

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

富含  $\gamma$ -胺基丁酸之紅麴發酵產物最適生產條件  
與其抗憂鬱功效評估

Study on the optimal culture condition and evaluation of  
the antidepressant effect of the GABA-rich  
*Monascus*-fermented product

莊佳穎

Chia-Ying Chuang

指導教授：潘子明 博士

Advisor: Tzu-Ming Pan, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

## 謝 誌

光陰荏苒，轉瞬即逝，看似平常的鳳凰花開與謝，此時此刻竟讓我內心多了幾分悸動，就在這炎熱的夏季，完成了整整兩年的碩士生涯，我，畢業了！感謝指導教授潘子明老師的細心指導，雖然常忙碌於系所上許多事物，仍無時無刻默默關心著實驗室裡每一個學生，更於週六日甚至半夜、凌晨費心於學生的研究及論文的批閱，此等研究精神與學術之堅持更是令我感動，也是我未來學習的目標。非常感謝台灣大學微生物與生化學所名譽教授蘇遠志博士、微生所黃健雄教授、屏東科技大學食品科學系邱秋霞教授與輔仁大學食品科學系蔡宗佑教授於百忙中仍嚴謹且細心的審定論文內容，並撥冗擔任口試委員，提出許多珍貴建議，使此論文更臻完備，以及感謝台大食科所沈立言教授在單胺分析儀器的協助，於此獻上十萬分的感謝與無限的敬意。

回憶這短短的兩年裡，就像一杯黑咖啡，初嚐雖苦，但終究能品味出其濃郁的香味，實驗室的學長姐與學弟妹如同奶精與細砂糖，再經由老師精心調製與巧手拉花，更突顯其咖啡的特質與價值。感謝維護世界和平、和藹可親的宗偉學長，模改部部長兼 HPLC 特修部與地球捍衛隊隊長志輝大人，在實驗、報告及生活上的提攜與指點；感謝亞利安星機噲教特使兼英文特仆部隊苦力姿杏學姐，讓我練就一身輕功與千錘百鍊的身體；還有時常面帶微笑的錦烽學長、中草藥藥頭建利學長在動物實驗操作與計畫申請上超大的協助，及感謝傳說中酸到喉嚨痛的酸牛並擁有寶貴玉手之食嚙達人，同時也是實驗室未來棟樑的黃之丞學長、帥氣海綿超人羽潔、生工之花瑋萱、常笑到無法自拔的珮祺、走瀟灑路線的保宏等同學的幫忙與陪伴；感謝相互激勵之實驗室出師表原著、眾人之表的四維羅伊絢學妹、有趣的檳榔包雅芸學妹、莎很大莎文豪學弟和永遠笑臉的羽涵學妹；還有秉穎、岳庭、雅雯、力川、智夫與雨青等學長姐在實驗上的建議與協助，更感謝政倫學長的關心及實驗指導、麻吉桌友賀培的全力協助，這些都將是最珍貴的回憶。在實驗後半段特別感謝食科所沈老師家的麗雲學姐、惠瑩、庭如、侑純等許

多學長姐與同學之協助，讓我順利的完成了所有實驗。

這段日子裡，繞哥、偉仲、秀芸、玉婷及易儒等如同家人般 SD 家族的各位學長姐，在工作或學業之餘還抽空陪我聊天、談心，內心說不出的感動難以言表；好友昱甫雖然常常很悠閒，但也麻煩你跑腿了很多次，還有育彬、小蛇、英禎、黃上、禹澤、瓊玉、如婕、少東大頭等大家的相互打氣，這一路才能風雨無阻的向前邁進。最後，感謝我辛勞的父母，忙碌工作之餘，總無時無刻關心著我的健康與學業，許許多多叮嚀的電話，道盡了你們的關心與鼓勵，一直耍憨憨的老弟和自認像蔡依林的老妹，感謝你們常常回家替爸媽分憂，並特地趕來參加我的畢業典禮；還有像媽媽般，不論在國內外都時刻關心我的淑德老師，讓我感覺到研究的路上並不孤獨，永遠都有一盞燈照亮著未來的路。

短短千字，道不盡所有故事，字裡行間，填不滿所有感謝，我非常珍惜與各位相處的緣份，祈願在不久的將來，大家再相遇之時，都有各自翱翔的一片天空。

莊佳穎

謹誌於台灣大學農化舊館 105 室

2010.8.10



## 縮寫表

Abbreviation	English	中文
AAP	amino acid permease	胺基酸透性酶
ALT	alanine aminotranferease	丙胺酸轉胺酶
AST	aspartate aminotransferase	天門冬胺酸轉胺酶
BUN	blood urine nitrogen	尿素氮
BW	body weight	體重
CaM	calmodulin	攜鈣素
CMC	carboxymethylcellulose	羧甲基纖維素
DA	dopamine	多巴胺
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid	3,4-羥酸
FST	forced swimming test	強迫游泳試驗
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid	$\gamma$ -胺基丁酸
GABAT	$\gamma$ -aminobutyrate transaminase	$\gamma$ -胺基丁酸轉胺基酶
GAD	glutamate decarboxylase	麩胺酸脫羧酶
GDP	guanosine diphosphate	二磷酸鳥苷
GTP	guanosine triphosphate	三磷酸鳥苷
HPLC	high performance liquid chromatography	高效能液相層析
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid	5-氫氧靛基醋酸
5-HT	5-hydroxytryptamine	血清素
LD <sub>50</sub>	lethal dose	50% 半數致死量
LDL	low density lipoprotein	低密度脂蛋白
L-Glu	L-glutamate	麩胺酸
MAOI	monoamine oxidase inhibitor	單胺氧化酶抑制劑
MSF	<i>Monascus</i> submerged fermented product	紅麴液態發酵產物
MSG	monosodium glutamate	麩胺酸鈉
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide	二磷酸吡啶核苷酸
NC	normal control	正常控制組
NE	norepinephrine	正腎上腺素
NF	non-fermented	未發酵
NSRI	norepinephrine-selective reuptake inhibitor	選擇性正腎上腺素回收抑制劑
OPA	ortho-phthaldialdehyde	鄰苯二甲醛
PDA	potato dextrose agar	馬鈴薯葡萄糖瓊脂

<b>PDB</b>	potato dextrose broth	馬鈴薯葡萄糖培養液
<b>PLP</b>	pyridoxal-5'-phosphate	磷酸吡哆醛
<b>ProT</b>	proline transporter	脯氨酸運輸蛋白
<b>RB</b>	rice bran	米糠
<b>RO</b>	reverse osmosis	逆滲透
<b>RSM</b>	response surface methodology	反應曲面法
<b>SD rats</b>	Sprague Dawley rats	SD 大鼠
<b>SSA</b>	succinic semialdehyde	琥珀酸半醛
<b>SSADH</b>	succinic semialdehyde dehydrogenase	琥珀酸半醛脫氫酶
<b>SSRI</b>	serotonin-selective reuptake inhibitor	選擇性血清素回收抑制劑
<b>TCA</b>	tricyclic antidepressant	三環抗憂鬱劑
<b>TCA cycle</b>	tricarboxylic acid cycle	三羧酸循環
<b>vvm</b>	air volume/culture volume/min	氣體體積、培養體積與時間比
<b>YES medium</b>	yeast extract sucrose medium	酵母萃出物-蔗糖培養基



## 摘要

憂鬱症為主要最常見的神經失調疾病，包括心情及認知能力的改變，及經常有死亡或自殺念頭。現今臨床的治療藥物並不適用於所有患者且會產生副作用，因此尋找具抗憂鬱功效且低副作用的物質為極具價值性的研究方向。 $\gamma$ -胺基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 是一重要的神經傳導物質，且具有許多生理活性，如降血壓、利尿及改善焦慮、憂鬱等情緒相關疾病，在此研究中，利用紅麴探討在不同培養基質及培養條件 (培養時間、pH 值、溫度及接種量) 對 GABA 生成的影響；另一方面，利用強迫游泳動物試驗 (forced swimming test, FST) 評估富含 GABA 的紅麴發酵產物其抗憂鬱功效。利用反應曲面法探討 GABA 最適生成條件，當米糠添加比例為 77.3%、培養基起始 pH 值 6.3 及麩胺酸鈉濃度 122.6 mM 時，發酵 7 天後，GABA 從原本 40 mg/L 提升至 350 mg/L，每克 GABA 生產成本為新台幣 8.5 元。另一方面，在強迫游泳短期試驗顯示，GABA 為紅麴發酵產物中主要具抗憂鬱功效之物質；而長期試驗中，紅麴發酵產物比同劑量之 GABA 具更好的抗憂鬱潛力，效果類似於 fluoxetine (臨床抗憂鬱藥劑)。於腦組之中，GABA 能提升杏仁核及海馬迴中正腎上腺素、多巴胺與血清素含量；除此之外，紅麴發酵產物更能減緩杏仁核及海馬迴多巴胺的消耗。因此，富含 GABA 之紅麴發酵產物具有低基質成本與抗憂鬱功效等市場潛力。

關鍵字：紅麴、 $\gamma$ -胺基丁酸、成本、強迫游泳試驗、抗憂鬱

## Abstract

Depression is a disorder characterized by a broad range of symptoms, including altered mood and cognitive functions, and recurrent thoughts of death or suicide. The pharmacotherapy used in clinic today is not suitable for all patients and causes certain side-effects. Thus, looking for alternative treatments with antidepressant effect and minimal side-effect is important.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is a key compound of the major neurotransmitters. It also has several physiological functions, not hypotensive and diuretic effects, but related to anxiety, depression and numerous mood disorders. In this study, various cultivation substrates and culture conditions (cultural time, pH value, temperature and inoculum volume) were selected to investigate the effect on GABA production by *Monascus* sp. Moreover, the forced swimming test (FST) of animal model was used to evaluate the antidepressant effect of GABA-rich *Monascus* submerged fermented product (MSF). To explore the GABA optimal culture conditions, response surface methodology experiment was used. When 77.3% rice bran was used as a substrate which initial pH value and monosodium glutamate concentration were 6.3 and 122.6 mM respectively, the GABA increased from 40 mg/L to 350 mg/L in day 7. The cost of GABA was NT \$8.5 per gram. On the other hand, the FST data shows that GABA may be the major compound in MSF to provide antidepressant-like effect in short-term test. In long-term test, the MSF had more antidepressant potential than GABA to reduce the immobility time, and as well as fluoxetine (a clinical prescription) in FST. In brain tissue, GABA provide a high potential to recovered the concentration of norepinephrine, dopamine and serotonin in hippocampus and amygdala. However, MSF also can reduce the consumption of dopamine in hippocampus and amygdala. Thus, MSF which with high GABA level has more potential in low production cost and antidepressant-like effect.

Keywords: *Monascus*, GABA, cost, forced swimming test, antidepressant

## 目錄

縮寫表 .....	i
摘要 .....	iii
圖目錄 .....	vii
表目錄 .....	ix
第一章 文獻回顧 .....	1
第一節 紅麴菌 .....	1
1. 古今歷史記載 .....	1
2. 紅麴菌之特性 .....	2
3. 紅麴之高價值代謝產物 .....	5
第二節 $\gamma$ -胺基丁酸 (GABA) .....	12
1. GABA 之特性 .....	12
2. GABA 的代謝途徑 .....	12
3. GABA 的生產 .....	18
4. GABA 產品的拓展與演進 .....	19
5. GABA 的作用機制 .....	20
6. GABA 的生理功能 .....	23
7. 安全性 .....	23
第三節 憂鬱症 (Depression) .....	24
1. 憂鬱症盛行趨勢 .....	24
2. 憂鬱症的診斷 .....	27
3. 憂鬱症病理 .....	28
4. 憂鬱症的藥物治療 .....	30
5. 憂鬱症的動物模式 .....	33

6. 憂鬱症與 GABA 之關係.....	34
第二章 研究動機與目的.....	37
第三章 材料與方法.....	39
第一節 儀器設備.....	39
第二節 藥品.....	40
第三節 紅麴菌菌株來源、培養方法.....	42
第四節 紅麴菌液態發酵方法與條件.....	42
第五節 紅麴菌固態發酵方法與條件.....	43
第六節 發酵槽控制條件與樣品製備.....	44
第七節 紅麴中代謝產物之分析方法.....	44
第八節 以反應曲面法探討 GABA 最適培養條件之設計.....	46
第九節 紅麴發酵產物抗憂鬱功效性評估試驗 (強迫游泳).....	48
第十節 大鼠腦組織單胺濃度及其代謝產物分析.....	53
第四章 結果與討論.....	55
第一節 GABA 生產菌株之挑選.....	55
第二節 培養條件對 GABA 生成之影響.....	58
第三節 以反應曲面法 (response surface methodology, RSM) 探討紅麴生產 GABA 最適培養條件.....	73
第四節 抗憂鬱評估-強迫游泳試驗.....	81
第五章 結論.....	100
參考文獻.....	104
附錄.....	121

## 圖目錄

圖 1-1	紅麴菌之生活史.....	4
圖 1-2	GABA 與其他相關代謝路徑.....	13
圖 1-3	生物及非生物性壓力對 GABA 細胞內與細胞間的調節.....	15
圖 1-4	真菌無性生活史中各階段 GABA 代謝產物及酵素表現.....	17
圖 1-5	GABA 突觸概要.....	22
圖 1-6	十大高負擔疾病 2004 年排名及 2030 年預估排名.....	25
圖 2	研究大綱.....	38
圖 3	動物實驗流程.....	49
圖 4-1	不同紅麴菌株之 $\gamma$ -胺基丁酸生成曲線.....	57
圖 4-2-1	味精濃度對 <i>M. purpureus</i> BCRC 31499 $\gamma$ -胺基丁酸生成之影響.....	59
圖 4-2-2	米的種類對 <i>M. purpureus</i> BCRC 31499 生成 $\gamma$ -胺基丁酸之影響.....	60
圖 4-2-3	培養基質於液態發酵對 $\gamma$ -胺基丁酸生成之影響.....	62
圖 4-2-4	與米等比例混合之農業副產品對生產 $\gamma$ -胺基丁酸之影響.....	62
圖 4-2-5	米糠添加量對固態發酵的影響.....	65
圖 4-2-6	培養基質於固態發酵對生產 $\gamma$ -胺基丁酸之影響.....	66
圖 4-2-7	不同培養條件對 <i>M. purpureus</i> BCRC 31499 生成 $\gamma$ -胺基丁酸之影響.....	70
圖 4-2-8	米糠添加量對液態發酵的影響.....	72
圖 4-3-1	米糠添加比例與 MSG 濃度對 $\gamma$ -胺基丁酸生成量之反應曲面圖.....	75
圖 4-3-2	<i>Monascus purpureus</i> BCRC 31499 於發酵槽培養之 $\gamma$ -胺基丁酸生成曲線.....	80
圖 4-4-1	試驗中體重之變化.....	82
圖 4-4-2	試驗中攝食量之變化.....	83

圖 4-4-3 紅麴發酵產物在短期試驗中對強迫游泳不活動時間之影響.....	85
圖 4-4-4 紅麴發酵產物在長期試驗中對強迫游泳之不活動時間影響.....	86
圖 4-4-5 單胺物質標準品之層析圖譜.....	88
圖 4-4-6 紅麴發酵產物與 GABA 對大腦不同區域多巴胺代謝速率之影響 .....	93
圖 4-4-7 紅麴發酵產物與 GABA 對大腦不同區域血清素代謝速率之影響 .....	94
圖 4-4-8 不同實驗組別之肝、腎臟組織切片.....	99



## 表目錄

表 1-1	依國家收入分組之全球疾病負擔造成因素 (2004).....	26
表 1-2	美國 2007 年零售市場常見抗憂鬱劑處方用藥統計.....	31
表 1-3	抗憂鬱藥物副作用比較.....	32
表 1-4	GABA 在情緒疾病生理學的功能與在情緒穩定劑、抗憂鬱藥劑及電痙攣療法產生的機制.....	36
表 2-1	固態發酵之三因子-三階層之中心旋轉組合設計.....	47
表 2-2	動物分組與劑量設計.....	51
表 4-2	<i>M. purpureus</i> BCRC 31499 以固態發酵或液態發酵生產 $\gamma$ -胺基丁酸的基質成本之比較.....	68
表 4-3-1	反應曲面法之三因子-三階層條件.....	74
表 4-3-2	三因子-三階層之中心旋轉組合設計.....	76
表 4-3-3	變異數迴歸分析.....	77
表 4-3-4	生產 $\gamma$ -胺基丁酸基質成本之比較.....	79
表 4-4-1	紅麴發酵產物對不同腦區正腎上腺素含量之影響.....	89
表 4-4-2	紅麴發酵產物對不同腦區多巴胺含量之影響.....	90
表 4-4-3	紅麴發酵產物對不同腦區血清素含量之影響.....	91
表 4-4-4	紅麴發酵產物與 $\gamma$ -胺基丁酸對不同腦區單胺物質含量之影響.....	95
表 4-4-5	紅麴發酵產物對 SD 大鼠血清中 AST、ALT、BUN 及 creatinine 之影響.....	97
表 4-4-6	紅麴發酵產物對 SD 大鼠血清中電解質之影響.....	98

# 第一章 文獻回顧

## 第一節 紅麴菌

### 1. 古今歷史記載

紅麴的食用記錄早在三國時代王粲《七釋》中提及：「西旅遊梁，御宿秦粲，瓜洲紅麴，參揉相拌軟滑膏潤，入口流散」，所以在漢魏時代就有吃紅麴的習慣。一千多年前北宋初期有更多的典籍載述，如「紅麴煮肉」載於陶穀雜采隋唐至五代典故所撰寫的《清異錄》中；胡伯的《苕溪漁隱叢話》「江南人家造紅酒，色味兩絕」；李之儀《姑溪居士集》中之「紅糟筍」；莊綽的《雞肋編》曰「江南閩酒中公私醞釀皆紅麴酒」；及唐宋八大家蘇東坡在詩詞中亦有「臘糟紅麴寄駝蹄」、「夜傾閩酒赤如丹」、「有興欲傾紅麴酒」等詩句。

元朝後，紅麴的使用更為普遍，許多調理食物的書與藥典上均有紅麴的記載，飲膳太醫忽思慧在《飲膳正要》中記錄紅麴的製法：「選擇土壤為暗紅色的地方，挖一深坑，上下週圍鋪以篾席，將梗米倒入其中，上壓以重石，使其發酵，而變為紅色。」將紅麴從土壤中分離出來，並提及紅麴具「健脾、益氣、溫中」功效，元朝吳端的《日用本草》則敘述「紅麴釀酒，破血行藥勢」。

到了明朝，紅麴的製法改為用蒸熟的米飯做為培養基質以縮短培養時間，李時珍所著的《本草綱目》(1590年)對於以米飯培育紅麴的製作過程應如何調節溫度及補充水分皆有很詳盡的說明。在《本草綱目》中，記述著紅麴的功效：「紅麴主治消食活血，健脾燥胃。治赤白痢，下水殼。釀酒破血行藥勢，殺山嵐瘴氣，治打撲傷損，治女人血氣痛及產後惡血不盡」。明末宋應星在所著《天工開物》(1637年)的「丹麴」一節中，除指出製紅麴要選用精白在來米外，其中還記載蒸飯及接種後的管理方法，均是目前國人製造紅麴的重要管理依據（蘇，1978）。而在本草《衍義補遺》、《本草備要》及《醫林纂要》等也均有紅麴藥效之記載。

台灣紅麴的起源則相傳於明末清初鄭成功光復台澎後，由福建渡海來台之司

阜（製酒匠人）所帶入。經考證後得知，當時紅麴製法是從大陸購買麴公，麴公為充分乾燥的米粒，具有大蒜氣味，外表黑紫色，內部呈紅白色，所含微生物幾乎皆為紅麴菌，甚少有其他雜菌，售價極為昂貴，但對其製造方法尚無任何記載（蘇，1978）。購得之麴公先製麴公糟，再以此製成麴種，並進一步製成麴種糟，最後將米飯與麴種糟混合，培育成紅麴。臺灣早期民間流傳，紅麴用來治小孩和老人夜尿及輕微氣喘的功效極為良好（陳，2000）。

## 2. 紅麴菌之特性

紅麴又名丹麴、赤麴，在日本稱 *beni koji* 或 *anka koji*，歐美也以中國紅米（red Chinese rice）或 red yeast rice 稱呼，但實際上應是 red mold rice 更為恰當。紅麴菌屬 (*Monascus*) 之研究是在 1884 年由法國學者 Van Tieghem 為分離在馬鈴薯培養基上所發現之兩種真菌所建立的，奠定了紅麴在生物學上的位置。而紅麴菌其實廣泛存在於穀類、澱粉、新鮮牧草、泥土、魚乾、河床表面沉積物及松樹根組織中（陳及莊，2003）。

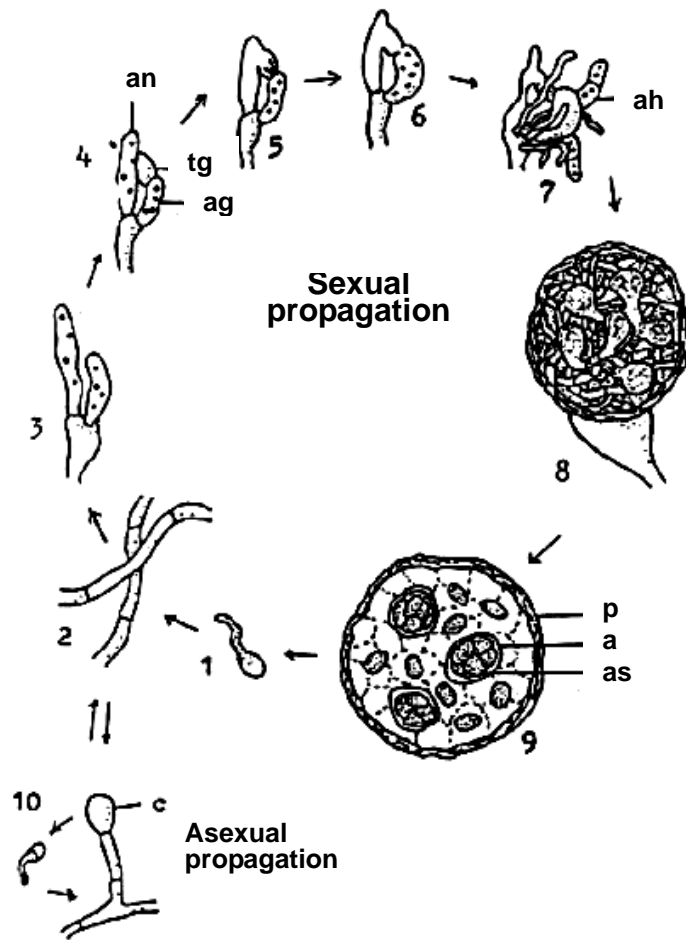
真菌紅麴特徵是菌絲呈無色、褐色或紅色，具有橫隔（septa），於末端會產生一個大型的有性厚壁子囊（ascocarp），故被分類學家歸列為子囊菌門（Ascomycota）、子囊菌綱（Ascomycetes），不整子囊菌目（Plectascales）。又於紅麴菌的無性繁殖是由菌絲頂端往下切割，形成鏈狀分生孢子的特異方式，與同一目的麴菌（*Aspergillus*）與青黴菌（*Penicillium*）有所區別，故被獨立成為單一屬（genus）的紅麴菌科（*Monascaceae*）、紅麴菌屬（*Monascus*）（林，1983）。

在早期文獻上被命名的紅麴菌約有 20 個不同的種名，目前則多以 Hawksworth 等人根據紅麴菌在洋菜固體培養基上的生長速度、菌叢顏色及閉囊果（cleistothecia）與分生孢子的大小、顏色，將紅麴菌分成 *M. ruber*、*M. purpureus* 和 *M. pilosus* 等三種，往後又有 *M. floridanus*、*M. pallens* 與 *M. sanguineus* 的發現（Blanc et al., 1994; Juzlova et al., 1996 b），而在台灣發酵食品中常見的 *Monascus*

*anka* 為 1930 年中澤亮治及佐藤喜吉於早期台灣民間所用紅麴中分離出的優良菌株 (佐藤喜吉, 1936), 與 *Monascus purpureus* 應屬同種。

圖 1-1 所示為紅麴菌之生活史, 紅麴菌為雌雄同體 (homothallic), 其營養菌絲呈不規則狀分歧, 內有大型液泡與隔膜結構, 可產生子囊果進行有性生殖或藉由分生孢子 (conidium) 行無性生殖。有性生殖時, 菌絲頂端之精子器 (antheridium) 會延長為一多核管狀細胞, 雌性母細胞也同時分裂成受精絲 (trichogyne) 與造囊果 (ascogonium), 精子器內核藉由受精絲移入造囊果而融合。結合後, 造囊果發育成直徑約 20~40  $\mu\text{m}$  的子囊果, 待孢子成熟後從子囊果裂口處釋出, 再開始其新的生活史 (蘇等, 1970)。





(蘇等，1970)

圖 1-1 紅麴菌之生活史

Fig. 1-1 Life cycle of *Monascus* species

1, 2: 子囊孢子形成營養菌絲

3→7: 生殖器官之形成與造囊菌絲之發育

8, 9: 成熟之子囊果

10: 單一細胞分生孢子 (one cell conidia) 之無性生殖

a: 子囊 ag: 造囊果 ah: 造囊菌絲 an: 精子器 as: 子囊孢子

tg: 受精毛 p: 擬護膜 c: 分生孢子

### 3. 紅麴之高價值代謝產物

隨著科學的進步，由紅麴分離出的一些活性成分已經得到許多與古籍功效上相同的實驗驗證，更發現許多對人類有助益的新代謝產物，因而成為國際矚目的經濟真菌研究焦點，目前已知的紅麴重要二次代謝產物主要可分成下列四種：

#### (1) 紅麴色素 (紅、橘和黃色等)：

紅麴色素目前已確定有十幾種化學結構，可分為紅色素 (monascorubramine 及 rubropunctamine)、橘色素 (monascorubrin 及 rubropunctatin)、黃色素 (ankaflavin、monascin、yellow II 及 xanthomonascin A) 及 2008 年才被發表的藍色螢光色素 (monasfluore A 及 monasfluore B) 四類 (Huang et al., 2008)。橘色素的生成是經由一連串酵素反應合成，為對胺基酸有高度親和力的化合物；橘色素若和胺基酸反應，則會生成水溶性的紅色素 (Blanc et al., 1994)，而黃色素則可能為橘色素的還原產物。在紅麴菌的培養過程中，產生的色素常和培養基中的胺基酸分子反應，溶解於基質中 (Fabre et al., 1993)。紅麴色素在自然狀態下易受光、溫度及 pH 值的影響，Fabre 等人在 1993 年對紅麴色素的安定性做探討時發現，在水溶液狀態時，紅色素對光及熱的敏感性較黃色素高，而抗氧化劑的存在則可減少紅色素的脫色反應。由此可知，在紅麴菌所產生的色素中，紅色素較黃色素不安定；而在實驗中 *Monascus ruber* 所產生的色素在中性或鹼性的環境下較安定；在肉製品的加工過程中，添加紅麴萃出物的香腸，在 4°C 真空保存 3 個月時，色素穩定性達 92%-98%，且在食品官能品評時有不錯的風味及口感，認為可取代傳統肉製品之亞硝酸鹽或人工色素 (Budavari et al., 1989)。而陳等 (1997) 將豬肉浸漬於紅糟中，亦可賦予肉品相當的紅色。長久以來，紅麴已被國人做為食品著色劑及香料使用，經多數中外學者的研究報告也指出紅麴色素的安全性極高，以口腔胃管強迫給予及腹腔注射兩種方法，進行動物急毒性安全試驗，前者所得 LD<sub>50</sub> 值大於 33.3 g/kg，超出安全標準一倍以上；後者 LD<sub>50</sub> 值大於 8.7 g/kg，且飼養十二週之亞急毒性試驗組，經血液生化指標分析、內臟檢查均無病變

現象 (蘇和黃, 1981), 故認為紅麴色素是很安全的天然食品添加物 (Wada et al., 2007)。最新的研究也指出, 紅麴色素及其胺基酸衍生物也具有調節膽固醇之功效 (Jeun et al., 2008)。

## (2) 抗菌活性物質 (citrinin):

*Monascus purpureus* 於 1977 年首次被 Wong 及 Bau 學者報導具有抗菌的效果, 分離出 monascidin A 為主要的有效抗菌成分 (Wong and Bau, 1977)。Monascidin A 是一種較黃、橘、紅色素極性高, 對神經有毒性的代謝產物, 對於 *Bacillus*、*Streptococcus* 與 *Pseudomonas* 等食品腐敗菌有抑制作用 (Wong and Koehler, 1981; 陳等, 1998)。

據層析分離得知, 有效的抗菌成分為 monascidin A 及螢光黃色素的混合物。而 Blanc 等人於 1994 年利用氣相色層質譜儀、紅外線光譜儀、核磁共振光譜儀等檢驗方法確認所謂的 monascidin A 就是 citrinin (Blanc et al., 1994)。Monascidin A 的活性受培養條件所影響, Wong 與 Koehler (1981) 以 0.8% 的酵母萃出物及 10% 的葡萄糖為培養基質振盪培養時, 紅麴菌抗菌物質的產量較佳, 同時紅麴色素於菌絲內亦多, 而添加 0.04 M 的醋酸鹽 (acetate) 會抑制抗菌物質的生成。在近期研究中, 使用 YES 培養基 (yeast extract 40 g/L 及 sucrose 160 g/L) 於多種紅麴菌株進行培養, 發現易生成大量的 citrinin 約 65 ~ 480 mg/L (Wang et al., 2005)。另外由 *M. anka* 培養液中分離得到一種新的抗菌物質, 其結構類似  $\alpha, \beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone 的衍生物稱之為 ankalactone, 此物質顯著抑制 *Escherichia coli* 及 *Bacillus subtilis* 的生長, 但其抑菌效應比 monascorubin 或 rubropunctatin 低 (Nozaki et al., 1991)。

而先前本研究室發現, 利用 45% 酒精及混合 1.5% 磷酸鹽, 萃取紅麴米 70 分鐘後, 可移除原本 citrinin 含量達 91.6%, 且仍可保有 79.5% 的 monacolin K, 是一種移除紅麴產品中 citrinin 簡單且快速的方法 (Lee et al., 2007a)。

### (3) 膽固醇合成抑制劑 (monacolins) :

歐美國家總死亡率 51% 以上皆與血膽固醇過高而引起的心臟血管病變 (包括中風、冠狀動脈硬化性心臟病及高血壓) 有關 (Brown and Goldstein, 1984), 台灣目前也佔有很大的比率 (39%), 遠超過癌症及後天免疫不全症候群, 且有越來越嚴重的趨勢。近年來我國步入已開發國家型態, 多數人過著緊張繁忙之生活, 因此心臟血管病變的死亡率及罹病率有上昇之趨勢, 尤其以腦中風的死亡率最高, 根據我國行政院衛生署 98 年十大死因資料統計中, 心臟病及腦血管疾病造成之死亡人數分別位列於癌症後的二、三名 (行政院衛生署, 2009)。

遠藤學者於日本三共藥廠資助下, 率先從分離自泰國發酵食品的紅麴菌 *Monascus ruber* 培養液中找到 monacolin K (Endo, 1979)。三共藥廠所用之生產株 *Monascus ruber* M-1005 在三角瓶培養結果, monacolin 最終含量約為 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在小型發酵槽嚴密控制培養條件下, 產量可提高到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 固體培養結果為 540  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。Merck 美國藥廠也從 *Aspergillus terreus* 之培養液中發現同一化合物 (Alberts et al., 1980), 並以 mevinolin 的商品名上市, 1991 年全美銷售額超過美金十億元。Monacolin K (mevinolin) 為紅麴菌及 *Aspergillus* 等絲狀真菌所產生能降低膽固醇的化合物, 由於 monacolin K 的結構式與 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 類似, 因此會競爭 HMG-CoA reductase, 使 mevalonic acid 無法生成, 間接抑制膽固醇合成, 進而達到降低膽固醇的效果, 進一步發現能促使 LDL receptor (low density lipoprotein receptor) 的增加, 提高 LDL 的代謝, 降低造成動脈硬化最嚴重的 LDL 所產生之影響 (Alberts et al., 1980; Endo, 1979)。

由於 monacolin K 和紅麴色素、citrinin 的合成代謝途徑有相互的關係, 產生 monacolin K 能力高的紅麴菌, 其 citrinin 的產量相對有提升現象, 且 monacolin K 的生成菌種偏向產生紅色色素 (Hajjaj et al., 1999; Juzlova et al., 1996 a; 陳等, 1998)。除了 monacolin K 外, 紅麴菌尚可分離出一群和 monacolin K 具有相同基

本結構的降膽固醇物質，monacolin L、X、J、4- $\alpha$ -5-dihyromonacolin L 及 3- $\alpha$ -hydroxy-3,5-dihyromonacolin L，但這些物質的降膽固醇能力則較 monacolin K 差 (Endo et al., 1985; Kimura et al., 1990)。

據 Su 等學者研究指出，在選用的 16 株紅麴菌株中，*Monascus purpureus* BCRC 31615 於固態發酵具有較高的 monacolin K 及 GABA 的生成，添加 NaNO<sub>3</sub> 及 MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 能同時提升 monacolin K 及 GABA 產量 (Su et al., 2003)，而添加乙醇也能提升 monacolin K 及抑制 citrinin 的生成 (Wang et al., 2003 a)。利用山藥為基質，以紅麴進行固態發酵，亦能提高 monacolin K 產量 (Lee et al., 2007b)，並於動物試驗發現紅麴山藥有較未發酵山藥及紅麴米更好的降血脂及抗粥狀動脈硬化之功效 (Lee et al., 2007c)，且 monacolin K 還可抑制 C57BL/6 小鼠身上 Lewis lung 腫瘤細胞的生長及轉移 (Ho and Pan, 2009)。

#### (4) 降血壓物質 ( $\gamma$ -胺基丁酸)：

$\gamma$ -胺基丁酸 ( $\gamma$ -amino butyric acid, GABA) 為一水溶性胺基酸，廣泛存在於微生物、昆蟲、植物及動物之體內 (Ueno, 2000)。在植物中，如豆屬、參屬、中草藥等的種子、根莖和組織液中都含有 GABA，但一般情況下含量非常低，約為 0.03-2.00  $\mu$ mol/g (Fougere et al., 1991)。在動物體內，GABA 主要存在於神經組織，為重要的神經傳導物質，中樞神經約有 20-25% 的突觸是以 GABA 為抑制傳導物質 (Beaulieu, 1993)；而微生物則以大腸桿菌、乳酸菌、麴菌發酵產物中為多，一般紅麴菌的產量約 100~300 mg/kg (區，2002)。

