

科技部補助專題研究計畫報告

發酵條件對乳酸菌生產 γ -氨基丁酸(GABA)之影響

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 108-2635-E-041-001-
執行期間：108年08月01日至109年07月31日
執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：王淑珍

計畫參與人員：大專生-兼任助理：陳伊曄
大專生-兼任助理：陳秉宏
大專生-兼任助理：朱嫻如

本研究具有政策應用參考價值：☒否 ☐是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：☐否 ☐是

中 華 民 國 109 年 11 月 06 日

中文摘要：γ-氨基丁酸 (γ-aminobutyric acid, GABA)，是專利乳酸菌菌株 B0091 發酵的產物。經 glutamate decarboxylase (GAD) 檢測，B0091、B0088、B0059 具有 gadB1 及 gadB2 基因。以 MRS 為培養基，添加 2 % monosodium glutamate (MSG)，發酵時間 24 小時，以 B0091 所生產之 GABA 含量較高。以 B0091 為發酵菌種，MRS 為培養基，試驗結果，發酵時間 72 小時，GABA 含量較高；MSG 添加量 6%，GABA 含量較高；以此條件進行 B0091 發酵，GABA 含量為 811 μg/mL；以 3% yeast extract + 5% soymilk powder + 2% glucose 為培養基取代 MRS，添加 6% MSG，發酵 72 小時，GABA 含量為 1038 μg/mL；5L 發酵槽發酵後，經濃縮至恆重，回收率為 12.25%，GABA 含量為 7.30 mg/g；以 100L 發酵液進行賦形劑試驗，經多次試驗，不同賦形劑(含量 30%、40% 及 50%) 與濃縮物 1:1 (v/v) 方式混和，效果皆不好。以添加脫脂奶粉及玉米澱粉為賦形劑，回收率 22.50%，GABA 含量為 3.58±0.086 mg/g。

中文關鍵詞：γ-氨基丁酸、谷氨酸鈉、谷氨酸脫羧酶

英文摘要：γ-aminobutyric acid (GABA) is a fermentation product of patented lactic acid bacteria strain B0091. B0091, B0088, and B0059 have gadB1 and gadB2 gene after detected with glutamate decarboxylase (GAD). With MRS as the medium, 2% monosodium glutamate (MSG) is added, the fermentation time is 24 hours, and the GABA content produced by B0091 is higher than others. Using B0091 as the fermentation strain and MRS as the medium, the test results showed that the fermentation time was 72 hours and the GABA content was higher; MSG was added at 6%, and the GABA content was higher; B0091 was fermented under this condition, and the GABA content was 811 μg/mL; Use 3% yeast extract + 5% soymilk powder + 2% glucose as the medium to replace MRS, add 6% MSG, and fermentation time for 72 hours. The GABA content is 1038 μg/mL; after fermentation in a 5L fermentation tank, it is concentrated to constant weight and the recovery rate is 12.25%, GABA content is 7.30 mg/g; 100L fermentation broth is used for excipient test, after many tests, different excipients (content 30%, 40% and 50%) and concentrate 1:1 (v/v) mixed, the effect is not good. With the addition of skimmed milk powder and corn starch as excipients, the recovery rate was 22.50%, and the GABA content was 3.58±0.086 mg/g.

英文關鍵詞：γ-aminobutyric acid, monosodium glutamate, glutamate decarboxylase

計畫摘要

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)，是專利乳酸菌菌株 B0091 發酵的產物。經 glutamate decarboxylase (GAD) 檢測，B0091、B0088、B0059 具有 gadB1 及 gadB2 基因。以 MRS 為培養基，添加 2 % monosodium glutamate (MSG)，發酵時間 24 小時，以 B0091 所生產之 GABA 含量較高。以 B0091 為發酵菌種，MRS 為培養基，試驗結果，發酵時間 72 小時，GABA 含量較高；MSG 添加量 6% ，GABA 含量較高；以此條件進行 B0091 發酵，GABA 含量為 811 $\mu\text{g/mL}$ ；以 3% yeast extract + 5% soymilk powder+2% glucose 為培養基取代 MRS，添加 6% MSG，發酵 72 小時，GABA 含量為 1038 $\mu\text{g/mL}$ ；5L 發酵槽發酵後，經濃縮至恆重，回收率為 12.25%，GABA 含量為 7.30 mg/g；以 100L 發酵液進行賦形劑試驗，經多次試驗，不同賦形劑(含量 30%、40%及 50%) 與濃縮物 1:1(v/v)方式混和，效果皆不好。以添加脫脂奶粉及玉米澱粉為賦形劑，回收率 22.50%，GABA 含量為 3.58 ± 0.086 mg/g。

