

公開
 密件、不公開

執行機構(計畫)識別碼：100105F104

行政院農業委員會 95 年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：952761

計畫名稱：介貝類煮汁乳酸發酵保健食品之生產技術

(第1年／全程1年)

The production technology of lactic acid fermented
shellfish extract

計畫編號：95 農科-10.1.5-漁-F1(4)

全程計畫期間：95 年 3 月 1 日至 94 年 12 月 31 日止

本年計畫期間：95 年 3 月 1 日至 94 年 12 月 31 日止

計畫主持人：潘崇良

執行機關：國立臺灣海洋大學食品科學系

目 錄

中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
一、計畫目標.....	1
二、擬解決問題.....	1
三、實驗流程.....	3
四、實驗方法.....	5
五、執行成果.....	9
六、結論.....	12
七、評估指標.....	14
八、參考文獻.....	14
Table 1. 於不同條件下蜆與牡蠣煮汁之生菌數、蛋白量、與總糖量.....	16
Table 2. 牡蠣煮汁各別接種三組乳酸菌發酵過程之 pH 值、可滴定酸度、 與微生物菌數變化.....	17
Table 3. 不同水比例的牡蠣煮汁之總糖量與蛋白量.....	17
Table 4. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 10069 (2%) 和 BCRC 12250 (2%) 發酵 不同水比例的牡蠣煮汁 (w/v) 之 pH 值、可滴定酸度、與微生 物菌數變化.....	18
Table 5. 添加不同比例蔗糖之蜆煮汁總糖量與蛋白量.....	18
Table 6. 添加不同比例蔗糖之蜆煮汁接種乳酸菌 10069 (2%)+12250 (2%) 發酵之 pH 值、可滴定酸度、與微生物菌數變化.....	19
Table 7. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後之清除 DPPH 效果.....	20
Table 8. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後螯合亞鐵離子之測定.....	21
Table 9. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後之抑制 ACE 能力.....	22
Table 10. <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 及 TA 100 之基因形態.....	22
Table 11. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 及 TA 100 之毒性評估.....	23
Table 12. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 <i>Sal. typhimurium</i> TA 98 之致突變性評估.....	23
Table 13. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 <i>Sal. typhimurium</i> TA100 之致突變性評估.....	24
Table 14. 蜆與牡蠣煮汁發酵對間接型致突變劑 B[a]P 之抗致突變性評估.....	24
Table 15. 蜆與牡蠣煮汁於發酵前後總糖、肝糖、與還原糖含量之變化.....	25
Table 16. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後游離胺基酸組成.....	26
Fig 1. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後電泳圖.....	27
Fig 2. 發酵前後之蜆與牡蠣煮汁 TLC 圖.....	27
Fig 3. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁 於 4°C 貯藏 2 週之 pH 值變化.....	28

Fig 4. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蛭與牡蠣煮汁 於 25°C 貯藏 3 天之 pH 值變化.....	28
Fig 5. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蛭與牡蠣煮汁 於 4°C 貯藏 2 週之可滴定酸度變化.....	29
Fig 6. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蛭與牡蠣煮汁 於 25°C 貯藏 3 天之可滴定酸度變化.....	29
Fig 7. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蛭與牡蠣煮汁 於 4°C 貯藏 2 週之乳酸菌數變化.....	30
Fig 8. 以 <i>Lb. plantarum</i> BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蛭與牡蠣煮汁 於 25°C 貯藏 3 天之乳酸菌數變化.....	30

中文摘要

本研究以介貝類煮汁乳酸發酵保健食品之生產技術進行探討，本年度擬先開發蜆與牡蠣煮汁之發酵產品，除確定乳酸菌發酵條件外，並進行抗氧化、抑制 ACE 活性與抗致突變試驗，用以開發新型態之保健產品。實驗結果介貝類煮汁取得條件為：蜆(帶殼)與純水比例為 1:2 (w/v) 以及牡蠣與純水比例為 1:4 (w/v)，置入螺蓋玻璃瓶中以 100°C 蒸汽處理 40 min，所得煮汁採用 *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 (2%) 與 *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%) 做為發酵菌醃，其中蜆煮汁添加 0.50% 蔗糖利於發酵。之後將蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後製品，測定清除 DPPH 能力、螯合亞鐵離子能力、抑制 ACE 能力、以及抗致突變活性，發酵後之蜆與牡蠣煮汁清除 DPPH 能力為 30.76-34.18% 與 41.07%，發酵後之蜆與牡蠣煮汁螯合亞鐵離子能力為 142.81-179.80% 與 171.69%，而發酵後蜆與牡蠣煮汁抑制 ACE 能力分別為 58.13% 與 35.03%。蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後之製品對 TA 98 與 TA 100 不具毒性及致突變性，且二組製品添加 S9 mixed 代謝後對 TA 98 與 TA 100 仍不具致突變性，在間接型致突變劑 B[a]p 處理下，蜆煮汁乳酸發酵後組別添加間接型致突變劑 B[a]P，對 TA 98 具有 76.54% 的抗致突變活性。接著以 TLC 與 SDS-PAGE 分析蜆與牡蠣煮汁發酵前後醣量與蛋白質變化。蜆煮汁經 TLC 分析寡醣組成，顯示未觀察到呈色反應，這也反映出蜆煮汁在進行乳酸發酵時需額外添加 0.5% 蔗糖才可順利發酵產酸，而牡蠣煮汁則被觀察到寡醣之呈色反應，因此牡蠣煮汁不須添加額外碳源即可順利發酵產酸，顯示 TLC 分析呈現之寡醣可被乳酸菌利用。而另外測量蜆與牡蠣煮汁之發酵前後總糖量與肝醣量，發現肝醣量佔總糖量之比例較高，因此可於 TLC 分析中發現寡醣之 spot 呈色較淺，而由 SDS-PAGE 膠片發現經乳酸菌發酵的蜆與牡蠣煮汁之較大分子蛋白質降解快速且明顯，在發酵前存在的高分子量蛋白質於發酵 4 hr 後幾乎完全未被觀察到，應均已降解成為胺基酸或寡肽等小分子水解物。最後進行產品之儲藏試驗，4°C 下貯藏 0、4、7、14 天，蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品 pH 值各為 4.41-3.74 與 4.35-4.16，可滴定酸度則各為 0.14-0.27% 與 0.14-0.16%，另外 25°C 下貯藏 0、1、2、3 天，pH 值各為 4.41-3.29 與 4.35-4.07，可滴定酸度為 0.14-0.59% 與 0.14-0.18%，而蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品於 4°C 下，乳酸菌數為 8.77-8.27 log CFU/mL 與 8.67-7.68 log CFU/mL，25°C 下則為 8.77-8.78 log CFU/mL 與 8.67-8.29 log CFU/mL。