日本國立健康營養研究所的學者樽井庄一在飼料中添加紅麴培養物的動物試驗中，發現添加 0.2-0.3% 紅麴培養物的飼料，可使患有先天高血壓症的老鼠，血壓由 200 mmHg 降至 180 mmHg 以下，其有效成分為 GABA (樽井，1993)。東京警察醫院也在高血壓患者的臨床試驗上證實，含有高濃度 GABA 的保健紅麴確實具有良好的降血壓功效，使白天活動時段最高血壓會超過 180 mmHg 的患者最

高血壓降至 160 mmHg 以下 (井上, 1994)。而 Wu 等以自發性高血壓大鼠 (spontaneous hypertensive rat) 管餵含有 GABA 的紅麴米或紅麴山藥, 顯示單一次餵食紅麴米可降低收縮壓 8 mmHg 與舒張壓 9 mmHg, 紅麴山藥顯著降低收縮壓 20 mmHg 與舒張壓 17 mmHg ( $p < 0.05$ ), 且持續至八小時後仍有效果; 餵食八週後紅麴米顯著降低收縮壓 20 mmHg 與舒張壓 18 mmHg ( $p < 0.05$ ), 紅麴山藥顯著降低收縮壓 26 mmHg 與舒張壓 22 mmHg ( $p < 0.05$ ), 降血壓效果更優於同劑量之 GABA, 同時發現餵食紅麴發酵產物的組別血管間隙之彈性蛋白排列較餵水及餵未發酵山藥整齊, 改善因血管間隙彈性蛋白排列紊亂所造成的血管壁彈性下降 (Wu et al., 2009)。

為了進一步確認其有效成分, 利用高效液相層析法 (high performance liquid chromatography)、質譜儀 (mass spectrometer) 及核磁共振儀 (nuclear magnetic resonance) 鑑定, 確知紅麴的降血壓活性物質為 GABA 及乙醯膽鹼 (acetylcholine)。乙醯膽鹼為常見的神經傳導物質之一, 易受熱破壞, 無法在體內維持較長時間的降血壓功能。GABA 於動物的腦髓中, 能與  $GABA_A$  受體結合, 刺激交感神經活動, 促使腎上腺分泌兒茶酚胺, 達到長效降壓作用 (區, 2002), 另外 GABA 也可活化腎功能, 增進利尿作用將多餘的鹽分排出, 使血壓降低 (張等, 2002)。

在先前利用紅麴生產 GABA 的相關研究中, *Monascus pilosus* IFO 4520 經 24 小時的厭氧處理後可使菌絲內 pH 值由 5.7 降至 5, 因而提高了 GABA 及 glutamic acid 的含量 (Kono and Himeno, 2000); 添加  $K_2HPO_4$  及 MSG 可提高 *Monascus purpureus* BCRC 31615、*Monascus* sp. S2 菌株 GABA 的產量, *Monascus purpureus* BCRC 31540 則以添加  $MnSO_4$  效果為佳 (林, 2000)。而 *Monascus purpureus* NTU 601 添加 0.5% 酒精為碳源時, 紅麴米中 GABA 含量由 1060 mg/kg 提高至 7450 mg/kg, 但仍含有 citrinin 561 ppb; 添加氮源 methionine、urea、 $NH_4Cl$  及 MSG 或脂肪酸 octanoic acid、dodecanoic acid 皆有助於 GABA 的

形成，但 corn oil 卻會使 citrinin 上升至 4037 ppb (Wang et al., 2003 a)。此外，*Monascus purpureus* BCRC 31615 於培養溫度 25°C 時 GABA 產量明顯低於 30°C 時的培養結果，但當溫度提升至 37°C 卻使 GABA 濃度快速下降；以蛋白、硝酸鈉、味精及酵母萃出物為氮源皆可提升 GABA 產量，但味精卻會降低 monacolin K 生成，因此添加 NaNO<sub>3</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 可使 *M. purpureus* BCRC 31615 得到最高的 GABA 產量 1,396.04 mg/kg 及 monacolin K 26.77 mg/kg (Su et al., 2003)。許 (2005) 以米為培養基質，在培養 7 天後，發現 *M. purpureus* BCRC 31540 之 monacolin K 產量為 670 mg/kg、GABA 產量為 3933 mg/kg，為五株菌 (*M. purpureus* BCRC 31498、31499、31540、31615、*M. pilosus* BCRC 31502) 中最高；但 citrinin 也高達 11.2 mg/kg，另外發現在 100 °C 加熱 10 分鐘，monacolin K 及 GABA 濃度變化不大，但 citrinin 之濃度下降約 69%，推測其 monacolin K 及 GABA 為熱穩定物質。吳 (2008) 發現 *Monascus purpureus* NTU 568 以山藥為基質生產之 GABA 較在來米高，發酵過程 GABA 含量在第六天達到最高點，在第八天開始進行厭氧處理 60 小時及添加 3% 乙醇，可使 GABA 含量從 134 mg/kg 提高至 513 mg/kg，而 citrinin 從 30.81 ppm 降低至 6.35 ppm，趨勢顯示厭氧處理可造成 GABA 含量提升及 citrinin 含量下降。

除上述這四種主要研究的二級代謝產物外，蘇等 (1970) 以 *M. anka* 培養於以葡萄糖為碳源之培養基中，經七天後可產生琥珀酸 (succinic acid)、檸檬酸 (citric acid)、葡萄糖酸 (gluconic acid)、草酸 (oxalic acid) 及乙醇等一級代謝產物。此外，紅麴也可生產不飽和脂肪酸、醇和酯等芳香物質 (Juzlová et al., 1996; Rasheva et al., 1997) 及多種水解酵素如澱粉分解酵素 (amylase、glucoamylase)、蛋白分解酵素 (protease) (Lakshman et al., 2010)、半乳糖分解酵素 (galactosidase)、核糖核酸分解酵素 (ribonuclease) 等，因此被用為製造多種酵素食品之重要材料 (蘇，2001)。

目前紅麴還有許多具功效的物質陸續被發現，例如具防癌的 ankaflavin (Su et

al., 2005; Tsai et al., 2009)、抗氧化物質 dimerumic acid (Aniya et al., 2000; Taira et al., 2002), 以及其他生理活性, 如降血糖、抗疲勞、改善阿茲罕默症類澱粉蛋白沉積及其造成的記憶、學習能力下降、預防高脂飲食所造成之肥胖等等的研究 (玉田, 1988; Chen et al., 2008 a; Lee et al., 2007d; Lee et al., 2010)。另外, 產品應用方面, 在餵食紅麴米的母雞發現可降低其雞蛋、雞肉中膽固醇含量 (Wang and Pan, 2003 b; Wang et al., 2006), 研究結果更刊載於已發行一百多個國家的刊物-美國科學新知 (Science News) 的專訪。



## 第二節 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA)

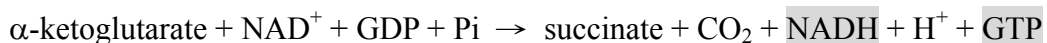
### 1. GABA 之特性

GABA 為一種四碳的非蛋白質胺基酸，分子式為  $C_2H_2NO_2$ ，因胺基接於  $\gamma$  碳上，使得分子結構較胺基接於  $\alpha$  碳的其他胺基酸有更好的彈性，在水溶液中易呈現多種構型，包括類似脯胺酸的環狀分子結構，因此具高度水溶性，但不溶於苯及乙醚等有機溶劑；而 GABA 也為兩性離子 ( $pK$  值為 4.03 和 10.56)，有助於細胞間質的 pH 平衡 (Christensen et al., 1994)，另外還具耐酸鹼、高溫，不易受熱破壞之特性，有利於食品加工上的應用 (白等, 2005; 區, 2002)。在哺乳動物中的神經系統內 GABA 為一種抑制性傳遞物質，除了腦與脊髓外，已在近三十種組織發現有 GABA 的存在，包括視網膜、嗅球細胞、心臟細胞、肝細胞、腎細胞與骨骼肌細胞等 (Tillakaratne et al., 1995)，其中腦組織的 GABA 濃度約為 0.1 ~ 0.6 mg/g (江, 2008)，而大部分組織所含的 GABA 含量僅為腦的 1% (張等, 2002)，正常人體血漿中的 GABA 濃度平均為 62.9 ng/mL (區, 2002)。

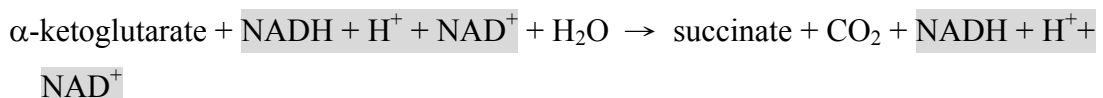
### 2. GABA 的代謝途徑

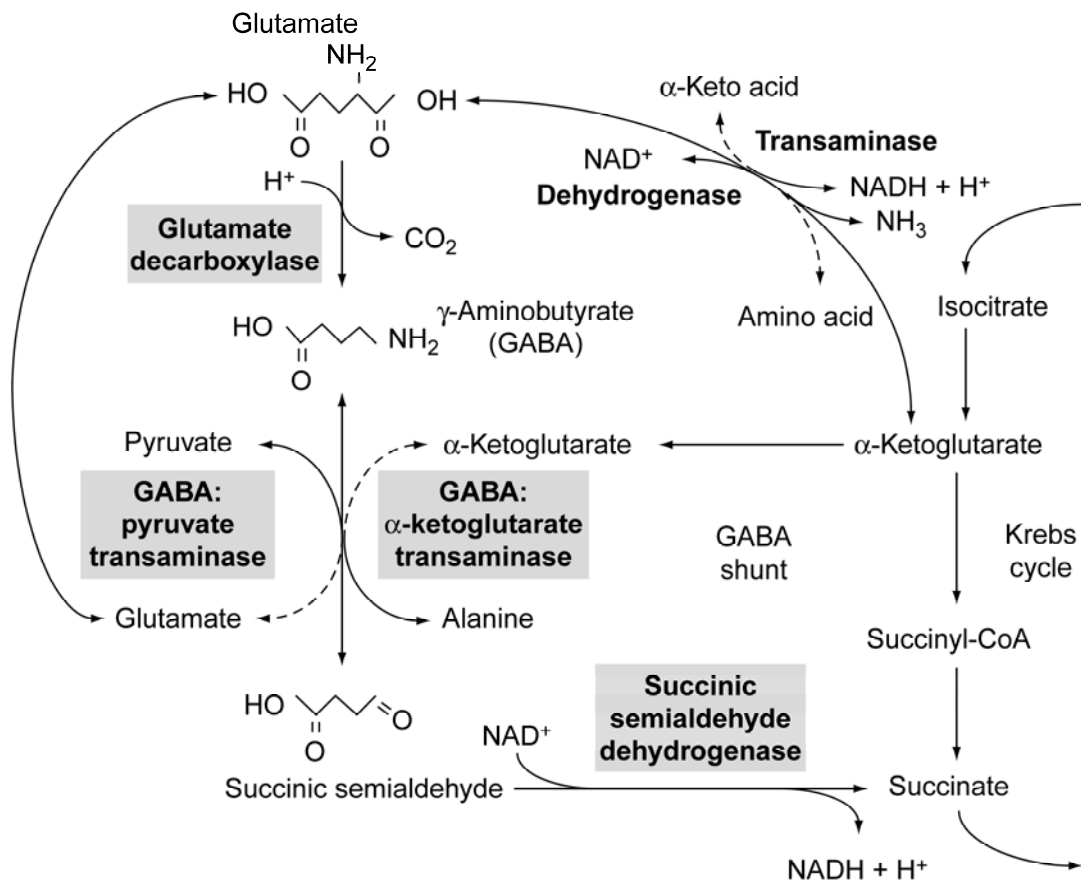
GABA 為 TCA cycle 分支路徑的中間產物，如圖 1-2 所示。由麩胺酸 (L-glutamate, L-Glu) 經麩胺酸脫羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD) 催化而成，會因 GABA 轉胺基酶 ( $\gamma$ -aminobutyrate transaminase, GABAT, EC 2.6.1.19) 的轉胺作用產生琥珀酸半醛 (succinic semialdehyde, SSA)，最後再被琥珀酸半醛脫氫酶 (succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH, EC 1.2.1.16) 氧化為琥珀酸。比較於  $\alpha$ -ketoglutarate 之兩代謝路徑：

#### (1) 典型 TCA cycle



#### (2) GABA shunt





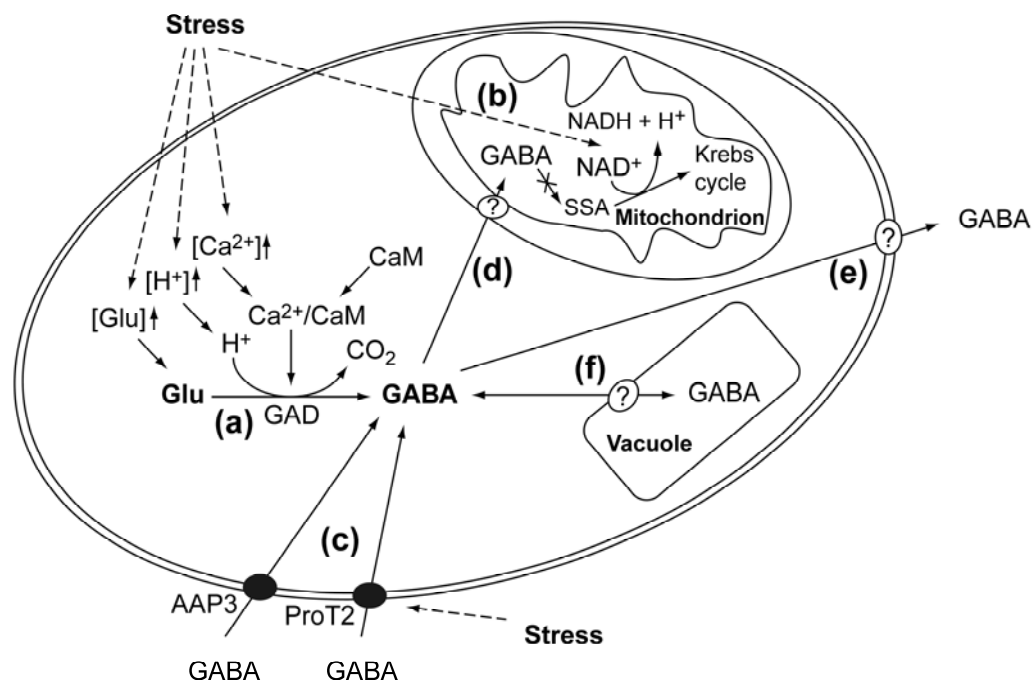
(Shelp et al., 1999)

圖 1-2 GABA 與其他相關代謝路徑

Fig. 1-2 The gamma-aminobutyric acid (GABA) shunt and its relationship to other metabolic pathways. Enzymes are indicated in bold; those specifically associated with the GABA shunt are in bold and highlighted in grey.

若基於能量效率比較，行 TCA cycle 可獲得比 GABA shunt 更多的能量，所以在生物體內正常情況下行 GABA shunt 約只有 2% ~ 17% (Schousboe and Waagepetersen, 2009)，在腦組織 *in vivo* 研究中，發現醣類代謝有 8%~10% 會經由 TCA cycle 流向 GABA shunt (Balazs et al., 1970)。從另一角度來看，TCA cycle 代謝  $\alpha$ -ketoglutarate 需要消耗  $\text{NAD}^+$ ，當細胞面對一些壓力，如缺氧環境，會造成  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  比例下降，使  $\text{NAD}^+$  來源不足而影響了琥珀酸的合成及限制了 TCA cycle 的運作，此時 GABA shunt 則可扮演調節角色，緩和環境壓力帶來的衝擊，使 TCA cycle 繼續進行 (Bown and Shelp, 1997)。

在植物中，GABA 合成主要是受到來自外界的壓力或刺激產生的代謝產物，外界的刺激條件包含有溫度、壓力、觸碰、酸性環境與氧濃度等。當植物的組織遇到這些刺激時，會引發信號傳遞，藉以增加細胞質中  $\text{Ca}^{2+}$  含量並活化促進 GABA 的合成與累積 (Shelp et al., 1999)。如圖 1-3 所示，GABA 在植物體的累積通常可歸納為下列幾項因素：(1) GAD 活化時需消耗  $\text{H}^+$ ，當 pH 值下降時 GAD 活性上升，而當 pH 回復時活性則下降，因此 GABA 的蓄積能改善細胞質的酸化，達到 pH 值的調節 (Bown and Shelp, 1997)。(2) 減緩厭氧時  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  失衡造成對 TCA cycle 造成的影響。(3) 當麩醯胺酸 (glutamine) 合成遭到抑制、蛋白質合成減緩或提升蛋白質降解速度時，麩胺酸 (glutamate) 合成 GABA 的效率會提升，成為氮原的暫存型式 (Narayan and Nair, 1990)。(4) 和 proline 及 glycine betaine 一樣具有調節滲透壓功能，保護植物對於水壓及冷凍時細胞基質濃縮所造成的損傷 (Schwacke et al., 1999)。(5) 調節植物莖的長度及刺激賀爾蒙的表現，高濃度的 GABA 會抑制植物莖部組織的生長，並刺激賀爾蒙  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid 及 kinetin 生成，進而抑制根部組織分化 (Ford et al., 1996)。(6) 保護植株防蟲害，抑制部分昆蟲生長，如玫瑰帶紋捲葉蛾之幼蟲 (Ramputh and Bown, 1996)。

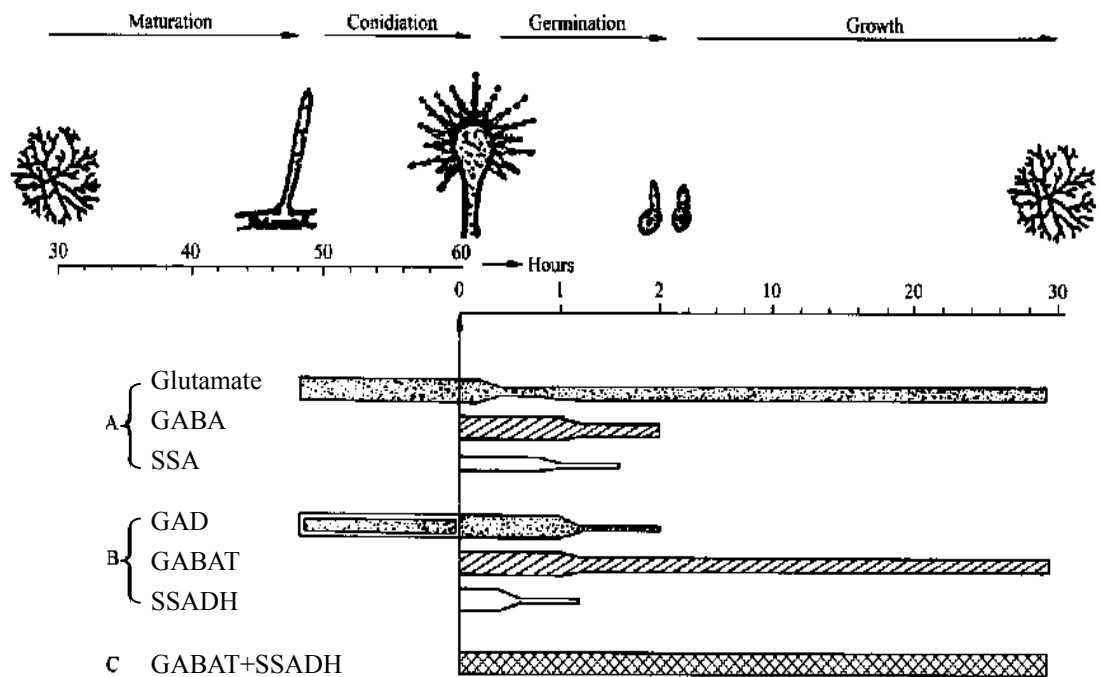


(Shelp et al., 1999)

圖 1-3 生物及非生物性壓力對 GABA 於細胞內與細胞間的調節

Fig. 1-3 Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) levels by biotic and abiotic stresses and intracellular and intercellular transport. Stress might increase ( $\uparrow$ ) cytosolic  $Ca^{2+}$ /calmodulin,  $H^+$  or glutamate levels, which in turn stimulate the production of GABA by glutamate decarboxylase (a). Stress might also decrease the NAD:NADH ratio, thereby limiting or competitively inhibiting succinic semialdehyde dehydrogenase activity and causing the accumulation of succinic semialdehyde, the feedback of which in turn inhibits ( $\times$ ) GABA transaminase (b). In addition stress increases the import of GABA, as well as other compounds (c). GABA accumulation might also result from decreased import into the mitochondrion (d). Export from the cell (e). GABA might also be sequestered in the vacuole (f). Abbreviations: AAP, amino acid permease; CaM, calmodulin; GAD, glutamate decarboxylase; ProT, proline transporter; SSA, succinic semialdehyde; circled question marks indicate that experimental evidence supports the existence of unknown transport steps.

微生物中，GABA 的產生主要與 GAD 的酵素活性有關，不同菌株最高 GAD 活性的酸鹼值亦不同。1950 年，Reed 學者從酵母酸處理之酵素萃取物中分離出 GABA (Reed, 1950)；1998 年 Nomura 等學者研究乾酪的生產菌 *Lactococcus lactis*，發現該菌株在 pH 值 4.7 時 GAD 活性最佳，但在 pH 值 5.0 時 GABA 產量最高，而當培養基之 pH 超過 5.5 時，則不產生 GABA。其他微生物如 *Escherichia coli* 在 pH 3.8 時 GAD 活性最佳，*Clostridium perfringens* 亦是在 pH 值在 4.7 時 GAD 的活性最佳，而相較於一般茶葉中的 GAD 酵素則在 pH 5.8 時活性最高 (Nomura et al., 1998)。圖 1-4 為絲狀真菌在無性生殖生活史上不同階段 GABA 相關代謝產物及酵素消長之情形，隨著孢子萌發 GAD 表現，GABA 才開始累積，SSA、GABAT 與 SSADH 於菌絲生長時才出現。*Neurospora crassas* 在孢子發芽時期，GABA pool 增加、麩胺酸代謝才開始，故在孢子發芽初期才開始有 GABA 的產生 (Kumar and Punekar, 1997)。*Aspergillus nidulans* 和 *Aspergillus niger* 也有 GABA 表現，不同的是 *Aspergillus niger* 是在產酸時期累積 GABA (Kubicek et al., 1979)。而紅麴米萃取物同樣發現 GABA 存在 (Kohama et al., 1987)，學者 Kono 發現厭氧處理後可使紅麴菌體 pH 值降至 5，更接近提高 GAD 的最適 pH，並提高 GABA 及 glutamic acid 的含量，但當紅麴菌生長至對數末期時，培養基 pH 值會逐漸上升，使 GAD 酵素活性下降，同時 GABA transaminase 活性上升，將 GABA 代謝為琥珀酸，故 GABA 含量快速減少 (Kono and Himeno, 2000)。Aoki 也於 2003 年指出經過厭氧處理後可提高 *Rhizopus microspores* var. *oligosporus* IFO 8631 發酵黃豆之 GABA 含量，並隨氧氣含量的降低而升高 (Aoki et al., 2003)。Handoyo 及 Morita 將 *Rhizopus oligosporus* 接種於黃豆中，使原黃豆中 GABA 含量為 2.7 mg/100 g 經 24 小時發酵後提升約 10 倍 (21.4 mg/100 g soybean) (Handoyo and Morita, 2006)。



(Kumar and Puneekar, 1997)

圖 1-4 真菌無性生活史中各階段 GABA 代謝產物及酵素表現

Fig. 1-4 Metabolites and enzymes of GABA metabolism along the asexual developmental cycle of fungi: a schematic temporal representation. The thickness of the horizontal bars relates to changes in enzyme/metabolite levels. Zero corresponds to the beginning of spore germination and GAD is functional only in the germinating spores. GABAT and SSADH are induced in GABA grown mycelia (shown in C).

### 3. GABA 的生產

雖然 GABA 在自然界的分佈很廣泛，但動植物組織中 GABA 的含量都較低，例如豆葉中的含量僅為 0.04  $\mu\text{g/g}$ ，因而從動植物體內直接提取 GABA 並作為食品配料的可行性不大，其原因主要是因為 GABA 存在量少並且分離困難，因此轉而以合成方法進行 GABA 的生產。

GABA 的製備方法主要有化學合成法和生物合成法兩種。化學合成法多見於專利文獻的報導，利用鄰苯二甲醯亞胺鉀 (potassium phthalimide) 與  $\gamma$ -氯丁腈 (4-chlorobutyronitrile) 在 180°C 反應，然後將產物與濃硫酸回流，再結晶純化而得 (林等，2008)，或由吡咯烷酮 (pyrrolidone) 經氫氧化鈣、碳酸氫銨水解、開環所製得 (趙，1992)，也有學者使用酞醯亞胺 (phthalimide) 或氮作用於  $\gamma$ -鹵化丁酸 (葉，2002)。這些合成方法條件劇烈，且容易有化學溶劑殘留，使得純化成本高，主要應用於化工領域，無法作為天然的安全食品添加劑。

生物合成法又可分為植物富集法與微生物發酵法。植物富集法為利用植物組織中的 GABA shunt，由麩胺酸脫羧酶直接將麩胺酸脫去  $\alpha$ -羧基以得到 GABA，此步驟需要經由外界的壓力或刺激來加速運作。常以提高  $\text{H}^+$  和受質含量來刺激麩胺酸脫羧酶的活性，其活性也與發芽有關，發芽糙米中的 GABA 含量便是因發芽促使麩胺酸脫羧酶活化的結果 (Bautista et al., 1964)。催芽法常用於種子類穀物，Komatsuzaki 等學者將糙米經過 35°C 浸泡發芽 24 小時後，GABA 含量從 7.3 mg/100 g 提升為 10.1 mg/100 g (Komatsuzaki et al., 2007)。一般市售的發芽玄米便是利用催芽使糙米中 GABA 含量增加後再經由加工所製作出的產品。而厭氧處理則廣為應用在茶葉上，普通茶中含有豐富的麩胺酸，可達 1.78-4.95 mg/g，但 GABA 含量卻非常低僅有 0.02-0.21 mg/g d.b. (冀等，2007)。澤井等 (1999) 利用有氧-無氧交互處理提升茶葉中 GABA 的含量，經過一次有氧-無氧處理過程，其 GABA 含量為連續厭氧處理茶葉的 1.5 倍，原理為厭氧時消耗麩胺酸，生成 GABA，有氧環境時又補充剛剛已消耗之麩胺酸，以利下階段厭氧時的轉換，經過四次循環

GABA 含量可提高至 2.3 倍。

發酵法在早期的研究中，以大腸桿菌為 GABA 生產菌，發酵培養基為麩皮水解液、玉米漿、蛋白胨、礦物質等 (Maras et al., 1992)。但使用大腸桿菌進行食品開發，生產富含 GABA 的製品仍存在安全性方面疑慮，因此轉而從乳酸菌、酵母菌、麴菌等一些安全性高的微生物進行生產 (Aoki et al., 2003; Hao and Schmit, 1993; Su et al., 2003; Sun et al., 2009)。

相較而言，化學合成法較快速但安全性差；植物富集法安全性高但 GABA 含量偏低、控制不易；而微生物發酵所合成的 GABA 含量高且操作均一化，較適合工廠大量生產。

#### 4. GABA 產品的拓展與演進

最早研究開發富含 GABA 食物是在 1986 年日本。當時由日本農林水產省茶業試驗場的津志田氏等開發了綠茶富集 GABA 的新技術，將新鮮綠茶葉在含氮條件下放置 6~8 小時，綠茶葉中的麩胺酸就能轉化為 GABA。在此研究的基礎上，一些公司開始生產 GABA 富集的綠茶新產品，並推上市場銷售。

1994 年，日本農水省中國農業試驗場的森堀野氏等研究又發現了米胚芽加水後，即可在內含的脫碳酸酶作用下，將麩胺酸轉化為大量 GABA。此技術經 Oryza 油化公司應用到實際生產以後，試驗場和 Oryza 公司聯合申請專利權，並合作生產以米胚芽為原料的 GABA 富集製品，商品取名為“ORYZA GABA”。富含 GABA 的米胚芽等食品雖然含有蛋白質、維生素、無機鹽、糖脂質和食物纖維等多種有益的營養成分，但 GABA 的含量不夠高，達不到純 GABA 的抗高血壓等生理效果。隨著 GABA 市場認知度不斷提高，許多公司開始著手研究開發高濃度的 GABA 產品，包括穀物類、乳酪、番茄、南瓜和小球藻等許多天然食物進行富集 GABA 的研究 (杉下，2001)。

此外，Fujicco、大洋 (Taiyo) 香料、Yaegaki 發酵技術研究所、Pharma 食品研究所等許多公司和企業單位也先後開發生產了富集 GABA 功能食品。大洋香料

公司開始以牛乳和天然麩胺酸為主要原料，經乳酸發酵生產的 GABA 富集食品“GABA LACTO”，已經上市銷售。發酵乳生產用的乳酸菌株經篩選得到的優良菌株，使 GABA 生產得以實現短時間、高效率目標，因採用乳原料製成，故風味良好，適合製成功能飲料和食品，市場評價很高。Pharma 食品研究所與京都府中小企業中心合作研究，從朝鮮酸辣白菜中獲得的乳酸菌為菌種，也成功的開發出高富集 GABA 新食品，雖然乳酸菌生產菌株來自酸辣白菜生產公司最初有些出人意料，但此方法已被眾多鹹菜生產公司開發利用 (杉下，2001)。

除乳酸菌、酵母菌外，學者姜等也指出利用具多保健功效之真菌生產 GABA，從 *Grifia frondosa* (舞菇)、*Lentinula edodes* (香菇)、*Ganoderma lucidum* (赤芝)、*Coriolus versicolor* (雲芝)、*Flammulina velutipes* (金針菇)、*Agaricus bisporus* (洋菇) 及 *Agaricus Blazei* Murill (巴西蘑菇) 之子實體及液態培養中，*Agaricus Blazei* Murill 有最高的 GAD 活性，更發現利用子實體發酵，進行自消化，可於培養液中獲的高濃度的 GABA 及 beta-glucan，同時也提高了製成粉末產品後的溶解率 (姜等，2001)。

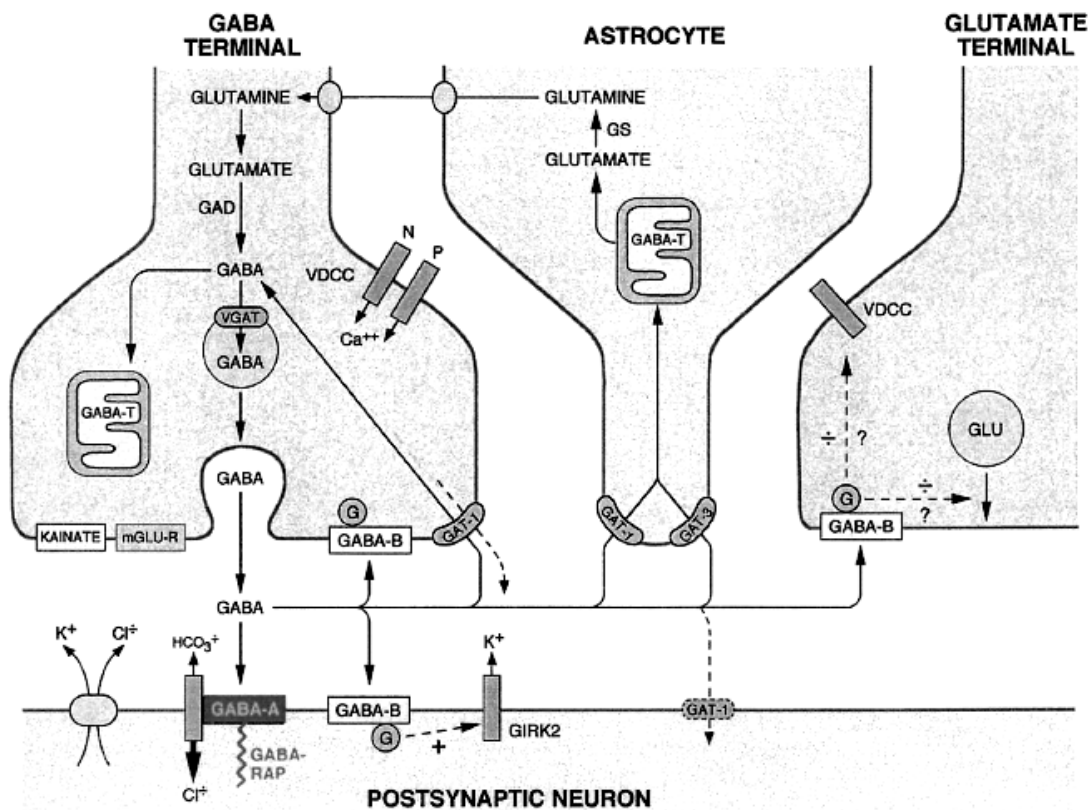
縱觀整個市場趨勢，GABA 的生產從早期處理較簡單 (厭氧) 的茶葉，進而到須控制浸泡及發芽時間，且須防止雜菌生長之發芽米，接續而來的為高 GABA 單位產量的乳酸菌及酵母菌，而到了現今利用多功效性經濟真菌進行產品開發。GABA 也已列為日本厚生省特定保健用食品 (foods for specified health uses) 可添加物之一，功效訴求以降血壓為主。因此，利用富含多重保健功效的紅麴菌株進行 GABA 生產，為相當具有市場潛力的研究。

## 5. GABA 的作用機制

大腦掌管了人類精神、思維、體覺、聽覺、視覺等五大功能，控制著運動、感覺、視覺、聽覺、語言、情緒及記憶中樞等的執行。而構成腦的基本單位是神經元細胞 (neurons)，藉由這些細胞間的訊息傳遞來調控整個生命體的運作，目前已知有許多化學物質具有神經訊息傳導的作用，包括血清素、多巴胺、乙醯膽鹼

等，而最常見也分布最廣的為 L-glutamate 及 GABA，L-glutamate 是主要的興奮型突觸訊號傳遞物質，相反的，GABA 為主要的抑制型神經傳導因子，glycine 則為次要的抑制型神經傳導因子，尤其在脊髓中為多 (Olsen and DeLorey, 1999)。一般神經細胞前突觸端 (presynaptic terminal) 釋放出神經傳導物質之後，這些化學物質便利用擴散的方式抵達後突觸區 (postsynaptic terminal)，並且和其上的受體相互結合，以 L-glutamate 為例，此時將引發一個動作電位，細胞膜對  $\text{Na}^+$  的通透性大增，促使較平常更多的  $\text{Na}^+$  進入細胞內，使原本細胞保持外部正電荷、內部負電荷的極化現象去除，此階段為去極化 (depolarization)，神經衝動因此從一個神經元傳向下一個神經元。隨後  $\text{Na}^+$  通道關閉， $\text{K}^+$  通道打開，細胞內大量的  $\text{K}^+$  擴散至胞外，細胞膜又回復為原來極化現象，稱再極化 (repolarization)。GABA 的角色則是使神經突觸後細胞膜上的  $\text{Cl}^-$  通道 ( $\text{GABA}_A$  receptor 即為  $\text{Cl}^-$  通道) 開啟，使大量  $\text{Cl}^-$  流入細胞內，導致電位更趨向於負值，稱為過極化 (hyperpolarization)，因此更難產生動作電位，達到抑制神經傳導的效果 (圖 1-5)。

GABA 受體依據對刺激物及拮抗劑的敏感性分為  $\text{GABA}_A$ 、 $\text{GABA}_B$  與  $\text{GABA}_C$  三種。 $\text{GABA}_A$  為氯離子通道調節蛋白，是主要的 GABA 受體，能快速使細胞電位回復平靜，一些麻醉藥 (Bicuculline、Metrazol 等  $\text{GABA}_A$  拮抗劑) 及常用的鎮定劑 benzodiazepine 都作用於此 (Schofield et al., 1987)。 $\text{GABA}_B$  亦稱 G 蛋白耦合受體 (G protein-linked receptor)，在突觸前端經活化後能抑制  $\text{Ca}^{2+}$  流入細胞，進而抑制了興奮性傳遞物質的釋放；而在突觸末端的  $\text{GABA}_B$  可長時間的移除細胞內  $\text{K}^+$  達到過極化效果。近年研究指出， $\text{GABA}_B$  受體與降低體溫、促進脂肪產熱、降血壓、增加胃部蠕動與刺激胃酸分泌等作用，但相關機制仍需要進一步研究 (張和徐，2006)。 $\text{GABA}_C$  為近期發現之受體，主要存在於視神經中，與  $\text{GABA}_A$  一樣為氯離子 ( $\text{Cl}^-$ ) 通道蛋白，相較於  $\text{GABA}_A$  作用快速且短暫， $\text{GABA}_C$  為緩慢且持久 (Olsen, 2002)。



(Olsen, 2002)

圖 1-5 GABA 突觸概要

Fig. 1-5 Schematic GABA synapse. Diagram showing the main features of the GABA synapse. Transporters are indicated by oval symbols, receptors and ion channels by rectangular symbols. A: Transporters: GAT-1, GAT-3, plasma membrane GABA transporters; VGAT, vesicular GABA transporter. B: Receptors: GABA-A, ionotropic GABA receptor; GABA-B, G-protein - coupled GABA receptor; KAINATE, presynaptic kainate receptor; MGLUR, metabotropic glutamate receptor. C: Ion channels: GIRK2, G-protein-coupled inwardly rectifying K channel; VDCC: voltage-dependent calcium channel. D: Enzymes: GABA-T, GABA transaminase; GAD, glutamic acid decarboxylase; GS, glutamate synthetase.

