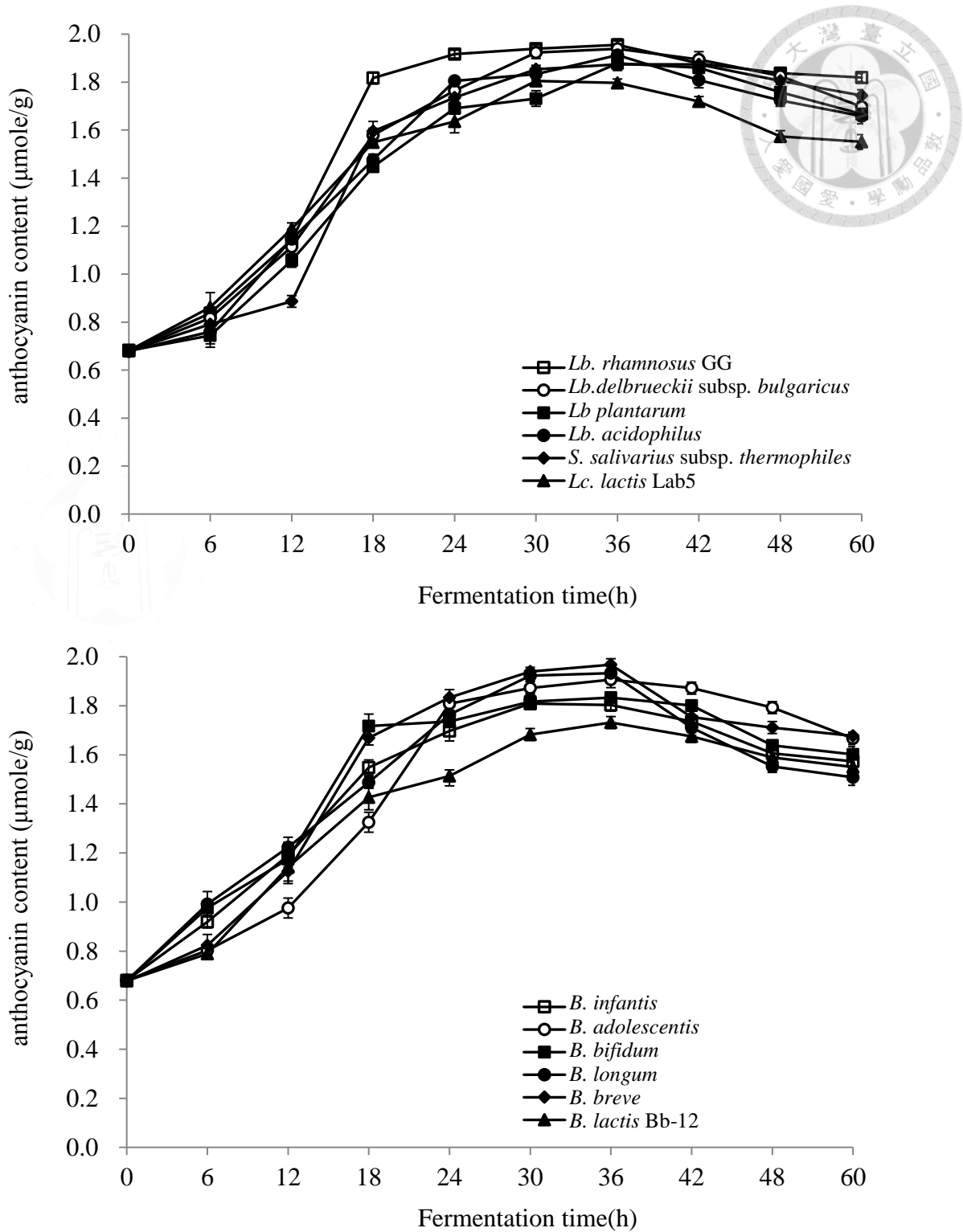


圖 3.6. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳花青素含量之影響。

Fig. 3.6. Effect of fermentation on anthocyanin content for adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains. Values are expressed as mean \pm SD(n = 3).

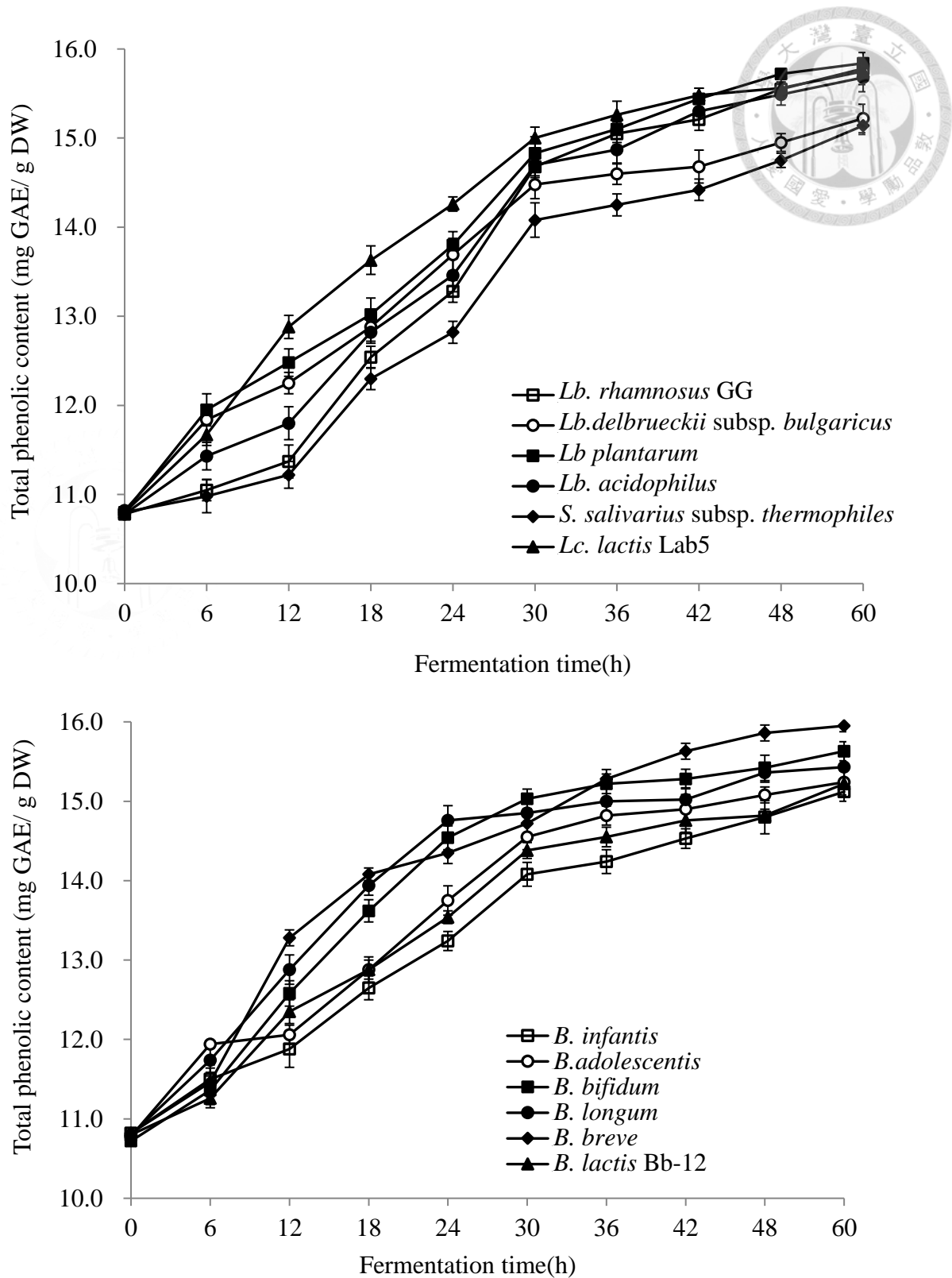


圖 3.7. 不同益生菌株發酵對紅豆發酵乳總酚含量之影響。

Fig. 3.7. Effect of fermentation on total phenolic content content for adzuki bean milk inoculated with different probiotic strains. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3).