關鍵詞： γ -氨基丁酸、谷氨酸鈉、谷氨酸脫羧酶

英文摘要

γ -aminobutyric acid (GABA) is a fermentation product of patented lactic acid bacteria strain B0091. B0091, B0088, and B0059 have gadB1 and gadB2 gene after detected with glutamate decarboxylase (GAD). With MRS as the medium, 2% monosodium glutamate (MSG) is added, the fermentation time is 24 hours, and the GABA content produced by B0091 is higher than others. Using B0091 as the fermentation strain and MRS as the medium, the test results showed that the fermentation time was 72 hours and the GABA content was higher; MSG was added at 6%, and the GABA content was higher; B0091 was fermented under this condition, and the GABA content was 811 $\mu\text{g/mL}$; Use 3% yeast extract + 5% soymilk powder+2% glucose as the medium to replace MRS, add 6% MSG, and fermentation time for 72 hours. The GABA content is 1038 $\mu\text{g/mL}$; after fermentation in a 5L fermentation tank, it is concentrated to constant weight and the recovery rate is 12.25%, GABA content is 7.30 mg/g; 100L fermentation broth is used for excipient test, after many tests, different excipients (content 30%, 40% and 50%) and concentrate 1:1 (v /v) mixed, the effect is not good. With the addition of skimmed milk powder and corn starch as excipients, the recovery rate was 22.50%, and the GABA content was 3.58 ± 0.086 mg/g.

Key words: γ -aminobutyric acid, monosodium glutamate, glutamate decarboxylase

(一)前言

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)是一種天然存在人體中的胺基酸，為哺乳動物中樞神經系統中重要的抑制性神經傳遞物質，GABA 可以抑制或阻斷神經細胞過度興奮，使心情平靜放鬆。GABA 普遍被公認具有調節自律神經、減緩緊張、減少壓力、提高免疫力、改善身體機能、改善睡眠，並對高血壓有緩解和作用(Komatsuzaki et al., 2005)。GABA 可以用化學方式合成，但依現行法規無法應用於食品中。生物體中 GABA 是代謝的終產物，由 glutamate decarboxylase (GAD)將 L-glutamic acid 去梭作用(decarboxylation)而來。以植物萃取之 GABA 含量低且價格昂貴(Liao et al., 2013)。因此，以乳酸菌發酵生產富含 GABA 之發酵產品漸被大家所重視(Liu et al., 2011)。

近年來許多研究指出乳酸菌菌種具有生產 GABA 能力。乳酸菌具有 GAD 活性，目前有許多研究利用乳酸菌發酵來生產 GABA。Renes et al. (2017)以 *L. brevis* 之 gadB1 及 gadB2 引子進行 GAD 基因之檢測，並進行生產 GABA 菌株之篩選。由泡菜分離之乳酸乳桿菌(Kim et al., 2009)、由酒粕中分離之 *Lactobacillus brevis*(Yokoyama et al., 2002)、由發酵魚製品分離出 *Lactobacillus paracasei* (Komatsuzaki et al., 2005)、由起司和乳製品中分離之 *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 皆可發酵生產 GABA(Park and Oh, 2007)。另有學者指出控制發酵條件及培養基組成可增加 GABA 含量，Zhang et al. (2012)利用 *L. brevis* 厭氧下培養於含 7% monosodium glutamate (MSG)之培養基控制 pH 發酵 66 小時，GABA 增加為 7.1 g/L；以 *L. brevis* FPA 3709 發酵紅豆泥、黃豆泥及黑豆泥，發現黑豆泥的 GABA 含量最高為 2.20 mg/mL (Ko et al., 2013)；控制脫脂奶的濃度、MSG 濃度及發酵溫度，以 *L. plantarum* NT102 發酵脫脂奶，可產生 8% to 12% nonfat solids supplemented (Tung et al., 2011)。*Lactobacillus plantarum* 發酵 wheat-based fermented rice(dosa)生產 GABA，經 120 小時發酵，GABA 含量 143 mg/kg (Zareian et al., 2015)；*L. lactis* and *L. rhamnosus* GG 發酵紅豆泥(紅豆:水=1:10)經 24 小時，GABA 含量 16.46 mg/100 mL；將培養基、培養溫度、pH 調整至最佳發酵條件，經 24 小時發酵 GABA 提高至 68.81 mg/100 ml(Liao et al., 2013)。由上述發現乳酸菌種類、培養基組成及培養條件對提升 GABA 含量具有一定的影響(Liao et al., 2013)。鑒於乳酸菌種類、培養基組成及培養條件有助於提升 GABA 含量，本研究擬進行蛋白質類培養基對 GABA 含量生產之探討；亦探討發酵時間、monosodium glutamate(MSG)含量對 GABA 生成之影響。進一步進行 5 公升及 100 公升試量產，找出試量產最佳發酵條件，將來可進一步將研發之產品進行推廣。