## 6. GABA 的生理功能

除第一節提及的降血壓功效外，GABA 的生理功能還包括促進生長激素分泌：強化  $\text{Ca}^{2+}$  流動與增加細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  含量，使生長激素分泌量增加超過 5 ng/mL (McCann et al., 1984)、改善臨床酒精相關症狀，包括降低酒精對肝造成之損傷、提升血清中 HDL-C，降低三酸甘油酯的含量 (Oh et al., 2003)、利尿及鎮靜效果 (Jakobs et al., 1993; Wong et al., 2003)、調節免疫功能 (Oh and Oh, 2003)、促進腦部代謝作用之進行、增進記憶力與學習力、預防動脈硬化、活化腎機能、促進酒精代謝等功能 (茅原與杉浦，2001) 及改善失眠、憂鬱與自主神經失調等疾病 (Okada et al., 2000)。

另一方面 GABA 在痛覺及憂慮的情緒上亦扮演一重要的角色，許多神經性的紊亂，例如：Parkinson's disease、stiff-man syndrome 及 schizophrenia (精神分裂症) 都被認為與大腦中 GABA 及 GAD 濃度的交互作用有關。岡田等人 (2000) 臨床研究發現，患有老年失智症與精神方面疾病者其腦脊髓液中的 GABA 濃度較低，給予此類病患補充  $\gamma$ -胺基丁酸製劑可以改善其症狀，另外又證實了  $\gamma$ -胺基丁酸的精神安定作用，其使用經過脫脂處理富含  $\gamma$ -胺基丁酸稻米胚芽，對患有更年期障礙或初期精神症狀的 20 位女性病患 (平均年齡 49.4 歲) 進行治療，所用之胚芽  $\gamma$ -胺基丁酸含量為 292 mg/100 g rice germ。研究中每天給予病患  $\gamma$ -胺基丁酸含量為 26.4 mg 的米粉末食品，進行 16 週實驗，結果發現 65% 以上的病患認為對其更年期障礙或初期精神憂鬱症狀及失眠有改善的效果。

## 7. 安全性

因 GABA 為水溶性胺基酸，過量的 GABA 會經由尿液排出，目前為止並無明顯副作用報導 (區，2002)。而楊等 (2008) 對 GABA 進行急性毒性與亞毒性試驗，證實 GABA 對小鼠的管餵劑量  $\text{LD}_{50}$  大於 15.55 g/kg，屬無毒物質，亦無蓄積毒性。一般動物飼料在 GABA 添加量為 10-100 mg/kg 的範圍內安全可靠。

### 第三節 憂鬱症 (Depression)

#### 1. 憂鬱症盛行趨勢

隨著經濟的進步與工商業的快速發展，為了趕上社會變動的步調，人們的生活腳步不斷加快，一天二十四小時似乎再也不夠用，與之而來的無形壓力累積，使得人們罹患憂鬱症的比例不斷上升，根據台灣精神醫學會統計，台灣憂鬱症之終生盛行率為 5% - 11%，約 150 萬人到 250 萬人罹患憂鬱症 (胡，2003)。

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 最新統計報告中指出，憂鬱症於 2004 年世界十大高負擔疾病的排名躍升至第三，已超過心血管疾病與愛滋病，更預估於 2030 年站上世界第一 (圖 1-6)。表 1-1 依國家薪資收入做區分，發現在低收入國家因生活水平較低，故主要負擔疾病為環境衛生問題居多，例如呼吸道感染、腸胃疾病、愛滋病及瘧疾等等，憂鬱則排列第八；隨著收入的增加，人民生活品質、醫療設備逐漸改善，感染疾病機率大幅降低，但取而代之的則是現代人常好發的文明病，包括心血管、腦、憂鬱、阿茲海默症及酒精性傷害等疾病，而憂鬱症在中、高收入國家皆位列第一。此研究以全球疾病所造成的負擔 (global burden of disease, GBD) 為基礎，利用「失能調整存活人年 (disability adjusted life years, DALYs)」為指標進行統計。全球疾病負擔之研究始於 1992 年，由世界衛生組織、世界銀行及哈佛大學共同著手研究，藉著醫療經濟學的原理與方法，並配合倫理學之公平原則，建構出疾病負擔的新指標 DALYs，能更詳細而明確的判斷一個國家，甚至全球不同的社經和不同的衛生發展階段地區的疾病負擔情形，有助於一個國家或全球性界定衛生問題、優先次序，和評估各項衛生計劃策略及其成效 (WHO, 2008)。

DALYs 是一測量疾病成果的單位，依國家衛生研究院實證臨床指引平台將其翻譯為失能調整存活人年，指一個人因早夭或失能，所造成的生命損失年數；簡單來說，一個 DALYs 代表一個人失去一個健康年。DALYs 相當於生命損失 (years of life lost, YLL) 人年數加上失能損失 (years lived with disability, YLD) 人年數之

2004 Disease or injury	As % of total DALYs	Rank		Rank	As % of total DALYs	2030 Disease or injury
Lower respiratory infections	6.2	1		1	6.2	Unipolar depressive disorders
Diarrhoeal diseases	4.8	2		2	5.5	Ischaemic heart disease
Unipolar depressive disorders	4.3	3		3	4.9	Road traffic accidents
Ischaemic heart disease	4.1	4		4	4.3	Cerebrovascular disease
HIV/AIDS	3.8	5		5	3.8	COPD
Cerebrovascular disease	3.1	6		6	3.2	Lower respiratory infections
Prematurity and low birth weight	2.9	7		7	2.9	Hearing loss, adult onset
Birth asphyxia and birth trauma	2.7	8		8	2.7	Refractive errors
Road traffic accidents	2.7	9		9	2.5	HIV/AIDS
Neonatal infections and other <sup>a</sup>	2.7	10		10	2.3	Diabetes mellitus
COPD	2.0	13		11	1.9	Neonatal infections and other <sup>a</sup>
Refractive errors	1.8	14		12	1.9	Prematurity and low birth weight
Hearing loss, adult onset	1.8	15		15	1.9	Birth asphyxia and birth trauma
Diabetes mellitus	1.3	19		18	1.6	Diarrhoeal diseases

(WHO, 2008)

圖 1-6 十大高負擔疾病 2004 年排名及 2030 年預估排名

Fig. 1-6 Ten leading causes of burden disease in 2004 and 2030  
COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

<sup>a</sup> This category also includes other non-infectious causes arising in the perinatal period apart from prematurity, low birth weight, birth trauma and asphyxia. These non-infectious causes are responsible for about 20% of DALYs shown in this category.

表 1-1 依國家收入分組之全球疾病負擔造成因素 (2004)

Tab. 1-1 Leading causes of burden of disease (DALYs), countries grouped by income, 2004

Disease or injury		DALYs (millions)	Per cent of total DALYs	Disease or injury		DALYs (millions)	Per cent of total DALYs
<b>World</b>				<b>Low-income countries<sup>a</sup></b>			
1	Lower respiratory infections	94.5	6.2	1	Lower respiratory infections	76.9	9.3
2	Diarrhoeal diseases	72.8	4.8	2	Diarrhoeal diseases	59.2	7.2
3	Unipolar depressive disorders	65.5	4.3	3	HIV/AIDS	42.9	5.2
4	Ischaemic heart disease	62.6	4.1	4	Malaria	32.8	4.0
5	HIV/AIDS	58.5	3.8	5	Prematurity and low birth weight	32.1	3.9
6	Cerebrovascular disease	46.6	3.1	6	Neonatal infections and other <sup>b</sup>	31.4	3.8
7	Prematurity and low birth weight	44.3	2.9	7	Birth asphyxia and birth trauma	29.8	3.6
8	Birth asphyxia and birth trauma	41.7	2.7	8	Unipolar depressive disorders	26.5	3.2
9	Road traffic accidents	41.2	2.7	9	Ischaemic heart disease	26.0	3.1
10	Neonatal infections and other <sup>b</sup>	40.4	2.7	10	Tuberculosis	22.4	2.7
<b>Middle-income countries</b>				<b>High-income countries</b>			
1	Unipolar depressive disorders	29.0	5.1	1	Unipolar depressive disorders	10.0	8.2
2	Ischaemic heart disease	28.9	5.0	2	Ischaemic heart disease	7.7	6.3
3	Cerebrovascular disease	27.5	4.8	3	Cerebrovascular disease	4.8	3.9
4	Road traffic accidents	21.4	3.7	4	Alzheimer and other dementias	4.4	3.6
5	Lower respiratory infections	16.3	2.8	5	Alcohol use disorders	4.2	3.4
6	COPD	16.1	2.8	6	Hearing loss, adult onset	4.2	3.4
7	HIV/AIDS	15.0	2.6	7	COPD	3.7	3.0
8	Alcohol use disorders	14.9	2.6	8	Diabetes mellitus	3.6	3.0
9	Refractive errors	13.7	2.4	9	Trachea, bronchus, lung cancers	3.6	3.0
10	Diarrhoeal diseases	13.1	2.3	10	Road traffic accidents	3.1	2.6

(WHO, 2008)

COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

<sup>a</sup> Countries grouped by gross national income per capita.

<sup>b</sup> This category also includes other non-infectious causes arising in the perinatal period apart from prematurity, low birth weight, birth trauma and asphyxia. These non-infectious causes are responsible for about 20% of DALYs shown in this category.

和。因此 DALYs 是一個「負向」指標，以時間基礎為測量單位，試圖量化人類疾病、傷害及危險因子。而 DALYs 本身是一種非特異性疾病的概念，將各種不同傷病之負擔做相互比較（行政院主計處，2009）。

DALYs 比死亡率更能表現出憂鬱症所造成的負荷，除了以疾病的出發點來討論憂鬱造成的失能與提早死亡，更能得知憂鬱症對於未來社會發展影響為最大的潛在因子，因此，尋求預防、改善或治療的方法是非常重要且迫切的問題。

## 2. 憂鬱症的診斷

由 WHO 對憂鬱症的定義得知，憂鬱症為一種常見的精神（情感）性疾病，通常伴隨有沮喪、對事物失去興趣、專注力下降、有罪惡感、自我認同度低、嗜睡或失眠等症狀，並可能有自殺等念頭（WHO, 2010）。

目前憂鬱症的診斷可分兩個系統，為世界衛生組織的國際疾病分類手冊（International Classification of Disease 10<sup>th</sup>, ICD-10）及美國精神病學會（American Psychiatric Association）所公告的心理疾病診斷與統計手冊（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4<sup>th</sup>, DSM-IV）。早期 DSM-III 稱憂鬱症為「情緒性疾病」（affective disorders）（孔，1996），1994 年 DSM-IV 改稱「情感性疾病」（mood disorders），以強調此類疾病是因情緒呈現異常過高或過低所導致（Othmer and Othmer, 1994）。DSM-IV 將憂鬱症的診斷條例化，並將憂鬱症分成重型憂鬱症（major depressive disorder）及輕型憂鬱症（dysthymic disorder），診斷準則為下列九點（Othmer and Othmer, 1994）：

- a. 經常感到情緒低落、沮喪或絕望
- b. 對日常活動皆失去興趣或樂趣
- c. 胃口不佳、體重顯著減輕，或食慾增加、體重顯著增加
- d. 失眠或睡眠過度
- e. 精神運動激昂或遲滯
- f. 常感到疲勞或缺乏活力

- g. 無價值感或過度不適當的罪惡感
- h. 思考無法集中、注意力減退或猶豫不決
- i. 反覆地想到死亡或已有一詳細自殺計畫

符合 a 或 b 及 c-i 中四項，時間 2 週以上者則判定患有重度憂鬱症。

### 3. 憂鬱症病理

對於憂鬱症的發生，大致可歸納為兩種因素：社會心理因素、生物化學因素。從社會心理的角度來看，憂鬱症的發生，和病患的早期發展經驗、人格氣質及環境等因素相關。例如在年幼時父母分居或離婚，可能引起日後憂鬱症的發作；喜怒無常、不穩定的情緒氣質，易造成人際間的衝突及睡眠障礙等問題，也可能為引起憂鬱症的原因；而生活壓力帶來的不單純是心理上的影響，也會引發生理上的反應，例如荷爾蒙或神經傳導物質的失衡，因而引發憂鬱症的發作 (Hagop and Akiskal, 2005)。

在生物化學因素方面則有許多不同的理論，目前則以單胺類假說最為廣泛討論。1950 年代有相關研究指出，使用降血壓劑 reserpine 發現有 15% 的患者因情緒低落引發憂鬱症，進一步研究發現 reserpine 會減少大腦中突觸前神經原內的單胺物質正腎上腺素、多巴胺及血清素 (Abe and Coppen, 1969)。近年研究則發現部分患者腦中單胺氧化酶 A (monoamine oxidase A，代謝正腎上腺素、多巴胺及血清素之酵素) 的表現量也較正常人高 (Beach et al., 2010; Dannlowski et al., 2009; Tzeng et al., 2009)，因而可能造成憂鬱症患者的腦脊髓液中，多巴胺的代謝產物 homovanillic acid (HVA)、血清素的代謝產物 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 以及正腎上腺素的代謝產物 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) 均較正常人顯著性下降 (Manji et al., 2001)。

部分研究指出抗憂鬱藥物會增加突觸間正腎上腺素及血清素的濃度，並會和細胞內的一些傳訊物質作用，目前發現的路徑有：(一) 神經傳訊物質會和細胞膜上的 G 蛋白作用進而活化 cAMP，再作用到 PKA (cAMP-dependent protein kinase,

PKA) 蛋白質上 (Ozawa and Rasenick, 1991)；(二) 也有學者發現有的抗憂鬱藥物是作用在 phospholipase C (PLC) 蛋白質，影響細胞內鈣離子以及活化鈣離子調節激酶 (Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent kinase) (Popoli et al., 2000; Tiraboschi et al., 2004)；(三) 活化 Rasmitogen-activated protein (MAP) kinase-extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 路徑 (Tiraboschi et al., 2004)。這些路徑最後都會活化轉錄因子 CREB (Johannessen et al., 2004)，進而調控一些基因表現，改變動物行為反應、內分泌及細胞反應，其中主要作用是促進 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) mRNA 的表現量。BDNF 是大腦中含量最豐富的神經滋養因子，它調節神經介質傳導、參與神經元生長、分化及重塑 (例如海馬迴所掌管的記憶與學習的過程)。近年來，BDNF 也被認為與憂鬱症的病理機轉有關 (Dang et al., 2009; Duman, 2002; Vaz et al., 2008)。

另外，下視丘-腦下腺-腎上腺軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 失調假說則指出急性或慢性壓力會導致 HPA 功能異常，進而影響到海馬迴及杏仁核的作用；海馬迴是維持壓力荷爾蒙的製造，而杏仁核則是對 HPA 有興奮作用 (Nestler et al., 2002)。在一般的狀況下若醣皮質激素的濃度增加，會促使海馬迴產生負回饋抑制作用，但在憂鬱狀態下會使得醣皮質激素的濃度產生過多，此時反而會傷害海馬迴神經細胞 (特別是 CA<sub>3</sub> 錐狀細胞)，使得海馬迴體積變小。用核磁共振影像掃描腦部 3D 立體影像圖，發現有憂鬱症病史者的左右兩側海馬迴體積都比對照組小約 9%-13%，而且憂鬱症病史越久者，海馬迴體積就越小 (Sheline, 2000)。在憂鬱症的病患身上也發現 HPA 有不正常、過度活化的現象，而服用抗憂鬱劑治療可恢復正常 (Dekloet et al., 1988; Sachar and Baron, 1979)。

而在一些家族發生史研究中也發現，情感性疾患的家人罹患憂鬱症的機率較一般人高 (Kendler et al., 2007)，證實情感性疾患的病因與基因可能有很大的關係 (Shih et al., 2004)。

#### 4. 憂鬱症的藥物治療

基於單胺假說，目前所有抗憂鬱藥物的作用幾乎皆為改變大腦內的單胺代謝反應過程，包括早期的三環抗憂鬱劑 (tricyclic antidepressant, TCA) 及單胺氧化酶抑制劑 (monoamine oxidase inhibitor, MAOI)，前者的作用是抑制血清素和正腎上腺素的回收，而後者為分解合成單胺類最主要的酵素 (Frazer, 1997)。隨後，又陸續發展出選擇性血清素回收抑制劑 (serotonin-selective reuptake inhibitor, SSRI) 及選擇性正腎上腺素回收抑制劑 (norepinephrine-selective reuptake inhibitor, NSRI) 等藥物。表 1-2 為美國 2007 年零售市場常見抗憂鬱劑處方用藥的銷售統計，顯示憂鬱症患者仍持續上升中，因副作用因素，TCA 類抗憂鬱藥劑逐漸被 SSRI 取代，Sertraline (SSRI 抗憂鬱藥劑) 銷售量上升近 2 倍，有 2800 萬美元的市場。

所有的藥物都會產生副作用 (side effect)，抗憂鬱藥物也不例外。表 1-3 列出各類抗憂鬱藥物常見的副作用，這些副作用會因病患的不同，有程度的差別。一般來說，TCAs 因為具有較多的副作用，比如會產生心律傳導異常 (conduction abnormalities)、姿態性低血壓 (orthostatic hypotension)、鎮靜 (sedation)、抗膽鹼作用 (anti-cholinergic effects) 及增進自殺傾向 (increased suicidal tendencies) 等等，現在多退居第二線使用，但對於無法接受 SSRI 類藥物所引起的焦慮與躁動的病患，則可選擇 TCAs。由於憂鬱症所引起的併發症包括自殺，對於有自殺傾向的病人，使用 SSRIs 藥物較為恰當，比較不會增加病人自殺的傾向，但 SSRIs 可能造成低血鈉症 (hyponatremia) 和抗利尿激素分泌異常 (syndrome of inappropriate vasopressin secretion) (Wells, 2008)。憂鬱患者若有營養不良、體重下降的現象，應避免使用 fluoxetine 等會使體重減輕的藥物，可改用 paroxetine 或 mirtazapine 來增加食慾，會是比較好的選擇，由於具鎮靜作用，也適用在睡眠障礙的病患，而使用 Venlafaxine 則會使血壓上升 (Hale, 1993)。

除了副作用外，造成藥物順從性不佳的因素還包括社會壓力與對精神疾病的錯誤觀念所致，因害怕外界的眼光而至精神科接受診斷及治療的意願性不高；已

表 1-2 美國 2007 年零售市場常見抗憂鬱劑處方用藥統計

Tab. 1-2 The most commonly prescribed antidepressants in the US retail market in 2007.

Drug	Brand	Class	2007 Prescriptions (in millions, \$)	% change from one year ago
Sertraline	Zoloft	SSRI	28.037	197.6
Escitalopram	Lexapro	SSRI	27.023	3.5
Fluoxetine	Prozac	SSRI	22.266	2.5
Paroxetine	Paxil	SSRI	15.650	-3.6
Venlafaxine	Effexor	SNRI	17.200	0.6
Citalopram	Celexa	SSRI	16.246	35.5
Trazodone	Desyrel	SARI	15.473	5.8
Amitriptyline	Elavil	TCA	13.462	-3.3
Bupropion	Wellbutrin	NDRI	6.370	-48.1
Mirtazapine	Remeron	TeCA	5.129	5.7
Nortriptyline	Pamelor	TCA	3.105	-2.2
Imipramine	Tofranil	TCA	1.524	-6.4

(整理自 Drug Topics, 2008)

SSRI: serotonin-selective reuptake inhibitor, SNRI: serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, SARI: serotonin antagonist and reuptake inhibitor, TCA: tricyclic antidepressant, NDRI: norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor, TeCA: tetracyclic antidepressant.

表 1-3 抗憂鬱藥物副作用比較

Tab. 1-3 Comparison of the side effects on antidepressants

Drug	Sedation	Insomnia	Anti-cholinergic	Orthostatic Hypotension	Seizure	Weight Gain	Cardiac Effects	GI Upset
<b>TCAs (tertiary)</b>								
Amitriptyline	++++	0	++++	++++	++	+++	+++	0
Clomipramine	++	0	+++	+++	+++	++	+++	0
Doxepin	++++	0	+++	++++	++	+++	++	+
Imipramine	++	+	+++	+++	++	+++	+++	0
Trimipramine	++++	0	+++	+++	++	+++	+++	0
<b>TCAs (secondary)</b>								
Amoxapine	++	++	++	++	++	+	++	0
Desipramine	+	+	+	++	+	0/+	++	0
Nortriptyline	++	0	+	+	+	+	++	0
Protriptyline	+	+	++	++	++	0/+	+++	0
<b>Tetracyclic</b>								
Maprotiline	+++	0	0	++	+++	++	++	0
Mirtazapine	++	+	++	++++	0/+	++	++	++
<b>SSRI</b>								
Citalopram	0	0/+	0/+	0	0	0/+	0	+
Fluoxetine	0	++	0	0	0	0	0	+
Fluvoxamine	0/+	+	0	0	0	0	0	++
Paroxetine	-	++	0/+	0	0	0	0	+++
Sertraline	0/+	+	0	0	0	0	0	+++
<b>MAOI</b>								
Phenelzine	+	+	+	+++	0	++	0	+
Tranylcypromine	0/+	+	0	++	0	+	0	+
<b>Other</b>								
Bupropion	0	++	0	0	++++	0	0	0
Trazodone	+++	0	0	++	0	+	0/+	+
Venlafaxine	0	++	+	0/+	0	0	0/+	+++
Nefazodone	+++	0	0	0	0	+	0/+	++

(整理自 Wells, 2008)

\*0 = none    + = low    ++ = moderate    +++ = moderate to high    ++++ = high

服藥治療之患者也常因副作用或認為病情已有改善而擅自停藥，因此如能從食品相關來源著手，開發低副作用之輔助治療劑或保健食品添加物應能改善此問題，並迎合廣大的市場需求。

## 5. 憂鬱症的動物模式

一般動物模式可以分成分析測量模式 (assay models) 與症狀類比模式 (homologous models) 兩大類。分析測量模式以動物的特殊行為或生理反應做為所要探討疾病的病理指標。其操作與量化容易，只要能改變該特殊行為或生理反應的藥物，就意味著對該疾病可能有療效，但有可能過度簡化疾病病理，甚至與所要探討的疾病相似性很低。例如已知精神分裂症與腦部神經傳導因子多巴胺過盛有關，而過多的多巴胺會使大鼠產生旋轉的行為，因此抗精神病藥物(antipsychotics)對老鼠旋轉行為的抑制效力就常常被用來當做此藥物對精神分裂症療效的指標。常見的模式還有咬殺小鼠試驗 (muricide)、日夜顛倒調適試驗 (circadian rhythm readjustment)、延遲獎賞試驗 (differential operant responding for low reinforcement)、小鼠隔離試驗 (isolation-induced hyperactivity)、嗅球受損模式 (lesioning of the olfactory bulbs) 等 (Deussing, 2006; Mckinney and Bunney, 1969; Porsolt et al., 1977)。

憂鬱症的症狀包括情緒低落、喪失興致、注意力不能集中、喪失鬥志、容易絕望、死亡意念、無助感、罪惡感、易怒、激躁不安甚至自殺等。動物對這些症狀無法用語言表達其內心的情緒，因此需輔以行為模式以為判定，是否有活動遲緩的問題可測量動物的自發性活動；無助感可以從老鼠放棄逃避對生命有威脅的電擊、放棄在水中或被懸吊在半空中時的掙扎加以評估；喪失興致的症狀也可以從老鼠受壓力之後降低其原有的偏好 (例如喝蔗糖水) 來衡量。種種行為與人類的憂鬱症狀相似，但沒有預先假設特殊的生理變化，因此仍歸類於症狀類比模式。

目前最廣泛被用來做篩選抗憂鬱劑的藥理作用的動物模式為強迫游泳試驗 (forced swimming test, FST)，這是 Porsolt 最先在 1977 年所提出的方法 (Porsolt

et al., 1977)，該方法將大鼠或小鼠丟在有水的透明壓克力圓柱桶內，老鼠會在水中掙扎試圖逃脫，努力無效之後會放棄掙扎而漂浮在水面上呈現靜止不動的姿勢。老鼠靜止不動的時間被解釋成絕望的時間，時間愈長表示老鼠愈容易絕望，其特徵與生化指標與人相類似，為憂鬱症藥物篩選最適合的模式 (Borsini and Meli, 1988)。這種靜止不動的時間與尾部懸吊試驗 (tail suspension test) 模式一樣可以被所有的典型、非典型抗憂鬱劑和電痙攣刺激治療 (electroconvulsive therapy) 所改善 (Lucki, 1997)。隨後又發展出習得無助 (learned helplessness) 動物模式，將動物被束縛在無法逃脫的電擊箱中接受間歇的電擊之後，再放到無束縛的電擊測試箱中，該動物會喪失逃脫的能力。在這些動物模式中，動物表現憂鬱症狀的時間最多只有 2-3 天，所以又發展出慢性溫和壓力 (chronic mild stress) 的動物模式；慢性溫和壓力法是將大鼠在 4-8 週的時間裡，每天經歷一小段不舒適的壓力，例如：在冷水裡游泳、潮濕或高溫的環境、日夜顛倒、噪音、禁食與禁飲水一天、獨處等，之後該大鼠的自發性活動就會減少 (Reid et al., 1997)。

## 6. 憂鬱症與 GABA 之關係

1960 年代對於情感性疾病 (mood disorders) 的研究中，生化學理論焦點主要在於生物性胺類物質。直至 1980 年時，在臨床上發現服用 valproic acid (抗癲癇藥劑，為一種 GABA 促進劑) 可以有效改善憂鬱症狀，而在往後的臨床、藥理實證上，一再佐證了 GABA 與情感性疾病之關連 (Emrich et al., 1980)。但 GABA 對於憂鬱為何並沒有受到更多的關注，其一原因為以單胺傳導物質作為情感疾病理論為當時的趨勢，大部分人也相信許多更複雜之情感性疾病可能牽扯更多不同的傳導因子，而不單單只是 GABA。另一原因則是 GABA 在大腦中所扮演的角色為一種抑制型神經傳導物質，表面是與憂鬱實無相關，但一些研究則指出，對於酒精及 benzodiazepine (安眠藥物) 的作用，GABA 實際上扮演著解除這些神經抑制狀態的角色，而非單單只有抑制型神經傳導功能而已 (Krosgaardlarsen et al., 1994)。另外，正腎上腺素與血清素在憂鬱症中為重要的神經化學因子，但實際上

在大腦的皮質前區 (frontal cortex) 及海馬迴組織發現，GABA 能同時經由調控突觸前的 GABA<sub>A</sub> 受體與突觸後的 GABA<sub>B</sub> 受體，促進正腎上腺素的分泌 (Karbon et al., 1984; Suzdak and Gianutsos, 1985)。雖然有研究指出 GABA 在生物體內對於血清素在皮質前區的分泌通常為抑制作用，但藉由體外微透析技術，發現血清素的釋放與促進或抑制 GABA 表現無明顯改變 (Petty et al., 1993)，因此針對於 GABA 與血清素之關係還需確認。在面對於壓力時，多巴胺表現會被活化，進而也會刺激血清素的釋放，但過度的消耗血清素反而造成了憂鬱情緒。且完整的血清素代謝系統主要由突觸後的受體進行調控，而 GABA 於突觸前與突觸後皆具有受體，可進行雙向控管，其受體也是些三環類等抗憂鬱藥劑作用的目標 (Petty, 1995)。

而 GABA 在兩種憂鬱症動物模式-習得無助與嗅球切除實驗中，發現經由抑制老鼠海馬迴 GABA<sub>A</sub> 受體會造成老鼠表現無助感，喪失逃離電擊的能力 (Petty and Sherman, 1981)，而壓力造成的無助感會使得 GABA 在海馬迴的釋放量下降，餵食三環類抗憂鬱藥劑可使 GABA 釋放量恢復，並改善壓力所造成之無助感 (Sherman and Petty, 1982)。由表 1-4 可清楚的了解到在不同情緒疾病中 (major depression, bipolar depression, bipolar mania and bipolar euthymia)，在患者的血漿 GABA 濃度明顯下降，而服用抗憂鬱劑可以使大腦及腦脊髓液 GABA 上升，並提高 GABA<sub>B</sub> 受體於腦皮質前區與海馬迴的表現。近年研究也發現，小鼠經 FST 誘導後 24 小時內，海馬迴中 GABA 量有下降趨勢 (Briones-Aranda et al., 2005)。而服用 SSRI、SNRI 抗憂鬱藥劑有助於恢復大腦皮質前區、海馬迴與杏仁核 GABA 的含量，並改善其憂鬱症狀 (Herman et al., 2003; Sanacora et al., 2002)。因此，GABA 對於憂鬱及情感性疾病為一個很重要的影響因子，除了抗憂鬱藥劑外，提升血漿中 GABA 含量亦有可能改善憂鬱症狀 (Bjork et al., 2001; Kalueff and Nutt, 2007)。

表 1-4 GABA 在情緒疾病生理學的功能與在情緒穩定劑、抗憂鬱藥劑及電痙攣療法產生的機制

Table 1-4 GABA function in the pathophysiology of mood disorders and in the mechanisms of action of mood stabilizers, antidepressants and electroconvulsive therapy

	GABA <sub>B</sub> Frontal Cortex	GABA <sub>B</sub> Hippo- campus	GABA <sub>B</sub> Hypo- thalamus	GABA <sub>A</sub> Frontal Cortex	GABA <sub>A</sub> Hippo- campus	CSF or Brain GABA	Plasma GABA	GAD Activity	GABA-T Activity	GABA Turnover	Baclofen Induced GH
Learned Helplessness Model	↓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Olfactory Bulbectomy Model	↓	0	0	↑	↑ <sup>a</sup>	—	—	—	—	↑	—
Major Depression	—	—	—	—	—	↓0	↓0	↓	—	—	↓0
Bipolar Depression	—	—	—	—	—	0	↓	—	—	—	—
Bipolar Mania	—	—	—	—	—	0	↓	—	—	—	—
Bipolar Euthymia	—	—	—	—	—	0	↓ <sup>b</sup> 0	—	↓	—	—
Postmortem Brain Studied in Major Depression	0	0	—	↑	0	0	—	↓0	—	—	—
Lithium	—	↑	↓	—	—	↑	0	—	—	↓	—
Carbamazepine	—	↑	—	—	—	0	—	—	—	↓	—
Divalproex	↑	↑	—	↓	—	↑0	↑0↓	—	—	↓	↓
Antidepressants	↑0	↑0	—	↓0	↓0	—	0	—	—	—	0
Electroconvulsive Therapy	↑	—	—	—	—	↑ <sup>c</sup> 0 <sup>d</sup>	↓	0	—	↓	—

(Shiah and Yatham, 1998)

GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid, GAD: glutamate decarboxylase, GABA-T:  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase, GH: growth hormone. CSF: cerebrospinal fluid, ↑: increased responsiveness. k: decreased responsiveness, 0: no change. -: not tested; multiple symbols indicate mixed results.

a: GABA<sub>A</sub> receptor density transiently increased following olfactory bulbectomy, b: unipolar euthymia, c & d: GABA levels increased in hippocampus but did not alter in cortex.