Abstract

The topic of this project is to develop the production technology of lactic acid bacteria fermented shellfish extracts. The fermented freshwater clam and oyster extracts are the aim of this year. The conditions of lactic acid fermentation will be established, and the biological activities of fermented shellfish products such as antioxidation, ACE inhibition, and antimutagenicity will be evaluated. The collected data could be used for the future lactic acid fermented shellfish health food development. The production technology of shellfish extracts was whole freshwater clam: water = 1: 2 (w/v) and oyster: water = 1: 4 (w/v) at 100°C for 40 min. Freshwater clam extracts added 0.5% sucrose and oyster extracts were fermented with 2% *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 and 2% *Lb. plantarum* BCRC 12250 at 37°C for 4 hr. In the evaluation on the antioxidation effect of the fermented shellfish extracts, the ability for scavenging DPPH free radical of the fermented freshwater clam extracts was examined to perform 30.76-34.18%. Scavenging DPPH free radicals of the fermented oyster extracts demonstrated 41.07% antioxidative activity. The ability of chelating Fe⁺ of the fermented freshwater clam and the fermented oyster extracts exhibited 142.81-179.80% and 171.69%, respectively. The inhibitory activity against ACE of the fermented freshwater clam extracts and oyster extracts were 58.13% and 35.03%. Only the fermented freshwater extracts performed inhibition of mutagenicity induced by indirect-acting mutagen B[a]P evaluated by *Sal. typhimurium* TA 98, measured as 76.54%. The oligosaccharides of the fermented freshwater clam extracts and oyster extracts were analyzed by TLC. The results showed no spots on the fermented freshwater clam extracts and only one spot on the fermented oyster extracts. As a results, 0.5% sucrose was added for freshwater clam extracts fermentation. However, additional carbon source was not necessary for oyster extracts fermentation. SDS-PAGE profile of lactic acid bacteria fermented freshwater clam extracts and oyster extracts suggested that most protein were rapidly degraded after 4 hr fermentation. In addition, the pH of fermented freshwater clam extracts and oyster extracts decreased from 4.41 to 3.74 and from 4.35 to 4.16; titratable acidity was increased from 0.14% to 0.27% and from 0.14% to 0.16%, LAB counts maintained 8.77-8.27 log CFU/mL and 8.67-7.68 log CFU/mL storage at 4°C for 14 days. At 25°C for 3 days, the two fermented shellfish extracts exhibited pH value was decreased from 4.41 to 3.29 and from 4.35 to 4.07; titratable acidity was increased from 0.14% to 0.59% and from 0.14% to 0.18%, LAB counts maintained 8.77-8.78 log CFU/mL and 8.67-8.29 log CFU/mL.

介貝類煮汁乳酸發酵保健食品之生產技術

95 農科-10.1.5-漁-F1 (4)

潘崇良教授

國立臺灣海洋大學食品科學系

一、計畫目標：

蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵保健食品之產製研發。

二、擬解決問題：

臺灣地區重要之介貝類水產食品經研究具多種生理活性物質。文蛤之酵素水解物具抗氧化活性，如：肌紅蛋白催化亞麻油酸過氧化抑制能力、DPPH 自由基清除能力及還原力，且其水解物具抑制 ACE 活性、調節血壓、增加細胞存活率與引起癌細胞凋亡的生理效果 (劉，2004；林，2004；陳，2005；柯，2005)。

而蜆熱水抽出物以酵素水解可得具抑制 ACE 活性之物質，且蜆之水草物具有抑制人類肝癌細胞增生及誘導發生凋亡的效果，另外，實驗也顯示，蜆粉與蜆精可改善由四氯化碳所引起之肝障害大白鼠之肝臟過氧化及血漿脂質 (林，2005b；梁，2005；陳，2003)。

在餵食吳郭魚含蜆及花蛤熱水抽出物之飼料，可抑制其 LDL (Low-density lipoprotein) 氧化，使吳郭魚血脂降低，推測具有預防動脈硬化之效果 (林，2005a)。牡蠣抽出物經酵素水解物具有抑制血紅蛋白催化亞麻油酸氧化能力、DPPH 自由基清除能力、還原力及亞鐵離子螯合能力等抗氧化活性亦有抑制 ACE 活性能力，餵食原發性高血壓老鼠牡蠣水解物可降低老鼠收縮壓 18.6 mmHg 與舒張壓 19.6 mmHg，顯示具降血壓之生理活性 (於，2005；林，2004)。