(二) 研究方法、進行步驟及執行進度。

1. 材料

- (1) 菌株:本計畫使用之菌株為南部地區植物或農產品發酵物中分離之乳酸菌(經濟部學界科專計畫)，有 B0007、B0022、B0014、B0015、B0059、B0060、B0096、B0137、B0018、B0019、B0020、B0052、B0088 及 CNU091 等共 159 株進行分析。
- (2) 乳酸菌培養基:如 MRS(作為對照組)，蛋白質如黃豆粉、黃豆蛋白質、乳清蛋白質、脫脂奶粉等。蛋白質水解產品有 yeast extract 等及 Na-glutamate。賦形劑如 soy milk powder、skim

milk powder、lactose、海藻糖、玉米澱粉、果寡糖或麥芽糊精等。

2.方法

(1)乳酸菌種培養及 glutamate decarboxylase (GAD)檢測

(a) 菌株保存及活化

從 -20°C 冷凍櫃取出乳酸菌，取 1% 菌液接種至 5mL 液態 MRS 培養基，培養 37°C，24hr，為第一次活化，而後再取 1% 的發酵液至 5mL 新鮮液態培養基，以 37°C，培養 24hr 為二次活化，重覆一次活化步驟為第三次活化菌種。以第三次活化之菌液進行實驗，另取第三次活化之菌液與甘油以 1:1 的比例至冷凍保存瓶，震盪均勻，保存於 -20°C 冷凍櫃備用。

(b)乳酸菌種 GAD 篩選

*乳酸菌種 GAD 基因檢測:擬採用 PCR 反應確認試驗之乳酸菌是否具有 GAD 基因。以 Renes et al (2017)分離之 *Lactobacillus brevis*，gadB1 及 gadB2 基因引子進行 PCR 分析。

gadB1 (*L. brevis*)引子:

brevB1f AGGCAGTGTCGAAGCCGGGCAA 及

brevB1r : CATGGATGGGCGTACCACGATCC，擴增後 PCR 產物長度約 1300 bp。

gadB2 (*L. brevis*)引子:

brevB2f :CTCGCCACGTTCTGTCAGACTTACATGG 及

brevB2r : TCATCAATAAAGTCGTGGGGCCATACTCATACC，擴增後 PCR 產物長度約 1100 bp。

*PCR 反應

依以 Renes et al (2017)方法修飾後進行，5 μ L DNA，2.5 units of DNA polymerase 2 μ L，10 mM dNTP，5 μ L 10 x reaction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C) containing 50 mM KCl, 0.01% Triton X-100, 0.01% gelatin, 6.0 mM MgCl₂), and 50 pmol 的 primers 總體積 50 μ L，反應條件 94 °C for 5 min，之後進行 94°C 40 sec, 50 °C 50sec, and 72 °C 30 秒，共 35 循環，最後 72°C 5min。以電泳進行確認。

(2) GABA 檢測平台之建立(李 2009)

取 100 μ l 不同濃度標準品或乳酸菌發酵上清液,置於烘箱中使其揮發至乾，再以 20 μ l 溶劑 (Ethanol : Water : Triethyl amine(V/V/V，2 : 2 : 1))回溶後進行乾燥，再加入 30 μ l 溶劑 (Ethanol : Water : Triethylamine : PITC(phenylisothiocyanate)((V/V/V，7 : 1 : 1: : 1))回溶，反應 20 分鐘，進行乾燥。將乾燥物以 100 μ l 移動相(組成如下)回溶，以 0.22 μ m 濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以不同濃度標準品進行標準曲線之製作，求得 GABA 之濃度。建立 HPLC 之 GABA 檢測分析條件，找出最適移動相及比例及流速探討，標準曲線 r² 值達 0.99 以上。移動相:

A 液:Sodium acetate 4.1 g, Water 500 mL, pH 5.8; B 液:Acetonitrile : water = 60:40, pH 5.8。

TIME (min)	比例	
	移動相 A%	移動相 B%
0	100	0
40	60	40
50	60	40

(3) GABA 生產菌鑑定及篩選

(a) 菌種鑑定

將所萃取的乳酸菌菌株之 Genomic DNA 進行 16S rDNA 的增幅反應。分別加入 5 μ L 的 DNA、2.5 mM dNTP 2.5 μ L、10 $\times$ PCR buffer 5 μ L、primer 1 (27F)、primer 2 (1492R) (Michael et al, 2000) (30 pmole/ μ L) 1.6 μ L 及 5 U 的 ExSel high DNA polymerase 0.04 μ L，補充無菌水至總量 50 μ L，進行 PCR 反應 (GeneAmp PCR system)。反應條件開始以 94 $^{\circ}$ C 10 分鐘以及 94 $^{\circ}$ C 30 秒、45 $^{\circ}$ C 40 秒鐘、72 $^{\circ}$ C 30 秒、進行 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 維持 10 分鐘。將 PCR 產物以 1.8% agarose gel 於 1 x TBE buffer 中進行電泳分離，置於 UV Box 下觀察。PCR 產物送成功大學基因體中心進行序列分析。將序列與 NCBI 進行序列比對。