## 第二章 研究動機與目的

憂鬱為現代社會普遍的情感性疾病，根據 2004 年世界衛生組織研究發現，憂鬱症已成為全世界造成失能及病痛的第四大原因，更預估在 2030 年成為世界第一的高負擔疾病。這種輕微精神性疾病在臨床上雖有藥物可以治療，但根據統計，接受治療的患者比例遠低於實際患病人數，且藥物順從度不高，主因為抗憂鬱藥物常伴隨著強烈的副作用。因此尋找副作用低並能輔助或改善憂鬱情緒的替代方案，例如具有抗憂鬱效果的食材或菌體代謝產物，為相當重要之研究方向。

在過去研究中發現，富含 GABA 之發芽米於臨床試驗，具有改善更年期障礙或初期精神憂鬱症狀及失眠的效果，且隨著 GABA 產品開始走向由真菌發酵、複合保健功效訴求的生產趨勢，利用紅麴進行生產 GABA 與其發酵產物對抗憂鬱效果評估為具潛力之研究。紅麴發酵產物中，除 GABA 外亦具有保護神經細胞 (PC-12) 免受自由基傷害、類澱粉樣蛋白所造成發炎反應之抗氧化物質，本研究利用反應曲面法期以紅麴開發低成本之 GABA 富化發酵產物，並利用強迫游泳之憂鬱動物模式評估其改善憂鬱效果，試圖探討其影響機制 (圖 2)。

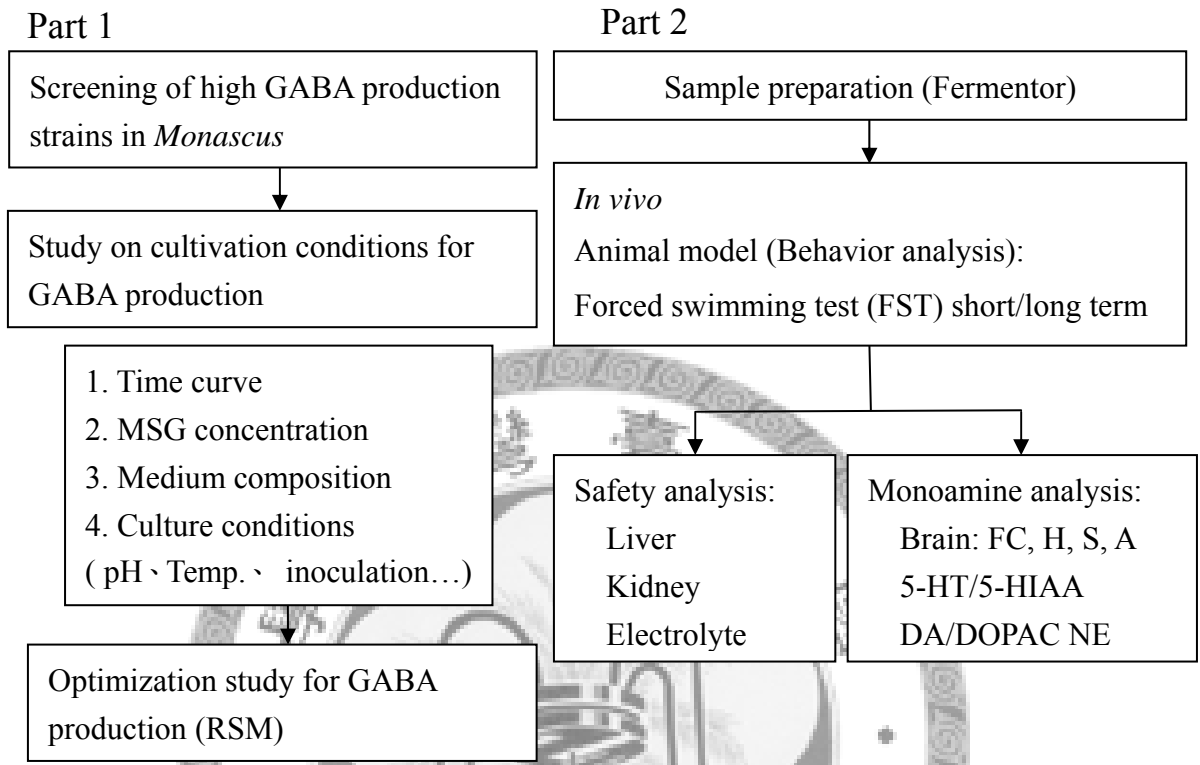


圖 2 研究大綱

Fig. 2 Outline of the experiment

## 第三章 材料與方法

### 第一節 儀器設備

#### 1. 固態培養相關設備

- a. 純水製造機 (Ultrapure water system) (Millipore Co., Molsheim, France)
- b. 恆溫振盪培養箱 (Orbital incubator shaker) (Model 717, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
- c. 黴菌操作箱 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
- d. 殺菌釜 (Autoclave) (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
- e. pH meter (Model 6071, Jenco Co., San Diego, CA, USA)
- f. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)

#### 2. 發酵槽相關設備

- a. 6.6 公升桌上型發酵槽 (FB-6S, Firstek Co., Taipei, Taiwan)
- b. 發酵槽控制系統 (Firstek Co.): 與電腦連接以傳送訊號, 進行培養條件控制及記錄。
- c. pH sensor (InPro 3030/325, Mettler Toledo Inc. Columbus, OH, USA)
- d. DO sensor (InPro 6000 series O<sub>2</sub> sensors, Mettler Toledo Inc.)
- e. 冷卻水槽 (B401L, Firstek Co.)
- f. 空氣壓縮機 (C205A, Firstek Co.)

#### 3. 萃取及分析相關設備

- a. 冷凍乾燥機 (Freeze dryer) (Bench Top3R, Virtis Co., East Greenbush, NY, USA)
- b. 超音波洗淨器 (Ultrasonic cleaner) (Model 690D, Crest Co., Fredericksburg,

NY, USA)

- c. HPLC 層析幫浦 (PU2089 plus, Jasco Co., Tokyo, Japan)
  - d. HPLC 紫外光偵測器 (UV detector) (UV2075 plus, Jasco Co.)
  - e. HPLC 螢光偵測器 (Fluorescence detector) (FL-1, Rainin Co., Wobum, MA, USA)
  - f. 電化學偵測器 (Electrochemical detector) (LC-4C, BAS, USA)
  - g. HPLC C18 層析管柱 (C18 column) : Discovery® C18 column, 25 cm x 4.6 mm i.d., 5 µm (Bellefontia, PA, USA)
  - h. 分光光度計 (Spectrophotometer) (Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
  - i. 均質機 (Model PRO 200, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA)
  - j. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
4. 其他
- a. 數位相機 (Coolpix 800, Nikon Co., Tokyo, Japan)
  - b. DV 錄影機 (JVC GR-D230, Victor Co., Tokyo, Japan)
  - c. 影像分析系統 (Ethovision XT, Noldus Information Technology, Nederland)
  - d. 組織均質機 (POLYTRON® PT 1200, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland)

## 第二節 藥品

### 1. 標準品

Citrinin

γ-aminobutyric acid

Dopamine hydrochloride (DA)

Serotonin hydrochloride (5-HT)

DL-norepinephrine hydrochloride (NE)

3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)

Homovanillic acid (HVA)

5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)

以上均購至 Sigma Co., St. Louis, MO, USA.

## 2. 一般試藥

Sodium phosphate, dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodium phosphate, monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), ortho-phthaldialdehyde (OPA), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), carboxymethyl (CMC), ascorbic acid, pyridoxal phosphate (PLP), pargyline hydrochloride, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1-octanesulfonic acid, sodium salt (SOS), magnesium sulphate ( $\text{MgSO}_4$ ), dipotassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Sodium hydroxide (NaOH), 購自 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)

Trifluoroacetic acid (TFA), hydrochloric acid (HCl) 購至 Merck Co. (Darmstadt, Germany)

Prozac<sup>®</sup>, 20 mg fluoxetine/table (Lilly Co., Taipei, Taiwan)

## 3. 萃取分析溶劑

Acetonitrile, methanol, ethanol 購至 Merck Co. (Darmstadt, Germany)

## 4. 培養基

Potato dextrose broth (PDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Bacto agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Monosodium glutamate (食用味精) (味王股份有限公司, 台北, 台灣)

米糠 (農泉碾米工廠, 宜蘭, 台灣)

麩皮 (發昌企業有限公司福昌場, 宜蘭, 台灣)

脫脂大豆粉 (大統益股份有限公司, 台南, 台灣)

高粱酒糟 (金門酒廠實業股份有限公司, 金門, 台灣)

### 第三節 紅麴菌菌株來源、培養方法

#### 1. 試驗菌株

本研究使用之菌株包含 *Monascus purpureus* NTU 568、*Monascus* sp. S2 為本研究室保存菌株。*M. purpureus* BCRC 31615、*M. purpureus* BCRC 31499、*M. purpureus* BCRC 31530、*M. purpureus* BCRC 31540 與 *Monascus* sp. BCRC 32808 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

#### 2. 紅麴菌之種菌培養方法

菌株之培養基為 potato dextrose agar (PDA)。將紅麴菌株分別培養於 PDA 培養基 5 天後，挖取菌塊接種至種菌培養基，種菌搖瓶培養基為 100 mL potato dextrose broth (PDB)，於 30°C、130 rpm 振盪培養約 72 小時後備用。

### 第四節 紅麴菌液態發酵方法與條件

於已滅菌之培養基中加入 5% 的種菌培養液與無菌之 pyridoxal phosphate (PLP)，使 PLP 濃度為 0.01 mM，於 30°C、130 rpm 振盪培養，根據不同時間點進行取樣。探討不同基質對 GABA 產生之影響實驗中，以基礎培養基為標準，米糠、麥麩、酒糟與脫脂大豆取代米的添加比例進行實驗。

#### 基礎培養基

Components	Concentration % (w/w)
Rice	5
MSG	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.1

## 第五節 紅麴菌固態發酵方法與條件

以傳統麴盤進行培養，製作較小型之麴盤，長、寬、高各約 30 × 20 × 5 cm；培養時底層放置麴布（麻紗織布）包裹麴盤，之上再放置一層包裹固態基質，此有利於翻麴，同時可以保持濕度；上層再蓋上兩層麴布以隔絕外界之污染，同時並可保持發酵過程紅麴米的濕度。整個培養過程於半開放式空間進行。

將 400 g 在來米，以水洗淨後浸泡 30 分鐘，用麴布濾水，置於水鍋上，於高壓殺菌釜內蒸煮 20 分鐘，取出冷卻至 30°C，完成蒸煮之程序。取紅麴種菌液 40 mL，接種入蒸過之米中，並充分攪拌均勻後，蓋上麴布置於培養箱培養。培養期間經翻拌及補水，第 3、4 天添加兩次 80 mL 無菌水，第 5 天添加兩次 40 mL 無菌水，第 6 至 8 天添加一次 40 mL 無菌水，之後不加水待後熟完成培養，培養條件為 30°C，10 天。將培養所得之紅麴發酵產物於 50 °C 烘乾 48 小時，保存各乾燥樣品進行後續分析。

### 第一天：接種

接種後用麴布包妥，置於 30°C 恆溫箱中，將固態基質集中於麴盤之中央。

### 第二天：翻拌

菌絲急速繁殖，為防止品溫過度升高，適時給予翻拌，且視繁殖情況，將蒸飯厚度逐漸改薄，以控制保持紅麴菌之最適繁殖條件。

### 第三天：頭水

因紅麴菌急速繁殖，固態基質中之水分除一部份因溫度上升被蒸發外，大部分被繁殖所消耗，因此基質變乾燥。為了使紅麴菌順利繁殖，需施行補水，給予適當水分生長。此項操作因第一次補水故稱為頭水。將麴盤內之半製品攤開，噴灑無菌水，每 12 小時補水 80 mL。補水後再放回 30°C 恆溫箱培養。

### 第四天：次水

此時半製品顏色轉紅，為繁殖最旺盛時期，水分被紅麴菌繁殖及蒸發所消耗，故需實行第二次補水，此項操作稱為次水。將包裹半製品之麴布攤開，噴灑無菌

水，每 12 小時補水 80 mL。

第五天：完水

為調節半製品水分，促進繁殖與菌絲之滲透，需施行第三次灑水，水量為 40 mL 每隔 12 小時加一次，此項操作稱為完水。

第六至九天：後熟

完水後漸進入後熟階段。此時需給予適當翻拌，每 24 小時翻拌一次。

第十天：收麴

將完成發酵後的紅麴發酵物於烘箱內乾燥 (55, 48 hrs)，之後以均質機磨成粉末，經萃取後進行分析。

## 第六節 發酵槽控制條件與樣品製備

發酵槽操作體積為 3 L，設定培養溫度 30°C，轉速 150 rpm，通氣量 2 v.v.m.，pH、培養基比例則同反應曲面法所得結果進行模擬量化。經滅菌後之培養基接入 5% 之菌液，於發酵期間同時進行溶氧量的監控，並每隔 24 小時進行取樣以備分析。

收集之發酵液以孔徑 1 mm<sup>2</sup> 之濾網進行過濾，取濾液進行冷凍乾燥，測得所得粉末中 GABA 含量後，保存於乾燥箱中待動物實驗使用。

## 第七節 紅麴中代謝產物之分析方法

### 1. 紅麴中 GABA 之萃取方法

稱取 0.3 g 紅麴發酵產物的粉末，加入 10 mL 去離子水於 25°C 下超音波萃取 15 分鐘，萃取後經離心 (1000 x g, 4°C, 10 min)，取上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，以備 HPLC 分析。

### 2. OPA 衍生化之 HPLC 分析條件

OPA 衍生試劑為胺基酸分析常用之方法，GABA 可經由 OPA 反應後於螢光

偵測器測得一吸收峰，將 Herbert 等人之衍生化反應步驟 (Herbert et al., 2000) 稍修改，設定自動進樣器 (autosampler) 並參照 OPA 試劑使用說明，將待分析樣品 50  $\mu$ L 加上 OPA 衍生試劑 50  $\mu$ L 進行混合反應，以反應模式 pre-column 1、混合速率 100  $\mu$ L/sec 混合 5 次，總反應時間 1.5 分鐘，樣品注射量 20  $\mu$ L 進行分析。

HPLC 條件：

a. Column: Discovery<sup>®</sup> C18 (25 cm x 4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

b. Mobile phase:

A solvent: 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (sodium phosphate dibasic 10.9 g and sodium phosphate monobasic 3.2 g in 1L, pH 7.4)

B solvent: 0.1 M 磷酸緩衝溶液/乙腈 (acetonitrile) (60/40)

c. Flow rate: 1 mL/min

d. Fluorescence detector: ex: 364 nm, em: 490 nm

Program condition:

0 ~ 5 min: A/B (68/32)

5 ~ 9 min: A/B (84/16)

11 ~ 13 min: A/B (45/55)

13 ~ 30 min: A/B (60/40) to A/B (68/32)

3. 紅麴中 Citrinin 濃度之分析方法 (Lee et al., 2006)

HPLC 條件：

a. Column: Discovery<sup>®</sup> C18 (25 cm x 4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

b. Mobile phase: acetonitrile/water/TFA = 55: 45: 0.05

c. Flow rate: 1 mL/min

d. Detector: UV detector,  $\lambda$  max: 238 nm

## 第八節 以反應曲面法探討 GABA 最適培養條件之設計

以 *M. purpureus* BCRC 31499 為實驗菌株，以反應曲面法設計培養基米糠之添加量、味精濃度、起始 pH 值之實驗組合，根據 Box 及 Behnken 等之三變數、三階層因子設計 (表 2-1)；在中心混成設計中心點的決定，採前實驗中米糠與米比例 1:1 定為中心點，而味精濃度則參考先前單因子試驗，並以 100 mM 為中心點，另一中心點為培養基起始 pH 5.0，培養時間參考 GABA 生成曲線定於發酵 7 天，以搖瓶於 30°C、130 rpm 進行培養。反應曲面實驗設計採用三變數-三階層之中心旋轉組合設計，共經 15 個組合實驗，如表 2-1 所示，試驗後進行分析各組合 GABA 含量，所得結果再以 SAS (Statistic Analysis System) 電腦套裝軟體中 RSREG (Response Surface Regression) 程式進行反應曲面分析 (Giovanni, 1983)，以米糠添加比例 (X1)、味精濃度 (X2) 與培養基起始 pH 值 (X3) 作為條件變數因子，以 GABA (Y) 生成量作為反應曲面性狀，求出如下之三變數二次多項式：

$$Y=A_0+A_1X_1+A_2X_2+A_3X_3+A_{12}X_1X_2+A_{13}X_1X_3+A_{23}X_2X_3+A_{11}X_1^2+A_{22}X_2^2+A_{33}X_3^2$$

(a 表示各項之係數) 進行變異數分析 (ANOVA) 以得到總迴歸係數 ( $R^2$ )、欠和度 (lack of fit) 顯著性、複迴歸方程式之各項係數及各因子對反應觀測值得顯著程度，再將求得之迴歸方程式利用 STATISTICA 與 Sigma Plot 10.0 統計與繪圖軟體繪出反應曲面圖與等高線，探討最適培養條件。

表 2-1 固態發酵之三因子-三階層之中心旋轉組合設計

Table 2-1 Three variables-three levels of rotatability central composite design arrangement

Run	Independent variables (coded-level)					
	RB (%)		MSG (mM)		Initial pH value	
1	5	(1)	180	(1)	5	(0)
2	5	(1)	20	(-1)	5	(0)
3	1	(-1)	180	(1)	5	(0)
4	1	(-1)	20	(-1)	5	(0)
5	5	(1)	100	(0)	8	(1)
6	5	(1)	100	(0)	2	(-1)
7	1	(-1)	100	(0)	8	(1)
8	1	(-1)	100	(0)	2	(-1)
9	3	(0)	180	(1)	8	(1)
10	3	(0)	180	(1)	2	(-1)
11	3	(0)	20	(-1)	8	(1)
12	3	(0)	20	(-1)	2	(-1)
13	3	(0)	100	(0)	5	(0)
14	3	(0)	100	(0)	5	(0)
15	3	(0)	100	(0)	5	(0)

RB: rice bran, MSG: monosodium glutamate.

## 第九節 紅麴發酵產物抗憂鬱功效性評估試驗 (強迫游泳)

### 1. 動物模式建立

#### (1) 實驗動物之飼養

本試驗動物使用四週齡雄性 SD 大白鼠 (Sprague-Dawley rats)，購自樂斯科生物科技公司 (Taipei, Taiwan)，飼養時控制環境相對溼度 60%，溫度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間為 9:00 ~ 21:00 之 12 小時光照循環，並保持安靜，每週定時測定體重與記錄老鼠攝食量。每三天換墊料一次；飼料及飲用水 (逆滲透水) 需保持充足，餵食係採用管餵法供給大鼠固定量的樣品，每次管餵量為 1 mL。動物試驗於台大醫院實驗動物中心與動物行為測試核心實驗室進行，試驗動物計畫審核同意書附於後。

試驗動物分配成正常組 (normal control, NC) (指未經任何游泳試驗之正常大鼠)、憂鬱控制組 (control, C)、抗憂鬱正對照組 (fluoxetine, F)、未發酵基質組 (non-fermented substrate, NF)、GABA 組、0.5 倍 GABA 劑量紅麴發酵液組 (0.5 times of GABA dosage of *Monascus* submerged fermented product, 0.5 MSF)、1 倍 GABA 劑量紅麴發酵液組 (1 time of GABA dosage of *Monascus* submerged fermented product, MSF)，共 7 組，每組 12 隻，共 84 隻。

試驗操作分兩部分：短期試驗中，在強迫游泳試驗預試驗 (pretest) 後半小時餵食樣品，主要目的為觀察餵食之樣品是否有改善外界突如其來壓力所造成之情緒。而長期試驗中，老鼠每天管餵 1 次，持續四週，為模擬長期食用樣品後是否可預防外界壓力所造成之影響與改善憂鬱之情緒 (圖 3)。

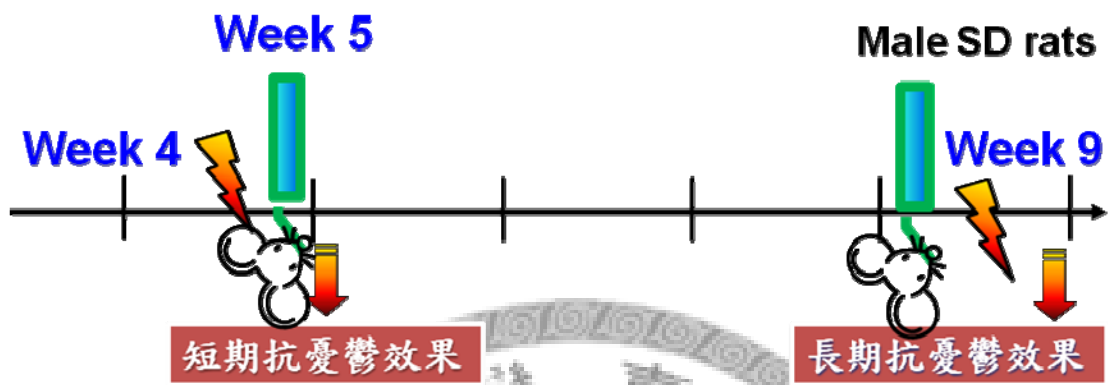


圖 3 動物實驗流程

Fig. 3 The flow chart of animal experimentation



## (2) 試驗物質

本研究受試物-紅麴發酵產物在進行最適生產後，將發酵液以 1 mm<sup>2</sup> 濾網過濾，隨即進行冷凍乾燥，保存於乾燥皿內。參考岡田忠司等人 (2000) 的功效攝取量，以凍乾粉末中 GABA 含量，每人 (體重 60 kg) 每天 26 mg 為一倍劑量，並同時餵食等劑量之純 GABA 與未發酵基質凍乾產物進行比較，以探討紅麴發酵產物是否在強迫游泳的憂鬱症動物模式中有改善憂鬱情緒之能力。表 2-2 為詳細動物分組與管餵劑量，GABA 餵食劑量之計算以 FDA 所提供之體表面積換算公式計算，大鼠之餵食劑量為 2.7 mg/kg body weight (26 mg x 6.2 (體表面積換算倍率) / 60 kg)。正對照組 Fluoxetine (Prozac<sup>®</sup>，百憂解) 為抗憂鬱藥物，管餵劑量 20 mg/kg body weight (Chen et al., 2008 b; Jang et al., 2009; Lopez-Rubalcava and Lucki, 2000)。

## (3) 飼料配方配製與投予途徑：

老鼠於四週實驗期間食用一般正常飼料 (Laboratory Rodent Diet 5001)，紅麴及其他餵食樣品均溶於含 0.5% CMC 的 RO 水中，每日依老鼠體重配製相對劑量，以 5 mL 無菌塑膠針筒套上不鏽鋼餵食管餵食，每次餵食量為 1 mL。不鏽鋼餵食管平時保存在 95% 酒精中，使用前再以無菌蒸餾水潤溼。各組老鼠每週經口投予七天，共投予四週，試驗期間老鼠採自由進食，並供應充足的飼料及飲水。

表 2-2 動物分組與劑量設計

Table 2-2 Animal grouping and dosage design

Group	Sample	Dosage
Normal control Control	0.5% CMC H <sub>2</sub> O (RO)	1 mL/rat/day
Fluoxetine	Prozac <sup>®</sup>	20 mg/kg bw
GABA	γ-aminobutyric acid	2.6 mg/kg bw
NF	freeze-drying powder of non-fermented substrate	GABA 0.2 mg/kg bw <sup>a</sup>
MSF-0.5X	freeze-drying powder of <i>Monascus</i> submerged	GABA 1.3 mg/kg bw
MSF-1X	fermented product	GABA 2.6 mg/kg bw

CMC: carboxymethylcellulose, bw: body weight, RO: reverse osmosis, NF: non-fermented substrate, MSF: *Monascus* submerged fermented.

<sup>a</sup> The original GABA in non-fermented substrate.

## 2. 安全性指標之評估

### (1) 體重、攝食量

每週測量老鼠體重、攝食量兩次，實驗期間比較各組動物體重與攝食量變化。

### (2) 血液生化值分析

血液中丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、腎指數肌酸酐 (creatinine) 及尿素氮 (blood urea nitrogen) 與電解質鈉、鉀、氯、鈣及鎂使用生化自動分析儀 (Beckman-700, Fullerton, Mississauga, CA, USA) 進行分析。

## 3. 憂鬱評估指標

參考 Porsolt 等學者於 1977 年提出的方法，將大鼠放入直徑 20 公分，水深 30 公分高之透明玻璃圓桶裡，水溫控制於 23-25°C，觀察老鼠在水中掙扎試圖逃脫之行為。除正常組 (normal control, NC) 之大鼠外，其餘組別老鼠均進行 15 分鐘的前試驗 (pretest) 主要施予老鼠壓力，誘導產生憂鬱之情緒。結束後以毛巾擦拭，並以吹風機稍微吹乾後放回原籠內；經 24 小時後進行正式實驗。正式實驗同前試驗之操作，目的為藉由前試驗所造成之壓力而影響接下來之行為表徵，因此游泳時間縮短為 6 分鐘，並將過程錄影記錄。

行為分析以正式試驗時間之後 4 分鐘進行判別，主動行為分為游泳 (swimming, S)、攀爬 (climb, C) 及激烈掙扎 (struggle, G)，為老鼠活動行為；被動行為分為完全不活動 (immobility, I)、四肢輕微擺動以維持鼻孔在水面上 (wiggle, W)，判定為老鼠不活動。除人為判定外，更使用影像分析軟體進行比對，降低人為判定之誤差。實驗中，老鼠靜止不動的時間類似人類絕望的情緒表現，時間愈長表示老鼠憂鬱程度愈明顯。

## 第十節 大鼠腦組織單胺濃度及其代謝產物分析

### 1. 腦組織的擷取

SD 大鼠在進行強迫游泳實驗後隨即犧牲，依 Glowinski (Glowinsk and Iversen, 1966) 之腦部組織劃分，於冰上操作取下大腦皮質前區 (frontal cortex)、紋狀體 (striatum)、海馬迴 (hippocampus) 及杏仁核 (amygdale)，隨即以液態氮冷凍後保存於  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

### 2. 單胺物質之萃取

參考 Cheng 等學者之操作方法 (Cheng et al., 1993)，稍做調整，以  $10^{-7}$  M ascorbic acid、15 mg/L parglyine、50 ng/mL isoproterenol 之 0.1 N HCl 溶液為萃取液，加入秤重後之腦組織於冰上進行均質，接著在  $4^{\circ}\text{C}$  進行離心 20 分鐘 (10000 x g)，取上清液以  $0.45\ \mu\text{m}$  膜過濾後，凍存於  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

### 3. 單胺物質之分析

使用高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 串接電化學偵測器 (electrochemical detector, ECD) 分析腦部 serotonin (5-HT)、norepinephrine (NE)、dopamine (DA)、5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 及 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 的濃度改變。

HPLC 條件：

#### a. Column：

Discovery<sup>®</sup> C18 (25 cm x 4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

#### b. 電化學偵測器：

偵測靈敏度 5 nA，filter 0.1 Hz，AppE cell 0.75 V，KCl 參考電極

#### c. Mobile phase：

0.1 M 磷酸緩衝溶液 (每升含 20.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、185 mg EDTA、130 mg SOS 及 200 mL methanol，以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  調整 pH 值至 3.0)

d. 流速：0.6 mL/min；樣品注射量：20  $\mu\text{L}$



## 第四章 結果與討論

### 第一節 GABA 生產菌株之挑選

參考 Su 等學者於 2003 的研究中，從 16 株紅麴菌中挑選出 GABA 生產量較高的菌株，分別為 *M. purpureus* BCRC 31615、*M. purpureus* BCRC 31499、*M. purpureus* BCRC 31530、*M. purpureus* BCRC 31540 與 *Monascus* sp. BCRC 32808、*Monascus* sp. S2 並加入本實驗室新培育出的菌株 *Monascus purpureus* NTU 568 進行研究。將此 7 株菌接種於添加 1% MSG 之 PDB 培養基，探討各菌株利用 MSG 生成 GABA 的能力。圖 4-1 於培養第三天時，GABA 的產量就明顯分成兩個群組，*M. purpureus* BCRC 31530、*M. sp.* BCRC 32808 與 *M. sp.* S2 幾乎無 GABA 生成，直至第 7 天後 GABA 才開始緩慢的累積，於第 15 天以 *M. sp.* BCRC 32808 所表現的 GABA 量最低。其他四株紅麴菌，除 *M. purpureus* NTU 568 於 3 ~ 11 天時 GABA 生成量稍呈持平外，*M. purpureus* BCRC 31615、*M. purpureus* BCRC 31499、*M. purpureus* BCRC 31540 於第 3 ~ 13 天之間 GABA 快速生成，有相同上升之趨勢。

培養所得菌絲乾重，*M. sp.* BCRC 32808 較低，而培養液最終 pH 值 *M. sp.* BCRC 32808、*M. purpureus* BCRC 31530 及 *M. sp.* S2 為 6.3 ~ 6.9，相較其他菌株 7.6 ~ 8.0 來的低。在一般情況下，紅麴液態培養時，培養基 pH 值會先降後升，藉此推估菌體生長情形，而從 pH、菌絲體重及 GABA 生成量相互對照，推測 *M. sp.* BCRC 32808、*M. purpureus* BCRC 31530 及 *M. sp.* S2 可能因生長速度較其他菌株緩慢而使 GABA 表現量相對較低；造成生長速度緩慢的原因除原本菌株生長特性外，培養基的組成也可能有影響，包括 MSG 的濃度是否對菌體生長造成抑制。GABA 亦是菌體可利用營養源之一，在 *M. purpureus* NTU 568 於生長後期 GABA 有降低現象，推測為培養基碳氮源大部分已被消耗，轉而利用 GABA 進行代謝。

藉由各菌株所生成的 GABA 濃度進行統計分析後，得到 *M. purpureus* BCRC 31499、*M. purpureus* BCRC 31540 和 *M. purpureus* BCRC 31615 同為可利用 MSG 轉換之高 GABA 生產菌株，與其他組別達顯著差異 ( $p < 0.05$ )。於 Su 等 (2003) 和許 (2005) 研究中，*M. purpureus* BCRC 31540 和 *M. purpureus* BCRC 31615 不管於液態或固態發酵均生成較高的 GABA，與此實驗結果相似。但此研究中 *M. purpureus* BCRC 31499 也具高 GABA 生成之潛力，與許 (2005) 結果相反，可能為許所選用培養基碳源為麥芽萃出物 (malt extract) 之 malt extract broth，而本試驗中則為 potato dextrose broth，另外還添加了 MSG 作為轉換 GABA 前驅物所致。

而在許研究中，發現培養 14 天後，其 citrinin 之含量以 *M. purpureus* BCRC 31540 為最高，達 99.7 mg/L，*M. purpureus* BCRC 31615 次之，為 22.6 mg/L，*M. purpureus* BCRC 31499 則小於 3 mg/L；citrinin 含量趨勢同本實驗結果 *M. purpureus* BCRC 31540 2.7 mg/L，*M. purpureus* BCRC 31615 1.8 mg/L，*M. purpureus* BCRC 31499 0.7 mg/L。Citrinin 含量較許 (2005) 少可能為 MSG 所造成的影響，Wang (2003 a) 發現添加 MSG 為氮源同時會降低 monacolin K 與 citrinin 生成。綜合以上結果，選擇低 citrinin 高 GABA 之菌株 *M. purpureus* BCRC 31499 為後續實驗之 GABA 生產菌。

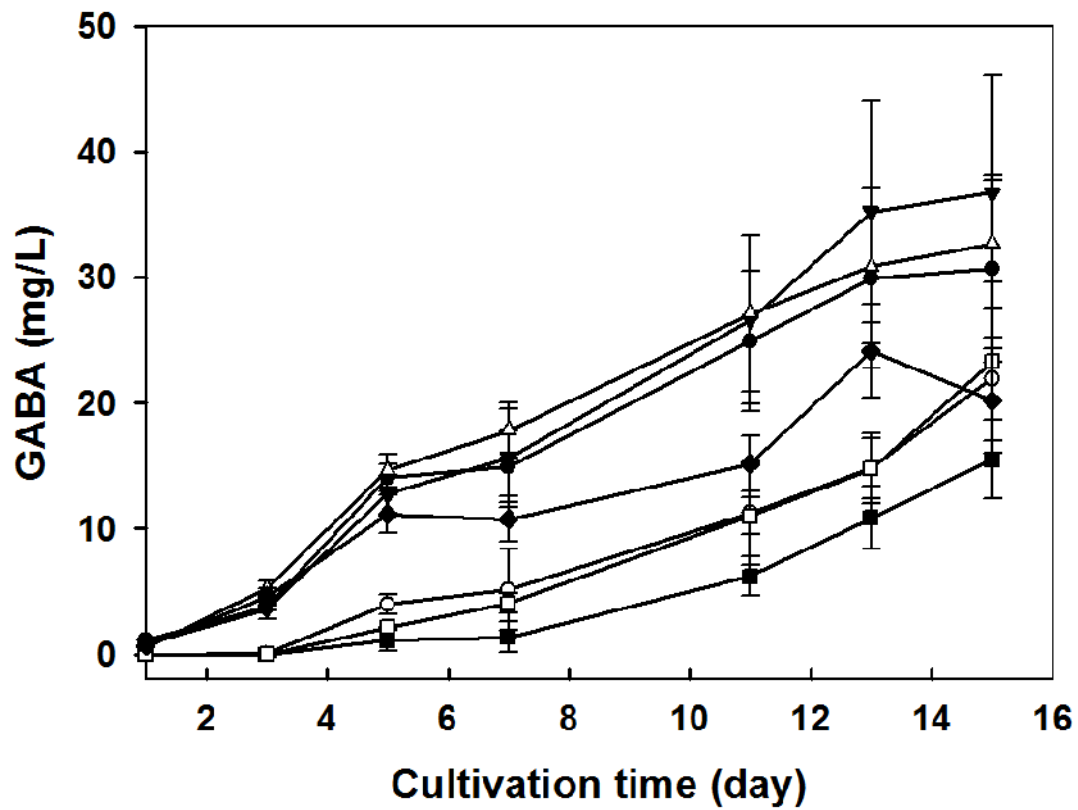


圖 4-1 不同紅麴菌株之  $\gamma$ -氨基丁酸生成曲線

Fig. 4-1 The  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production curve of different strain of *Monascus* by submerged cultures. The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 5)

●: *M. purpureus* BCRC 31499, ○: *M. purpureus* BCRC 31530, ▼: *M. purpureus* BCRC 31540, △: *M. purpureus* BCRC 31615, ■: *M. sp.* BCRC 32808, □: *M. sp.* S2, ◆: *M. purpureus* NTU 568