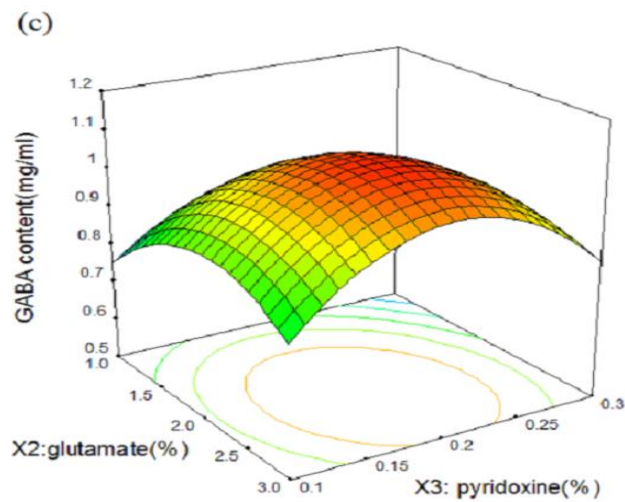
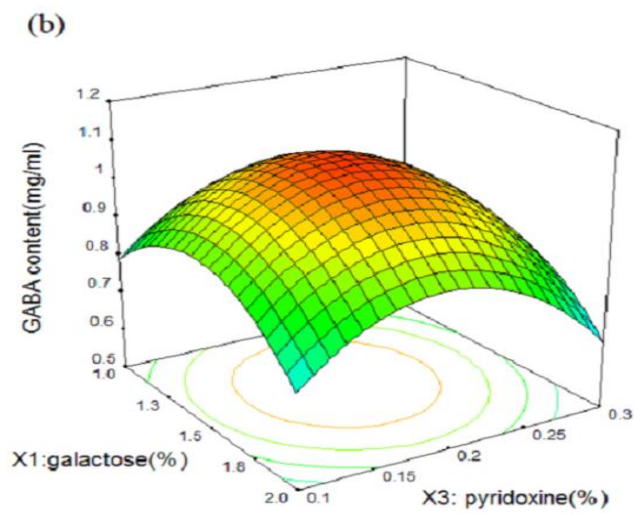
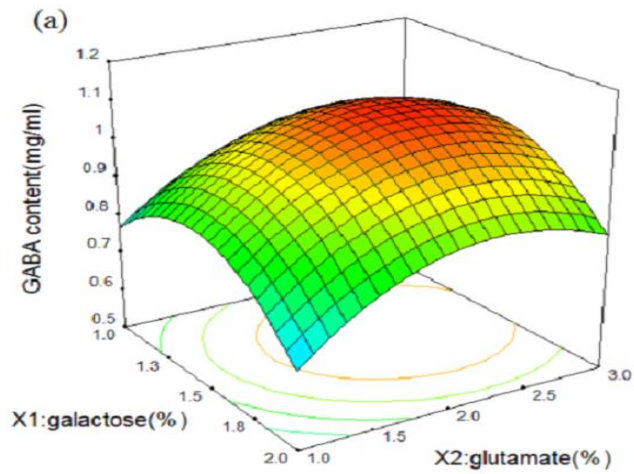
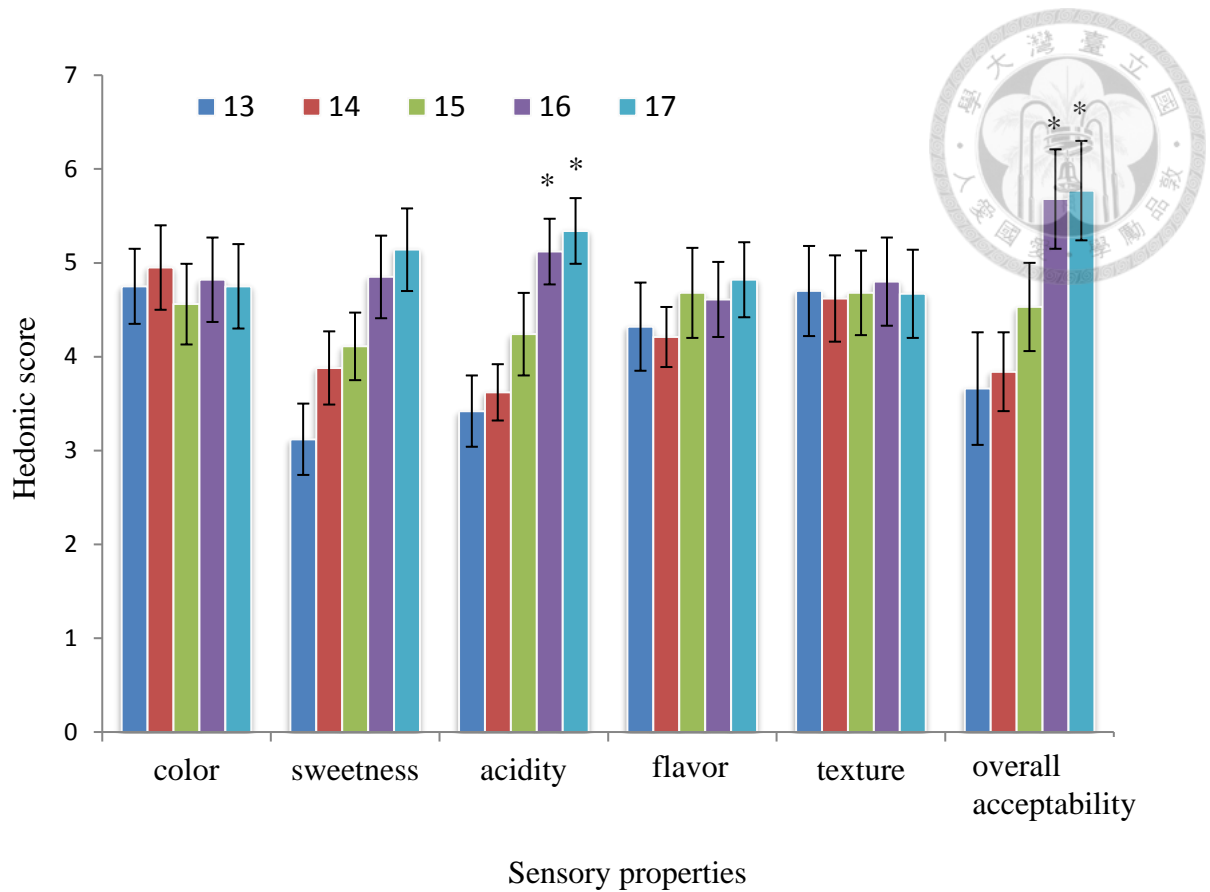


圖 3.8. 發酵紅豆乳 GABA 生成量之反應曲面圖。

Fig. 3.8. The response surface for the production of GABA content of fermented adzuki bean milk.



圖

3.9.不同糖酸比之發酵紅豆乳感官品評值。

Fig. 3.9. Hedonic score of fermented adzuki bean at different sugar/acid ratios. Each value was expressed as mean±SD(n=3).^{*} Statistical differences were calculated by Duncan's multiple range test($p < 0.05$).

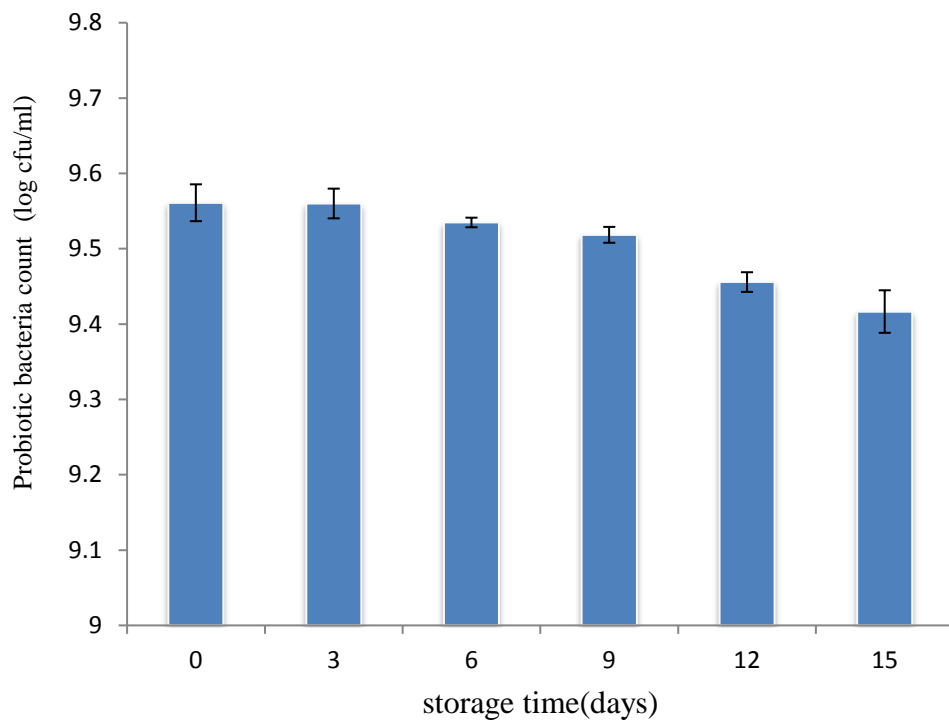
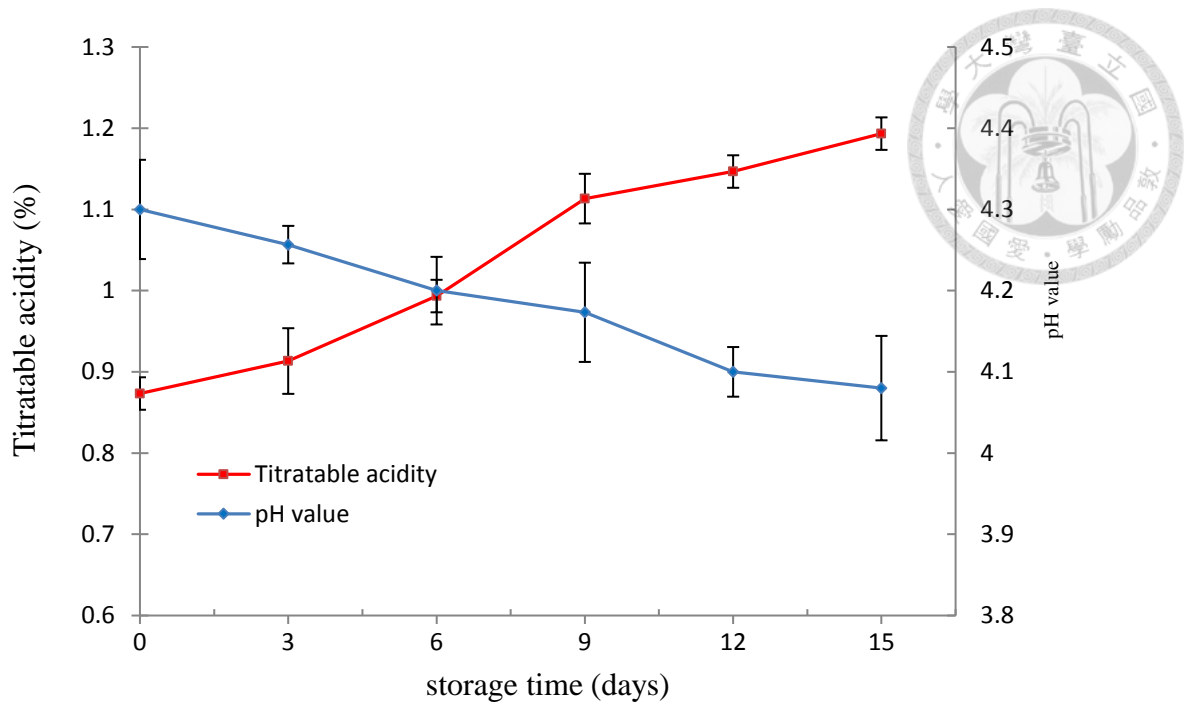