(b) GABA 生產菌之篩選

乳酸菌種接種 3% 於含 2% MSG 之 MRS 培養基，菌株培養 35 $^{\circ}$ C，24 小時後。取 1ml 離心 (12000 $\times$ g，10 min) 取上清液分析 GABA 含量、pH 及測菌數含量之測定。GABA 測定:取上清液與 32%TCA 以 1:1(v/v)，經離心，取 100 μ L 上清液進行 GABA 衍生及 HPLC 測定。

(4) 探討培養時間對乳酸菌生產 GABA 之影響

(a) 發酵時間對乳酸菌生產 GABA 之探討

乳酸菌培養於 2% MSG 之 MRS 培養基，進行培養時間探討，分別於 24、36、48 及 72 小時進行取樣，並分析 GABA 含量、pH 及菌數含量之測定，找到最適發酵時間。

(b) MSG 含量對乳酸菌生產 GABA 之探討

乳酸菌培養於 2%、4%、6%、8% MSG 之 MRS 培養基，最適培養時間，並分析 GABA 含量、pH 及菌數含量之測定，找到最適 MSG 濃度。

(c) 蛋白質或其水解產物對乳酸菌生產 GABA 之探討 (Grygorczyk and Corredig, 2013)

乳酸菌培養基使用的蛋白質有 yeast extract、黃豆粉、黃豆蛋白、脫脂奶粉、乳清蛋白等蛋白質含量高者，則經蛋白酶進行部分水解，另添加適量 6% MSG，於 37 $^{\circ}$ C 培養 72 小時，取上清液與 100 μ L 分析 GABA 含量、pH 及測菌數含量之測定。取 GABA 含量高者進行下列實驗。

(5) 擴大發酵

(a) 5 公升發酵條件探討

將上述最佳生產 GABA 條件，進行 1 公升搖瓶試驗，修正發酵條件，接著進行 5 公升試驗 (實際發酵 3L)，發酵條件控制 37 $^{\circ}$ C，pH 控制 5.0，發酵 72 小時，進行收槽。測定 GABA 含量、pH 及測菌數含量之測定。取 GABA 含量高者進行下列實驗。發酵液離心 8000rpm，

取上清液 1500ml 進行減壓濃縮，溫度定為 70 °C，接著烘箱(50 °C)烘乾，烘約 38 小時至恆重，取出秤重。計算回收率、菌數及 GABA 含量。

(b)100 公升發酵試量產

將上述 5 公升最佳生產 GABA 條件，再進行 100 公升(實際發酵 60L) 發酵槽試驗，發酵條件與 5 公升發酵槽一樣，發酵條件控制 37°C，pH 控制 5.0，發酵 72 小時，進行收槽。

(c)產品凍乾試驗及添加賦形劑之探討

(a)收槽後，離心後上清液：將發酵培養液進行離心，取上清液 3000mL 進行濃縮，添加不同的賦型劑後先冷凍，再進行冷凍乾燥，使用的賦型劑有(1)skim milk powder、lactose 一組、(2)海藻糖、skim milk powder、lactose，(3)豆粉、乳糖，或(4)skim milk powder、玉米澱粉等。乾燥粉末分析 GABA 含量。

(三)結果

1. 乳酸菌種培養及 glutamate decarboxylase (GAD)基因檢測

以 GAD 基因引子 BrevB1f-BrevB1r 及 BrevB2f-BrevB21r，引子 BrevB1f-BrevB1r 經 PCR 擴增，PCR 產物大小為 1.3 kb，選擇 PCR 產物為 1.2-1.4Kb 之菌種 (圖一)進行試驗；引子 BrevB2f-BrevB21r，PCR 產物大小為 1.1 kb，選擇 PCR 產物大小 1.0-1.1Kb 之菌種 (表一)，同時具有此二特徵之菌種為 B0059、B0088、B0091 及商業菌株 A 菌及 Bb12 菌，PCR 產物圖如圖一及二。以此 5 株菌種進行培養條件探討。

2. γ -aminobutyric acid (GABA)生產菌之篩選及菌種鑑定

(1) GABA 檢測平台建立

GABA 標準曲線的建立如圖二。另由於吸光的波長在 254nm，培養基中有很多的蛋白質及胺基酸，皆在 254nm 有吸光值，故以內標準品進行確認 (圖三)，確認 GABA 的圖譜位置。