## 第二節 培養條件對 GABA 生成之影響

### 1. MSG 培養濃度

確定使用菌株為 *M. purpureus* BCRC 31499 後，為了避免 MSG 濃度影響菌體生長，因此決定後續實驗中 MSG 的添加量為當前重要之課題。於組成較簡單之 PDB 培養基進行不同 MSG 濃度之測試，採 MSG 添加量為 0.5%、1.0%、1.5% 進行試驗，相對濃度分別為 30 mM、60 mM 與 90 mM。

圖 4-2-1 顯示培養初期，培養基 MSG 濃度 60 mM 與 90 mM 組別 GABA 濃度為 30 mM 組之兩倍，更遠高於未添加 MSG 組，證實較高濃度的 MSG 能促進早期 GABA 的產生；但於第 4 天後，培養基 MSG 濃度 90 mM 組別的 GABA 累積速度開始減緩，於第 6 天後持平，而 60 mM 組別則持續上升，於第 7 天時與 MSG 濃度 90 mM 組達到顯著差異 ( $p < 0.05$ )。培養基最終 pH 值隨著 MSG 濃度遞增而增加，分別為 8.01、8.21 與 8.44，菌絲乾重則無顯著影響；推測 MSG 雖能在早期促進 GABA 的生成，但過高濃度的 MSG 可能加速 *M. purpureus* BCRC 31499 對胺類物質的代謝，進而影響培養基 pH 值，較高 pH 值的環境會抑制 GAD 酵素的活性，且促進 GABAT (GABA transaminase) 將 GABA 代謝為琥珀酸，與 Kono 和 Himeno 學者論點相同 (Kono and Himeno, 2000)。結果顯示 MSG 添加量以 1% 為當前 GABA 生產最適條件，並以此添加量為後續培養基成分基準。

### 2. 培養基質-米種類 (碳源) 之影響

紅麴菌為較喜好澱粉等複雜基質之菌種，於 PDB 培養基生長情形並不是最佳狀態，因此改以米為碳源，期以增加菌體繁殖，藉此提高 GABA 產量。使用市面上常見不同種類的米進行實驗，意外發現菌體對澱粉的喜好度也有所差異。圖 4-2-2 在來米 (*Oryza sativa* ssp. *hsien*) 於發酵 3~11 天時，GABA 產量較蓬萊米 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 與蓬萊糙米高，但隨後即開始下降，而蓬萊米 GABA

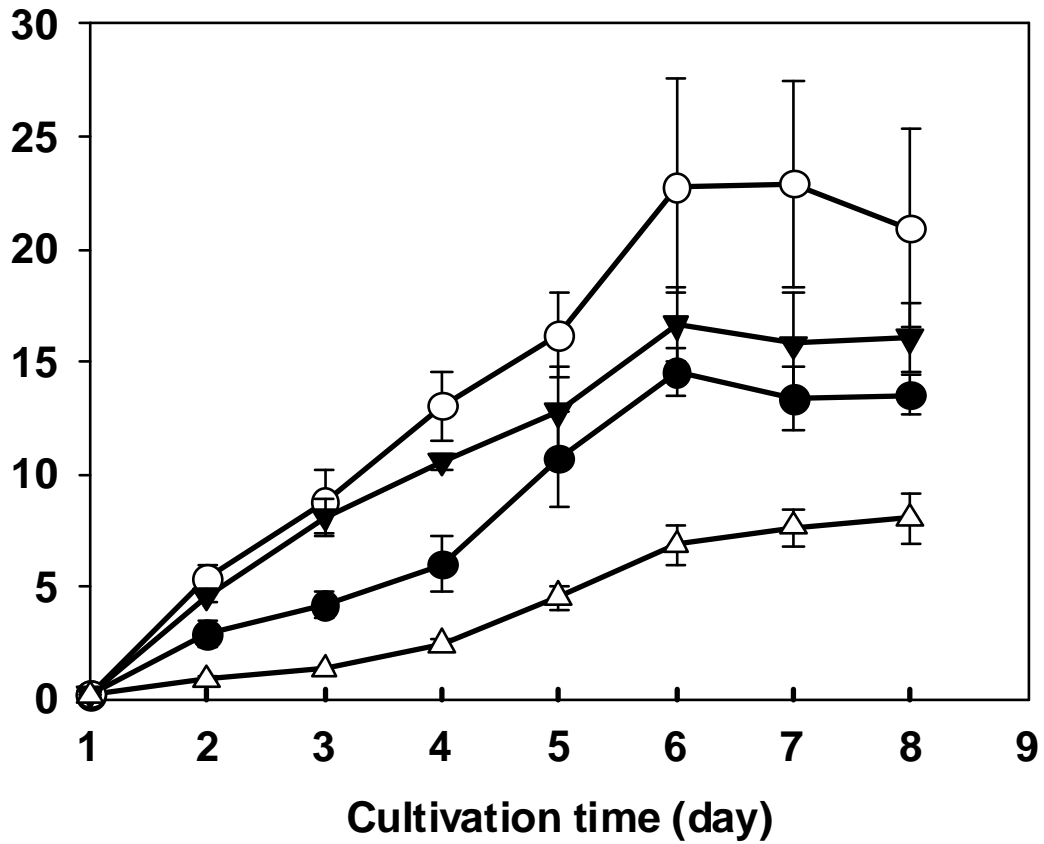


圖 4-2-1 味精濃度對 *M. purpureus* BCRC 31499  $\gamma$ -胺基丁酸生成之影響

Fig. 4-2-1 Effect of the concentration of monosodium glutamate on GABA production by *M. purpureus* BCRC 31499. The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 5)

Concentration of monosodium glutamate:  $\triangle$ : 0 mM;  $\bullet$ : 30 mM;  $\circ$ : 60 mM;  $\blacktriangledown$ : 90 mM

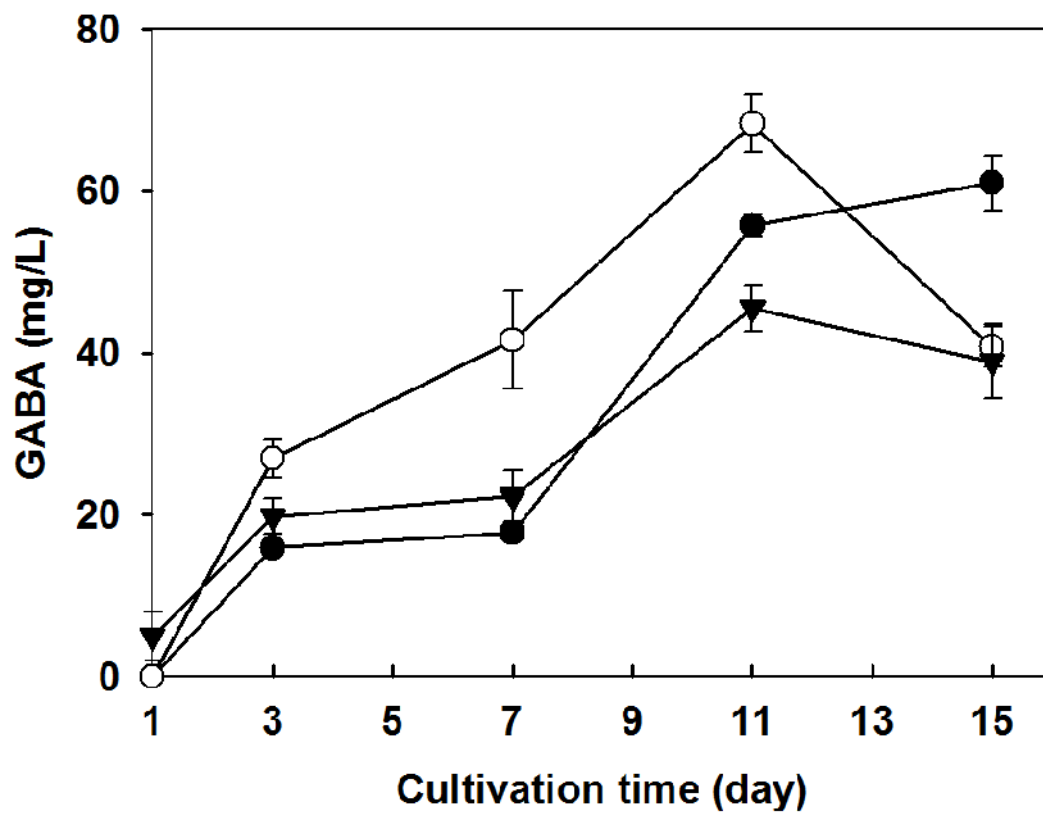


圖 4-2-2 米的種類對 *M. purpureus* BCRC 31499 生成  $\gamma$ -氨基丁酸之影響

Fig. 4-2-2 Effect of the types of rice (carbon source) on GABA production by *M. purpureus* BCRC 31499. The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 5)

●: *Oryza sativa* ssp. *japonica*, ○: *Oryza sativa* ssp. *hsiensis*, ▼: Brown rice

含量則緩慢上升。結果顯示 *M. purpureus* BCRC 31499 對於在來米基質有較好的利用率，且能使 GABA 於培養初期就開始生成，於第 11 天時達到最高量 68 mg/L，為 PDB 培養基同時期 GABA 產量的 3 倍。在來米為紅麴固態發酵常用基質，因為其黏性低、吸水效果好，提供了固態發酵時菌體生長的良好環境；但於本研究液態發酵結果發現，*M. purpureus* BCRC 31499 同樣於在來米培養基生長較佳，排除基質黏性及吸水效果，可能因在來米直鏈澱粉組成較蓬萊米高，*M. purpureus* BCRC 31499 對於直鏈澱粉的分解利用率較佳，使得生長較快，GABA 生成時間也跟著提前；能在越短期間獲得越高的目標物質產量往往也是生產者考量因素之一，而對 *M. purpureus* BCRC 31499 而言，在來米較蓬萊米與蓬萊糙米為更佳之培養基質。

### 3. 農業副產物對液態培養生產 GABA 之影響

為降低生產成本，除縮短生產時間外，培養基質的選擇也是重要考量因素之一，本實驗選用台灣農業較大宗的副產物，米糠、麥麩、脫脂大豆、酒糟進行研究，目前這些基質主要使用於畜牧業的飼料添加。由圖 4-2-3 可發現 *M. purpureus* BCRC 31499 對各農業副產物的 GABA 生成量皆遠低於在來米培養基，可能因為農業副產物碳源成分含量低，單獨使用較不利於 *M. purpureus* BCRC 31499 生長，培養 7 天後 GABA 濃度均低於 10 mg/L。因此試以基質中再加入在來米，改善碳源不足對於菌生長所造成之影響。圖 4-2-4 為農業副產物與在來米以等比例混合之結果，發現添加在來米後，各組 GABA 產量皆大幅增加，以米糠為最高達 178 mg/L、脫脂大豆次之 127 mg/L，但隨後皆有下降趨勢。各培養基質 GABA 產量達到最高時間點也不同，米糠於第 7 天、大豆第 9 天、在來米第 11 天、酒糟則約於 13 天，但麥麩於 7 天後 GABA 濃度持平於 60 mg/L。

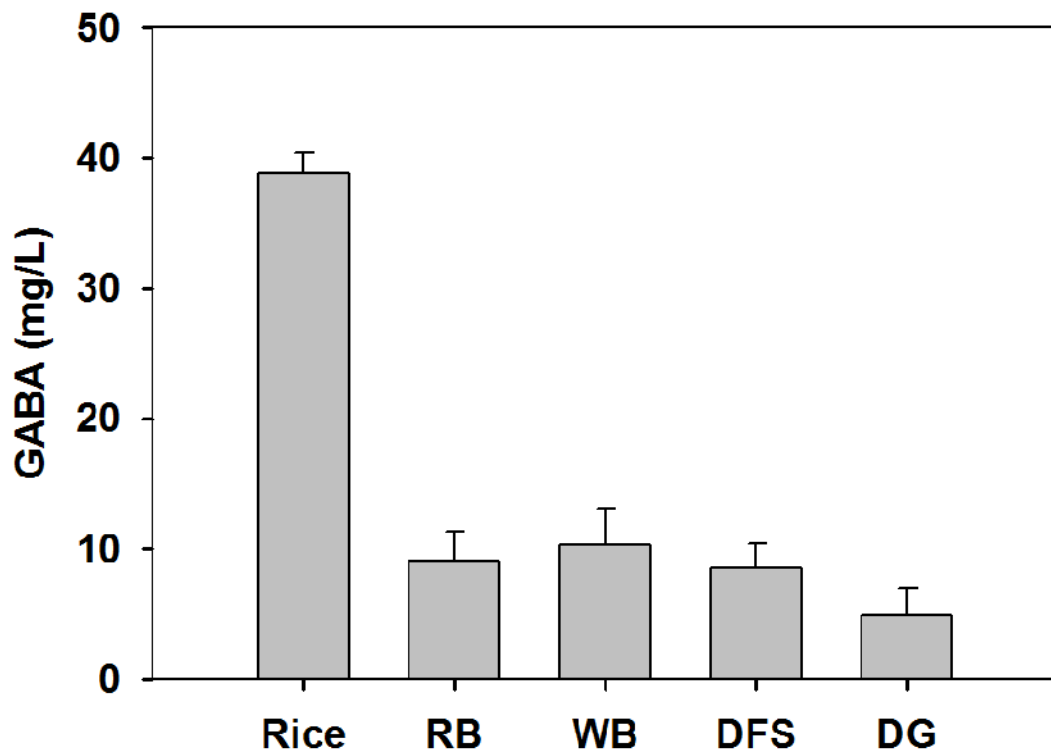


圖 4-2-3 培養基質於液態發酵對  $\gamma$ -胺基丁酸生成之影響

Fig. 4-2-3 Effect of the substrates on GABA production by submerged fermentation.

The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 5)

RB: rice bran, WB: wheat bran, DFS: defatted soybean, DG: distillers' grains

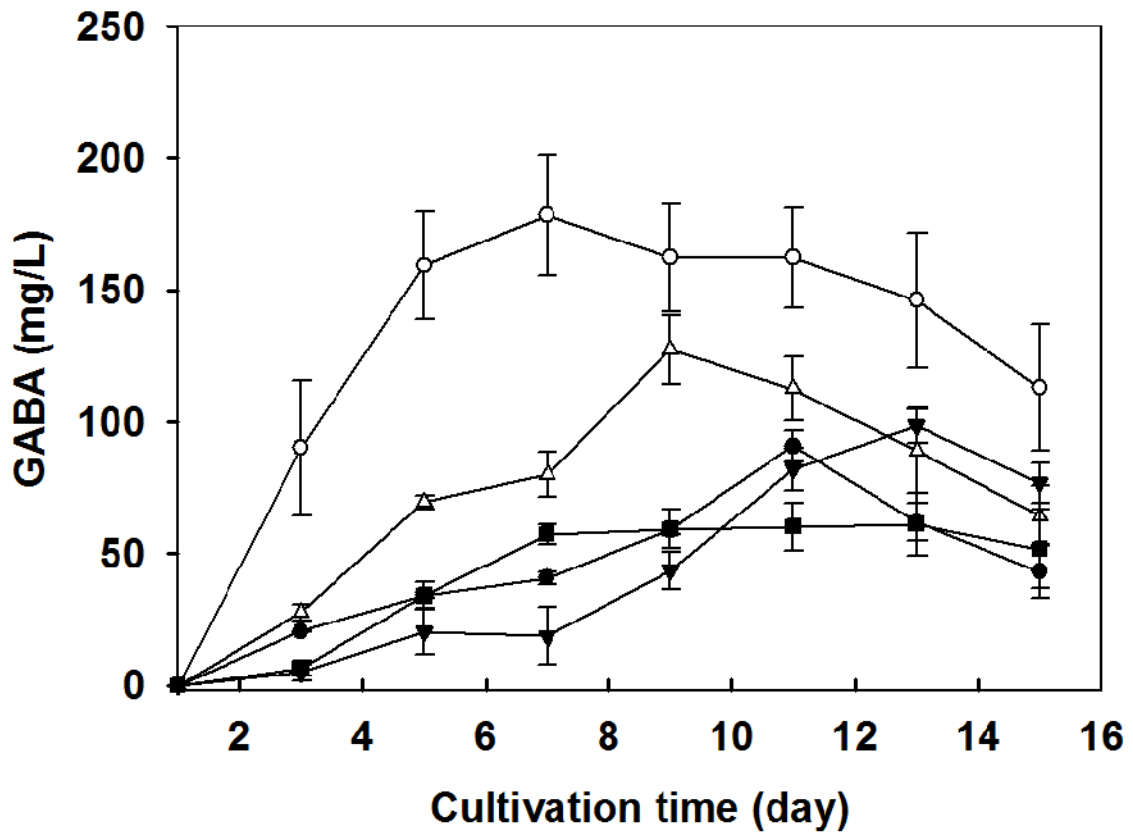


圖 4-2-4 與米等比例混合之農業副產品對生產  $\gamma$ -胺基丁酸之影響

Fig. 4-2-4. Effect of the isometric rice-mixed agricultural by-product on GABA produced. The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 3)

●: rice, ○: rice with rice bran, ▼: rice with distillers' grains, △: rice with defatted soybean, ■: rice with wheat bran

加入在來米共同培養之結果，證實可提升 *M. purpureus* BCRC 31499 對農業副產品的利用率，可能 *M. purpureus* BCRC 31499 一方面利用澱粉進行菌體的合成，另一方面增加的菌體更有助於基質的分解利用，大幅提升了 GABA 的產量。綜合 GABA 的產量與 GABA 最高濃度時間點，以米與米糠等比例混合，於第 7 天得 178 mg/L GABA 為最佳培養條件，GABA 產量為以在來米為培養原料高出 4.5 倍。如再加上原本米糠中含有的 GABA，發酵液中 GABA 含量約可達 230 mg/L。

#### 4. 農業副產品對固態培養生產 GABA 之影響

固態培養具節水節能等優點，且單位體積產量通常較液態培養為高，亦為一般紅麴傳統的培养方式，產物乾燥後即可食用，亦可經磨粉製成膠囊或錠劑狀等保健產品；同前實驗，於在來米基質中添入米糠、麥麩、脫脂大豆、酒糟進行培養，並與液態發酵結果進行比較，找出較合適且生產成本較低的 GABA 生產方法。米糠與麥麩為穀物精製過程中，經由螺旋擠壓機壓磨穀物外糠層所得的副產物，其型態為粉末狀 (圖 4-2-5 e)；而大豆為增加油脂萃取率，通常也將其磨碎壓餅，因此所得原料為脫脂大豆粉。粉狀物質對於固態培養操作較不方便，圖 4-2-5 為米與添加米糠 10%、20%、30% 發酵基質於發酵第 7 天時的情形，由於米糠為粉末狀，且易於吸水，隨著米糠添加比例的增加，使培養基質變得黏稠，影響了固態基質間的通氣性，進而影響了紅麴的生長。另外且發現隨著米糠、麥麩、脫脂大豆、酒糟的添加，色素的生成似乎減少，而以偏白色菌絲為多。

為了避免基質過於黏稠影響發酵，將米糠、麥麩、脫脂大豆、酒糟添加量維持於 10% 進行後續實驗。圖 4-2-6 為各基質於發酵 10 天後的 GABA 含量，可能為添加量較少的關係，各添加組 GABA 並無明顯高於純在來米組別，米糠及麥麩組 GABA 有較低之趨勢，而添加脫脂大豆之 GABA 產量略有增加，約 320 mg/kg。

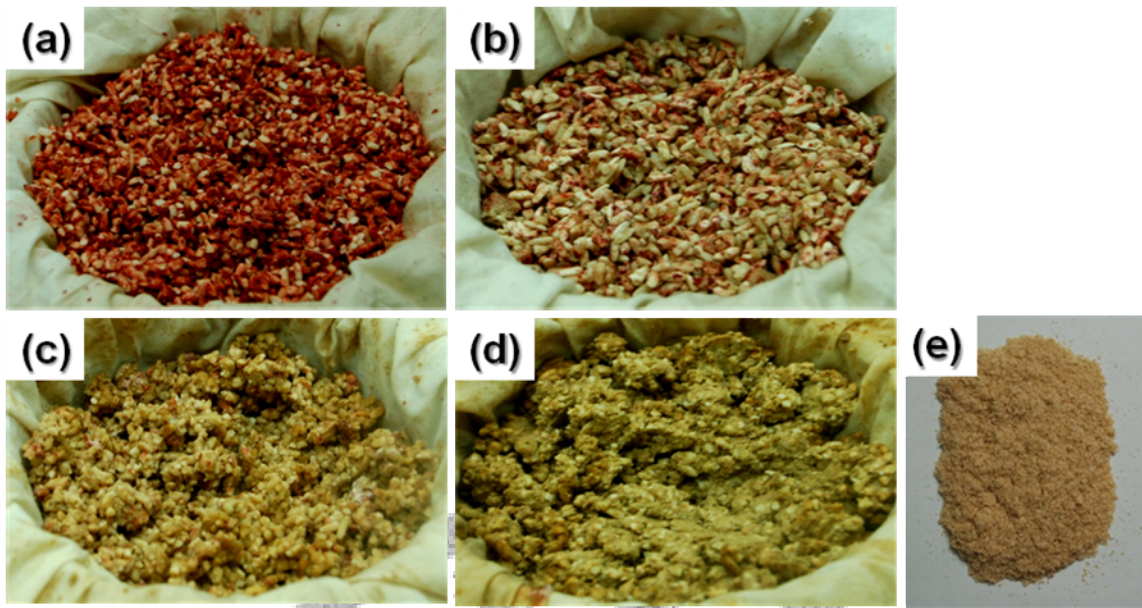


圖 4-2-5 米糠添加量對固態發酵的影響 (a) 米 (b) 米與 10% 米糠 (c) 米與 20% 米糠 (d) 米與 30% 米糠 (e) 米糠

Fig. 4-2-5. Effect of rice bran added volume on solid-state fermentation. (a) rice substrate (b) rice with 10% rice bran (c) rice with 20% rice bran (d) rice with 30% rice bran (e) rice bran powder.

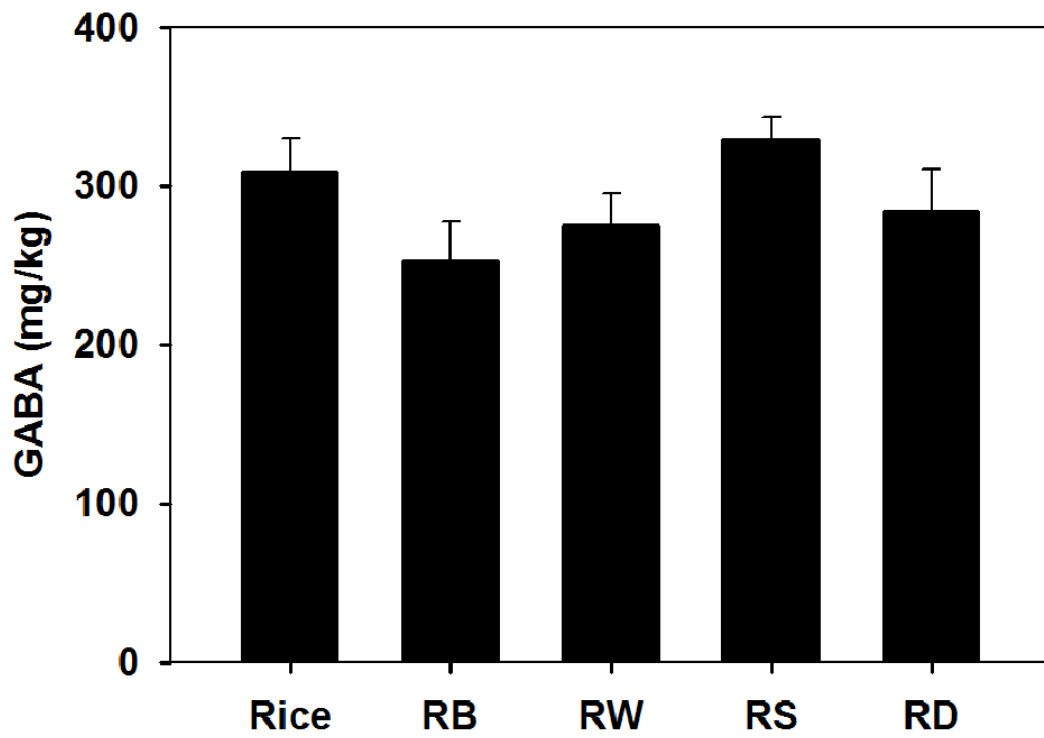


圖 4-2-6 培養基質於固態發酵對生產  $\gamma$ -氨基丁酸之影響

Fig. 4-2-6 Effect of the substrates on GABA produced by solid-state fermentation. RB: rice with rice bran, RD: rice with distillers' grains, RS: rice with defatted soybean, RW: rice with wheat bran

比較 *M. purpureus* BCRC 31499 於固態與液態發酵結果 (表 4-2)，固態發酵有利於 GABA 之生產，但發酵時間較液態發酵長，且會產生 1~2 ppm 的 citrinin。固態發酵每克基質可得 GABA 0.32 mg；而液態發酵添加基質量為培養基的 5%，因而每克基質可得 GABA 4.6 mg，較固態發酵多 14 倍。基質成本在來米每公斤市價新台幣 42 元、MSG 每公斤約為 100 元，米糠每公斤 8 元；固態發酵每公斤成本主要為米與 MSG (42 + 1)，若每公斤產 GABA 320 mg，獲得每克 GABA 需台幣 134 元成本。而液態發酵每升所用基質為 50 g (米與米糠各 25 g)，加上 MSG 後，每升基質成本為 2.3 元，若 GABA 產量為 230 mg/L，獲得每克 GABA 需台幣 10 元。

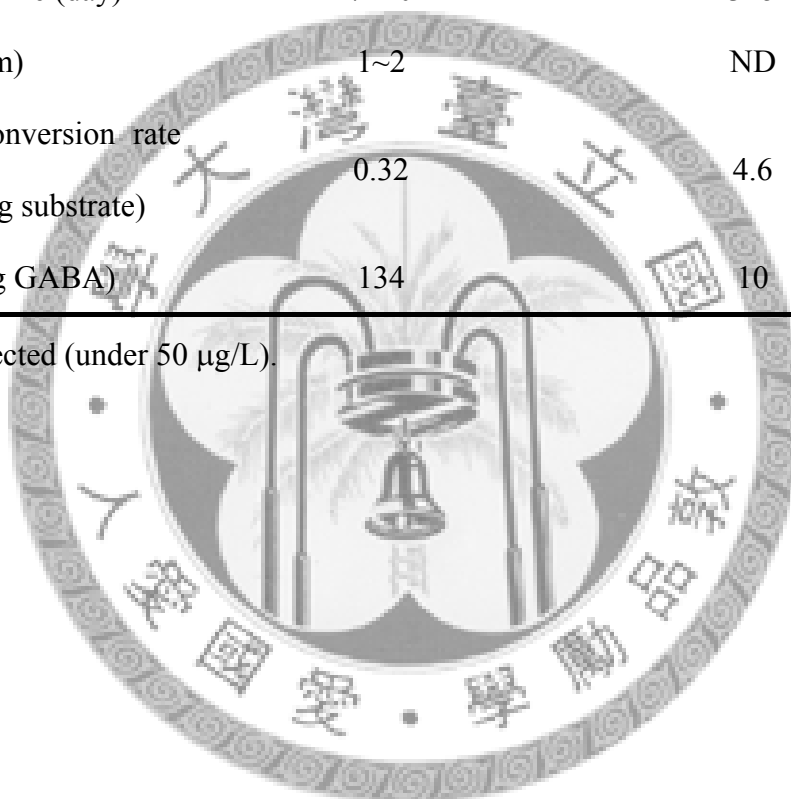
單以基質成本而言 *M. purpureus* BCRC 31499 以液態發酵進行生產 GABA 較固態發酵具有競爭力，但相對的還需考量後續加工問題與產品型態，若要將其乾燥後製成粉末狀、裝成膠囊或製成錠劑，成本一定會高出固態發酵許多，因此包裝飲料類為較適合液態發酵商品的型態。本研究將以飲劑為出發點，提供低成本 GABA 發酵液的生產選擇。

表 4-2 *M. purpureus* BCRC 31499 以固態發酵或液態發酵生產  $\gamma$ -胺基丁酸的基質成本之比較

Table 4-2 Comparison of the substrate cost in solid-state and submerged fermentation on GABA produced by *M. purpureus* BCRC 31499

	Solid-state fermentation	Submerged fermentation
GABA concentration	320 mg/kg	230 mg/L
Cultivation time (day)	7~10	3~5
Citrinin (ppm)	1~2	ND
Substrate conversion rate (mg GABA/g substrate)	0.32	4.6
Cost (NT \$/g GABA)	134	10

ND: not detected (under 50  $\mu\text{g/L}$ ).



## 5. 以米糠混合培養基於不同培養條件對 *M. purpureus* BCRC 31499 生產 GABA 之影響

液態培養考慮之影響因素常包括培養基碳氮比例、無機鹽添加、培養溫度、pH 值、培養時間、接菌量與搖瓶轉速或發酵槽之攪拌速度。而對於紅麴菌生產 GABA 而言，據前人研究歸納出主要影響條件可能為培養基碳氮比例、接菌量、培養時間（與菌體生長有關）、培養溫度與 pH 值（GAD 酵素作用環境），而根據前實驗結果，以米與米糠做為發酵基質可提高 GABA 的生成，並於 7 天時有最高產量，而後則開始下降。因此接下來將進一步探討米與米糠混合比例、培養溫度與培養基起始 pH 值對 GABA 生產所造成之影響，除米與米糠混合比例實驗外，其餘試驗以米與米糠等比例混合為培養基，而培養時間則參考前實驗以 7 天進行比較。

圖 4-2-7 (a) 為培養基起始 pH 值對 GABA 生成量之影響，pH 於 2 時 GABA 產量最低 98 mg/L，pH 5 與 8 有較高濃度的 GABA，分別為 217 mg/L 與 178 mg/L。於實驗中發現，過低的 pH 值對菌體生長產生抑制作用，而 pH 值大於 5 為較好的培養環境，GABA 產量相對提升，並推測 *M. purpureus* BCRC 31499 GAD 最適 pH 值活性範圍可能於 5~8 之間。

圖 4-2-7 (b) 為菌體接種量對 GABA 生成的影響，菌體的接種量對菌體生長速度具一定的影響，隨著接菌量的增加，有助於微生物加速跨越生長遲滯期 (lag phase) 進入對數期 (log phase)。接種量 2%~11% 之間對於 *M. purpureus* BCRC 31499 的 GABA 生成量並無顯著影響，有可能為接種量較少，使得變化不明顯，或者是 *M. purpureus* BCRC 31499 於此培養基中，生長遲滯期 (lag phase) 原本就比較短，故接種量之影響不明顯。一般工業微生物放大培養時，接種量約在 2%~10%，接種量過低除菌體生長較緩慢外，亦可能提高污染之風險；但接種量大於 10% 雖污染風險低，但還需視培養成本是否划算。

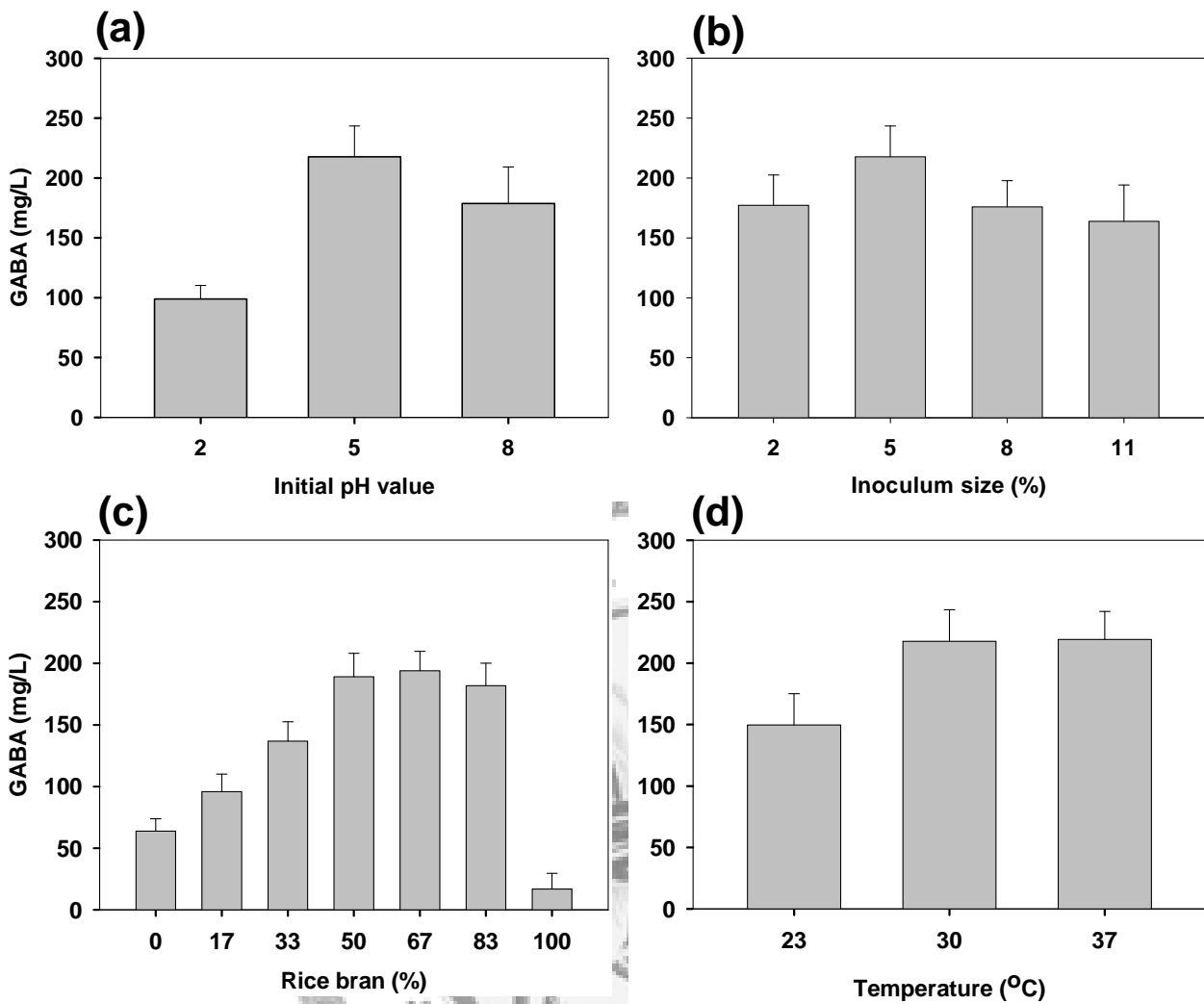


圖 4-2-7 不同培養條件對 *M. purpureus* BCRC 31499 生成  $\gamma$ -胺基丁酸之影響

(a) 培養基起始 pH 值 (b) 接種量 (c) 米糠添加比例 (d) 培養溫度

Fig. 4-2-7 The GABA production by *M. purpureus* BCRC 31499 at various culture condition. (a) effect of medium initial pH value (b) effect of inoculums size (c) effect of rice bran addition ratio (d) effect of culture temperature. The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 3)

由前試驗得知，單獨使用米糠對於 *M. purpureus* BCRC 31499 的利用率及 GABA 產量較不理想，添加米可提升菌體對基質的利用效率，但米成本較高，如能以最少的米生產最高的 GABA 將能提升生產優勢，因此圖 4-2-7 (c) 以陡升法探討隨著米糠比例增加，對於 GABA 生產之影響。隨著米糠添加比例的提升，GABA 產量也有相同之趨勢，但添加比例在 50% 以後則 GABA 產量波動不大，可提供後續反應曲面法設計之參考；同樣於固態發酵結果，隨培養基中米糠添加量增加，基質顏色也從粉紅色逐漸變淡 (圖 4-2-8 a-g)，而 (h) 為 *M. purpureus* BCRC 31499 於添加 1% MSG 之 PDB 培養基顏色，相較之下可知道基質成分對於色素生成影響很大，利用米與米糠進行液態發酵利於 GABA 的產生，但色素生成量卻較低。

GAD 酵素最適反應溫度隨菌種而異，由 30°C ~ 45°C 不等，而依食工所生物資源保存及研究中心對 *M. purpureus* BCRC 31499 的建議培養溫度為 30°C，所以溫度可能同時影響紅麴的生長與酵素的作用。圖 4-2-7 (d) 以不同溫度對於 GABA 生成量進行討論。23°C 的低溫環境似乎較不利於菌體的生長，而 GABA 的產量也隨之降低；30°C 與 37°C 對於 GABA 產量無明顯變化，而實驗中觀察 *M. purpureus* BCRC 31499 於 37°C 環境下培養初期有生長較快的趨勢，而 GABA 產量可能因代謝速率與酵素作用，使得最終產量與 30°C 相似。溫度的上升意味著電力能源的消耗，因此培養溫度以 30°C 較為恰當。

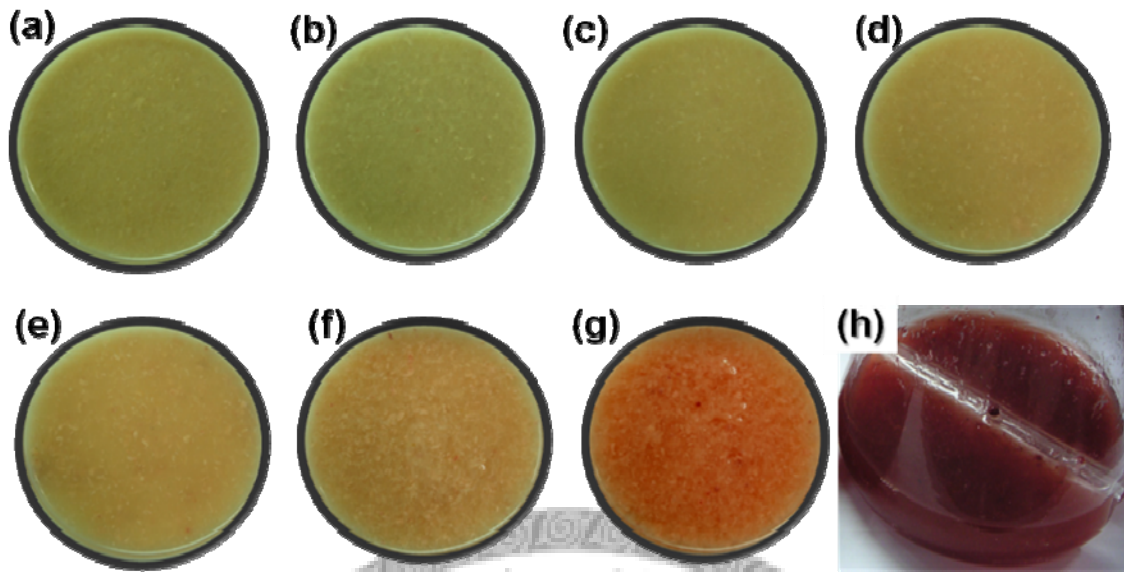


圖 4-2-8 米糠添加量對液態發酵的影響

(a) 米糠 (b) 米與 83% 米糠 (c) 米與 66% 米糠 (d) 米與 50% 米糠 (e) 米與 33% 米糠 (f) 米與 17% 米糠 (g) 米 (h) PDB 培養基

Fig. 4-2-8 Effect of rice bran added volume on submerged fermentation.