圖 3.10. 紅豆發酵乳儲存期間 pH 值、可滴定酸度及益生菌數之變化。

Fig 3.10. Changes of pH value, titratable acidity, and probiotic bacteria count in fermented adzuki bean milk during storage.

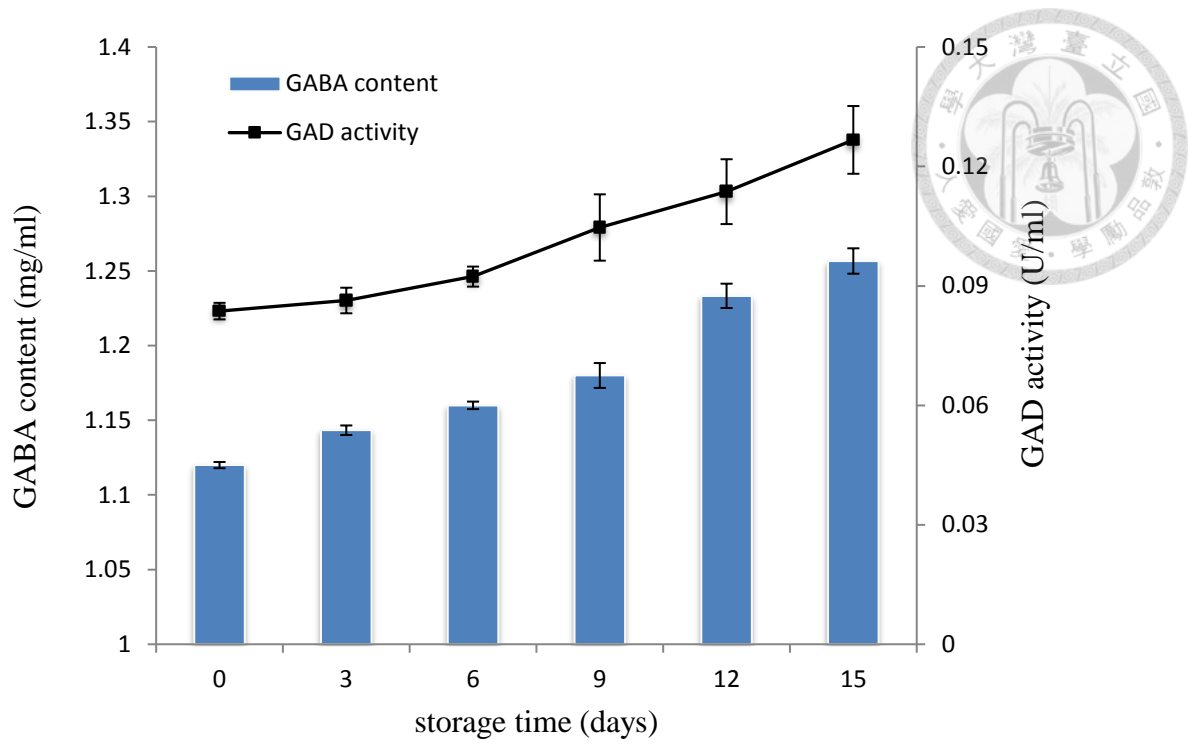


圖 3.11. 紅豆發酵乳儲存期間 GABA 及 GAD 活性之變化。

Fig 3.11. Changes of GABA content and GAD activity in fermented adzuki bean milk during storage at 4°C.

參考文獻



- 呂榮仿、任紅濤、程麗英，2006。發酵奶質量不穩定因素探討及應對措施。食品工業科技 12，63。
- 吳祖芳，1999。褐藻乳酸菌發酵奶飲料的研製。東海海洋 17(2)，56-60。
- 汪宛霖，2006。乳酸菌在紫米奶中的生長情形及紫米發酵乳之研製。中興大學食品暨應用生物科技學系碩士學位論文，臺中市。
- 崔樹勇，2009。乳酸菌發酵豆奶飲料的開發及生產研究。江南大學食品工程學系碩士學位論文，無錫市。
- 張磊，2008。米糠中 γ -胺基丁酸富集技術及保健飲料製作研究。南京農業大學食品科技學院碩士學位論文，南京市。
- 張月眉，2007。利用乳酸菌發酵花生乳生產 γ -胺基丁酸最適發酵條件。國立嘉義大學食品科學系碩士學位論文，嘉義市。
- 張維芬，2012。以納豆菌及乳酸菌共同發酵開發具多重保健功能之紅豆產品。靜宜大學食品營養系碩士學位論文，臺中市。
- 陳筱慧，2006。利用 HPLC 方法檢測發芽種子,發芽玄米,加碼茶,以及市售 GABA 膠囊中 GABA 含量。中興大學食品暨應用生物科技學系碩士學位論文，臺中市。
- 董英麗，2013。乳酸菌對紅豆發酵特性的研究。內蒙古農業大學食品科學與工程學院碩士學位論文，呼和浩特市。
- 馮志彬、程顯好、陳笑、張玉香、李玉芳、李玲，2008。 γ -氨基丁酸產生菌分離篩選及發酵培養基初步優化。中國釀造 27(21)，51-53。
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., Fujimoto, K., 2003. The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of gamma-aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 67(5), 1018-1023.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC International. (17th ed.). Gaithersburg, MD, USA.
- Bae, H.C., Renchinkhand, G., Ku, J.-H., Nam, M.S., 2011. Characterization of fermented milk added with green whole grains of barley, wheat, glutinous rice and common rice powders. CNU Journal of Agricultural Science 38(3), 485-491.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., 2008. Response

- surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5), 965-977.
- Binh, T. T. T., Ju, W.T., Jung, W.J., Park, R.D., 2014. Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters* 36(1), 93-98.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., Foster, J. W., 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181(11), 3525-3535.
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., Baek, K.H., 2012. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4), 1230-1241.
- Gacula, M. C., Singh, J., Bi, J., Altan, S., 2009. Response surface designs and analysis. In M. C. Gacula, J. Singh, J. Bi, S. Altan (Eds.), *Statistical methods in food and consumer research*, 247-256. Academic press, Inc., London, UK.
- Giovanni, M., 1983. Response surface methodology and product optimization. *Food technology* 37, 96-105.
- Grønnevik, H., Falstad, M., Narvhus, J. A., 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal* 21(9), 601-606.
- Heller, K. J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2), 374-379.
- Hu, Y., Ge, C., Yuan, W., Zhu, R., Zhang, W., Du, L., Xue, J., 2010. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(7), 1194-1202.
- Huang, J., Lehe, M., Sheng, Q., Shanjing, Y., Dongqiang, L., 2007. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 15(2), 157-161.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.C., Choi, I., Kim, G.B., 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160, 346-356.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition* 57(3), 490-495.
- Jeng, K.C., Chen, C.S., Fang, Y.P., Hou, R. C.W., Chen, Y.S., 2007. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21), 8787-8792.
- Kang, T. C., Park, S. K., Hwang, I. K., An, S. J., Bahn, J. H., Kim, D. W., Choi, S. Y., Kwon, O. S., Baek, N. I., Lee, H. Y., Won, M. H., 2002. Changes in pyridoxal kinase

- immunoreactivity in the gerbil hippocampus following spontaneous seizure. *Brain Research* 957(2), 242-250.
- Kato, Y., Kato, Y., Furukawa, K., HARA, S., 2002. Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66(12), 2600-2605.
- Kuo, Y.H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C., 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry* 86(4), 537-545.
- Kim, J., Lee, M., Ji, G., Lee, Y., Hwang, K., 2009. Production of [gamma]-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology* 130(1), 12-16.
- Kinnersley, A. M., Turano, F. J., 2000. Gamma aminobutyric acid (gaba) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., Kimura, T., 2005. Production of [gamma]-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology* 22(6), 497-504.
- Koskenniemi, K., 2012. A proteomic view of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. Doctoral dissertation, Molecular and Cellular Proteomics, University of Helsinki Helsinki. Finland.
- Li, H., Yan, L., Wang, J., Zhang, Q., Zhou, Q., Sun, T., Chen, W., Zhang, H., 2012. Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. *Annals of Microbiology* 62(4), 1473-1483.
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z., Han, Y., 2008. Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal* 41(1), 48-52.
- Lu, X. X., Xie, C. Y., Gu, Z. X., 2009. optimisation of fermentative parameters for gaba enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech Journal of Food Sciences* 27(6), 433-441.
- McCue, P. P., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. *Process Biochemistry* 40(5), 1791-1797.
- Monma, G., Hayakawa, K., 2007. Production method of food and beverage products with high content of gamma-aminobutyric acid and food and beverage products with high content of gamma-aminobutyric acid. US Patents, US20070048353 A1
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., Gobbetti, M., 2013. Manufacture of a functional fermented milk enriched of angiotensin-i converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology* 51(1), 183-189.

- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., Suzuki, I., 1998. Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 81(6), 1486-1491.
- Özer, B. H., Kirmaci, H. A., 2010. Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology* 63(1), 1-15.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V., Reddy, A. R., 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* 46(3), 499-502.
- Park, K. B., Oh, S. H., 2007. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technology* 98(2), 312-319.
- Pyo, Y., Song, S., 2009. Physicochemical and sensory characteristics of a medicinal soy yogurt containing health-benefit ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(1), 170-175.
- Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G., Kok, J., 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular microbiology* 27(2), 299-310.
- Seo, Y. C., Choi, W. Y., Kim, J. S., Lee, C. G., Ahn, J. H., Cho, H. Y., Lee, S. H., Cho, J. S., Joo, S. J., Lee, H. Y., 2012. Enhancement of the cognitive effects of γ -aminobutyric acid from monosodium glutamate fermentation by *Lactobacillus sakei* B2-16. *Food Biotechnology* 26(1), 29-44.
- Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., Li, T., Zhang, L. W., Jiang, Y. J. 2015. Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2138-2149.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4(11), 446-452.
- Sugiyama, M., 2012. Method of producing GABA-containing fermented product: US Patents, US8153175 B2
- Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y., Zhang, H., 2009. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *European Food Research and Technology* 228(4), 607-612.
- Tong, J. C., Mackay, I. R., Chin, J., Law, R. H. F., Fayad, K., Rowley, M. J., 2002. Enzymatic characterization of a recombinant isoform hybrid of glutamic acid decarboxylase (rGAD67/65) expressed in yeast. *Journal of Biotechnology* 97(2), 183-190.

- Tsuji, K., 1992. Antihypertensive activities of beni-koji extracts and γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 50, 285-291.
- Tung, Y. T., Lee, B.H., Liu, C.F., Pan, T.M., 2011. Optimization of culture condition for acei and gaba production by lactic acid bacteria. *Journal of food science* 76(9), 585-591.
- Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., Oda, K., 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(7), 1168-1171.
- Wu, T. Y., Tsai, C. C., Hwang, Y. T., Chiu, T. H., 2012. Effect of antioxidant activity and functional properties of Chingshey purple sweet potato fermented milk by *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. gasseri* strains. *Journal of food science* 77(1), 2-8.
- Yang, F., Li, J., Xu, Y., Fang, J., 2008. Optimizing of fermentation condition for high-production glutamic acid decarboxylase(GAD). *Journal of Food Science and Biotechnology* 27(4), 107-111.

附 錄

(The article has been accepted for published in J Food Drug Anal.)



Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk



Hung Yi Song,^{ab,*} Roch Chui Yu^b

^a Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture Executive Yuan, Taipei, Taiwan, ROC

^b Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

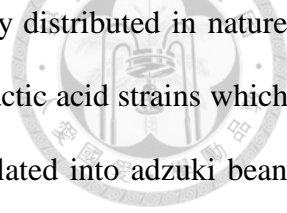
Postal address: Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, No.15
Sec 1, Hangzhou South Rd, Taipei, Taiwan.

TEL: 886-2-2393-7231ext596

FAX: 886-2-2985-3402

E-mail: d92641007@ntu.edu.tw (H.-Y. SONG), yurc@ntu.edu.tw (R.-C. Yu)

Abstract



γ -aminobutyric acid (GABA), a non-protein amino acid, is widely distributed in nature which provides several physiological functions. In this study, various lactic acid strains which were commonly used to produce fermented milk products were inoculated into adzuki bean milk for producing GABA. The high GABA producing strain was selected in further experiment to improve the GABA production utilizing culture medium optimization. The results demonstrated that adzuki bean milk inoculated with *L. rhamnosus* GG increased GABA content from 0.05 mg/mL to 0.44 mg/mL after 36 h. of fermentation, which showed the greatest elevation in this study. Further, the optimal cultural condition to adzuki bean milk inoculated with *L. rhamnosus* GG to improve the GABA content was performed by response surface methodology (RSM). The results showed that GABA content was dependent on the addition of galactose, monosodium glutamate and pyridoxine with which the increasing ratios of GABA was 23-38%, 24-68%, and 8-36%, respectively. The optimal culture condition for GABA production of adzuki bean milk was found at the content of galactose 1.5%, monosodium glutamate 2%, and pyridoxine 0.3%. Under the optimal cultural condition, the amount of GABA produced in the fermented adzuki bean milk was 1.08 mg/ mL, increased 21.6 folds higher than that of the unfermented adzuki bean milk (0.05 mg/ 100mL). The results suggested that the optimized cultural condition of adzuki bean milk inoculated with *L. rhamnosus* GG can increase GABA content for consumers as a daily supplement as suggested.

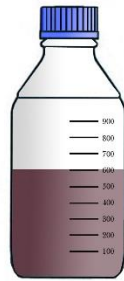
Keywords

Gamma-aminobutyric acid, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Adzuki beans, Response surface methodology

1 Graphical Abstract



Adzuki bean

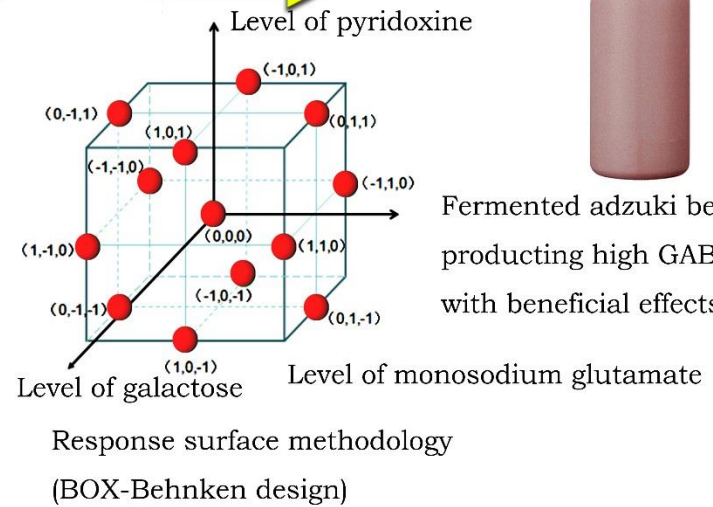


Sterilized Adzuki bean milk

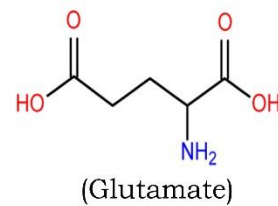
Inoculation with LAB



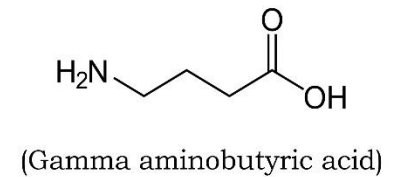
Optimization of cultural conditions



Fermented adzuki bean milk producing high GABA yield with beneficial effects



Glutamate and decarboxylase



1. Introduction

The adzuki bean (*Vigna angularis*) is an annual vine widely grown throughout Southern Taiwan that is used mainly in the production of sweets such as mooncakes, tangyuan, youkan, etc. It is a good source of a variety of minerals, with 100 g of adzuki beans providing 7.1 mg of iron, 162 mg of magnesium, 442 g of potassium, 3.1 mg of zinc and 94.5 mg of calcium. It also contains various amino acids, the most abundant being glutamate (3608 mg/100g), followed by aspartate, leucine, lysine and arginine [1]. In addition, the adzuki bean contains pro-anthocyanidins and polyphenols that are known to have antioxidant effects, attenuate blood pressure elevation, lower serum triglyceride level, suppress hyperglycemia, and prevent cancer metastasis [2]. Though the adzuki bean is used extensively in the treatment of dropsy and beriberi in traditional Chinese medicine [3], it is seldom the focus of functional food development studies.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a four carbon non-protein amino acid that is known to function as an inhibitory neurotransmitter in the brain and spinal cord of mammals. GABA is produced primarily from the α -decarboxylation of glutamate catalyzed by glutamate decarboxylase (GAD) and is known for relieving menopausal syndrome, enhancing immunity, treating cancer, preventing chronic alcohol-related symptoms and fighting obesity[4]. Although GABA is available in many fruits and vegetables, the concentration in foods is low in nature ranging from 0.03 to 2.00 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight [5]. Many researches focus on finding new ways to increase GABA content in natural food that can benefit human health. Environmental stress, additives and biotransformation have been found to stimulate the accumulation of GABA [6, 7]. The microorganism fermentation is an effective and convenient method to ferment and produce GABA in food industry. The fermentation of *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, and *Rhizopus microspores* var. *oligosporus* can produce high-purity GABA, such as Tempeh, and Chinese fermented soybean product [6, 8]. Lactic acid bacteria

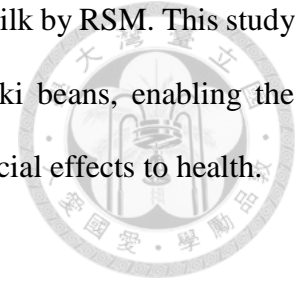
(LAB) have been applied in GABA production over the last few years. For example, *Lactobacillus brevis*, *L. paracasei* and *Lactococcus lactis* are applied to the GABA-rich foods and pharmaceuticals synthesis [9-11]. The GABA-producing LAB is mostly cultivated in synthetic or semisynthetic media; however, the purification of GABA after fermentation is necessary, and this will increase the time and cost of production. Application of natural media such as dairy products, fruits and vegetables for LAB to obtain GABA-enriched food could avoid the previous problems, however the literature was limited.