(2) GABA 生產菌鑑定

以 16S rDNA 進行 PCR 及定序，經確認 B0059 為 *Lactobacillus casei*；B0088 及 B0091 為 *Lactobacillus plantarum*，其核酸相似度為 99%(表二)。

3. GABA 生產菌篩選

(1) 不同菌株培養 24 小時探討 GABA 含量：

乳酸菌種接種 3%於含 2% MSG 之 MRS 培養基，菌株培養 37°C，24 小時後。分析 GABA 含量、pH 及菌數含量之測定。由表三發現 B0059、B0088、B0091 及商業菌株 A 菌及 Bb12 菌經 37°C培養 24 小時後，pH 為 4.01~4.58；菌數 $1.06\sim4.05\times10^9$ CFU/mL；B0091 之 GABA 含量為 226 μ g/mL；B0059 之 GABA 含量為 154.00 μ g/mL；其餘菌株 GABA 含量較低，故往後實驗以 B0091 為探討對象。

(2) B0091 培養時間之 GABA 含量探討：

B0091 種接種 3%於含 2% MSG 之 MRS 培養基，菌株培養 37°C，24 至 72 小時後。分析 GABA 含量、pH 及菌數含量之測定。由表四發現 B0091 菌經培養 24 小時後，pH 為 4.12；菌數 4.05×10^9 CFU/mL；B0091 之 GABA 含量為 226 μ g/mL；B0091 培養 36 小

時後，pH 為 4.11；菌數 4.13×10^9 CFU/mL；GABA 含量為 309 μ g/mL；B0091 培養 48 小時後，pH 為 4.13；菌數 5.20×10^7 CFU/mL；GABA 含量為 425 μ g/mL；B0091 培養 72 小時後，pH 為 4.13；菌數 5.80×10^7 CFU/mL；GABA 含量為 554 μ g/mL。培養時間對 pH 變化沒有影響，培養 48 小時後，可能由於酸的影響，菌數下降約 2 log 值，GABA 含量則逐漸增加，故培養時間定為 72 小時。

(3) Monosodium glutamate (MSG)含量對 B0091 生產 GABA 之影響:

MSG 添加量為 2%~8%，培養 37 $^{\circ}$ C，時間為 72 小時，分析 GABA 含量、pH 及菌數含量之測定。結果如表五所示。添加 2% MSG，B0091 菌經培養 72 小時後，pH 為 4.12；菌數 1.01×10^7 CFU/mL；B0091 之 GABA 含量為 518 μ g/mL；添加 4% MSG，pH 為 4.32；菌數 1.81×10^7 CFU/mL；GABA 含量為 571 μ g/mL；添加 6% MSG，pH 為 4.50；菌數 1.88×10^7 CFU/mL；GABA 含量為 811 μ g/mL；添加 8% MSG，pH 為 4.65；菌數 1.93×10^7 CFU/mL；GABA 含量為 834 μ g/mL。MSG 含量對 pH 及菌數影響不明顯，但 GABA 含量再添加 2%及 4% MSG 沒有差異，但 MSG 添加量為 6%時，GABA 有明顯上升，故 MSG 含量定為 6%。

3. GABA 發酵生產

(1) 發酵培養基製備

經上述條件探討，培養時間 72 小時、MSG 添加量為 6%，以此條件進行發酵培養基的探討。經過測試，發現 yeast extract 及 soymilk powder 經 alcalase 水解 1 小時，B0091 培養效果較佳，故以 yeast extract 及 soymilk powder 經 alcalase 水解 1 小時，探討。培養基(1)1.5% yeast extract + 3% soymilk powder+2% glucose；(2) 2% yeast extract + 4% soymilk powder+2% glucose；(3) 3% yeast extract + 5% soymilk powder+2% glucose；B0091 培養時間 72 小時，MSG 添加量 6%，結果如下所述。培養基(1)，pH 為 4.22；菌數 3.00×10^8 CFU/mL；GABA 含量為 811 μ g/mL；培養基(2)，pH 為 4.22；菌數 3.13×10^8 CFU/mL；GABA 含量為 823 μ g/mL；培養基(3)，pH 為 4.21；菌數 3.41×10^8 CFU/mL；GABA 含量為 1038 μ g/mL；與對照組 MRS 比較，發酵培養基菌數提高 10 倍；由於搖瓶發酵，未控制 pH，故 pH 仍然 4.21-4.22；培養基(3)其 GABA 含量達到 1038 μ g/mL，故 5L 發酵槽以培養基(3)進行。

(2) 5L 發酵培養

培養基為 3% yeast extract + 5% soymilk powder+2% glucose；B0091 接種 3%，培養時間 72 小時，MSG 添加量 6%發酵 72 小時，結果如表八所是。由於控制 pH 為 5.0，菌數維持 2.17×10^9 CFU/mL，GABA 含量為 7.30 ± 0.067 mg/g；固體回收率為 12.25%，但烘乾之物質，仍為黏稠狀，故 100L 發酵液進行賦形劑試驗。