(a) rice bran only (b) rice with 83% rice bran (c) rice with 66% rice bran (d) rice with 50% rice bran (e) rice with 33% rice bran (f) rice with 17% rice bran (g) rice powder only (h) PDB medium.

### 第三節 以反應曲面法 (response surface methodology, RSM) 探討紅

#### 麴生產 GABA 最適培養條件

##### 1. 於搖瓶生產 GABA 之最適條件探討

由前項試驗所得之各項 GABA 生產影響因子進行統計比較，發現影響 GABA 變動率最大的為米與米糠添加比例，其次則是 MSG 的濃度與培養基起始 pH 值。以此三因子進行設計 (表 4-3-1)，共經 15 個組合實驗，結果如表 4-3-2 所示。由反應曲面趨勢圖 (圖 4-3-1) 可知，於低 pH 值培養環境下，MSG 的添加有助於 GABA 的提升，可能因為 MSG 可經由菌體代謝生成其他胺類物質及 GABA，協助調整低 pH 值的不利生長環境；隨著米糠增加的比例也會刺激紅麴生成 GABA，米糠添加量與 GABA 呈現正相關，綜合兩因子的影響，於低 pH 值環境下，較高濃度的 MSG 與米糠的添加，可改善紅麴生長情形，使得 GABA 生成量也相對增加，而其中又以米糠添加量影響較為顯著。而在培養基起始 pH 為 5 的環境下，從曲面圖中可得一高點，MSG 濃度為 110 mM ~ 130 mM 與米糠添加量約為 60% ~ 70% 之間，依其等高圖由 MSG 面至峰點較陡於米糠添加比例面至峰點顯示，米糠添加量為影響 GABA 生成之主要因子，MSG 為其附屬因子；但此趨勢於高 pH 質條件下則較不明顯，反而結果較相似於低 pH 培養環境，不同的為 GABA 的改變量較小。可能因為 pH 5 為大部分真菌適合生長之環境，所以於 pH 5 時才有高點出現，而由三圖結果也可知道，低 pH 環境比鹼性環境中更不利 *M. purpureus* BCRC 31499 生產 GABA。

經由表 4-3-2 所得數據進行迴歸分析，結果呈現於表 4-3-3，將所得係數帶入迴歸公式：

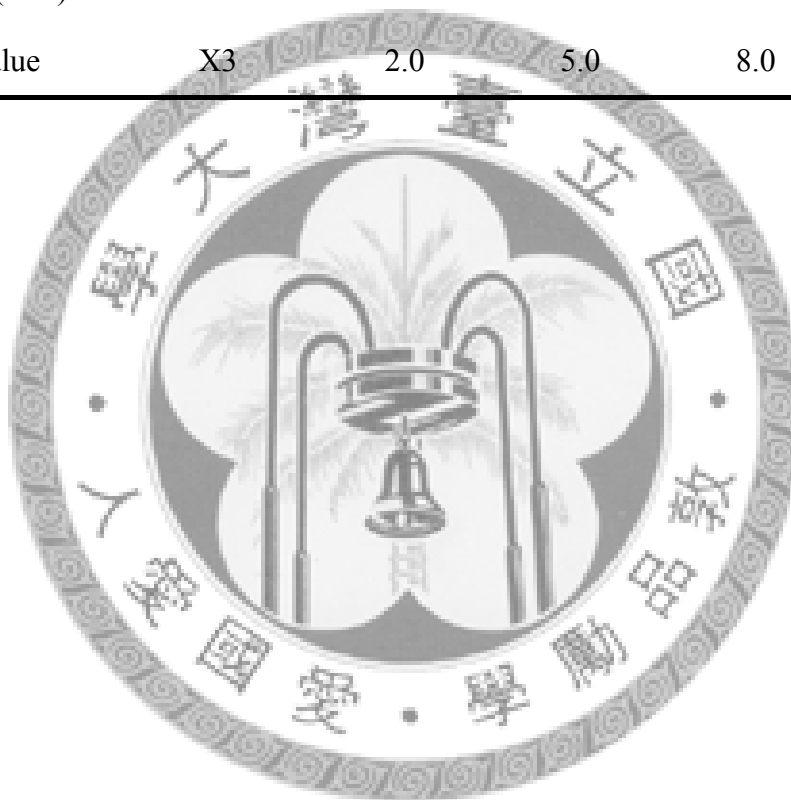
$$Y=A_0+A_1X_1+A_2X_2+A_3X_3+A_{12}X_1X_2+A_{13}X_1X_3+A_{23}X_2X_3+A_{11}X_1^2+A_{22}X_2^2+A_{33}X_3$$

經偏微分，解聯立方程式後，可得 rice bran (%)  $X_1 = 77.31$ ，MSG (mM)  $X_2 = 122.64$ ，initial pH value  $X_3 = 6.29$ ，並預估 GABA 最高理論產量為 268 mg/L。以

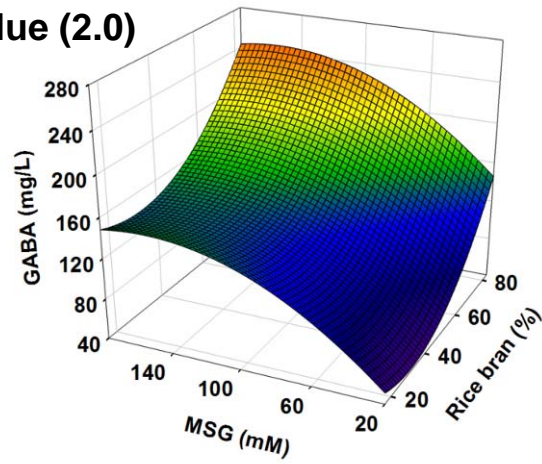
表 4-3-1 反應曲面法之三因子-三階層條件

Table 4-3-1 Process variables and levels in the three variables – three levels response surface design

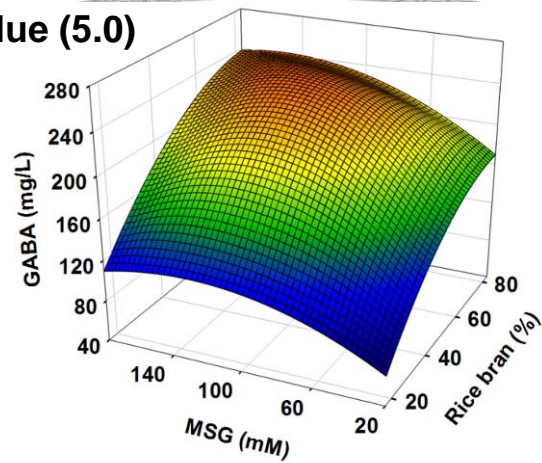
Factor	Symbol	Coded-variables level		
		-1	0	1
Rice bran (%)	X1	16.7	50	83.3
MSG conc. (mM)	X2	20	100	180
Initial pH value	X3	2.0	5.0	8.0



**Initial pH value (2.0)**



**Initial pH value (5.0)**



**Initial pH value (8.0)**

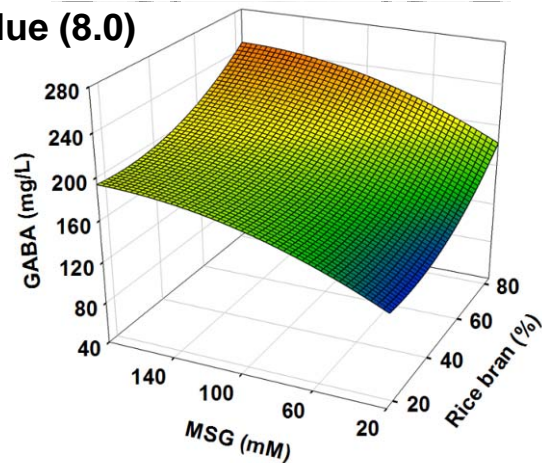


圖 4-3-1 米糠添加比例與 MSG 濃度對  $\gamma$ -胺基丁酸生成量之反應曲面圖

Fig. 4-3-1 The response surface for the production of GABA at various rice bran addition ratio and various MSG concentration

表 4-3-2 三因子-三階層之中心旋轉組合設計

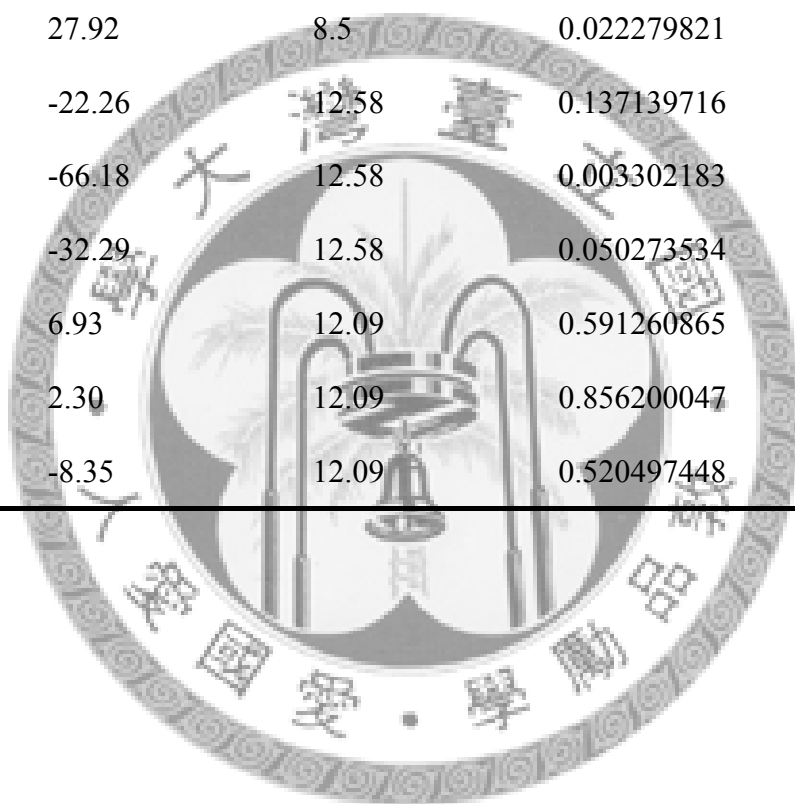
Table 4-3-1 Three variables-three levels of rotatability central composite design of GABA production

Run	Independent variables (coded-level)				Observed metabolite compound
	RB (%)	MSG (mM)	Initial pH value		GABA conc. (mg/L)
1	5 (1)	100 (1)	5 (0)		237.9
2	5 (1)	20 (-1)	5 (0)		169.5
3	1 (-1)	100 (1)	5 (0)		229.9
4	1 (-1)	20 (-1)	5 (0)		178.9
5	5 (1)	60 (0)	8 (1)		109.6
6	5 (1)	60 (0)	2 (-1)		68.9
7	1 (-1)	60 (0)	8 (1)		177.2
8	1 (-1)	60 (0)	2 (-1)		135.4
9	3 (0)	100 (1)	8 (1)		201.2
10	3 (0)	100 (1)	2 (-1)		152.5
11	3 (0)	20 (-1)	8 (1)		137.1
12	3 (0)	20 (-1)	2 (-1)		55.1
13	3 (0)	60 (0)	5 (0)		233.8
14	3 (0)	60 (0)	5 (0)		245.6
15	3 (0)	60 (0)	5 (0)		225.4

表 4-3-3 變異數迴歸分析

Table 4-3-3 Multivariate regression analysis

	Coefficient	Standard error	<i>p</i> value
intercept	234.94	13.96	1.35499E-05
X1	40.66	8.54	0.005075454
X2	33.82	8.54	0.010787546
X3	27.92	8.5	0.022279821
X1 <sup>2</sup>	-22.26	12.58	0.137139716
X2 <sup>2</sup>	-66.18	12.58	0.003302183
X3 <sup>2</sup>	-32.29	12.58	0.050273534
X1*X2	6.93	12.09	0.591260865
X1*X3	2.30	12.09	0.856200047
X2*X3	-8.35	12.09	0.520497448



此變數再進行試驗，所得實驗結果 GABA 實際增加產量為 259.8 mg/L，稍較理論值低。若在加上原本培養基中的 GABA 量，最終發酵液 GABA 約為 320 mg/L，為純米培養基添加 1% MSG 所得 40 mg/L GABA 的 8 倍；且每克 GABA 的成本由原先預估新台幣 10 元降低為 8.5 元。表 4-3-4 為 GABA 生產基質成本比較，台灣市售的發芽米、伽瑪茶 (GABA tea) 都屬於高單價的 GABA 產品，而一般乳酸菌培養大部分需添加奶粉為基質而增加了 GABA 生產成本，Yokoyama 等轉而從酒精發酵後副產物-米酒粕進行 GABA 的生產 (Yokoyama et al., 2002)，也有學者使用海帶為基質進行發酵 (Lee et al., 2010)。而以真菌紅麴進行 GABA 生產，培養基質選擇較乳酸菌多，可直接利用農業副產物為其優點，先前研究中主要以米或山藥為發酵基質，山藥以 *Monascus purpureus* NTU 568 發酵可產生的紅麴色素較多 (吳，2008)，而添加 MSG 雖會提高 GABA 產量，卻同時也會抑制 monacolin K、citrinin 生成 (Su et al., 2003)，於本實驗最適化培養條件生產後可得到最低基值生產成本的 GABA，且 citrinin 含量低於 50 µg/L 偵測極限。

## 2. 發酵槽生產富含 GABA 之紅麴發酵產物

進一步將發酵體積進行量化，培養條件參考前項實驗最適培養結果：米糠添加比例 77.3%、麩胺酸鈉 122.64 mM 及 pH 值控制於 6.3，以 6.6 L 攪拌式發酵槽進行生產。圖 4-3-2 為 GABA 於不同時間點的產量，由於發酵槽通氣、pH 值、溫度及攪拌等環境培養控制都較搖瓶培養佳，因此於培養第三天時 GABA 產量即達最高 355 mg/L，較原本搖瓶培養所需時間縮短了一半，顯示菌體生長加快，基質利用速度也相對提升。第三天後，GABA 開始被利用，使得產量快速下降，與前實驗趨勢相同。因此以發酵第三天的樣品經過濾及冷凍乾燥後進行後續動物試驗。

表 4-3-4 生產  $\gamma$ -胺基丁酸基質成本之比較

Table 4-3-4 Comparison of the substrate-cost in GABA production

Source	Substrate	GABA concentration	Substrate cost (NT \$/g GABA )	Reference
Germinated brown rice	Rice	249 mg/kg	> 600	Komatsuzaki et al., 2007
Green tea	Tea	169 mg/kg	> 5500	Wang et al., 2006
GABA tea		1809 mg/kg	> 1000	
<i>L. brevis</i> IFO-12005	Rice <i>shochu</i> distillery lees	649 mg/L	$\geq$ 250	Yokoyama et al., 2002
<i>L. brevis</i> BJ20	Sea tangle	2465 mg/L	$\geq$ 40	Lee et al., 2010
<i>M. purpureus</i> BCRC 31615	Rice	1494 mg/kg	28.7	Su et al., 2003
<i>M. purpureus</i> NTU 601	Rice	5004 mg/kg	9.5	Wang et al., 2003 a
<i>M. purpureus</i> BCRC 31540	Rice	3933 mg/kg	10.7	Hsu, 2005
<i>M. purpureus</i> NTU 568	Dioscorea	513 mg/kg	> 500	Wu, 2008
<i>M. purpureus</i> BCRC 31499	Rice bran	320 mg/L	8.5	This study
		16.4 g/kg dry weight		

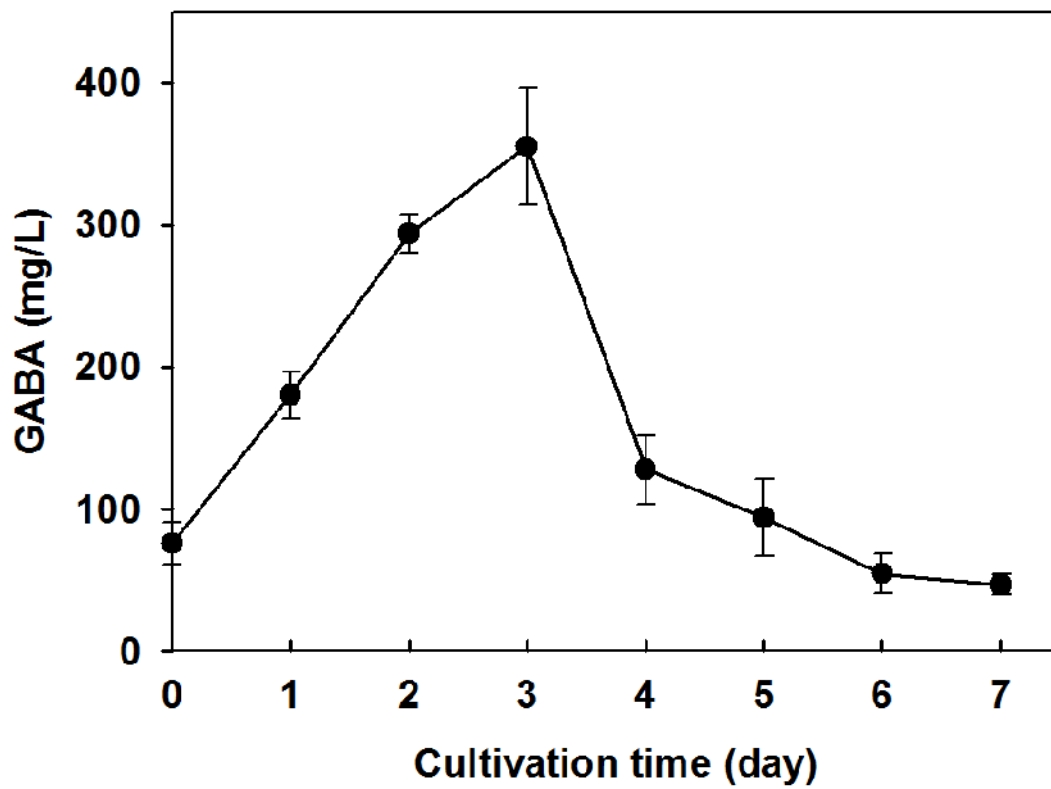


圖 4-3-2 *Monascus purpureus* BCRC 31499 於發酵槽培養之  $\gamma$ -氨基丁酸生成曲線

Fig. 4-3-2 The production curve of GABA by *Monascus purpureus* BCRC 31499 in jar-fermentor.

## 第四節 抗憂鬱評估-強迫游泳試驗

### 1. 攝食量及體重變化

服用百憂解常見可能副作用為使食慾降低，及造成體重下降，藉由試驗中動物平均每週攝食量與體重的變化，研究試驗樣品對大鼠食慾及重量的影響。所有組別於試驗開始時體重及攝食量皆無任何差異，抗憂鬱藥劑組體重增加量於試驗兩週後相較於其他組別有降低趨勢，於第 21 天後明顯低於正常組 ( $p < 0.05$ )，其餘組別於試驗中體重變化量均無差異 (圖 4-4-1)。攝食量變化示如圖 4-4-2，從第二週開始即可觀察到抗憂鬱藥劑組攝食量略低於其他組別；正常情況下，老鼠隨著飼養時間長大，攝食量也會增加，而試驗中抗憂鬱藥劑組 2 ~ 4 週的平均攝食量相近，其餘組別攝食量則隨時間而增加，於第四週時，抗憂鬱藥劑組平均攝食量顯著低於正常組，綜合以上兩結果可得知：服用百憂解會因食慾降低而造成體重的下降，但餵食 GABA、未發酵液與紅麴發酵液則無此副作用。



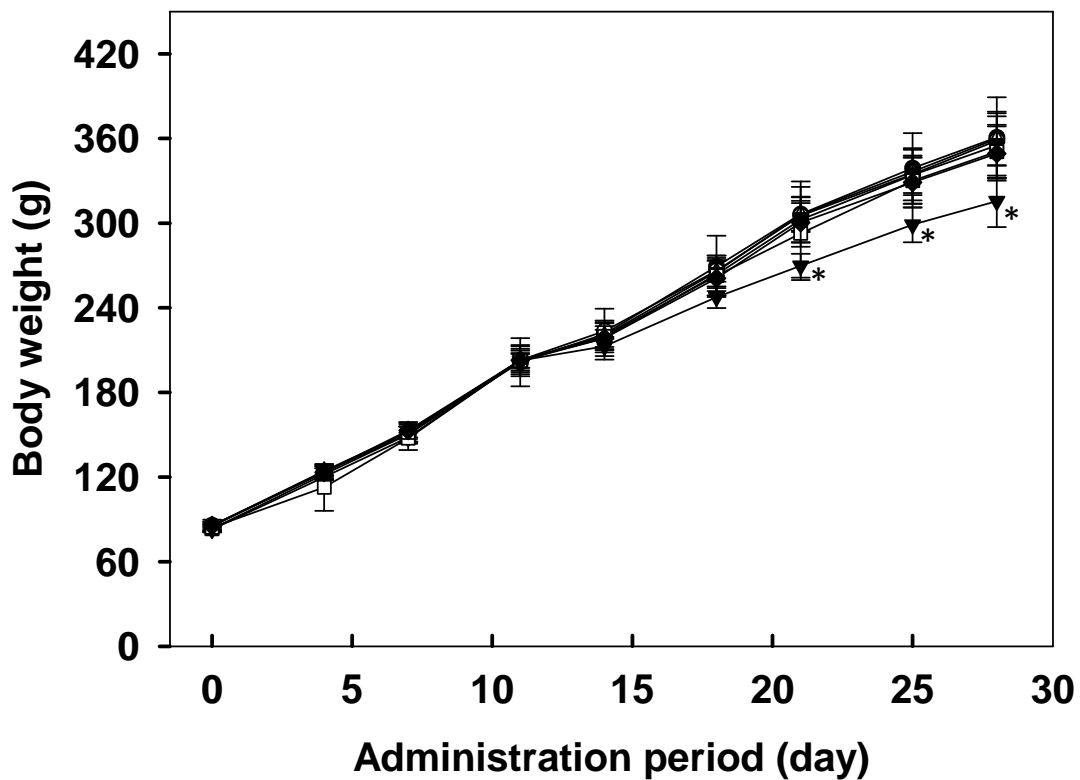


圖 4-4-1 試驗中體重之變化

Fig. 4-4-1 The changes of body weight in the administration period.

●: normal control, ○: control, ▼: fluoxetine, 20 mg/kg bw, △: GABA, 2.6 mg/kg bw, ■: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw, □: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw, ◆: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 12), \*significantly different ( $p < 0.05$ ) compared with normal control.

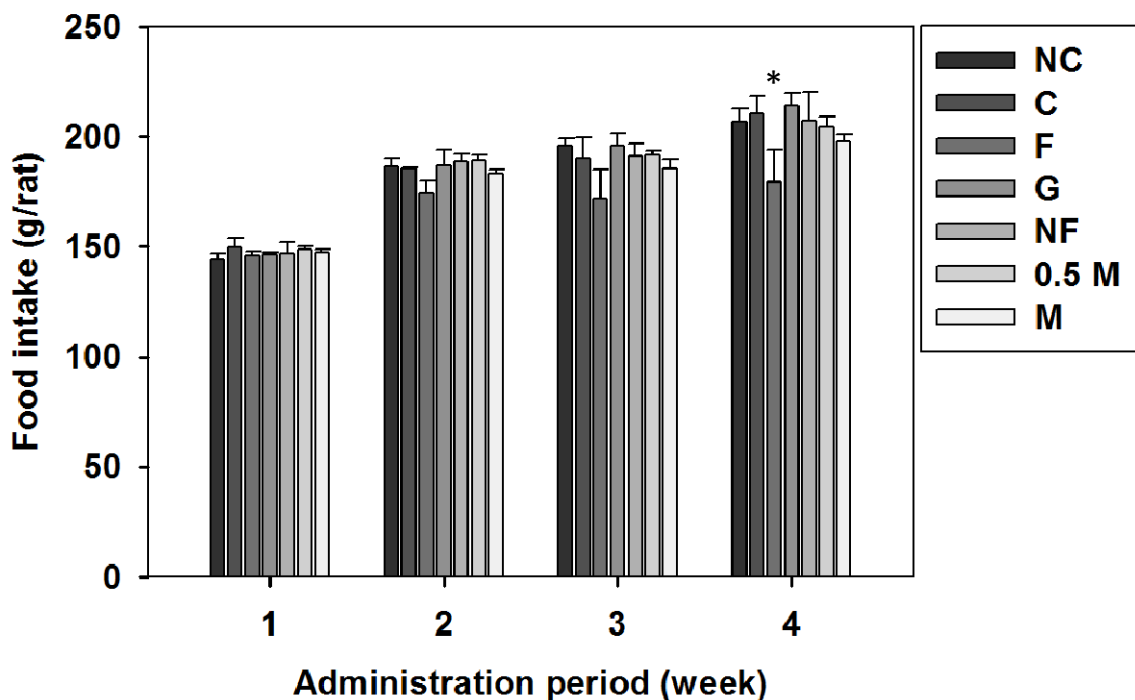


圖 4-4-2 試驗中攝食量之變化

Fig. 4-4-2 The changes of food intake in the administration period.

NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 12), \*significantly different ( $p < 0.05$ ) compared with normal control.

## 2. 短期試驗

短期試驗目的在於模擬當遭遇環境壓力時，餵食 GABA 或紅麴發酵產物是否能改善強迫游泳壓力所帶來的憂鬱情緒。強迫游泳試驗中的不活動時間為憂鬱程度指標，由圖 4-4-3 得知，餵食 GABA 組於水中不活動時間顯著低於控制組，且具同劑量 GABA 之紅麴發酵產物也有相同效果，而 0.5 倍 GABA 劑量的紅麴發酵產物、未發酵組、抗憂鬱藥劑組（百憂解）與控制組並無顯著差異，證實短期試驗中 GABA 為主要具有改善憂鬱情緒之活性成分，且於高劑量時效果較佳，而抗憂鬱藥劑組因百憂解本身藥物之作用，據臨床藥物手冊 (Wells, 2008) 及百憂解藥物說明指出，患者服用藥物兩週或一個月後才開始有改善憂鬱情緒作用，因此在本短期試驗內並無法立即得到改善效果。

## 3. 長期試驗

為模擬長期攝取試驗樣品後是否能預防外界壓力所造成之憂鬱情緒，經過四週的餵食，除未發酵組外，其餘各組在強迫游泳不活動時間均顯著低於控制組，GABA 組與 0.5 倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物有相同效果，而 1 倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物則與抗憂鬱藥劑組與控制組相比皆達極顯著差異 ( $p < 0.01$ )，結果顯示 GABA 亦能改善長期試驗中憂鬱情緒的表現，而紅麴發酵產物改善不活動時間的效果較同劑量之 GABA 更佳，推測發酵產物中另有其他物質與 GABA 共同達到改善憂鬱情緒之作用 (圖 4-4-4)。

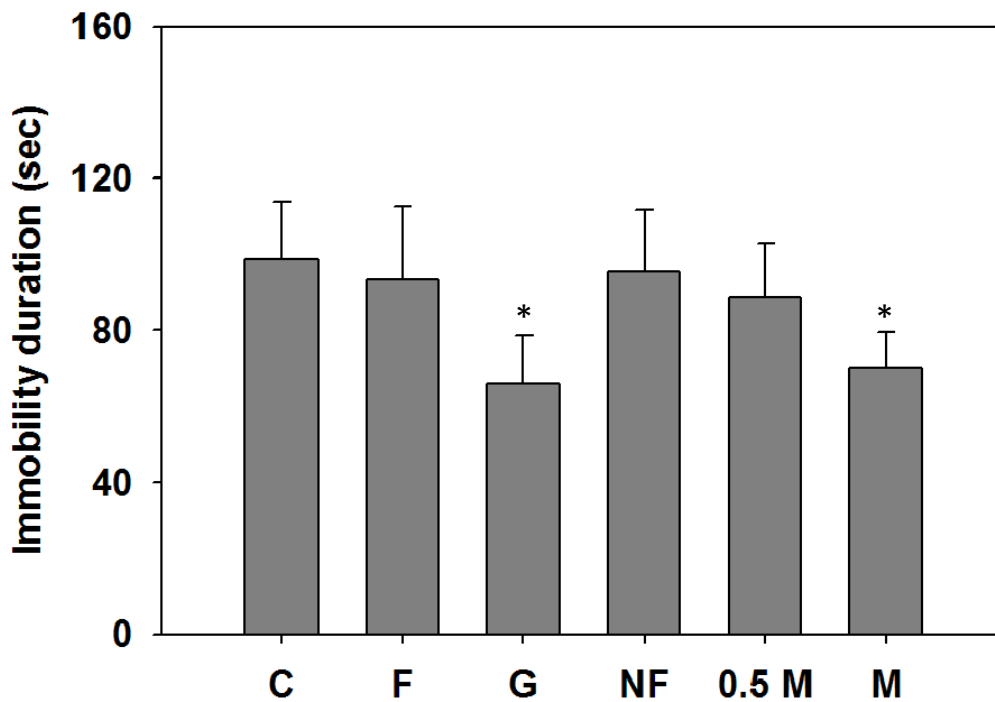


圖 4-4-3 紅麴發酵產物在短期試驗中對強迫游泳不活動時間之影響

Fig. 4-4-3 Effects of the *Monascus*-fermented product on the immobility time of the short-term test in forced swimming test

C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw.

Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 8), \*significantly different ( $p < 0.05$ ) compared with control.