The adzuki bean contains a high level of glutamate and has the potential via fermentation with LAB for enrichment of the GABA content; further development of fermented milk that is suitable for drinking every day and that assists the consumer to take in enough GABA and calcium to experience the conferred health benefits would then be possible.

It is found that GABA-production ability of LAB is influenced by the cultural compositions suitable for glutamate decarboxylase reaction, especially by the type of carbon source, nitrogen source and other components [12-14]. It is important to optimize the medium for enhancing GABA production during fermentation. Traditional optimizing methods involve changing one independent variable while fixing the others at given levels, but the single-dimensional search technique often fails to yield optimized conditions because it does not consider possible interactions among factors. Response surface methodology (RSM) is a combination of statistical and mathematical techniques useful for optimization of bioprocesses. It can be used to evaluate the effect of several factors that influence the responses by varying them simultaneously in limited number of experiments. Based on the key factors influencing the GABA production opted with one independent variable, RSM was applied to optimize the factors of medium for enhancing the GABA production.

The purposes of this study are aimed to evaluate the effects of various LAB commercially-used [15, 16] in the production of fermented milk on the GABA yield of fermented adzuki

bean milk and to find out the optimal culture medium of adzuki bean milk by RSM. This study provides an alternative to the traditional utilization of cooked adzuki beans, enabling the production of a variety of functional adzuki bean products with beneficial effects to health.



2. Materials and methods

2.1. Materials, reagents and equipments

Adzuki beans (obtained from Wandan Farmer's Association in Taiwan) were washed and soaked in five-fold volume of water (w/w) at 37°C for 8 h. After soaking, the adzuki beans and soaking solution were homogenized to a paste and filtrated twice through cotton cloth. Powdered skim milk (5%) was added to the filtrate and the mixture was homogenized in a blender for 5 minutes and heated in a water bath at 90°C for 1 h to prepare for the adzuki bean milk (ABM).

2.2. LAB strains

Bifidobacterium adolescentis (BCRC 14606), *B. longum* (BCRC 14634), *B. bifidum* (BCRC 14615), *B. breve* (BCRC 11846), *L. rhamnosus* GG (BCRC16000), *L. plantarum* (BCRC11697), *L. acidophilus* (BCRC14079), and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BCRC14085) were purchased from the Bioresource and Collection Center of the Food Industry Research and Development Institute (HsinChu, Taiwan). LAB were cultured in MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA) at 37°C in 5% CO₂ for 48 h, giving cells number about 8 log cfu/mL.

2.3. Adzuki bean milk fermentation

The ABM was inoculation with 1% activated probiotic strain and fermentation at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 6 to 60 h. The lactic acid bacteria count, pH and GABA content in the ABM were analyzed.

2.4. Cultural conditions for GABA production

2.4.1. Carbon source addition

Glucose, fructose, maltose, and galactose with concentration of 0.5-2% were respectively added to 100 mL ABM. It was inoculated with 1% *L. rhamnosus* GG BCRC16000 (v/v, 8 log cfu/mL) and fermented at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 36 h. in order to assay the best suitable conditions for GABA production.

2.4.2 Nitrogen source addition

Soytone, soy protein isolate and monosodium glutamate with concentration of 1-6% were, respectively, added to the ABM (100 mL) as the nitrogen source. The subsequent step was the same as 2.4.1.

2.4.3. Other source addition

Pyridoxine, which was filtered through a 0.22 μM sterilized membrane filter (Critical® Syringe Filters; Critical Process Filtration Inc., Nashua, NH, USA), together with magnesium sulfate and calcium chloride with concentration of 0.5-2% were added to ABM. The subsequent step was the same as 2.4.1.

2.5. Response surface methodology

On the basis of single-factor experiments, the cultural conditions to the cultured ABM, namely galactose (X1), monosodium glutamate (X2), and pyridoxine (X3), for the GABA yield (Y) in the ABM were optimized using response surface methodology (RSM) (RSREG in the Statistical Analysis System, SAS, Cary, NC, USA). The factors and levels investigated using a Box–Behnken design was listed in Table 1. The experimental results were analyzed by quadratic stepwise regression to fit the following second-order polynomial equation (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{i<j}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Where Y denotes the response observed for treatment combination X = (X1, X2, X3) for p factors, β_0 represents the intercept, and the parameters β_i , β_{ii} and β_{ij} represent the

regression coefficients of variables for linear, quadratic and interaction regression terms, respectively.

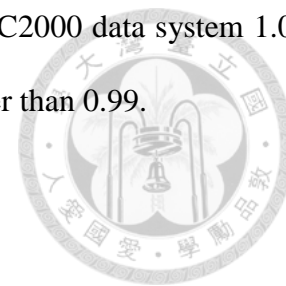
2.6. *Viable cells of Lactic acid bacteria*

Viable cells of LAB were quantified using the plate enumeration method. The viable cell numbers were determined after 36 h of incubation at 37 °C under anaerobic condition. Plates with 25–250 colonies were enumerated and recorded as colony forming units per millimeter (cfu/mL) of fermented milk.

2.7 *Gamma aminobutyric acid assay*

Freeze-dried fermented ABM powder of 0.1 g was extracted by the addition of 10 volumes of 70% (v/v) ethanol and ultrasonication at 2°C for 10 min. The samples were then centrifuged (18,000 x g, 15 min) and the precipitates were extracted twice as described above [12]. The supernatants were pooled and concentrated under vacuum, then re-dissolved in 0.1 M ammonium acetate to 10 mL, filtered through a 0.22 µm membrane filter (Critical® Syringe Filters; Critical Process Filtration Inc.) and analyzed for GABA content by HPLC gradient system with pre-column phenylisothiocyanate (PITC) derivation [17]. 20 µL sample extract was removed and dried under vacuum. Then 20 µL of derived reagent A [methanol, water, triethylamine (2:2:1; v/v)] was added. After mixing, the sample was directly dried under vacuum and was then reacted with 30 µL of derived reagent B [methanol, PITC, TEA, water (7:1:1:1; v/v)] at room temperature for 20 min before drying under vacuum to remove PITC. The derivatized samples were then redissolved in 200 µL of buffer A (0.1 M ammonium acetate, pH 6.5) that is used as mobile phase for HPLC and filtered through a Millipore membrane (0.22 µm). A 20 µL sample was injected into an HPLC system using a gradient system of buffer A (100–0% after 50 min) and buffer B [0.1 M ammonium acetate containing acetonitrile and methanol, 44:46:10, v/v, pH 6.5 ; (0–100% after 50 min)]. C18 reversed-phase column from Phenomenex(C18, 4 micron) was used. The flow rate was 1 mL/min.

Absorbance was detected at 254 nm. The results were analyzed by EC2000 data system 1.0 (Analab CO., Taipei). The coefficient of determination (r^2) was greater than 0.99.



3. Results and discussion

3.1. LAB screening for high GABA production in adzuki milk

The changes in pH and the lactic acid bacteria counts of the ABM during fermentation were as shown in Figure 1. The result showed that after 36 h incubation with different lactic acid strains, the pH values of ABM were decreased from 6.3 to the range of 3.81 to 4.31 (Fig. 1A). In the *L. rhamnosus* GG inoculation group, the pH value of ABM was significantly higher than the other groups (pH of 4.31). Previous study found that glutamate decarboxylase (GAD), a critical GABA synthesis enzyme, presents the high ability for synthesizing GABA at pH value of 4.4, which suggests that pH value of fermentation plays an important role in GABA production by regulating the activity of GAD [18]. Our result (Figure 1A) showed that ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG after 36 h may cause a low pH value of 4.31. The low pH value of fermentation may help to increase the production of GABA.

After 36h incubation, the growth of lactic acid bacteria was increased from 6.7 to 9 log cfu/mL when inoculated with ABM (Figure 1B), which is similar to previous study [19]. The *L. rhamnosus* GG inoculated ABM group exhibited the rapid growth ability after 36 h fermentation (9.53 cfu/mL), and reached the highest growth ability within 42-60 h compared to the other groups.

The GABA content of ABM milk without probiotic inoculation was approximately 0.05 mg/mL. After fermentation with LAB, the content significantly increased ($P < 0.05$; Table 2), reaching a maximum after 36 h. of fermentation, and then decreased (Table 2). Of the ABM fermented with the different strains of LAB, one that was inoculated with *L. rhamnosus* GG had the highest yield of GABA (0.44 mg/mL; $P < 0.05$) after 36 h. of fermentation, which was

approximately nine-fold the original content. Therefore, *L. rhamnosus* GG was selected in following experiments due to its rapid growth and high production of GABA.