乳酸菌亦具多種保健功能如：(1) 抑制致病菌維持腸道內菌叢之平衡，乳酸菌及雙叉乳酸桿菌可抑制 *Salmonella typhimurium*、*Clostridium difficile*、*Campylobacter jejuni*、*Escherichia coli* 及 *Shigella* spp. 等腸道內致病菌的生長，以維持腸內正常菌相平衡。亦有報告指出 lactobacilli 可阻止 *Chlamydia trachomatis*、*Bacteriodes bivius*、*Candida albicans* 等致病菌在泌尿生殖系統的生殖。(2) 緩和乳糖不耐症，乳酸菌可產生乳糖分解酵素，可對乳品中的乳糖先行分解，故可改善患有先天性腸黏膜 β -galactosidase 缺乏症或因胃腸炎導致的 lactase 活性不足者對於乳品中的乳糖無法代謝而引起腹瀉，增加其對乳品的攝取。而優格或其他含有活性乳酸菌的發酵乳製品，可在腸道中利用 β -galactosidase 分解腸內乳糖，減少乳糖滲透，因而能減緩乳糖不耐症。(3) 增加營養價值，乳酸菌於發酵過程中能將大分子初步分解成小分子，並因其蛋白質

的水解活性，使蛋白質凝固物粒子變細而擴大酵素作用面積，提高游離胺基酸含量，以便於人體之消化吸收，亦可幫助消化乳糖等功用，乳酸菌亦可合成維生素B1、B2、B6、K、葉酸、菸鹼酸等而增加產品之營養價值，促進鈣及其他營養素之消化吸收。(4) 降低血清中膽固醇，由 *Streptococcus thermophilus* 及 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 發酵之一般 yogurt 與由 *Streptococcus thermophilus* 及 *Lb. acidophilus* 發酵之 acidophilus yogurt 對老鼠血清中膽固醇之影響，發現由以上菌所發酵之 yogurt 均有降低老鼠血清膽固醇的能力。(5) 抗癌性，乳酸菌可直接壓抑致癌原或間接降低腸內其他雜菌分泌致癌物或原致癌原酵素活性，如亞硝酸還原酶 (Nitroreductase)、重氮還原酶 (Azoreductase) 及葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase) 等 (陳，2004；張，2005)。

故若能結合介貝類與乳酸菌的生理活性物質，開發具複合生理活性的水產發酵食品，相信可獲致更具特色之新型態保健食品。

三、實驗流程：

1. 介貝類煮汁乳酸發酵產品製程

蜆 (帶殼) 加水 (w/v) 1:2

或

牡蠣加水 (w/v) 1:4



100°C、40 min



蜆或牡蠣煮汁



接種乳酸菌菌醃

Lactobacillus. plantarum BCRC 10069 (2%) + *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%)

(蜆煮汁發酵前另添加 0.5% 蔗糖)



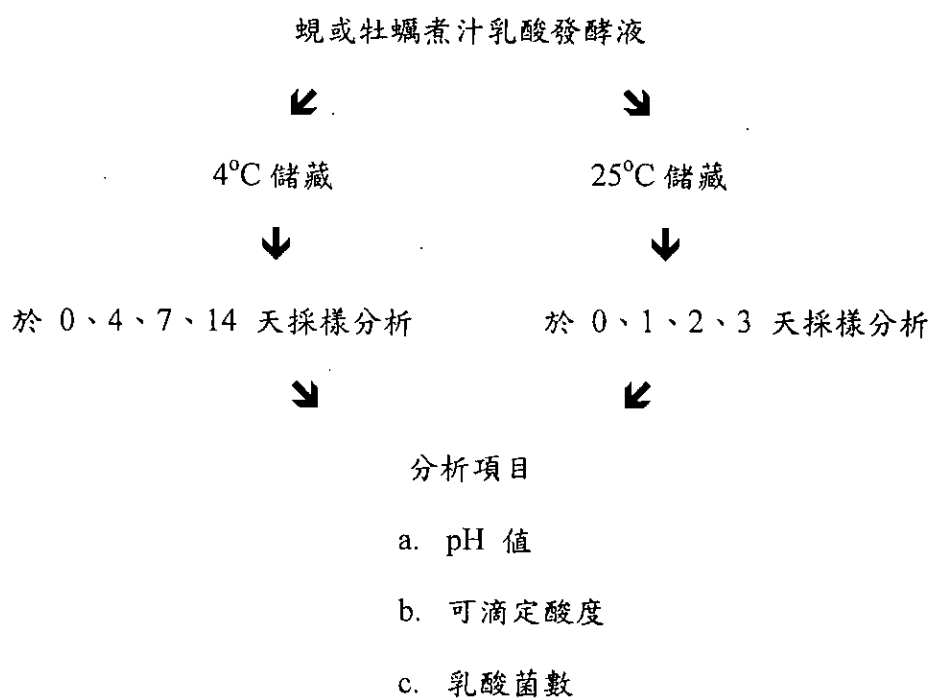
37°C 發酵



乳酸發酵液成分分析

- a. pH 值
- b. 乳酸菌數
- c. 可滴定酸度

2. 介貝類煮汁乳酸發酵產品儲藏試驗流程



四、實驗方法：

1. 可滴定酸度 (Titratable acidity) (CNS 3441, 1996)

取 9.0 g 之樣品加入等量蒸餾水，再加酚酞，以 0.1 N 之 NaOH 標準溶液滴定至變粉紅色。將滴定消耗的 NaOH 毫升 (mL) 數換算成酸度 (%), 以乳酸表示。

$$\text{乳酸 (\%)} = (N \times F \times V \times 0.09 / \text{樣品重}) \times 100\%$$

公式中 N = 0.1 為 NaOH 之當量濃度 (Normality), F 為氫氧化鈉溶液以鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium hydrogen phthalate, KHP) 校正力價, V 為試樣滴定之毫升數。

2. 總糖含量 (Dubois *et al.*, 1956)