(3) 100L 發酵培養

以 5L 發酵之條件進行 100L 發酵。離心後，由於濃縮機限制，取發酵液進行濃縮，由於黏稠度高，添加不同量(30%、40%、50%)賦形劑，與濃縮泥 1:1(v/v)混和，經過幾次試驗，凍乾後仍無法達到粉末狀要求。經過多次試驗，在添加賦形劑的輛不限於 1:1 (v/v)，進行冷凍後，凍乾後收率 22.50%。控制 pH 為 5.0，菌數維持 2.03×10^9 CFU/mL，GABA 含量為 3.58 ± 0.086 mg/g。由於前幾次試驗，凍乾後仍然優些黏稠，以至於賦形劑

量太多，體積變大，GABA 含量稍有下降(3.58 ± 0.086 mg/g)，但 GABA 總量仍維持一定。配方培養基 3% yeast extract + 5% soymilk powder+2% glucose，經乳酸菌發酵後，黏稠度增加，下降 yeast extract 含量或 soymilk powder 含量或許可以減少黏稠度，或尋找更好的賦形劑，以提高粉狀產品中 GABA 含量。

表一 PCR 產物 1100-1500bp 之菌株

Table 1 The PCR products of the GAD gene

Strains	BrevB1f-BrevB1r primer 1.3Kb	BrevB2f-BrevB21r primer 1.1Kb
B0059	1.2~1.3Kb	1.0-1.1Kb
B0088	1.2-1.4Kb	1.1Kb
B0091	1.3-1.4Kb	1.0-1.1Kb
A 菌	1.2-1.4Kb	—
Bb12	1.3-1.4Kb	—

GAD: glutamate decarboxylase

表二 乳酸菌分離株之 16S rDNA 核酸序列相似度

Table 2. Identification of LAB isolates based on 16S rDNA sequence similarity

Strain	Species	Genebank acc. No.	Similarity (%)
B0059	<i>Lactobacillus casei</i>	NC008526.1	99
B0088	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HM058789	99
B0091	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HM162417	99

表三 乳酸菌發酵 24 小時菌數、pH 及 GABA 含量

Table 3 The pH, cell number and GABA content of lactic acid bacteria after 24 hours fermentation

Strains	Cell no. (CFU/mL)	pH	GABA(μ g/mL)
B0091	4.05×10^9	4.12	226.00 $\pm$ 4.70
B0088	1.06×10^9	4.11	10.00 $\pm$ 1.00
B0059	3.70×10^9	4.58	154.00 $\pm$ 5.52
A 菌	1.23×10^9	4.12	56.00 $\pm$ 0.20
Bb12	3.90×10^9	4.10	70.00 $\pm$ 3.20

* 2% mono sodium glutamate(MSG) was added

*GABA: γ -aminobutyric acid

表四 B0091 培養不同時間之菌數、pH 及 GABA 變化

Table 4 Effect of different incubation time on GABA content

Strain	Time (hr)	Cell no. (CFU/mL)	pH	GABA(μ g/mL)
B0091	24	4.05×10^9	4.12	226.00 $\pm$ 4.70
	36	1.43×10^9	4.11	309.00 $\pm$ 6.50
	48	5.20×10^7	4.13	425.00 $\pm$ 11.00
	72	5.80×10^6	4.13	554.00 $\pm$ 4.50

*GABA: γ -aminobutyric acid

表五 添加不同含量 MSG 對 B0091 產生 GABA 之影響

Table 5 Effect on different concentration of MSG on GABA content

Strain	MSG concentration	Cell no.	pH	GABA(μ g/mL)
B0091	2%	1.01×10^7	4.12	518 $\pm$ 7.25
	4%	2.11×10^7	4.34	571 $\pm$ 13.00
	6%	1.88×10^7	4.50	811 $\pm$ 1.00
	8%	1.93×10^7	4.65	834 $\pm$ 2.10

*GABA: γ -aminobutyric acid

表六 不同配方培養基對 B0091 生產 GABA 之影響

Table 6 Effect of different medium on GABA content

Medium	Cell no.(CFU/mL)	pH	GABA($\mu\text{g/mL}$)
MRS	1.88×10^7	4.50	811 $\pm$ 3.30
1.5% yeast extract + 3% soymilk powder	3.0×10^8	4.22	811 $\pm$ 17.13
2% yeast extract + 4% soymilk powder	3.13×10^8	4.22	823 $\pm$ 15.20
3% yeast extract + 5% soymilk powder	3.41×10^8	4.21	1038 $\pm$ 15.15