3.2. Effect of the culture ingredients on GABA production in fermented adzuki milk

The effects of carbon source addition in ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG on GABA content were shown in Table 3. Without adding carbon source, the production of GABA was 0.44 mg/mL. With addition of galactose to ABM resulted in a higher GABA content than that of ABM with addition of other carbon-source ($P < 0.05$). In 1.5% galactose addition group, the GABA production increased up to 0.61 mg/mL, and no significant increase was observed when a higher concentration (2%) of galactose was added ($P > 0.05$).

GABA production by *L. brevis* K203 was addition 4% maltose with a 16 % increase of GABA, compared to standard MRS medium [20]. Our results showed that the addition of 1.5% galactose to ABM significantly increased 38.6% GABA content. Koskenniemi suggested that *L. rhamnosus* GG could degrade galactose by two different pathways: the Leloir pathway, which converts galactose to glucose-6-phosphate, and the tagatose-6-phosphate pathway, which metabolizes galactose to glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate [21]. It may be explained why the addition of galactose in ABM with *L. rhamnosus* GG can improve the production of GABA. The actual mechanism need to investigate in further study.

With regards to the nitrogen source, addition of monosodium glutamate to the ABM during fermentation led to a higher GABA. Our findings showed that the increasing ratios of GABA with addition of monosodium glutamate as a nitrogen source was 24-68%, respectively, higher than that of soytone or soy protein isolate. An addition of 2% monosodium glutamate could increase the GABA generation up to 0.64 mg/mL, while no significant increase of GABA content was observed as the concentration of monosodium glutamate was increased to 4–6% ($P > 0.05$). Monosodium glutamate can hydrate to form Na^+ and L-glutamic acid which is the substrate for GABA synthesis. Increasing the added glutamate was aiming to stimulate

the production of GABA by glutamate decarboxylase via GABA shunt [22]. Production of GABA by *Lactococcus lactics* in MRS broth, increase of monosodium glutamate addition at lower levels (0–20 g/L) can increase GABA yield [23]. Monosodium glutamate concentration above a certain level would inhibit cell growth. As for *L. rhamnosus* YS9, monosodium glutamate concentration should be limited to 200 mM. The highest GABA yield was observed with 200 mM of monosodium glutamate by *L. rhamnosus* YS9 [18]. Our findings showed the addition of 2% monosodium glutamate to ABM significantly enhanced its GABA content to 0.64 mg/mL ($P < 0.05$).

With regards to the addition of pyridoxine and mineral salts, 0.2% pyridoxine addition resulted in the highest GABA content, which was considerably higher than that with addition of magnesium sulfate or calcium chloride ($P < 0.05$). Increasing the addition levels of pyridoxine did not induce a higher production of GABA. Pyridoxal phosphate (PLP) plays an important role in stimulating GAD activity since it is a cofactor of enzyme [24]. Thus, the addition of PLP to the culture medium might influence GABA production [25]. With the addition of PLP, GABA production increased and reached to 7333 mg/L, 200 mM and 504 mg/kg during the fermentation with *S. salivarius* subsp. *thermophiles* Y2, *L. paracasei* NFRI 74150 and *L. plantrum* C48, respectively [26]. The enhancement effect of GABA production was similar to that of *S. salivarius* subsp. *thermophiles* Y2, *L. paracasei* NFRI 74150 and *L. plantrum* C48 [26]. The addition of sulfate ions increased the GAD activity of *L. brevis* IFO 12005 in a dose-dependent manner, suggesting that the increased GAD activity was due to an increased hydrophobic interaction between the subunits [26]. It explained that the addition of 0.3% magnesium sulfate to ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG could slightly increase GABA production, which was lower than that with addition of pyridoxine.

3.3. Optimization of culture conditions for GABA production in fermented adzuki milk

In present study, three factors including galactose, monosodium glutamate, and pyridoxine addition in ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG on GABA content were selected as independent variables. The Box-Behnken design (BBD) and the corresponding experimental data were shown in Table 1. Multiple regression analysis of the data demonstrated that the RSM design model was consistent with the second-order polynomial equation referred to as Eq. (1). The second-order polynomial model describing the correlation between GABA content and the three variables in this study is presented in Eq. (2) as below:

$$Y = -1.37 + 1.73X_1 + 0.49X_2 + 6.77X_3 + 0.01X_1X_2 - 0.15X_1X_3 + 0.38X_2X_3 - 0.60X_1^2 - 0.12X_2^2 - 18.88X_3^2 \quad (2)$$

Where Y was the predicted GABA production; X1, X2, and X3 were the uncoded values of initial concentration of galactose, monosodium glutamate and pyridoxine, respectively.

Table 4 showed that the proposed model was adequate for its purpose and had a satisfactory value of R^2 (0.9726). The closer the value of R^2 was to unity, the better did the empirical model fit the actual data. The “F-value” was 19.70, which implied that the model was significant because model terms which the values of “Prob > F” was less than 0.01. Meanwhile the model was adequate in approximating the response surface of the experimental design. Response surface plots were used to illustrate the interactive effects of galactose, monosodium glutamate and pyridoxine concentration on GABA content. The response surface plots for GABA content were displayed in Fig. 2. At a fixed pyridoxine concentration of 0.2%, as shown in Fig. 2(a), galactose addition led to a slight increase in GABA content; however, GABA content decreased if the addition level was higher. The highest GABA content happened at the galactose concentration of 1.5%. On the other hand, if the galactose level was set, the GABA content sharply increased with the addition of monosodium glutamate, in which the optimal addition concentration was 2%. The effects of monosodium glutamate and pyridoxine, at a constant galactose concentration of 1.5%, on GABA content were illustrated in Fig. 2(b). At the fixed monosodium glutamate concentration, GABA content increased rapidly with the increase of

pyridoxine addition at the beginning, after that a slower rate was observed, which showed the same relation between the GABA yield and the addition of monosodium glutamate. Figure 2(c) showed the effects of galactose and pyridoxine concentrations on GABA content in ABM at a constant monosodium glutamate concentration of 2%. The GABA content increased when the galactose concentration increased from 1.0% to 1.5%, and decreased thereafter when the galactose concentration was above 1.5%. At a fixed galactose concentration, the GABA content reached a peak value when the addition level of pyridoxine was 0.2%.

According to the results of RSM test, the optimal additives to the cultured ABM for the highest GABA content were 1.5% galactose, 2% monosodium glutamate and 0.2% pyridoxine. Under these optimal conditions, the predicted maximum GABA content in the fermented ABM was 1.11 mg/mL. Verification of the model represented by Eq. (2) was performed under the optimum conditions for maximum GABA content. The average GABA content observed in fermented ABM under the optimal conditions was 1.08 mg/mL, which was in agreement with the predicted value of the model. The GABA content in ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG and fermented under the optimum conditions was 21.6-fold that of unfermented ABM (which had a GABA content of 0.05 mg/mL).

In skim milk inoculated with *L. helveticus* after 30 h. of fermentation, the GABA content reached 0.165 mg/mL and had a high ACE-inhibitory activity [27]. In female patients with mental symptoms who were administered defatted rice germ enriched with GABA (26.4 mg GABA/day), and symptoms such as sleeplessness, somniphathy and depression improved in more than 65% of the patients [28]. The amount of GABA produced in the fermented ABM in this study was 108 mg/100 mL, which is sufficient to provide the beneficial functions. Previous study demonstrated that the fermentation of beans with GABA provides a successful strategy for producing a functional food with antihypertensive activity [29]. This study showed the alternative utilization of adzuki beans to promote health benefits of with enriched GABA and

probiotic bacteria when it was taken by consumers as a dietary supplement to provide the content required for physiological efficiency.



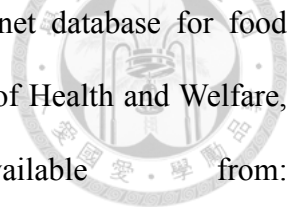
4. Conclusions

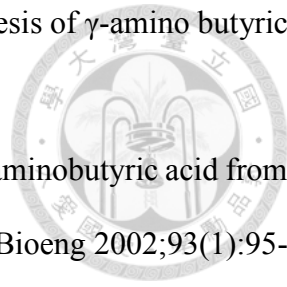
In this study, we focused on development of novel GABA enriched adzuki bean fermented milk. Various LAB strains that were commercially used in food fermentation were used to ferment milk with adzuki bean. Among all LAB strains, *L. rhamnosus* GG was selected in the following experiment due to its high GABA production ability. In addition to improve the GABA production in adzuki bean fermented milk, the adzuki bean fermented culture medium was also optimized by RSM. The RSM result suggests that the optimal culture medium including 1.5% galactose, 2% monosodium glutamate, and 0.4% pyridoxine can help to increase GABA production more than 21.6 folds compared to unfermented adzuki bean milk. The further studies on scaling up the production of adzuki bean fermented milk beverage will be the next challenge in future applications.

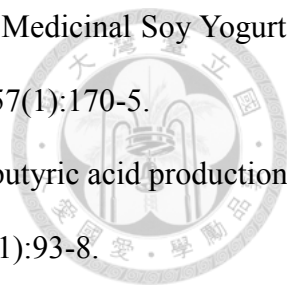
Acknowledgements

This paper was support provided by the Agriculture and Food Agency Council of Agriculture Executive Yuan. We also thank Mrs. Qian-wen Shang, who received her bachelor degree of English from National Chengchi University for English editing.