取樣品 1 mL, 加入 1 mL 5% phenol 及 5 mL 濃硫酸後, 靜置待冷卻, 測波長 480 nm 的吸光值。配置 0-125 ppm 的葡萄糖為標準溶液製作出標準曲線。

3. 蛋白含量 (Lowry *et al.*, 1951)

取 25 μ L 樣品, 加入 DC protein assay reagent A (Bio-Rad, USA) 125 μ L 和 reagent B (Bio-Rad, USA) 1 mL, 混合靜置 15 min 後, 測波長 660nm 的吸光值。配置 0.0-2.0 mg/mL 的 Bovine serum albumin 為標準溶液製作出標準曲線。

4. 清除 DPPH 自由基能力之測定 (Gyamfi *et al.*, 1999)

取樣品 50 μ L 加入 1,000 μ L 之 0.1 mM DPPH (溶於乙醇), 及 450 μ L 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 後, 靜置於暗室 30 min 後, 測波長 517 nm 的吸光值, 吸光值愈低即表示樣品的清除能力愈強。以維生素 C (L-ascorbic acid) 當做正對照組。

$$\text{清除率 (\%)} = [(\text{未加樣品之控制組吸光值} - \text{樣品吸光值}) / \text{未加樣品之控制組吸光值}] \times 100\%$$

5. 螯合亞鐵離子能力之測定 (Dinis *et al.*, 1994)

取 1 mL 之樣品, 加入 3.7 mL 的甲醇和 0.1 mL 2 mM 的 FeCl_2^{2+} , 待 30 sec 後再加入 0.2 mL 5 mM 的 Ferrozine, 使其反應 10 min 後立即測定 562 nm 的吸光值。吸光值愈低, 表示樣品螯合亞鐵能力愈強。

$$\text{螯合率 (\%)} = [1 - (\text{試樣於 562 nm 的吸光值} / \text{控制組於 562 nm 的吸光值})] \times 100\%$$

6. 抑制血管升壓素轉換酶 (Angiotensin I converting enzyme, ACE) 活性 (Nakamura *et al.*, 1995)

(1) 藥品配製

緩衝溶液 I (100 mM 硼酸緩衝溶液, pH 8.3): 將 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液加入 100 mM H_3BO_3 溶液中, 並調整 pH 為 8.30 ± 0.02 。

緩衝溶液 II (含 600 mM NaCl 之 100 mM 硼酸緩衝溶液, pH 8.3): 將含 600 mM NaCl 之 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液加入於含 600 mM NaCl 之

100 mM H₃BO₃ 溶液中，並調整 pH 為 8.30±0.02。

ACE 溶液之配置：將所購買之 5 Unit ACE 粉末，加入 46.88 mL 之緩衝溶液 I，保存於 4°C，使用時加等量之緩衝溶液 II，得 53.2 mU/mL 之 ACE 溶液。

HHL 溶液之配置：將所購買之 500 mg HHL (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL) 粉末，各加入 38.80 mL 之緩衝溶液 I 與 II，混合均勻，得 15 mM 之 HHL 溶液，並保存於 4°C。

(2) 試驗步驟

取 ACE 溶液 150 μ L，取樣品先經 5,000 Da 濾膜過濾後再取 150 μ L，共 300 μ L 混合物，於 37°C 預先溫熱 10 min，再添加 150 μ L 的 15 mM 之 HHL 溶液為基質，反應液最終濃度為 100 mM Sodium borate buffer (pH 8.3)、300 mM NaCl、8 mU ACE、5 mM HHL 及 150 μ L 發酵產物。混合液於 37°C 水浴反應 30 min 後，添加 0.5 mL 1 N HCl 終止反應。生成的馬尿酸以 1.5 mL 的乙酸乙酯萃取，取 1.0 mL 萃取液經乾式加熱器經蒸發至無液體後，加入 1.0 mL H₂O 溶解，於波長 228 nm 測吸光值，測定抑制 ACE 活性的百分比。

計算公式如下：

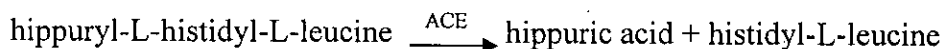
$$\text{抑制能力 (\%)} = [(B-A)/(B-C)] \times 100\%$$

A: 樣品之吸光值

B: 無添加樣品之吸光值

C: 無添加 ACE 之吸光值

其測定原理為：



7. 抗致突變性測定 (謝, 2004; Maron and Ames, 1983)

(1) 試驗菌株基因型態之確認

抗致突變性試驗所使用的 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 為變異的組胺酸合成缺陷突變菌種 (His⁻ mutant)，此菌株有可能會自發性突變回原先之基因型態 (His⁺)，而造成實驗之誤差，因此應定時測試菌株之基因型態。菌株之基因型態測試如下：

A. 組胺酸需求性之確認

以無菌接種環沾取 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100，分別在生物素控制洋菜平板 (Biotin control plates) 及組胺酸/生物素控制洋菜平板 (Histidine/biotin control plates) 上劃線，於 37°C 下隔夜培養，觀察其生長的情形，*Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 於生物素控制洋菜平板應無法生長，於組胺酸/生物素控制洋菜平板則可生長。

B. *rfa* 突變測試

取 0.1 mL 新鮮隔夜培養之 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100，加入已溶解之 Top agar 2.0 mL，振盪混合後倒入 Nutrient agar plates 上，輕微搖晃

待 Top agar 凝固後，在培養皿中央放置 6 mm 之無菌濾紙環片，輕壓使之固定後，取 10 μ L 0.1% 結晶紫溶液滴在濾紙上，在 37°C 下倒置培養 12-24 hr，觀察其抑制環區域。