¹Incubation time 72 小時

²MSG was added 6%

³ Medium was hydrolyzed with alcalase for 1 hour

⁴ GABA: γ -aminobutyric acid

表七 5L 發酵槽發酵之 GABA 含量

Table 7 GABA contents of 5L fermentation

Medium	Cell no. (CFU/mL)	Recovery (%)	GABA (mg/g)
3% yeast extract + 5% soymilk powder	2.17×10^9	12.25	7.30 $\pm$ 0.067

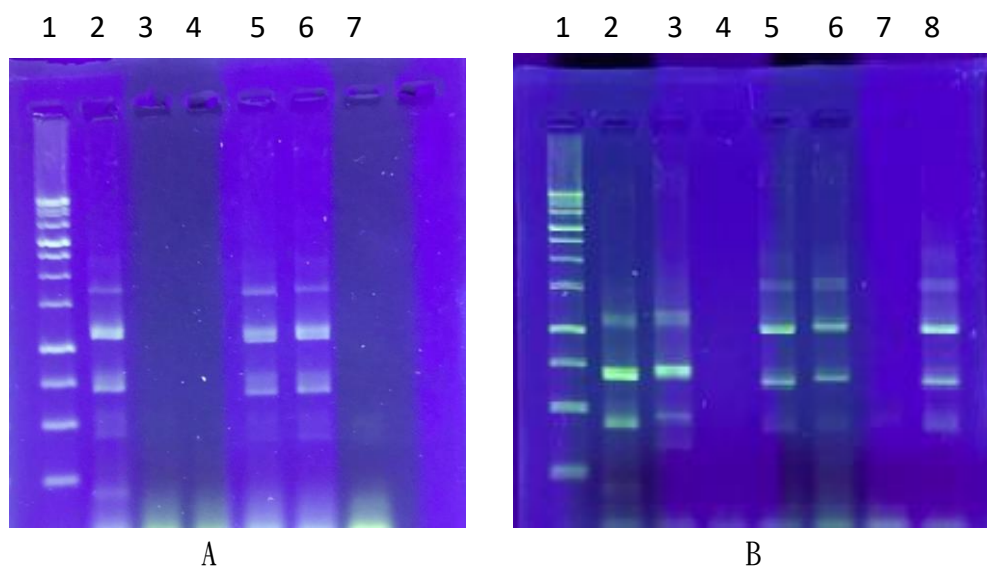
*GABA: γ -aminobutyric acid

表八添加賦形劑之 GABA 含量

Table 8 GABA contents after excipient was added

Medium	Cell no. (CFU/mL)	Recovery after added excipient (%)	GABA(mg/g)
3% yeast extract + 5% soymilk powder	2.03×10^9	22.50	3.58 $\pm$ 0.086

*Excipient: skim milk powder and 及 corn starch

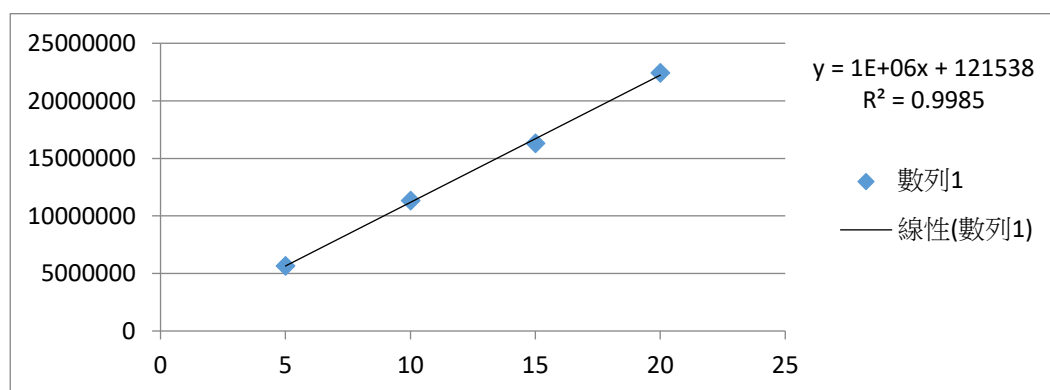


圖一: (A) BrevB1f-BrevB1r primer; (B) BrevB2f-BrevB2r primer 進行 GAD 基因擴增之 PCR 圖譜

Fig.1: PCR profile of GAD gene of (A) BrevB1f-BrevB1r primer; (B) BrevB2f-BrevB2r primer