Reference

- 
- [1] Food and Drug Administration DoH, Executive Yuan. The internet database for food composition in Taiwan.: Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare, R.O.C.; 2015 [cited 2015]. Available from: <https://consumer.fda.gov.tw/Food/TFND.aspx?nodeID=178>.
- [2] Sato S, Mukai Y, Yamate J, Kato J, Kurasaki M, Hatai A, et al. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(1):43-9.
- [3] Itoh T, Umekawa H, Furuichi Y. Potential ability of hot water adzuki (*Vigna angularis*) extracts to inhibit the adhesion, invasion, and metastasis of murine B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005;69(3):448-54.
- [4] Oh S, Moon Y, Soh J, Cha Y. Effect of Water Extract of Germinated Brown Rice on Adiposity and Obesity Indices in Mice Fed a High Fat Diet *J Food Sci*. 2005;10(3):251-7.
- [5] Kim J, Lee M, Ji G, Lee Y, Hwang K. Production of [gamma]-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int J Food Microbiol*. 2009;130(1):12-6.
- [6] Aoki H, Uda I, Tagami K, Furuya Y, Endo Y, Fujimoto K. The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of gamma-aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67(5):1018-23.
- [7] Kinnersley A, Turano F. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 2000;19(6):479-509.
- [8] Jiang LW, Zhou CY, Xia B, Li ZJ. Primary determination of γ -amino butyric acid content in fermented soybean product. *China Brewong*. 2007;4:62-6.

- 
- [9] Xu JJ, Jiang B, Xu SY. Screening of lactic acid bacteria for biosynthesis of γ -amino butyric acid. *J Food Sci Technol*. 2002;10:7-8.
- [10] Yokoyama S, Hiramatsu J-i, Hayakawa K. Production of [gamma]-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J Biosci Bioeng* 2002;93(1):95-7.
- [11] Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol*. 2007;98(2):312-9.
- [12] Chang YM. Optimization of the Peanut Milk Fermentation Conditions for the Production of γ -aminobutyric acid by Lactic Acid Bacteria., National Chiayi University. Chiayi. Taiwan, 2007.
- [13] Menghe B, Ji LI, Luo B, Zhang YB, Li L, SU SH, et al. Optimization of culture medium for lactic acid bacteria with high production of γ -amino butyric acid in traditional dairy products. *Science and Technology of Food Industry*. 2009;7:124-7.
- [14] Li H, Qiu T, Gao D, Cao Y. Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids*. 2010;38(5):1439-45.
- [15] Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J*. 2001;11(1):1-17.
- [16] Parvez S, Malik K, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*. 2006;100(6):1171-85.
- [17] Cohen SA, Strydom DJ. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Anal Biochem*. 1988;174(1):1-16.
- [18] Lin Q. Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Braz J Microbiol*. 2013;44:183-7.

- 
- [19] Pyo Y, Song S. Physicochemical and Sensory Characteristics of a Medicinal Soy Yogurt Containing Health-Benefit Ingredients. *J Agric Food Chem.* 2009;57(1):170-5.
- [20] Binh TTT, Ju W-T, Jung W-J, Park R-D. Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett.* 2014;36(1):93-8.
- [21] Koskenniemi K. A proteomic view of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG, University of Helsinki Helsinki, 2012.
- [22] Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 1999;4(11):446-52.
- [23] Lu XX, Xie CY, Gu ZX. Optimisation of Fermentative Parameters for GABA Enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech J Food Sci.* 2009;27(6):433-41.
- [24] Tong JC, Mackay IR, Chin J, Law RHF, Fayad K, Rowley MJ. Enzymatic characterization of a recombinant isoform hybrid of glutamic acid decarboxylase (rGAD67/65) expressed in yeast. 2002(0168-1656 (Print)).
- [25] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. Production of [gamma]-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 2005;22(6):497-504.
- [26] Dhakal R, Bajpai VK, Baek K-H. Production of gaba (γ – Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1230-41.
- [27] Sun T, Zhao S, Wang H, Cai C, Chen Y, Zhang H. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur Food Res Technol.* 2009;228(4):607-12.
- [28] Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, et al. Effect of the Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. *J JPN SOC FOOD SCI.* 2000;47(8):596-603.

[29] Suwanmanon, K., & Hsieh, P. C. Effect of γ -aminobutyric acid and nattokinase-enriched fermented beans on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. *J Food Drug Anal.* 2014;22(4), 485-491.

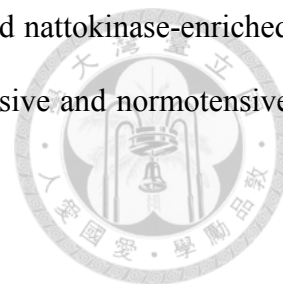
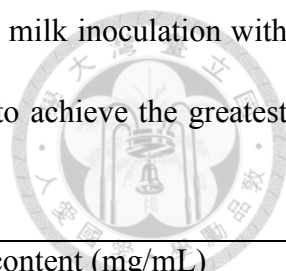


Table 1—Optimization of cultural conditions in fermented adzuki bean milk inoculation with *Lactobacillus rhamnosus* GG using a Box–Behnken design to achieve the greatest GABA content.



Trials	X1	X2	X3	GABA content (mg/mL)	
	Galactose (%)	Monosodium glutamate (%)	Pyridoxine (%)	Observed value	Predicted value
1	1 (2)	1 (3)	0 (0.2)	0.83±0.04	0.91
2	1 (2)	-1 (1)	0 (0.2)	0.73±0.03	0.69
3	-1 (1)	1 (3)	0 (0.2)	0.88±0.02	0.98
4	-1 (1)	-1 (1)	0 (0.2)	0.79±0.06	0.78
5	1 (2)	0 (2)	1 (0.3)	0.66±0.04	0.70
6	1 (2)	0 (2)	-1 (0.1)	0.73±0.06	0.76
7	-1 (1)	0 (2)	1 (0.3)	0.77±0.02	0.79
8	-1 (1)	0 (2)	-1 (0.1)	0.81±0.02	0.83
9	0 (1.5)	1 (3)	1 (0.3)	0.88±0.02	0.92
10	0 (1.5)	1 (3)	-1 (0.1)	0.85±0.05	0.89
11	0 (1.5)	-1 (1)	1 (0.3)	0.61±0.02	0.64
12	0 (1.5)	-1 (1)	-1 (0.1)	0.73±0.06	0.76
13	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.04±0.05	1.11
14	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.10±0.05	1.11
15	0 (1.5)	0 (2)	0 (0.2)	1.09±0.02	1.11

³. GABA content of ABM without inoculation *Lactobacillus rhamnosus* GG was 0.05±0.01 mg/ml. GABA content in ABM inoculated with *L. rhamnosus* GG at 37°C in 5%CO₂ for 36 hr was 0.44±0.01 mg/ml

⁴. Values are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 2—Changes of GABA content in adzuki bean milk inoculated with different LAB.

LAB	GABA content (mg/mL) ¹					
	0 h.	12 h.	24 h.	36 h.	48 h.	60 h.
<i>B. adolescentis</i>	0.05±0.03 ^{C,a} ²	0.08±0.01 ^{BC,b}	0.10±0.01 ^{B,d}	0.30±0.03 ^{A,c}	0.29±0.03 ^{A,bc}	0.10±0.03 ^{B,bc}
<i>B. longum</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.09±0.02 ^{B,b}	0.10±0.01 ^{B,d}	0.16±0.03 ^{A,f}	0.15±0.02 ^{A,e}	0.04±0.01 ^{C,d}
<i>B. bifidum</i>	0.05±0.01 ^{C,a}	0.06±0.01 ^{C,b}	0.12±0.03 ^{B,cd}	0.21±0.01 ^{A,ef}	0.22±0.02 ^{A,d}	0.04±0.01 ^{C,d}
<i>B. breve</i>	0.05±0.01 ^{D,a}	0.07±0.02 ^{CD,b}	0.14±0.02 ^{B,c}	0.29±0.02 ^{A,c}	0.29±0.04 ^{A,bc}	0.10±0.04 ^{C,bc}
<i>L. rhamnose</i> GG	0.05±0.01 ^{F,a}	0.15±0.02 ^{E,a}	0.28±0.03 ^{C,a}	0.44±0.02 ^{A,a}	0.38±0.02 ^{B,a}	0.20±0.02 ^{D,a}
<i>L. plantarum</i>	0.05±0.02 ^{D,a}	0.08±0.02 ^{CD,b}	0.18±0.03 ^{B,b}	0.37±0.05 ^{A,b}	0.33±0.05 ^{A,b}	0.14±0.05 ^{BC,b}
<i>L. acidophilus</i>	0.05±0.02 ^{C,a}	0.07±0.01 ^{C,b}	0.11±0.01 ^{B,cd}	0.23±0.04 ^{A,de}	0.22±0.03 ^{A,d}	0.06±0.02 ^{C,cd}
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	0.05±0.02 ^{C,a}	0.08±0.01 ^{C,b}	0.13±0.02 ^{B,cd}	0.27±0.01 ^{A,cd}	0.24±0.02 ^{A,cd}	0.06±0.02 ^{C,cd}

1. Each value was expressed as mean ± SD (n = 3).

2. ^{A-F} different letters in the same row show significant differences, ^{a-d} different letters in the same column show significant differences (P < 0.05, Duncan test).

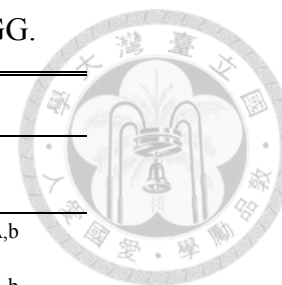


Table 3— Effects of the culture ingredients on GABA yield in fermented adzuki bean milk inoculated with *L. rhamnosus* GG.