C. *uvrB* 突變測試

測試菌株對紫外光之敏感度。先使用無菌之接種環沾取新鮮隔夜培養之 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100，在 Nutrient agar plates 上平行劃線培養。放一紙板在未加蓋之培養皿上，使劃線區域一半被遮住一半暴露，在距離 33 cm 處用 15 W 滅菌燈 (Germicidal lamp; 1,850-4,000Å) 照射培養皿 8 sec，於 37°C 下培養 12-24 hr，觀察其生長情形，經過紫外光處理的半邊 *Sal. typhimurium* TA 100 應該無法生長。

D. R-factor 之測試

測試菌株對 Ampicillin 之抗性，先使用無菌之接種環沾取新鮮隔夜培養之 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 在 Ampicillin plates 上劃線，之後在 37°C 下培養 12-24 hr，觀察其生長情形。

(2) 毒性試驗

在安氏試驗中測試樣品之致突變或抗致突變性效果前，若是樣品對 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 具有毒性而使菌數降低，而誤以為樣品具有抗致突變性，為避免樣品對抗致突變試驗產生干擾，必須先進行樣品不會影響 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 之生長能力，方可進行抗致突變性試驗。參照 Maron and Ames (1983) 之方法，取 0.1 mL 樣品、及 0.5 mL PBS 磷酸緩衝液和 0.1 mL 經活化之 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 菌液於試管中，在 37°C 下預培養 20 min 後，取 0.1 mL 反應液稀釋至適當倍數，再取 1.0 mL 稀釋液於培養皿中，加入 Nutrient agar 搖勻，凝固後置於 37°C 培養箱培養 48 hr 計數菌落數，樣品處理組菌數不少於控制組即証實此樣品不具毒性。

(3) 致突變實驗

在研究測試樣品之抗致突變性前，亦需觀察 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 His⁺ revertants 之數目，當測試系統中含有過量之 Histidine，將誤導 His⁺ revertants 數目之判讀，則樣品不適用於此測試系統；另外，當樣品所誘導菌株 TA 98 及 100 發生 His⁺ revertants 的數目高於自然突變的 2 倍以上，則表示樣品具有致突變性，亦不適合進行抗致突變試驗，為瞭解是否有上述情形，故先進行致突變試驗。參照 Maron and Ames (1983) 所提出的方法，取 0.1 mL 樣品、0.5 mL PBS 磷酸緩衝液、0.1 mL 經活化之 *Sal. typhimurium* TA 98 或 TA 100 菌液於試管中，加入 0.5 mL 之 S-9 混合物或代替的 PBS 磷酸緩衝液 0.5 mL，在 37°C 下預培養 20 min 後，再加入 2.0 mL Top agar (6 g agar/L、5 g NaCl/L、0.1 mM L-histidine、及 0.1 mM biotin)，混合均勻後倒入 Minimal glucose plates，將此培養皿置於 37°C 培養箱培養 48 hr 計數菌落數。對照組則是不添加樣品而改以無菌水代替之。如果試驗組

His⁺ revertants/plate 數目高於對照組 2 倍以上，則表示測試樣品有致突變性，則判定此樣品對 *S. typhimurium* TA100 具有致突變性。

(5) 抗致突變實驗

試驗方法主要依照 Ames test 之方法進行 (Maron and Ames, 1983)，利用致突變劑引起 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 之突變，添加樣品觀察其抑制突變劑所引起之 *Sal. typhimurium* TA 98 及 TA 100 突變。取 0.1 mL 樣品、及 0.1 mL 溶於 DMSO 的標準致突變劑 (4NQO, 0.5 µg/mL; B[a]P, 5 µg/mL) 和 0.1 mL 經活化之 *Sal. typhimurium* TA 100 菌液於試管中，加入 0.5 mL 之 S-9 混合物或代替的 PBS 磷酸緩衝液 0.5 mL，在 37°C 下預培養 20 min 後，再加入 2.0 mL Top agar，混合均勻後倒入 Minimal glucose plates，將此培養皿置於 37°C 培養箱培養 48 hr 計數菌落數。每一試驗中以加入標準致突變劑 4NQO 或 B[a]P 者 (不加樣品) 為正控制組，以加入無菌水 (不加樣品與標準致突變劑) 作為負控制組 (Negative control)，其中負控制組所得菌落數為自然回復株菌落數 (Spontaneous revertants)。

進行抗致突變試驗分析後，計算回復突變株菌落數，依下列公式計算其抗致突變率 (羅，2003)。

$$\text{Antimutagenicity (\%)} = [(A-B)/(A-C)] \times 100\%$$

A: 只添加致突變劑，不加入測試樣品所得之回復突變株菌落數

B: 添加致突變劑和測試樣品所得之反突變菌落數

C: 自然回復突變株的菌落數

8. 肝醣測定 (侯，2004; Carroll *et al.*, 1956)

1 mL 樣品及 5 mL 95% 乙醇混合均勻，於室溫下靜置隔夜 (或 37-40°C 加熱 3 hr)，以 1,010 x g 離心 15 min，去除上層液，沉澱部分加入 2 mL 水溶解，加水適當稀釋，取 1 mL 之稀釋液，加入 5 mL Anthrone 試劑混勻並放冷後，沸水 15 min 放冷，以波長 620 nm 測其吸光值，由標準曲線測得葡萄糖量，再乘以換算係數 0.9 即肝醣量 (mg/mL)。

9. 薄層色層分析 (Thin layer chromatography, TLC)

為瞭解蠅與牡蠣煮汁乳酸發酵前後之寡醣產物種類，參考 Duckworth and Yaphe (1970) 所發展的薄層色層分析法，使用 Silica gel 60 之 TLC 膠片，展開溶劑為乙酸乙酯：醋酸：水 = 2: 1: 1 (v/v) 之溶劑；檢出溶液為 5% 硫酸-甲醇溶液。試樣展開後以檢出溶液噴霧，再置於 150°C 下加熱 5 min，觀察膠片上的醣類生成痕跡。利用市售之葡萄糖、乳糖、麥芽糖、及蔗糖做為標準品進行分析。