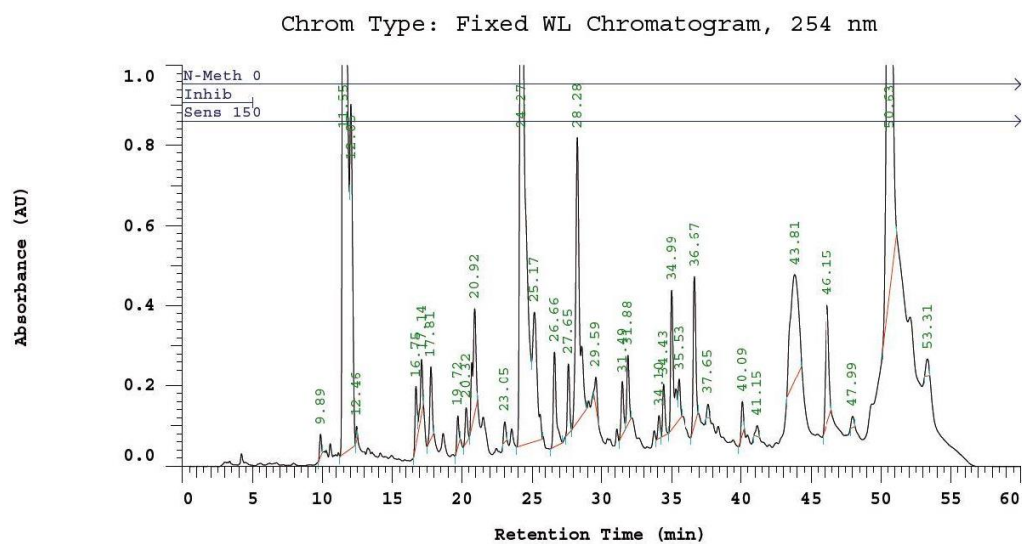
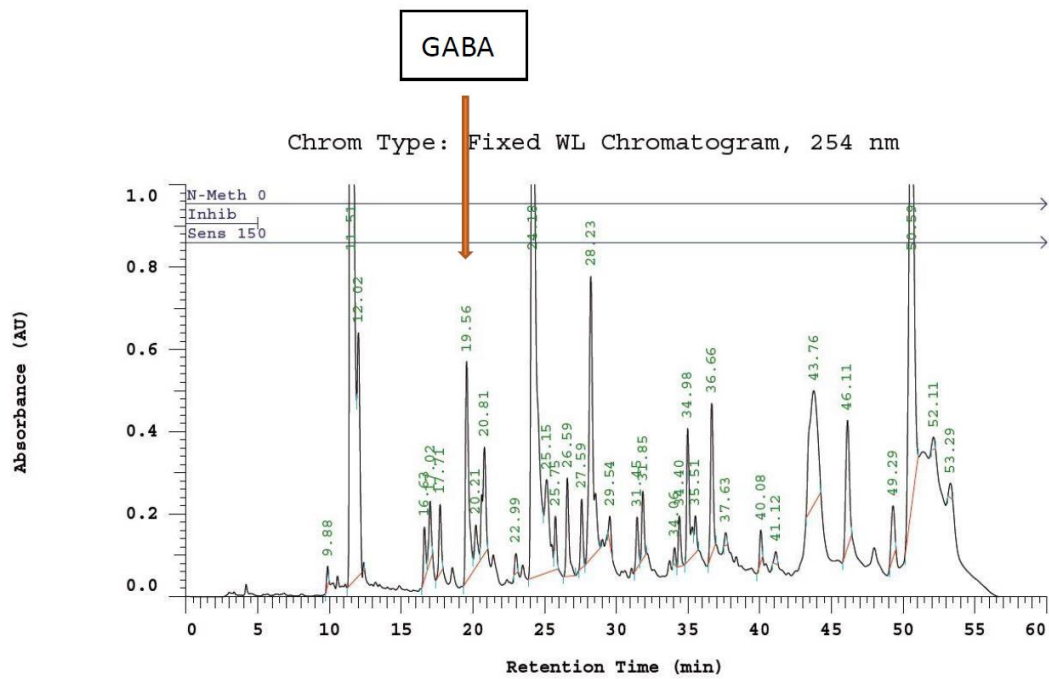
A: 1: Marker; 2: B0014; 3: B0019; 4: B0060; 5: B0088; 6: B0091; 7: A 菌

B: 1: Marker; 2: B0127; 3: B0052; 4: A 菌; 5: B0091; 6: B0019; 7: B0019; 8: B0014



圖二三: GABA 標準曲線

Fig.2 Standard curve of GABA



圖三: 以內標準品確認 GABA 的滯留時間

Fig.3: Confirmation of GABA retention time with internal standard

108年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王淑珍			計畫編號：108-2635-E-041-001-		
計畫名稱：發酵條件對乳酸菌生產 γ -胺基丁酸(GABA)之影響					
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	1	篇	預計整理一篇報告, 於研討會中發表
		其他	0	篇	
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	3	人次	朱嫻如 工讀12個月, 陳伊嘩工讀7個月, 陳秉宏工讀57個月
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等, 請以文字敘述填列。)					