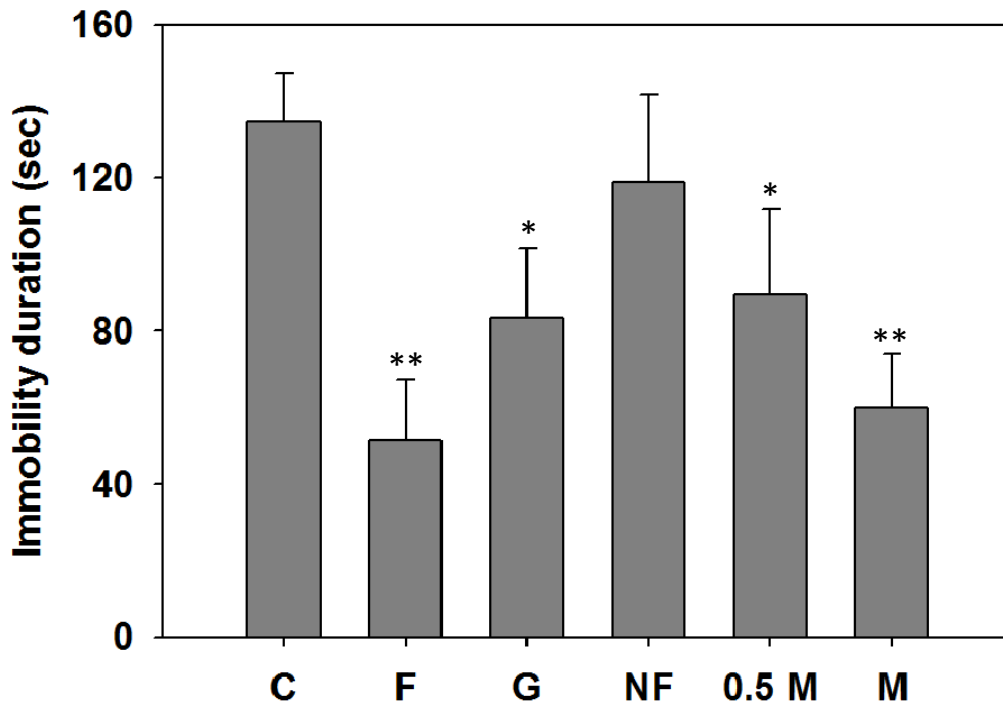


圖 4-4-4 紅麴發酵產物在長期試驗中對強迫游泳之不活動時間影響

Fig. 4-4-4 Effects of the *Monascus*-fermented product on the immobility time of the long-term test in forced swimming test

C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw.

Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 8). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, significantly different compared with control.

### 3. 腦部神經傳導物質分析

為確認發酵產物對憂鬱情緒改善是否與腦內神經傳導物質有關，進一步分析與憂鬱情緒表現相關的腦部組織，包括大腦皮質前區 (frontal cortex)、紋狀體 (striatum)、海馬迴 (hippocampus) 及杏仁核 (amygdale) 內單胺類物質的改變。單胺類假說指出憂鬱症產生原因是由於腦內單胺物質失衡所致，主要影響憂鬱或情感疾病的三大神經傳導物質為正腎上腺素 (norepinephrine)、多巴胺 (dopamine) 及血清素 (serotonin)，圖 4-4-5 為各單胺物質與其代謝產物之層析圖譜。著名的天然抗憂鬱保健食材金絲桃或稱聖約翰草 (*Hypericum perforatum*) 就具有提升正腎上腺素、多巴胺及血清素的效果，因此進行腦部神經傳導物質之分析有助於佐證強迫游泳試驗的結果。

表 4-4-1 可知經由強迫游泳後之大鼠，大腦杏仁核及海馬迴內正腎上腺素含量較正常組 (normal control) 顯著下降 ( $p < 0.01$ )，餵食抗憂鬱藥劑、GABA 與紅麴發酵產物可恢復杏仁核及海馬迴正腎上腺素的含量；另一方面，控制組 (control) 腦組織除皮質前區外，其餘組織中多巴胺含量皆顯著低於正常組，而餵食百憂解、GABA 與紅麴發酵產物能回復杏仁核及海馬迴的多巴胺含量，效果較未發酵基質佳 (表 4-4-2)。於表 4-4-3 不同腦區也會因強迫游泳的壓力導致血清素含量明顯低於正常組，餵食百憂解其腦組織血清素含量皆顯著提升，結果相似於正腎上腺素與多巴胺；而 GABA 與紅麴發酵產物主要作用於杏仁核、皮質前區與海馬迴，使血清素含量明顯增加，且於海馬迴組織紅麴發酵產物效果較等劑量 GABA 佳，並呈劑量效應。綜合以上結果，強迫游泳會使大鼠腦中正腎上腺素、多巴胺及血清素同時下降，因而造成憂鬱之情緒，服用抗憂鬱藥劑-百憂解能提升正腎上腺素、多巴胺及血清素含量達到改善憂鬱之效果。而餵食 GABA 及富含 GABA 之紅麴發酵產物亦能提升海馬迴與杏仁核中正腎上腺素、多巴胺與血清素含量，推測發酵產物中主要提升單胺物質的功效成份為 GABA，但對於海馬迴與皮質前區血清素的提升，紅麴發酵產物有較 GABA 更好的效果。

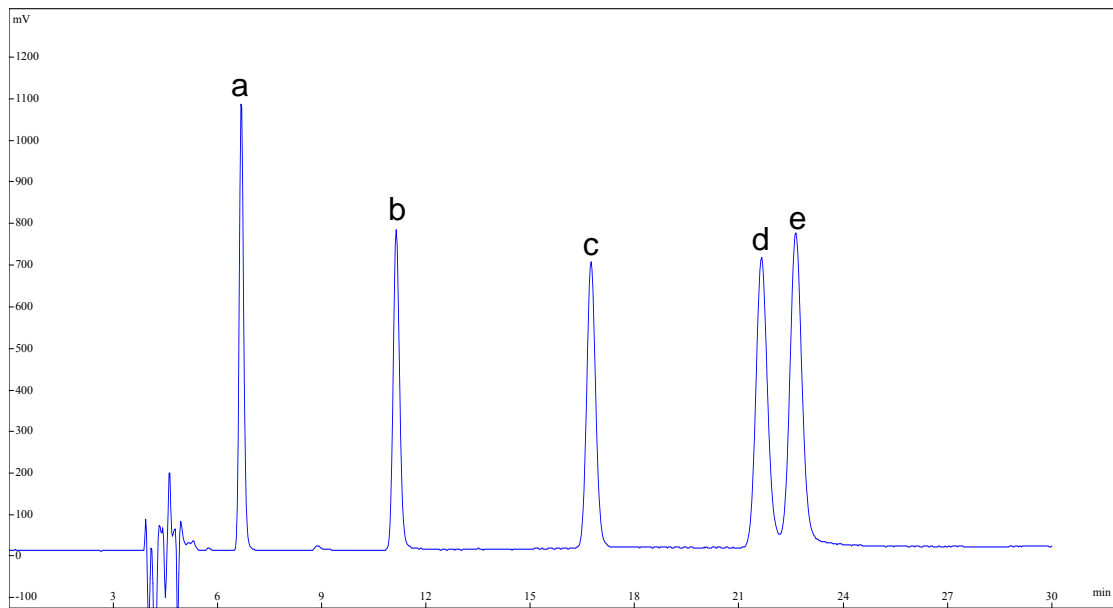


圖 4-4-5 單胺物質標準品之層析圖譜

a: 正腎上腺素 (NE), b: 多巴胺 (DA), c: 3,4-羥酸 (DOPAC), d: 血清素 (5-HT),  
e: 5-氫氧靛基醋酸 (5-HIAA), 各標準品濃度為 20 ng/mL

Fig. 4-4-3 The chromatogram of monoamine standards.

a: norepinephrine (NE), b: dopamine (DA), c: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), d: 5-hydroxytryptamine (5-HT), e: 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)

The concentration of each standard was 20 ng/mL. (determined by HPLC-ECD under detection range 5.0 nA)

表 4-4-1 紅麴發酵產物對不同腦區正腎上腺素含量之影響

Table 4-4-1 Effect on the concentration of norepinephrine in different brain sections by *Monascus*-fermented product.

Groups	Norepinephrine (ng/g brain tissue)			
	Amygdala	Frontal cortex	Hippocampus	Striatum
NC	487 ± 18 <sup>d</sup>	272 ± 12 <sup>bc</sup>	468 ± 32 <sup>d</sup>	1120 ± 134 <sup>c</sup>
C	370 ± 30 <sup>a</sup>	272 ± 26 <sup>bc</sup>	138 ± 22 <sup>a</sup>	1036 ± 92 <sup>c</sup>
F	469 ± 40 <sup>cd</sup>	246 ± 29 <sup>abc</sup>	231 ± 25 <sup>b</sup>	971 ± 134 <sup>bc</sup>
G	452 ± 54 <sup>bcd</sup>	219 ± 27 <sup>a</sup>	342 ± 17 <sup>c</sup>	870 ± 121 <sup>ab</sup>
NF	418 ± 30 <sup>abc</sup>	241 ± 33 <sup>ab</sup>	236 ± 39 <sup>b</sup>	780 ± 47 <sup>a</sup>
0.5 M	424 ± 33 <sup>abc</sup>	239 ± 16 <sup>ab</sup>	218 ± 23 <sup>b</sup>	808 ± 72 <sup>ab</sup>
M	398 ± 38 <sup>ab</sup>	288 ± 29 <sup>cd</sup>	344 ± 25 <sup>c</sup>	764 ± 46 <sup>a</sup>

NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. <sup>abcd</sup> Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ ) by oneway ANOVA following by Duncan's test.

Data are expressed as means ± SD (n = 8)

表 4-4-2 紅麴發酵產物對不同腦區多巴胺含量之影響

Table 4-4-2 Effect on the concentration of dopamine in different brain sections by *Monascus*-fermented product.

Groups	Dopamine (ng/g brain tissue)			
	Amygdala	Frontal cortex	Hippocampus	Striatum
NC	1050 ± 106 <sup>c</sup>	28 ± 3 <sup>a</sup>	88 ± 7 <sup>c</sup>	6065 ± 521 <sup>c</sup>
C	259 ± 43 <sup>a</sup>	92 ± 14 <sup>de</sup>	54 ± 12 <sup>a</sup>	4140 ± 519 <sup>ab</sup>
F	1183 ± 53 <sup>c</sup>	51 ± 9 <sup>b</sup>	75 ± 14 <sup>bc</sup>	7019 ± 482 <sup>d</sup>
G	681 ± 127 <sup>b</sup>	69 ± 9 <sup>c</sup>	88 ± 12 <sup>c</sup>	4383 ± 513 <sup>ab</sup>
NF	752 ± 87 <sup>b</sup>	46 ± 6 <sup>b</sup>	51 ± 9 <sup>a</sup>	4041 ± 481 <sup>ab</sup>
0.5 M	751 ± 89 <sup>b</sup>	76 ± 11 <sup>cd</sup>	65 ± 4 <sup>ab</sup>	3835 ± 311 <sup>a</sup>
M	733 ± 129 <sup>b</sup>	104 ± 14 <sup>e</sup>	89 ± 14 <sup>c</sup>	4807 ± 497 <sup>b</sup>

NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. <sup>abcd</sup> Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ ) by oneway ANOVA following by Duncan's test.

Data are expressed as means ± SD (n = 8)

表 4-4-3 紅麴發酵產物對不同腦區血清素含量之影響

Table 4-4-3 Effect on the concentration of serotonin in different brain sections by *Monascus*-fermented product.

Groups	Serotonin (ng/g brain tissue)			
	Amygdala	Frontal cortex	Hippocampus	Striatum
NC	559 ± 34 <sup>c</sup>	133 ± 17 <sup>bc</sup>	377 ± 43 <sup>d</sup>	382 ± 7 <sup>e</sup>
C	434 ± 52 <sup>b</sup>	106 ± 5 <sup>a</sup>	130 ± 15 <sup>a</sup>	241 ± 16 <sup>ab</sup>
F	596 ± 58 <sup>c</sup>	113 ± 16 <sup>a</sup>	204 ± 29 <sup>b</sup>	331 ± 11 <sup>d</sup>
G	452 ± 64 <sup>b</sup>	132 ± 8 <sup>bc</sup>	217 ± 34 <sup>b</sup>	253 ± 12 <sup>b</sup>
NF	329 ± 55 <sup>a</sup>	115 ± 7 <sup>ab</sup>	151 ± 32 <sup>a</sup>	218 ± 29 <sup>a</sup>
0.5 M	445 ± 62 <sup>b</sup>	106 ± 7 <sup>a</sup>	227 ± 15 <sup>b</sup>	312 ± 28 <sup>cd</sup>
M	436 ± 39 <sup>b</sup>	135 ± 11 <sup>c</sup>	250 ± 22 <sup>c</sup>	296 ± 13 <sup>c</sup>

NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. <sup>abcd</sup> Significantly different from the control group ( $p < 0.01$ ) by oneway ANOVA following by Duncan's test.

Data are expressed as means ± SD (n = 8)

腦內單胺物質的增加可改善憂鬱情緒，但目前最主要用來治療憂鬱症的藥劑並不是直接補充患者單胺物質，而是進一步抑制單胺物質被回收，如選擇性血清素回收抑制劑 (SSRI)、選擇性正腎上腺素回收抑制劑 (NSRI) 等，或是抑制單胺氧化酶作用。因此觀察腦內單胺物質的代謝產物亦能瞭解與推測食品或藥品的可能作用機制，圖 4-4-6 為餵食 GABA 與紅麴發酵產物於各部位腦組織中的多巴胺代謝速率關係，經由強迫游泳試驗，紋狀體、海馬迴與杏仁核中多巴胺的代謝速率皆較正常組高，於杏仁核中更高達三倍。餵食百憂解僅減緩紋狀體與杏仁核的多巴胺代謝，而 GABA 則主要作用於海馬迴與杏仁核；紅麴發酵產物除 GABA 之功效外，更能作用於紋狀體及皮質前區，減緩多巴胺的代謝，推測發酵產物中含有其他抑制多巴胺代謝之物質。圖 4-4-7 為血清素的代謝，經由強迫游泳同樣加速了各部位血清素的代謝，百憂解為選擇性血清素回收抑制劑，故能減緩各組織中血清素的消耗，GABA 也具有類似百憂解的功效，而紅麴發酵產物對於減緩血清素代謝效果與 GABA 相同，但未發酵之基質則無減緩效果。因此，紅麴發酵產物中除了 GABA 可提升杏仁核及海馬迴正腎上腺素、多巴胺與血清素含量，減緩海馬迴及杏仁核內多巴胺代謝速率與降低所有組織中血清素的代謝速度，效果相似於抗憂鬱藥劑百憂解外，更能促進海馬迴血清素分泌及抑制多巴胺於紋狀體與皮質前區代謝的額外效果。

綜合比較 GABA 及紅麴發酵產物對於腦中各部位單胺物質濃度之影響 (表 4-4-4)，GABA 主要影響於杏仁核及海馬迴中單胺表現，可恢復因強迫游泳試驗所造成單胺下降情形，以及減緩多巴胺的代謝速率；而富含 GABA 的紅麴發酵產物更能提升大腦皮質前區單胺物質的含量，並主要作用於多巴胺代謝系統，減緩各腦區多巴胺的代謝速率。

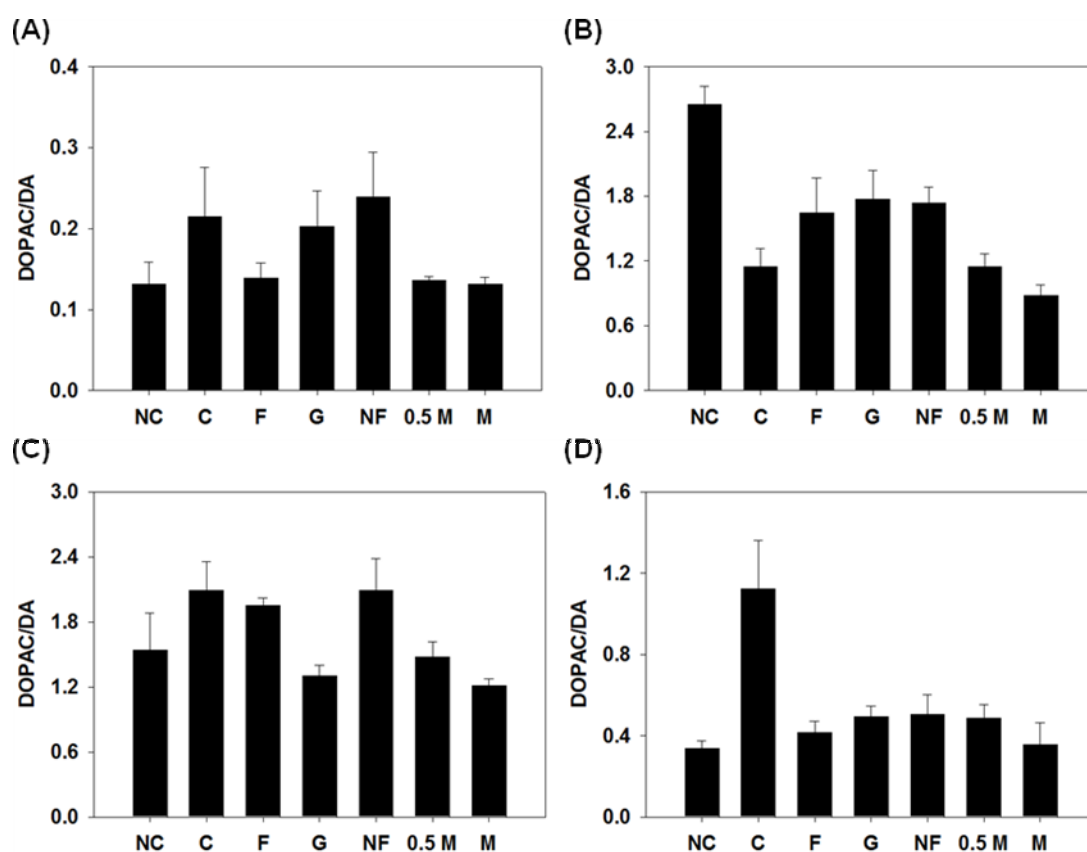


圖 4-4-6 紅麴發酵產物與  $\gamma$ -氨基丁酸對大腦不同區域多巴胺代謝速率之影響

(A) 紋狀體 (B) 皮質前區 (C) 海馬迴 (D) 杏仁核

Fig. 4-4-6 The effect of *Monascus*-fermented product and GABA on the dopamine turnover ratio (DOPAC/DA) in different brain sections.

(A) striatum (B) frontal cortex (C) hippocampus (D) amygdala.

DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 8)

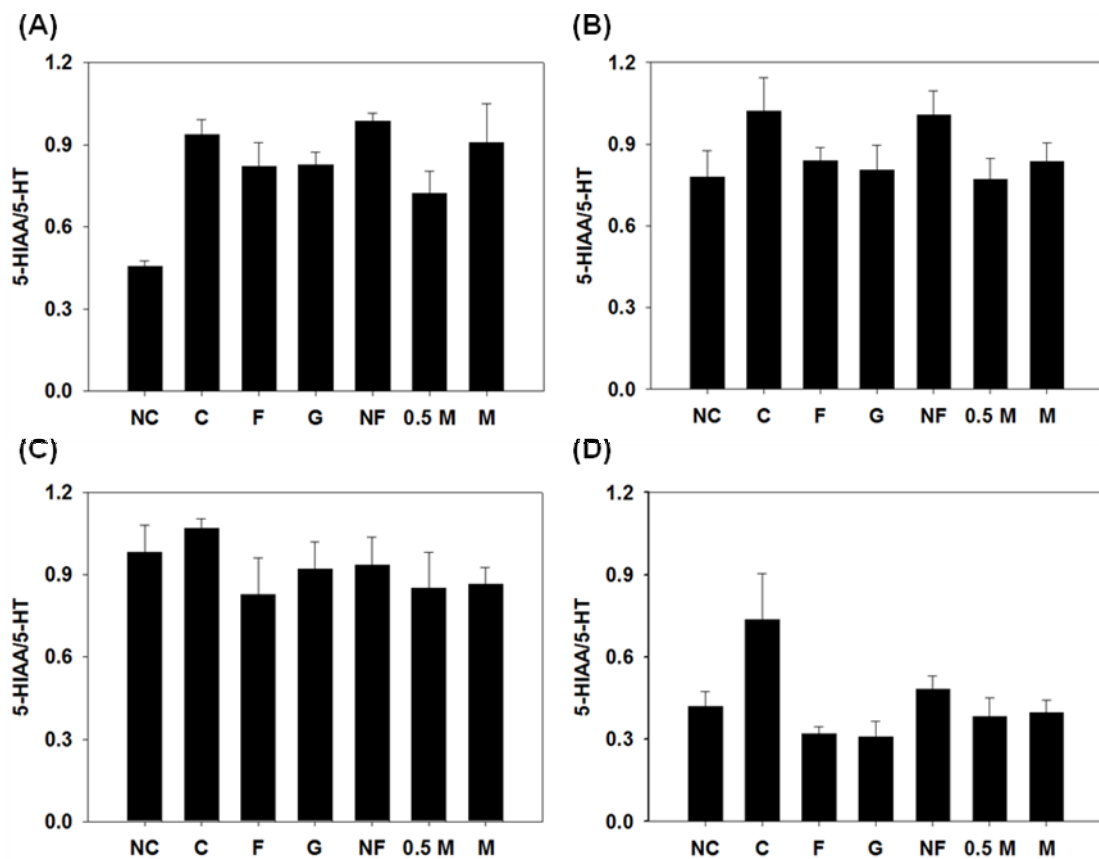


圖 4-4-7 紅麴發酵產物與  $\gamma$ -氨基丁酸對大腦不同區域血清素代謝速率之影響

(A) 紋狀體 (B) 皮質前區 (C) 海馬迴 (D) 杏仁核

Fig. 4-4-7 The effect of *Monascus*-fermented product and GABA on the serotonin turnover ratio (5-HIAA/5-HT) in different brain sections.

(A) striatum (B) frontal cortex (C) hippocampus (D) amygdala.

5-HT: 5-hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; NC: normal control; C: control; F: fluoxetine, 20 mg/kg bw; G: GABA, 2.6 mg/kg bw; NF: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw.

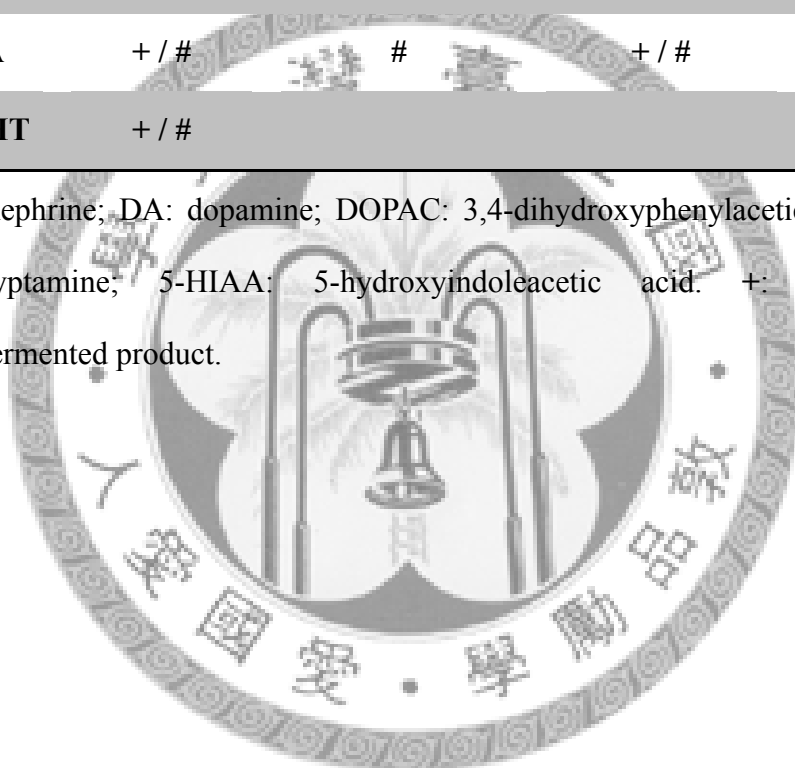
Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 8)

表 4-4-4 紅麴發酵產物與  $\gamma$ -氨基丁酸對不同腦區單胺物質含量之影響

Table 4-4-4 Effect on the concentration of monoamines in different brain sections by *Monascus*-fermented product and GABA.

	Amygdala	Frontal cortex	Hippocampus	Striatum
<b>NE</b>	+ / #	#	+ / #	
<b>DA</b>	+ / #	#	+ / #	
<b>5-HT</b>		+ / #	+ / #	
<b>DOPAC/DA</b>	+ / #	#	+ / #	#
<b>5-HIAA/5-HT</b>	+ / #			

NE: norepinephrine; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 5-HT: 5-hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid. +: GABA; #: *Monascus*-fermented product.



## 5. 受試樣品安全性評估

為評估受試樣品劑量是否對於大鼠造成代謝負荷，乃進行血清中肝腎指數分析。由表 4-4-5 之肝指數發現：以強迫游泳試驗誘導憂鬱之組別，其 AST (GOT)、ALT (GPT) 較正常組 (normal control) 高，而餵食純 GABA 可顯著降低 AST 值 ( $p < 0.05$ )，ALT 也較控制組 (control) 低，其餘組別則無顯著差異，餵食等倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物可能因樣品中含有其他物質，使得 AST 下降並無純 GABA 明顯；此結果相似於岡田等 (2000) 給予更年期障礙或精神障礙患者含等劑量 GABA 之發芽米，患者血清中 AST、ALT 下降約 10%~15%。

腎功能指標方面，尿素氮 (blood urine nitrogen, BUN) 是蛋白質的代謝產物，經腎臟分泌而由尿液排出體外，當血中尿素氮的濃度升高，就能反應腎功能異常；在所有試驗組別中，GABA 組與同 GABA 劑量之紅麴發酵產物組的 BUN 較低，紅麴發酵產物組相較於控制組 BUN 顯著下降 ( $p < 0.05$ )。而血清中的肌酐酸 (creatinine) 主要是來自於身體肌肉活動的代謝產物，也是肌肉疲勞指標之一，經腎臟回收由尿液排出，當腎功能有問題，無法完全排出每日所產生之肌酐酸，即會造成血中肌酐酸濃度上升，試驗結果得知抗憂鬱藥劑組、GABA 組與 1 倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物組肌酐酸顯著低於控制組。

由於 GABA 的利尿功能，與百憂解藥物使用指南上載明使用劑量較高時，可能造成低血鈉情況，因此分析血清中電解質含量以確定 GABA 及百憂解劑量是否造成電解質失調現象，由表 4-4-6 可知各組間血清中各電解質均無顯著差異，表示試驗物質使用劑量為正常範圍。因部分組別肝指數均高於正常組，故進一步將肝臟及腎臟進行組織切片，經判讀結果皆與正常組無顯著差異 (圖 4-4-8)，表示該試驗餵食之劑量與樣品並不會造成肝腎的損傷與代謝負荷，而影響肝臟 AST 提升原因可能為強迫游泳造成之壓力所導致。由以上結果推論 GABA 具有改善肝腎功能作用，與學者茅原與杉浦、Oh 等論點相同 (茅原與杉浦, 2001; Oh et al., 2003)。

表 4-4-5 紅麴發酵產物對 SD 大鼠血清中 AST、ALT、BUN 及 creatinine 之影響

Table 4-4-5 Effect of *Monascus*-fermented product on SD rats performance serum AST, ALT, BUN and creatinine levels

Group	Liver (U/L)		Kidney (mg/dL)	
	AST	ALT	BUN	Creatinine
Control	136.0 ± 16.5	73.1 ± 9.8	23.7 ± 1.7	0.44 ± 0.06
Normal control	113.5 ± 9.1 *	69.3 ± 10.7	22.2 ± 1.8	0.44 ± 0.06
Fluxitine	119.8 ± 12.6	74.3 ± 7.9	20.3 ± 2.1	0.36 ± 0.05 *
GABA	111.3 ± 8.2 *	64.9 ± 9.9	19.9 ± 2.8	0.36 ± 0.03 *
Non-fermented	125.9 ± 21.4	66.8 ± 3.7	20.8 ± 2.7	0.40 ± 0.04
0.5 M	132.3 ± 22.0	67.9 ± 7.0	21.1 ± 1.8	0.42 ± 0.07
M	130.8 ± 15.8	69.4 ± 8.0	19.7 ± 1.5 *	0.38 ± 0.07 *

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, BUN: blood urine nitrogen. Fluoxetine: 20 mg/kg bw; GABA: 2.6 mg/kg bw; Non-fermented substrate contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw.

Data are expressed as means ± SD (n = 10), \*significantly different ( $p < 0.05$ ) compared with control.

表 4-4-6 紅麴發酵產物對 SD 大鼠血清中電解質之影響

Table 4-4-6 Effect of *Monascus*-fermented product on SD rats performance serum electrolyte levels

Group	Electrolyte (mEq/L)				
	Na	K	Cl	Ca (mg/dL)	Mg
Control	149.0 ± 2.0	7.4 ± 0.9	96.1 ± 1.8	13.0 ± 1.0	4.4 ± 0.6
Normal control	150.3 ± 1.0	6.9 ± 0.5	93.9 ± 1.0	12.9 ± 0.6	4.1 ± 0.4
Fluxitine	148.0 ± 1.6	6.7 ± 0.3	94.9 ± 0.8	13.1 ± 0.5	4.2 ± 0.3
GABA	147.9 ± 1.6	7.1 ± 0.4	95.5 ± 1.7	12.6 ± 0.3	4.1 ± 0.4
Non-fermented	148.8 ± 2.3	6.8 ± 0.5	95.0 ± 1.9	12.8 ± 0.4	4.1 ± 0.3
0.5 M	147.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6	95.0 ± 1.1	12.5 ± 0.7	4.1 ± 0.7
M	148.0 ± 2.6	7.3 ± 0.5	95.0 ± 0.9	12.4 ± 0.8	4.0 ± 0.8

Fluoxetine: 20 mg/kg bw; GABA: 2.6 mg/kg bw; Non-fermented substrate contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; 0.5 M: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; M: 1 times of GABA dosage of *Monascus*-fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw.

Data are expressed as means ± SD (n = 12).

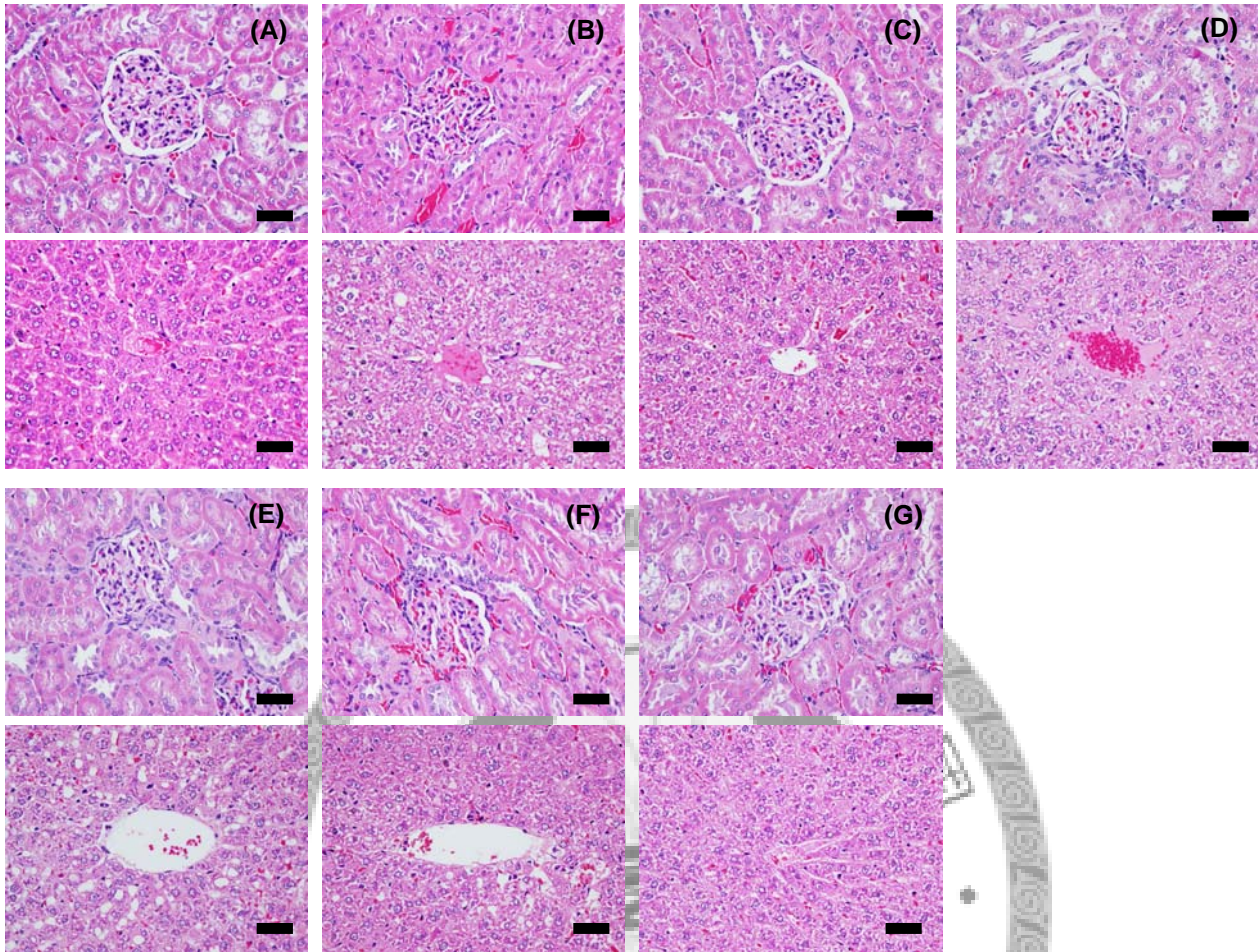


圖 4-4-8 不同實驗組別之肝、腎臟組織切片

A: 正常組；B: 控制組；C: 抗憂鬱藥劑組；D: GABA; E: 未發酵基質組; F: 0.5 倍 GABA 劑量紅麴發酵產物；G: 1 倍 GABA 劑量紅麴發酵產物 (■ = 3 μm)

上圖為腎臟切片，下圖為肝臟切片

Fig. 4-4-8 The tissue slice of liver and kidney in different experimental groups.