Carbon source	GABA content (mg/mL)				
	0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
Glucose	0.44±0.02 ^{A,a}	0.46±0.02 ^{A,a,b}	0.45±0.05 ^{A,b}	0.46±0.02 ^{A,b}	0.48±0.02 ^{A,b}
Fructose	0.43±0.02 ^{B,a}	0.39±0.06 ^{B,b}	0.44±0.04 ^{B,b}	0.51±0.04 ^{A,b}	0.52±0.01 ^{A,b}
Maltose	0.43±0.03 ^{A,a}	0.44±0.04 ^{A,b}	0.48±0.28 ^{A,ab}	0.47±0.03 ^{A,b}	0.50±0.03 ^{A,b}
Galactose	0.44±0.02 ^{B,a}	0.54±0.03 ^{B,a}	0.54±0.03 ^{B,a}	0.61±0.02 ^{A,a}	0.62±0.01 ^{A,a}

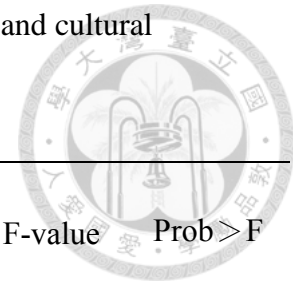
Nitrogen source	GABA content (mg/mL)				
	0 %	1 %	2 %	4 %	6%
Soytone	0.44±0.02 ^{A,a}	0.42±0.02 ^{AB,b}	0.47±0.04 ^{A,b}	0.41±0.02 ^{B, b}	0.41±0.03 ^{B,b}
Soy protein isolate	0.43±0.02 ^{Aa}	0.39±0.02 ^{AB,b}	0.41±0.02 ^{AB,b}	0.42±0.02 ^{A,b}	0.38±0.02 ^{B,b}
Monosodium glutamate	0.44±0.02 ^{C,a}	0.52±0.05 ^{B,a}	0.64±0.03 ^{A,a}	0.65±0.01 ^{A,a}	0.64±0.02 ^{A,a}

Other additives	GABA content (mg/mL)				
	0 %	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.5%
Pyridoxine	0.44±0.02 ^{B,a}	0.48±0.05 ^{B,a}	0.60±0.03 ^{A,a}	0.59±0.02 ^{A,a}	0.60±0.02 ^{A,a}
Magnesium sulfate	0.43±0.02 ^{C,a}	0.44±0.03 ^{C,a}	0.51±0.04 ^{AB,b}	0.52±0.02 ^{A,b}	0.46±0.01 ^{BC,b}
Calcium chloride	0.44±0.02 ^{A,a}	0.44±0.04 ^{A,a}	0.47±0.02 ^{A,b}	0.49±0.05 ^{A,b}	0.44±0.03 ^{A,b}

^{1.} Each value was expressed as mean ± SD (n = 3).

^{2.} A-C different letters in the same row show significant differences, a-c different letters in the same column show significant differences (P < 0.05, Duncan test).

Table 4 – Analysis of variance (ANOVA) for the production of GABA and cultural conditions.



Source	DF ²	Sum of squares	Mean of squares ³	F-value	Prob>F
Model ¹	9	0.0300	0.9726	19.70	0.0022
Linear	3	0.0583	0.1892	11.50	0.0111
Quadratic	3	0.2355	0.7643	46.46	0.0004
Cross-product	3	0.0059	0.0191	1.16	0.4118
Total error	5	0.0085	0.0017		
Pure error	2	0.0026	0.0013		
Lack of fit	3	0.0059	0.0195	1.50	0.4240

R²=97.26%

¹ANOVA for response surface quadratic model.

²Degree of freedom.

³Determination coefficient.

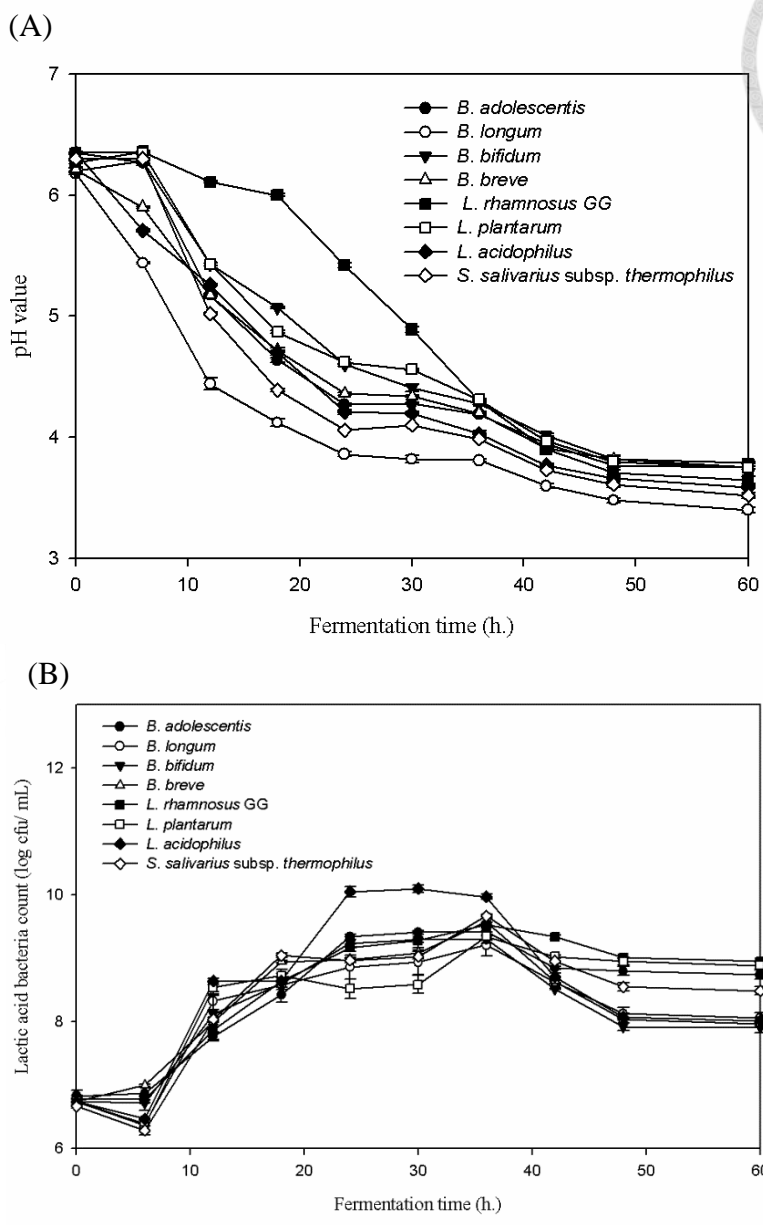


Figure 1 – Changes of pH and lactic acid bacteria count in adzuki bean milk inoculated with different LAB.

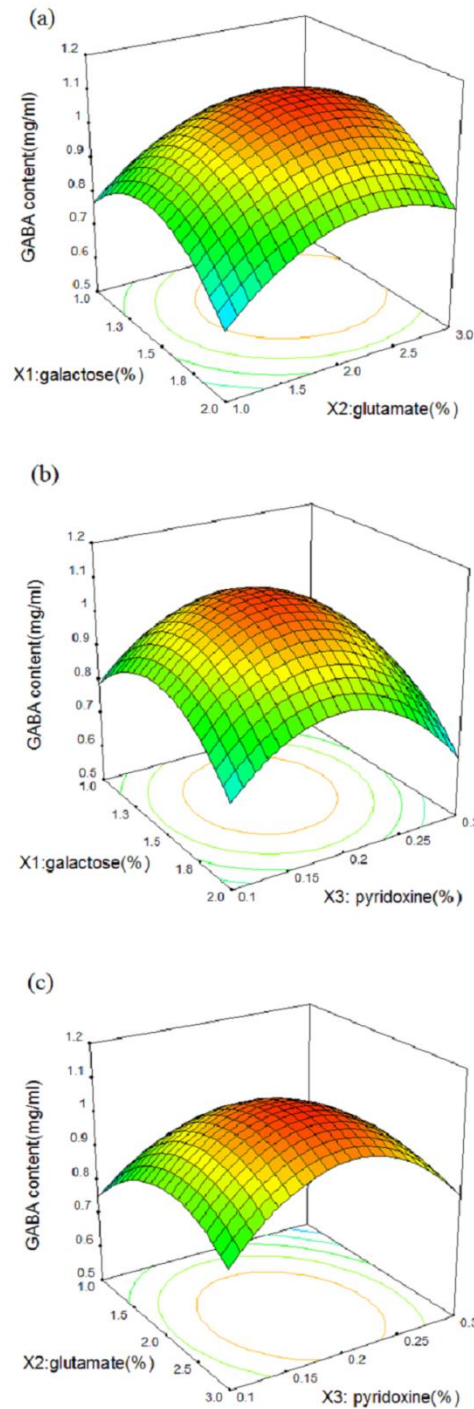


Fig 2 – The response surface for the GABA content of fermented adzuki bean milk. (a) Combined effects of galactose and monosodium glutamate with constant pyridoxine (0.2%); (b) Combined effects of galactose and pyridoxine with constant monosodium glutamate (2%); (c) Combined effects of monosodium glutamate and pyridoxine with constant galactose (1.5%)