10. 游離胺基酸組成分析 (林，2004)

參考林 (2004) 樣品前處理並稍做修飾，取 30 mL 樣品與 120 mL 95% 乙醇混合均勻，於 40°C 加熱 3 hr 後，以 1,010 x g 離心 15 min，去除沉澱物，將上清液減壓濃縮至乾涸，最後以 0.02N HCl 定容成 5 mL，並經由 0.22 µm 膜過濾以供胺基酸自動分析儀分析。

五、執行成果：

I. 熱萃條件探討

將蜆 (帶殼) 100 g 或牡蠣 100 g 與純水 100 mL，置入 400 mL 螺蓋玻璃瓶中以 80°C、90°C、或 100°C 熱萃 10、20、30、或 40 min 後，分析熱萃液中之生菌數 (Aerobic plate count, APC)、蛋白量、與總糖量 (Table 1)。結果顯示不同處理條件下蜆煮汁之生菌數為 2.05-2.67 log CFU/mL 或 < 2.00 log CFU/mL，蛋白量為 1.41-2.19 mg/mL，總糖量為 5.36-11.28 mg/mL，而牡蠣煮汁之生菌數則在各條件下皆 < 2.00 log CFU/mL，蛋白量則為 1.00-2.26 mg/mL，總糖量為 3.09-9.35 mg/mL。其中 100°C 下處理 40 min 後，蜆煮汁所得之生菌數 < 2.00 log CFU/mL，且具較高之總糖量為 11.28 mg/mL，牡蠣煮汁的生菌數也同樣 < 2.00 log CFU/mL，且有較高的蛋白量與總糖量為 2.26 mg/mL 和 9.35 mg/mL。故採用 100°C、40 min 做為蜆與牡蠣熱萃條件。

II. 蜆與牡蠣發酵條件探討

1. 將牡蠣 100 g 與水 100 mL 於 100°C 下 40 min，所得煮汁加入不同乳酸菌組合各 2%，分別為 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BCRC 10696 + *Streptococcus thermophilus* BCRC 12268、*Lb. plantarum* BCRC 10069 + *Lb. plantarum* BCRC 12250、和 *Pediococcus pentosaceus* MFL + *Ped. pentosaceus* MFS (Table 2)。各組菌醃發酵 24 hr 內之 pH 值變化為 5.67-4.09、5.45-3.63、和 5.55-3.94，可滴定酸度為 0.10-0.20%、0.11-0.35%、和 0.09-0.26%，乳酸菌數為 7.61-7.99 log CFU/mL、7.63-8.67 log CFU/mL、和 7.94-8.56 log CFU/mL。結果顯示以菌株 BCRC10069 + BCRC12250 為發酵菌醃可使牡蠣煮汁發酵 4 hr 內達 pH 4.25、可滴定酸度 0.19%、以及乳酸菌數 8.66 log CFU/mL。
2. 將牡蠣與水混合成不同比例 1:2 和 1:4 (w/v)，於 100°C 下 40 min，所得之牡蠣煮汁加入 10069 (2%) + 12250 (2%) 之乳酸菌組合，測定 pH 值、可滴定酸度 (%)、以及微生物菌相 (Table 4)。結果顯示二組皆可於發酵 4 hr 內達 pH 4.42 和 4.16，可滴定酸度 0.14% 和 0.16%，乳酸菌數 8.43 log CFU/mL 和 8.58 log CFU/mL，其中以 1:4 組產酸速度較快，故採用牡蠣與水 1:4 (w/v) 100°C 下 40 min，所得煮汁使用 10069 (2%) + 12250 (2%) 進行發酵。
3. 在預試驗中，蜆煮汁未添加碳源情況下，無法順利發酵，因此添加不同比例之蔗糖進行發酵條件測試。將蜆與水 1:2 (w/v) 熱萃 100°C、40 min 後，再分別添加 0.25%、0.50%、或 1.00% 之蔗糖，並使用 10069 (2%) + 12250 (2%) 做為發酵菌醃 (Table 6)。各組發酵 24 hr 內 pH 值變化為 6.47-3.52、6.54-3.02、和 6.50-3.18，可滴定酸度為 0.03-0.47%、0.03-0.46%、和 0.03-0.48%，乳酸菌數為 7.98-8.29 log CFU/mL、7.70-8.84 log CFU/mL、和 7.80-8.73 log CFU/mL。結果顯示添加 0.50% 的蔗糖即可使蜆煮汁於 4 hr 內達 pH 4.60、可滴定酸度 0.11%、以及乳酸菌數 9.32 log CFU/mL。故目前採

用蜆與水 1:2 (w/v) 添加 0.50% 蔗糖，熱萃 100°C、40 min，所得煮汁使用 10069 (2%) + 12250 (2%) 乳酸菌組合進行發酵。

III. 抗氧化活性探討

1. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後清除 DPPH 之能力 (Table 7)，結果顯示牡蠣煮汁 42.27% 比蜆煮汁 23.34-28.45% 有較佳的 DPPH 清除能力，而發酵後之蜆煮汁清除 DPPH 能力為 30.76-34.18%，相當於 27.05-35.82 ppm 的維生素 C，另外發酵後牡蠣煮汁清除 DPPH 能力為 41.07%，相當於 57.44 ppm 的維生素 C。
2. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後螯合亞鐵離子能力結果顯示，蜆煮汁 64.16-92.91% 比牡蠣煮汁 69.12% 有較佳的亞鐵離子螯合能力，而發酵後蜆煮汁螯合亞鐵離子能力為 142.81-179.80%，相當於 117.22-147.30 ppm 的 EDTA，另外發酵後牡蠣煮汁螯合亞鐵離子能力為 171.69%，相當於 140.71 ppm 的 EDTA (Table 8)。