A: normal control; B: control; C: fluoxetine, 20 mg/kg bw; D: GABA, 2.6 mg/kg bw; E: non-fermented substrate, contains the same dosage of GABA 0.2 mg/kg bw; F: 0.5 times of GABA dosage of *Monascus* submerged fermented product, contains the same dosage of GABA 1.3 mg/kg bw; G: 1 time of GABA dosage of *Monascus* submerged fermented product, contains the same dosage of GABA 2.6 mg/kg bw. The above chart is the kidney slice, and liver slice behind it. (■ = 3 μm)

## 第五章 結論

### 1. GABA 生產菌株之挑選與固液態發酵比較

*M. purpureus* BCRC 31499 之發酵產物較其他六株紅麴菌株 *M. purpureus* BCRC 31615、*M. purpureus* BCRC 31530、*M. purpureus* BCRC 31540、*Monascus* sp. BCRC 32808、*Monascus* sp. S2 與 *Monascus purpureus* NTU 568 更具低 citrinin 高 GABA 之生產優勢。培養基質為在來米時，其 *M. purpureus* BCRC 31499 菌體生長速度與 GABA 產量均高於以蓬萊米與蓬萊糙米為培養基質；單一使用米糠、麥糠、脫脂大豆與酒糟等農業副產品進行培養時，因碳源不足而使 GABA 產量遠低於原本在來米培養基質。農業副產品與在來米進行等比例混合後，GABA 產量大幅提升，以米糠達最高 (178 mg/L)、脫脂大豆次之 (127 mg/L)。於固態發酵，為避免基質過於黏稠影響發酵，將米糠、麥糠、脫脂大豆與酒糟添加量設定為 10%，於發酵 10 天後，各組 GABA 產量並未明顯高於純在來米組，米糠及麥糠組 GABA 有較低之趨勢，脫脂大豆組 GABA 則略有提升，達 320 mg/kg。比較固態與液態發酵結果，固態發酵有利於 GABA 之生產，但發酵時間較液態發酵長，且會產生 1~2 ppm 的 citrinin；而固態發酵獲得每克 GABA 需費基質成本約台幣 134 元，液態發酵則為台幣 10 元。單以基質成本而言 *M. purpureus* BCRC 31499 以液態發酵進行生產 GABA 較固態發酵具有競爭力，本研究提供低成本 GABA 發酵液生產方法，適合應用於包裝飲料類商品。

### 2. 以 RSM 探討紅麴生產 GABA 最適培養條件

以紅麴菌生產 GABA，由前人研究歸納出主要影響條件可能為培養基碳氮比例、接菌量、培養時間 (與菌體生長有關)、培養溫度與 pH 值 (GAD 酵素作用環境)，培養基起始 pH 值於 2 時 GABA 產量最低 98 mg/L，pH 5 與 8 有較高濃度的 GABA，分別為 217 mg/L 與 178 mg/L。過低的 pH 值對菌體生長產生抑制

作用，而 pH 值大於 5 為較好的培養環境，GABA 產量相對提升，並推測 *M. purpureus* BCRC 31499 GAD 最適 pH 值活性範圍可能於 5~8 之間，而接種量 2%~11% 之間對於 *M. purpureus* BCRC 31499 的 GABA 生成量並無顯著影響。以陡升法探討隨著米糠添加比例的提升，GABA 產量也有相同之趨勢，但添加比例大於 50% 以後則 GABA 產量波動不大。以不同溫度對於 GABA 生成量進行討論，23°C 的低溫環境較不利於菌體生長，而 GABA 的產量也隨之降低；30°C 與 37°C 對於 GABA 產量無明顯變化。

以米與米糠添加比例、MSG 濃度與培養基起始 pH 值之三因子三階層進行反應曲面設計。培養基起始 pH 為 5 的環境下，從曲面圖中可得一高點，MSG 濃度為 110 mM~130 mM 與米糠添加量約為 60%~70% 之間，依其等高圖由 MSG 面至峰點較陡於米糠添加比例面至峰點顯示，米糠添加量為影響 GABA 生成之主要因子，MSG 為其附屬因子，同時得知低 pH 環境比鹼性環境中更不利 *M. purpureus* BCRC 31499 生產 GABA。將結果經迴歸分析後得到於米糠添加量 77.3%、MSG 濃度 122.6 mM、培養基起始 pH 值 6.3 時可得一理論產量 268 mg/L，經實驗結果 GABA 實際增加產量為 259.8 mg/L，每克 GABA 的基質生產成本由原先預估新台幣 10 元降低為 8.5 元。於發酵槽進行生產時，培養第三天 GABA 產量即達最高 (355 mg/L)，較原本搖瓶培養所需時間縮短了一半，顯示菌體生長加快，基質利用速度也相對提升。

### 3. 紅麴發酵產物抗憂鬱功效評估

強迫游泳短期試驗中，餵食 GABA 組於水中不活動時間顯著低於控制組，且具同劑量 GABA 之紅麴發酵產物也有相同效果，而 0.5 倍 GABA 劑量的紅麴發酵產物、未發酵組、抗憂鬱藥劑組 (百憂解) 與控制組並無顯著差異，證實短期試驗中 GABA 為主要具有改善憂鬱情緒之物質。於長期試驗，除餵食未發酵基質組外，其餘各組在強迫游泳不活動時間均顯著低於控制組，GABA 組與 0.5 倍

GABA 劑量之紅麴發酵產物有相同效果，而 1 倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物則與抗憂鬱藥劑組與控制組相比皆達極顯著差異 ( $p < 0.01$ )，紅麴發酵產物改善不活動時間的效果更較同劑量之 GABA 佳。

於腦內單胺物質分析結果顯示，強迫游泳會使大鼠腦中正腎上腺素、多巴胺及血清素同時下降，因而造成憂鬱之情緒，服用抗憂鬱藥劑-百憂解能提升正腎上腺素、多巴胺及血清素含量達到改善憂鬱之效果。而餵食 GABA 及富含 GABA 之紅麴發酵產物亦能提升海馬迴與杏仁核中正腎上腺素、多巴胺與血清素含量，推測發酵產物中主要提升單胺物質的功效成份為 GABA，但紅麴發酵產物對於海馬迴與皮質前區血清素的提升有較 GABA 更好的效果。由單胺代謝速率得知，紅麴發酵產物中除了 GABA 可減緩海馬迴及杏仁核內多巴胺代謝速率與降低所有組織中血清素的代謝速度，效果相似於抗憂鬱藥劑百憂解，更能促進海馬迴血清素分泌及抑制多巴胺於紋狀體與皮質前區代謝等額外效果。

服用百憂解會因食慾降低而造成體重的下降，但餵食 GABA、未發酵液與紅麴發酵液則無此副作用。強迫游泳試驗誘導憂鬱之組別其 AST (GOT)、ALT (GPT) 較正常組 (normal control) 高，而餵食純 GABA 可顯著降低 AST 值 ( $p < 0.05$ )，ALT 也較控制組 (control) 低；抗憂鬱藥劑組、GABA 與 1 倍 GABA 劑量之紅麴發酵產物組別之肌酐酸也顯著低於控制組。進一步將肝臟及腎臟進行組織切片，經判讀結果皆與正常組無顯著差異，顯示該試驗餵食之劑量與樣品並不會造成肝腎的損傷，且 GABA 另具有改善肝腎功能作用。

#### 4. 總結與未來展望

本研究以 *M. purpureus* BCRC 31499 利用農業副產品-米糠進行 GABA 的最適化生產，得到低成本的 GABA 發酵液，並於抗憂鬱動物模式中得知 GABA 可改善外界壓力所造成之憂鬱情緒，且長期餵食紅麴發酵產物抗憂鬱效果較純 GABA 佳，於腦內單胺物質分析也佐證發酵液中除 GABA 外還具有減緩多巴胺

代謝之物質，而食用劑量換算為人大約每人每天 80 ~ 100 mL 發酵液，相當於一罐養樂多體積，因此富含 GABA 之紅麴發酵產物於成本及抗憂鬱功效上都相當具有市場潛力。由於試驗中發現紅麴發酵產物主要作用於多巴胺系統，提升多巴胺量與減緩其代謝，可能影響機制為抑制單胺氧化酶作用或減少單胺氧化酶表現。未來可嘗試以紅麴中已知的代謝產物及發酵液進一步萃取、純化，於體外試驗進行單胺氧化酶測試，探討是否為抑制單胺氧化之物質，進而探討其酵素與抑制劑間作用關係；亦或是以細胞或動物試驗藉由抗體染色，探討各物質是否會影響單胺氧化酶蛋白或其 RNA 量之表現，皆有助於釐清紅麴發酵產物對於多巴胺系統與改善憂鬱作用機制。



## 參考文獻

- 井上清他。1994。紅麴抽出物が本態性高血圧者の血圧に及ぼす影響。医学と薬学。31: 231-240。
- 孔凡鐘。1996。DSM-III-R 診斷準則手冊。合記出版社。台北。pp. 52。
- 玉田英明。1988。紅麴各種調味料之應用。食品及科學。July: 96-99。
- 白松、林向陽、阮榕生、鄭丹丹、劉玉環、何承雲。2005。γ-胺基丁酸的分布與製備。現代食品科技。21: 202-205。
- 江波。2008。GABA (γ-胺基丁酸) – 一種新型的功能食品因子。中國食品學報。8 (2): 1-4。
- 行政院主計處。2009。社會指標統計年報 2008。pp. 54。
- 佐藤喜吉。1936。東洋産 *Monascus* 屬分類に對する – 考察。日農化會誌。12: 583-586。
- 杉下朋子。2001。注目される GABA 富化素材の開発。食品と開發。36 (6): 17-18。
- 岡田忠司，杉下朋子，村上太郎，村井弘道，三枝喜代，堀野俊郎，小野田明彦，梶本修身，高橋 励，高橋丈夫。2000。γ-アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に對する効果。日本食品科学工学会誌。47: 596-603。
- 吳政倫。2008。含 γ-胺基丁酸與血管收縮素 I 轉化酶抑制劑紅麴山藥之最適化生產與降血壓功效評估。國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。
- 林姿岑。2000。紅麴二級代謝產物之發酵生產研究 – γ-胺基丁酸及 monacolin K。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 林親錄、王婧、陳海軍。2008。γ-胺基丁酸的研究進展。現代食品科技。24 (5): 496-500。
- 林讚鋒。1983。紅麴菌的鑑定及實用分類法。製酒科技專論彙論。5: 104-113。

- 胡維恆。2003。憂鬱症、精神分裂疾病與自殺。台灣精神醫學雜誌。3 (4): 44-47。
- 茅原 紘與杉浦友美。2001。近年の GABA 生理機能研究—腦機能改善作用，高血圧作用を中心に。食品と開発。36 (6): 4-6。
- 姜聖花、Mazumder T. K.、永井史郎。2001。アガリクス自己消化による GABA 高含有素材の開発。食品と開発。36 (6): 15-16。
- 區少梅。2002。吃 GABA 降血壓-神奇的  $\gamma$ -胺基丁酸。元氣齋出版社。
- 許祐榮。2005。菌種、培養條件和熱處理對紅麴二次代謝產物之影響。國立海洋大學食品科學系碩士論文。
- 張輝、姚惠源、薑元榮。2002。富含  $\gamma$ -胺基丁酸保健食品的研究與開發。食品與發酵工業。28 (9): 69-72。
- 張輝、徐滿英。2006。 $\gamma$ -胺基丁酸作用的研究進展。哈爾濱醫科大學學刊。40 (3): 267-269
- 陳明造、林坤炳、郭秀蘭與曾穎玉。1997。豬肉在紅麴菌、乳酸菌和酵母菌等培養液浸漬期間色澤、TBA 及 VBN 的變化。中華農學會報。181: 68-75。
- 陳彥霖、李昭蓉、陳建州與袁國芳。1998。紅麴菌種的研究開發與應用。食品工業月刊。30: 1-10。
- 陳彥霖。2000。紅麴與高血壓。科學與技術。32: 54-59。
- 陳慶源、莊淑惠。2003。綜論紅麴產品之開發與應用。食品工業。35: 1-2。
- 葉伶宜。2002。紅麴菌之二次代謝產物及其分析方法簡介。食品工業。34 (11): 11-20。
- 楊海峰、葛竹興、鬱杰。2008。 $\gamma$ -胺基丁酸的急性毒性和蓄積毒性的研究。安徽農業科學。36 (13): 5464-5491。
- 趙健。1992。中國化學藥品大全。科學出版社。
- 冀林立、孟和畢力格。2007。 $\gamma$ -胺基丁酸的生理功能和研究進展。農產品加工學刊。12: 11-14。

- 澤井祐典、許斐健一、小高保喜。1999。嫌氣-好氣交互處理による茶葉の $\gamma$ -アミノ酪酸量の増加。Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 46 (7): 462-466。
- 樽井庄一。1993。紅麴的開發與利用。食品及科學。28: 47-50。
- 蘇遠志、陳文亮、方鴻源、翁浩慶與王文祥。1970。紅麴菌 (*Monascus anka*) 之菌學研究。中國農業化學會誌。21: 63-71。
- 蘇遠志。1978。紅麴色素之生產研究。食品科學。5: 4-7。
- 蘇遠志、黃冬梨。1981。紅麴色素之動物飼養實驗。國立台灣大學農學院研究報告。21: 98-112。
- 蘇遠志。2001。紅麴製品應用與市場概況。生物產業。12: 68-75。
- Abe, K., and Coppen, A. (1969). Personality and body composition in monozygotic twins with an affective disorder. Brit J Psychiat 115, 777-780.
- Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albersschonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., Springer, J. (1980). Mevinolin-a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme-A reductase and a cholesterol-lowering agent. P Natl Acad Sci-Biol 77, 3957-3961.
- Aniya, Y., Ohtani, I.I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., and Taira, J. (2000). Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. Free Radic Biol Med 28, 999-1004.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., and 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, 1018-1023.
- Balazs, R., Machiyam.Y, Hammond, B.J., Julian, T., and Richter, D. (1970). The

- operation of gamma-aminobutyrate bypath of tricarboxylic acid cycle in brain tissue *in-vitro*. *Biochem J* 116, 445-461.
- Bautista, G.M., Lugay, J.C., Cruz, L.J., and Juliano, B.O. (1964). Glutamic acid decarboxylase activity as viability index of artificially dried and stored rice. *Cereal Chem* 41, 188-191.
- Beach, S.R.H., Brody, G.H., Gunter, T.D., Packer, H., Wernett, P., and Philibert, R.A. (2010). Child maltreatment moderates the association of MAOA with symptoms of depression and antisocial personality disorder. *J Fam Psychol* 24, 12-20.
- Beaulieu, C. (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Research* 609, 284-292.
- Bjork, J.M., Moeller, F.G., Kramer, G.L., Kram, M., Suris, A., Rush, A.J., and Petty, F. (2001). Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psychiat Res* 101, 131-136.
- Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A.L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Laussac, J.P., and Goma, G. (1994). Pigments of *Monascus*. *J Food Sci* 59, 862-865.
- Borsini, F., and Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity. *Psychopharmacology* 94, 147-160.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J. (1997). The metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Plant Physiol* 115, 1-5.
- Briones-Aranda, A., Rocha, L., and Picazo, O. (2005). Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. *Pharmacol Biochem Behav* 80, 463-470.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1984). How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 251, 58-60.
- Budavari, S., Maryadele, J.O., Smith, A. and Heckelman, P.E. (1989). *The Merck Index*

11, 2330-2331.

Chen, W.P., Ho, B.Y., Lee, C.L., Lee, C.H., and Pan, T.M. (2008 a). Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* 32, 1694-1704.

Chen, P.J., Hsieh, C.L., Su, K.P., Hou, Y.C., Chiang, H.M., Lin, I.H., and Sheen, L.Y. (2008 b). The antidepressant effect of *Gastrodia elata* Bl. on the forced-swimming test in rats. *Am J Chin Med* 36, 95-106.

Cheng, F.-C., Kuo, J.-S., Shih, Y., Lai, J.-S., Ni, D.-R., and Chia, L.-G. (1993). Simultaneous measurement of serotonin, catecholamines and their metabolites in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with a microbore column and dual electrochemical detection. In *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, pp. 225-236.

Christensen, H.N., Greene, A.A., Kakuda, D.K., and Macleod, C.L. (1994). Special transport and neurological significance of 2 amino-acids in a configuration conventionally designated as D. *J Exp Biol* 196, 297-305.

Dang, H., Chen, Y., Liu, X., Wang, Q., Wang, L., Jia, W., and Wang, Y. (2009). Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* In Press, Corrected Proof.

Dannlowski, U., Ohrmann, P., Konrad, C., Domschke, K., Bauer, J., Kugel, H., Hohoff, C., Schoning, S., Kersting, A., Baune, B.T., Mortensen, L. S., Arolt, V., Zwitterlood, P., Deckert, J., Heindel, W., Suslow, T. (2009). Reduced amygdala-prefrontal coupling in major depression: association with MAOA genotype and illness severity. *Int J Neuropsychoph* 12, 11-22.

- Dekloet, E.R., Rosenfeld, P., Vaneeckelen, J.A.M., Sutanto, W., and Levine, S. (1988). Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73, 101-120.
- Deussing, J.M. (2006). Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3, 375-383.
- Drug Topics. (2008). Top 200 generic drugs by units in 2007. <http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/Top200Drugs/ArticleStandard/article/detail/491194>. (Retrieved in 2008.10.23.)
- Duman, R.S. (2002). Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatr* 7, S29-S34.
- Emrich, H.M., Vonzerssen, D., Kissling, W., Moller, H.J., and Windorfer, A. (1980). Effect of sodium valproate on mania - the GABA-hypothesis of affective-disorders. *Arch Psychiat Nerven* 229, 1-16.
- Endo, A. (1979). Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)* 32, 852-854.
- Endo, A., Hasumi, K., Nakamura, T., Kunishima, M., and Masuda, M. (1985). Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites which inhibit cholesterol biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 38, 321-327.
- Fabre, C.E., Santerre, A.L., Loret, M.O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., and Blanc, P.J. (1993). Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *J Food Sci* 58, 1099-1102.
- Ford, Y.Y., Ratcliffe, R.G., and Robins, R.J. (1996). Phytohormone-induced GABA production in transformed root cultures of *Datura stramonium*: An in vivo N-15 NMR study. *J Exp Bot* 47, 811-818.
- Fougere, F., Lerudulier, D., and Streeter, J.G. (1991). Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of *Alfalfa (Medicago-Sativa L)*. *Plant Physiol* 96, 1228-1236.

- Frazer, A. (1997). Pharmacology of antidepressants. *J Clin Psychopharm* 17, S2-S18.
- Giovanni, M. (1983). Response-surface methodology and product optimization. *Food Technol-Chicago* 37, 41-45.
- Glowinski, J., and Iversen, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in rat Brain .I. Disposition of [<sup>3</sup>H]Norepinephrine [<sup>3</sup>H]Dopamine and [<sup>3</sup>H]Dopa in various regions of brain. *Journal of Neurochemistry* 13, 655-669.
- Hagop, S. and Akiskal, M.D., (2005). Mood disorders: historical introduction and conceptual overview. In: Sadock, B.J. and Sadock, V.A. eds. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1284-1297.
- Hajjaj, H., Blanc, P.J., Groussac, E., Goma, G., Uribelarrea, J.L., and Loubiere, P. (1999). Improvement of red pigment citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnol Bioeng* 64, 497-501.
- Hale, A.S. (1993). New antidepressants - Use in high-risk patients. *J Clin Psychiat* 54, 61-70.
- Handoyo, T., and Morita, N. (2006). Structural and functional properties of fermented soybean (tempeh) by using *Rhizopus oligosporus*. *Int J Food Prop* 9, 347-355.
- Hao, R.Y., and Schmit, J.C. (1993). Cloning of the gene for glutamate-decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochem J* 293, 735-738.
- Herbert, P., Barros, P., Ratola, N., and Alves, A. (2000). HPLC determination of amino acids in musts and port wine using OPA/FMOC derivatives. *J Food Sci* 65, 1130-1133.
- Herman, J.P., Renda, A., and Bodie, B. (2003). Norepinephrine-gamma-aminobutyric acid (GABA) interaction in limbic stress circuits: Effects of reboxetine on

- GABAergic neurons. *Biol Psychiat* 53, 166-174.
- Ho, B.Y., and Pan, T.M. (2009). The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 57, 8258-8265.
- Huang, Z.B., Xu, Y., Li, L.S., and Li, Y.P. (2008). Two new *Monascus* metabolites with strong blue fluorescence isolated from red yeast rice. *J Agr Food Chem* 56, 112-118.
- Jakobs, C., Jaeken, J., and Gibson, K.M. (1993). Inherited disorders of GABA-metabolism. *J Inherit Metab Dis* 16, 704-715.
- Jang, D.P., Lee, S.H., Park, C.W., Lee, S.Y., Kim, Y.B., and Cho, Z.H. (2009). Effects of fluoxetine on the rat brain in the forced swimming test: a [<sup>18</sup>F]FDG micro-PET imaging study. *Neurosci Lett* 451, 60-64.
- Jeun, J., Jung, H., Kim, J.H., Kim, Y.O., Youn, S.H., and Shin, C.S. (2008). Effect of the *Monascus* pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice. *Food Chemistry* 107, 1078-1085.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., and Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* 16, 1211-1227.
- Juzlová, P., Režanka, T., Martínková, L., and Kren, V. (1996 a). Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. *Phytochemistry* 43, 151-153.
- Juzlová, P., Martínková, L., and Kren, V. (1996 b). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *J Ind Microbiol* 16, 163-170.
- Kalueff, A.V., and Nutt, D.J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety* 24, 495-517.
- Karbon, E.W., Duman, R.S., and Enna, S.J. (1984). GABA<sub>B</sub> receptors and norepinephrine-stimulated camp production in rat-brain cortex. *Brain Research*

106, 327-332.

Kendler, K.S., Gatz, M., Gardner, C.O., and Pedersen, N.L. (2007). Clinical indices of familial depression in the Swedish twin registry. *Acta Psychiat Scand* 115, 214-220.

Kimura, K., Komagata, D., Murakawa, S., and Endo, A. (1990). Biosynthesis of monacolins - conversion of monacolin-J to monacolin-K (mevinolin). *J Antibiot* 43, 1621-1622.

Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A., and Nakanishi, T. (1987). Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 35, 2484-2489.

Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., and Kimura, T. (2007). Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering* 78, 556-560.

Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., and Kimura, T. (2007). Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering* 78, 556-560.

Kono, I., and Himeno, K. (2000). Changes in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci Biotech Bioch* 64, 617-619.

Krogsgaardlarsen, P., Frolund, B., Jorgensen, F.S., and Schousboe, A. (1994). GABA<sub>A</sub> receptor agonists, partial agonists, and antagonists - design and therapeutic prospects. *J Med Chem* 37, 2489-2505.

Kubicek, C.P., Hampel, W., and Rohr, M. (1979). Manganese deficiency leads to elevated amino-acid pools in citric-acid accumulating *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* 123, 73-79.

Kumar, S., and Punekar, N.S. (1997). The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in

- fungi. *Mycological Research* 101, 403-409.
- Lakshman, P.L.N., Toyokawa, Y., Toyama, H., Taira, T., and Yasuda, M. (2010). Purification and characterisation of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus*. *Food Chemistry* 121, 1216-1224.
- Lee, C.L., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2006). Synchronous analysis method for detection of citrinin and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J AOAC Int* 89, 669-677.
- Lee, C.L., Chen, W.P., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2007a). A simple and rapid approach for removing citrinin while retaining monacolin K in red mold rice. *J Agric Food Chem* 55, 11101-11108.
- Lee, C.L., Hung, H.K., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2007b). Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J Agric Food Chem* 55, 6493-6502.
- Lee, C.L., Hung, H.K., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2007c). Red mold dioscorea has greater hypolipidemic and antiatherosclerotic effect than traditional red mold rice and unfermented dioscorea in hamsters. *J Agric Food Chem* 55, 7162-7169.
- Lee, C.L., Kuo, T.F., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2007d). Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation. *J Neurosci Res* 85, 3171-3182.
- Lee, C.L., Kuo, T.F., Wu, C.L., Wang, J.J., and Pan, T.M. (2010). Red mold rice promotes neuroprotective sAPP $\alpha$  secretion instead of Alzheimer's risk factors and amyloid beta expression in hyperlipidemic Abeta40-infused rats. *J Agric Food Chem* 58, 2230-2238.

- Lee, B.J., Kim, J. S., Kang, Y.M., Lim, J.H., Kim, Y.M., Lee, M. S., Jeong, M.H., Ahn, C.B., and Je, J.Y. (2010). Antioxidant activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry* 122, 271-276.
- Lopez-Rubalcava, C., and Lucki, I. (2000). Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacol* 22, 191-199.
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8, 523-532.
- Manji, H.K., Drevets, W.C., and Charney, D.S. (2001). The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7, 541-547.
- Maras, B., Sweeney, G., Barra, D., Bossa, F., and John, R.A. (1992). The amino-acid-sequence of glutamate-decarboxylase from *Escherichia coli* - Evolutionary relationship between mammalian and bacterial enzymes. *Eur J Biochem* 204, 93-98.
- McCann, S.M., Vijayan, E., Negro-Vilar, A., Mizunuma, H., and Mangat, H. (1984). Gamma aminobutyric acid (GABA), a modulator of anterior pituitary hormone secretion by hypothalamic and pituitary action. *Psychoneuroendocrino* 9, 97-106.
- Mckinney, W.T., and Bunney, W.E. (1969). Animal model of depression I. Review of evidence - implications for research. *Arch Gen Psychiat* 21, 240-248.
- Narayan, V.S., and Nair, P.M. (1990). Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher-plants. *Phytochemistry* 29, 367-375.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.

- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki, I. (1998). Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J Dairy Sci* 81, 1486-1491.
- Nozaki, H., Date, S., Kondo, H., Kiyohara, H., Takaoka, D., Tada, T., and Nakayama, M. (1991). Ankalactone, a new alpha, beta-unsaturated gamma-lactone from *Monascus anka*. *Agr Biol Chem Tokyo* 55, 899-900.
- Oh, S.H., and Oh, C.H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol* 12, 248-252.
- Oh, S.H., Soh, J.R., and Cha, Y.S. (2003). Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J Med Food* 6, 115-121.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., and Takahashi, T. (2000). Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *J Jpn Soc Food Sci* 47, 596-603.
- Olsen, R.W., DeLorey, T. M. (1999). GABA and glycine. In Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R.W., et al., eds. *Basic neurochemistry*, sixth ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 335-346.
- Olsen, R.W. (2002). GABA. In Davis, K. L. and Coyle, J. T., eds. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 159-167.
- Othmer, E. and Othmer, S. C. (1994). *The clinical interview using DSM-IV*. America Psychiatric Press, 116-117.
- Ozawa, H., and Rasenick, M.M. (1991). Chronic electroconvulsive treatment augments coupling of the Gtp-binding protein-Gs to the catalytic moiety of adenylyl

- cyclase in a manner similar to that seen with chronic antidepressant drugs. *Journal of Neurochemistry* 56, 330-338.
- Petty, F. (1995). GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *Journal of Affective Disorders* 34, 275-281.
- Petty, F., and Sherman, A.D. (1981). Gabaergic modulation of learned helplessness. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 15, 567-570.
- Petty, F., Kramer, G.L., Moeller, M. and Jordan, S. (1993) In vivo modulation of serotonin release in frontal neocortex. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, DC, November 7-12.
- Popoli, M., Brunello, N., Perez, J., and Racagni, G. (2000). Second messenger-regulated protein kinases in the brain: Their functional role and the action of antidepressant drugs. *Journal of Neurochemistry* 74, 21-33.
- Porsolt, R.D., Lepichon, M., and Jalfre, M. (1977). Depression - new animal-model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Ramputh, A.L., and Bown, A.W. (1996). Rapid gamma-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiol* 111, 1349-1352.
- Rasheva, T., Kujumdzieva, A., and Hallet, J.N. (1997). Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain. *J Biotechnol* 56, 217-224.
- Reed, L.J. (1950). The occurrence of gamma-aminobutyric acid in yeast extract - Its isolation and identification. *J Biol Chem* 183, 451-458.
- Reid, I., Forbes, N., Stewart, C., and Matthews, K. (1997). Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model? *Psychopharmacology* 134, 365-367.
- Sachar, E.J., and Baron, M. (1979). Biology of affective disorders. *Annu Rev Neurosci* 2, 505-518.

- Sanacora, G., Mason, G.F., Rothman, D.L., and Krystal, J.H. (2002). Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiat* 159, 663-665.
- Schofield, P.R., Darlison, M.G., Fujita, N., Burt, D.R., Stephenson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T.A., Seeburg, P.H. and Barnard, E.A. (1987). Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328, 221-227.
- Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2009). Gamma-aminobutyric acid (GABA). In *Encyclopedia of Neuroscience*, R.S. Larry, ed. (Oxford, Academic Press), pp. 511-515.
- Schwacke, R., Grallath, S., Breitkreuz, K.E., Stransky, E., Stransky, H., Frommer, W.B., and Rentsch, D. (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11, 377-391.
- Sheline, Y.I. (2000). 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: The role of stress and medical comorbidity. *Biol Psychiat* 48, 791-800.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., and McLean, M.D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* 4, 446-452.
- Sherman, A.D., and Petty, F. (1982). Additivity of neurochemical changes in learned helplessness and imipramine. *Behav Neural Biol* 35, 344-353.
- Shiah, I.S., and Yatham, L.N. (1998). GABA function in mood disorders: An update and critical review. *Life Sciences* 63, 1289-1303.
- Shih, R.A., Belmonte, P.L., and Zandi, P.P. (2004). A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders. *Int Rev Psychiatr* 16, 260-283.

- Su, N.W., Lin, Y.L., Lee, M.H., and Ho, C.Y. (2005). Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J Agr Food Chem* 53, 1949-1954.
- Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T., and Pan, T.M. (2003). Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 41-46.
- Sun, T.S., Zhao, S.P., Wang, H.K., Cai, C.K., Chen, Y.F., and Zhang, H.P. (2009). 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* 228, 607-612.
- Suzdak, P.D., and Gianutsos, G. (1985). Differential coupling of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors to the noradrenergic system. *Journal of Neural Transmission* 62, 77-89.
- Taira, J., Miyagi, C., and Aniya, Y. (2002). Dimeric acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and heme protein-mediated oxidation. *Biochem Pharmacol* 63, 1019-1026.
- Tillakaratne, N.J.K., Medina-Kauwe, L., and Gibson, K.M. (1995). Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiology* 112, 247-263.
- Tiraboschi, E., Tardito, D., Kasahara, J., Moraschi, S., Pruneri, P., Gennarelli, M., Racagni, G., and Popoli, M. (2004). Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacol* 29, 1831-1840.
- Tsai, R.L., Ho, B.Y., and Pan, T.M. (2009). Red mold rice mitigates oral carcinogenesis in 7,12-Dimethyl-1,2-Benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Hamster. *Evid Based Complement Alternat Med*.

- Tzeng, D.S., Chien, C.C., Lung, F.W., and Yang, C.Y. (2009). MAOA Gene polymorphisms and response to mirtazapine in major depression. *Hum Psychopharm Clin* 24, 293-300.
- Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J Mol Catal B-Enzym* 10, 67-79.
- Vaz, S.H., Cristóvão-Ferreira, S., Ribeiro, J.A., and Sebastião, A.M. (2008). Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals. *Brain Research* 1219, 19-25.
- Wada, M., Kido, H., Ohyama, K., Ichibangase, T., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, M.N., Kuroda, N., and Nakashima, K. (2007). Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: Evaluation of grape seed, monascus, gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives. *Food Chemistry* 101, 980-986.
- Wang, J.J., Lee, C.L., and Pan, T.M. (2003a). Improvement of monacolin K, gamma-aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 669-676.
- Wang, J.J., and Pan, T.M. (2003b). Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *J Agric Food Chem* 51, 4824-4829.
- Wang, J.J., Pan, T.M., Shieh, M.J., and Hsu, C.C. (2006). Effect of red mold rice supplements on serum and meat cholesterol levels of broilers chicken. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 812-818.
- Wang, Y.Z., Ju, X.L., and Zhou, Y.G. (2005). The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiol* 22, 145-148.
- Wang, H. F., Tsai, Y. S., Lin, M. L., and Ou, A. S. (2006). Comparison of bioactive

- components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food Chem* 96, 648-653.
- Wells, B. G., DiPiro, J.T., Schwinghammer, T.L. and DiPiro, C.V. (2008). Major depressive disorder. In Broen, M. and Naglieri, C., eds. *Pharmacotherapy Handbook* 7<sup>th</sup>. America: McGraw-Hill, 778-798.
- Wong, C.G., Bottiglieri, T., and Snead, O.C., 3rd (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol* 54 Suppl 6, S3-12.
- Wong, H.C., and Bau, Y.S. (1977). Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron-ray and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus* went. *Plant Physiol* 60, 578-581.
- Wong, H.C., and Koehler, P.E. (1981). Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J Food Sci* 46, 589-592.
- World Health Organization. (2008). The global burden of disease: 2004 update. Switzerland, 44-51.
- World Health Organization. (2010). Depression. [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)
- Wu, C.L., Lee, C.L., and Pan, T.M. (2009). Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 57, 5035-5041.
- Yokoyama, S., Hiramatsu, J., and Hayakawa, K. (2002). Production of gamma-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J Biosci Bioeng* 93, 95-97.

# 附錄

## 附錄 1 動物試驗審查同意書

### 國立臺灣大學醫學院暨公衛學院動物實驗管理小組審查同意書 Affidavit of Approval of Animal Use Protocol

National Taiwan University College of Medicine and College of Public Health  
Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

動物實驗計畫申請表暨同意書編號：**20090200**

計畫申請人：潘子明 職稱：教授 單位：微生物與生化學研究所  
協同/共同主持人：外科 張金堅教授  
飼養地點：本院實驗動物中心  
實驗地點：本院實驗動物中心與動物行為測試核心實驗室  
計畫名稱：富含 GABA 之紅麴液態發酵產物於抗焦慮及抗憂鬱效果之探討  
計畫經費來源：自籌  
本計畫之「動物實驗申請表」業經動物實驗管理小組  實質  形式審查通過。  
本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物別	品系	年齡	數量/年	來源	計畫執行期限
Rat	Sprague-Dawley	4 週	84 隻/年	樂斯科生物科技公司	98.10.1~99.10.1

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Protocol Title: **Antidepressant and anxiolytic effects of Monascus submerged products with high GABA content in rats**

IACUC Approval No: **20090200**

Period of Protocol: Valid From: **10/1/2009** To: **10/1/2010** (mm/dd/yyyy)

Principle Investigator (PI) : **Pan Tzu-Ming**

動物實驗管理小組召集人：**林淑華**

日期：**98.10.22**

IACUC Chairman: **Shu-Wha Lin, Ph.D.**

Date: **October 22, 2009**



Institutional  
Animal Care and  
Use Committee  
(IACUC),  
NTUCM and  
NTUCPH  
2009.10.22  
15:47:44 +08'00'