張 (2005) 測定發酵牡蠣風味乳品之清除 DPPH 自由基效果為 20.40-27.42%，相當於 33.31 - 43.98 ppm 的維生素 C，而螯合亞鐵離子能力為 84.62-91.16%，相當於 11.02-11.86 ppm EDTA 含量。本實驗目前所得結果顯示發酵牡蠣煮汁之抗氧化活性高於張 (2005) 報告中述及之發酵牡蠣風味乳品。

IV. 抑制 ACE 活性探討

蜆與牡蠣煮汁以乳酸菌 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵後，抑制 ACE 能力各從 47.67% 與 25.26% 增加為 58.13% (乳酸發酵蜆煮汁) 與 35.03% (乳酸發酵牡蠣煮汁)，可能與乳酸發酵後會使胾肽和胺基酸含量增加有關 (Table 9)。

V. 抗致突變性探討

1. 在進行 Ames test 之前需測試樣品是否對 TA 98 與 TA 100 產生毒性，控制組 (不添加樣品) TA 98 與 TA 100 菌數為 7.48 log CFU/mL 與 7.05 log CFU/mL，而蜆煮汁發酵前後 TA 98 菌數為 7.44 log CFU/mL、7.50 log CFU/mL，TA 100 菌數為 7.15 log CFU/mL、7.20 log CFU/mL，牡蠣煮汁發酵前後 TA 98 菌數為 7.43 log CFU/mL、7.48 log CFU/mL，TA 100 菌數為 7.05 log CFU/mL、7.11 log CFU/mL，測試結果蜆與牡蠣煮汁不論發酵前後皆不對 TA 98 與 TA 100 產生毒性 (Table 11)。
2. 在進行 Ames test 之前除需進行毒性試驗外，也須先行測試樣品是否會導致 TA 98 與 TA 100 產生突變，此外另進行添加 S9 mixed，觀察樣品經 S9 mixed 代謝是否會產生毒性而導致突變，實驗結果自然突變組 TA 98 -/+ S9 為 34-62 His⁺ revertants/plate 與 TA 100 -/+ S9 為 71-82 His⁺ revertants/plate，蜆與牡蠣煮汁發酵前後 TA 98 為 28-37 His⁺ revertants/plate，TA 98 + S9 mixed 為 61-59 His⁺ revertants/plate，TA 100 為 84-103 His⁺ revertants/plate，TA 100 + S9 mixed 為 80-70 His⁺ revertants/plate，結果顯示

不論是否添加 S9 mix，蜆與牡蠣煮汁發酵前後之樣品皆不會導致 TA 98 與 TA 100 突變 (Tables 12, 13)。

3. 蜆與牡蠣煮汁以乳酸菌 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵前後之樣品添加間接型致突變劑 B[a]P 後，TA 98 與 TA 100 之突變菌數為 90-114、197-206 (His⁺ revertants/plate) 與控制組 (以無菌水代替) 99、226 (His⁺ revertants/plate) 無顯著差異，除蜆煮汁乳酸發酵後組別對添加間接型致突變劑 B[a]P 顯示可抗 TA 98 突變 76.54%，整體而言，蜆與牡蠣煮汁以乳酸菌 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵前後之樣品對間接型致突變劑 B[a]P 無明顯抗致突變性 (Table 14)。

VI. 醣類與蛋白質變化探討

1. 將蜆與牡蠣煮汁之發酵前後之樣品測試總糖、肝醣、與還原糖含量變化，蜆煮汁未添加 0.5% 蔗糖之總糖量為 3.21 mg/mL，因發酵前添加 0.5 % 蔗糖 (5 mg sucrose/mL)，雖發酵過程會消耗碳源，但發酵後剩餘的總糖量仍有 6.19 mg/mL，此外蜆煮汁還原糖量 0.01 mg/mL 顯著低於牡蠣煮汁 0.06 mg/mL，蜆與牡蠣煮汁之發酵前後肝醣量則無顯著變化，而將蜆與牡蠣煮汁之發酵前後總糖量與肝醣比較可發現，肝醣量佔總糖量之比例較高，因此可於 TLC 分析中 (Fig. 2) 發現寡醣之 spot 呈色較淺。
2. 將蜆與牡蠣煮汁發酵前後樣品經 TLC 分析寡醣，結果發現蜆煮汁幾乎無呈色反應，可能顯示蜆煮汁中可供乳酸菌利用之寡醣較少，這也反映出蜆煮汁在進行乳酸發酵時需額外添加 0.5% 之蔗糖才可順利發酵產酸，此外發酵之蜆煮汁其呈色之 spot 也接近標準品蔗糖，而牡蠣煮汁有呈色反應，故進行發酵時不須添加額外碳源即可順利發酵，而牡蠣煮汁乳酸發酵樣品則發現幾乎無呈色之 spot，可能為寡醣已被利用所致。
3. 將蜆與牡蠣煮汁以乳酸菌 *Lb. plantarum* BCRC 10069 (2%) 和 *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%) 發酵 4 hr 後達到發酵終點 (pH < 4.6)。以電泳圖 (Fig. 1) 觀察蜆與牡蠣煮汁發酵前後的水溶性蛋白質降解的情形，結果發現經乳酸菌發酵的蜆與牡蠣煮汁之較大分子蛋白質降解快速且明顯，在發酵前存在的高分子量蛋白質於發酵 4 hr 後幾乎完全未被觀察到，應均已降解成為胺基酸或寡肽等小分子水解物。
4. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後樣品分析游離胺基酸組成 (Table 16)，蜆煮汁發酵前 GABA 與 Taurine 含量各為 0.006 mg/mL 與 0.042 mg/mL，蜆煮汁乳酸發酵後則略為增加至 0.010 mg/mL 與 0.096 mg/mL，而蜆煮汁乳酸發酵後雙肽 Anserine 含量顯著增加，從發酵前 0.003 mg/mL 增加至 0.335 mg/mL，另外 Carnosine 於發酵前之蜆或牡蠣煮汁中未測得，但於蜆或牡蠣煮汁乳酸發酵後測得含量各為 0.031 mg/mL 與 0.210 mg/mL，蜆煮汁游離胺基酸總含量從 0.407 mg/mL 增加至發酵後 1.702 mg/mL。

VII. 儲藏試驗探討

1. 將已發酵至 pH = 4.40-4.60 左右之蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品，置於 4°C 下

貯藏 0、4、7、14 天，觀察貯藏期間 pH 值之變化 (Fig. 3)，二組於 4 天內 pH 值仍持續下降各為 4.41-3.78 與 4.35-4.05，但在第 4 天後蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵液之 pH 值則為持平的現象，由 Table 15 蜆煮汁乳酸發酵液之殘糖較牡蠣組別高有關，因此不論蜆或牡蠣煮汁乳酸發酵製品於 4°C 貯藏時，乳酸菌仍會持續產酸，而有助於抑制食品病原菌生長。

2. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵 4°C 儲藏期間之可滴定酸度變化 (Fig. 5)，二組於 4 天內可滴定酸度仍持續增加各為 0.14-0.23% 與 0.14-0.17%，在第 4 天後蜆煮汁乳酸發酵液之可滴定酸度仍有持續上升的趨勢，但牡蠣煮汁乳酸發酵組於第 4 天後可滴定酸度則為持平的現象，此與 Fig. 3 所顯示之 pH 變化大致相符。而乳酸菌數變化隨著儲藏天數的增加有下降的趨勢 8.77-8.27 log CFU/mL 與 8.67-7.68 log CFU/mL，顯示 4°C 儲藏下可能減緩乳酸菌的生長 (Fig. 7)。
3. 將已發酵至 pH = 4.40-4.60 左右之蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品，置於 25°C 下貯藏 0、1、2、3 天，觀察貯藏期間 pH 值之變化 (Fig. 4)，兩組於 2 天內 pH 值仍持續下降各為 4.41-3.30 與 4.35-4.02，但在第 2 天後則為持平的現象，雖然由 Table 8 顯示有殘糖但 25°C 儲藏時菌株代謝較快，因此降酸只能持續 2-3 天，相較於 4°C 儲藏可持續 4 天較短，但由實驗結果仍可發現蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品於 25°C 貯藏時，乳酸菌仍會持續產酸，有助於抑制食品病原菌生長。
4. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵 25°C 儲藏期間之可滴定酸度變化 (Fig. 6)，蜆煮汁乳酸發酵 3 天內可滴定酸度持續增加 0.14-0.59%，但牡蠣煮汁乳酸發酵組於第 1 天後可滴定酸度則為持平的現象 0.14-0.18%。而乳酸菌數變化於 Fig. 8 顯示蜆煮汁乳酸發酵組 2 天內乳酸菌數仍持續增加，之後便開始下降，而牡蠣煮汁乳酸發酵組則是於 1 天後乳酸菌數便開始降低。

六、結論：

1. 介貝類煮汁取得條件為：蜆（帶殼）與純水比例為 1:2 (w/v) 以及牡蠣與純水比例為 1:4 (w/v)，置入螺蓋玻璃瓶中以 100°C 蒸氣處理 40 min，所得煮汁採用 *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 (2%) 與 *Lactobacillus plantarum* BCRC 12250 (2%) 做為發酵菌配，其中蜆煮汁添加 0.50% 蔗糖利於發酵。
2. 發酵後之蜆煮汁清除 DPPH 能力為 30.76-34.18%，相當於 27.05-35.82 ppm 的維他命 C，而發酵後之牡蠣煮汁清除 DPPH 能力為 41.07%，相當於 57.44 ppm 的維生素 C。
3. 發酵後之蜆煮汁螯合亞鐵離子能力為 142.81-179.80%，相當於 117.22-147.30 ppm 的 EDTA，而發酵後之牡蠣煮汁為 171.69%，相當於 140.71 ppm 的 EDTA。
4. 蜆與牡蠣煮汁以乳酸菌 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵

- 後，抑制 ACE 能力各從 47.67% 與 25.26% 增加為 58.13% 與 35.03%。
5. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後之製品對 TA 98 與 TA 100 不具毒性及致突變性，且蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後之製品添加 S9 mixed 代謝後對 TA 98 與 TA 100 仍不具致突變性。
 6. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後之製品在間接型致突變劑 B[a]p 處理下，對 TA 98 與 TA 100 無明顯抗致突變活性，但蜆煮汁乳酸發酵後組別添加間接型致突變劑 B[a]P，對 TA 98 具有 76.54% 的抗致突變活性。
 7. 蜆煮汁未添加 0.5% 蔗糖之總糖量為 3.21 mg/mL，因發酵前添加 0.5% 蔗糖量仍有 6.19 mg/mL，顯示有多餘的殘糖，而蜆與牡蠣煮汁之發酵前後肝醣量無顯著變化。
 8. 蜆煮汁經 TLC 分析寡醣未觀察到呈色反應，顯示蜆煮汁中可供乳酸菌利用之寡醣較少，這也反映出蜆煮汁在進行乳酸發酵時需額外添加 0.5% 蔗糖才可順利發酵產酸，而牡蠣煮汁則被觀察到寡醣之呈色反應，由牡蠣煮汁進行發酵時不須添加額外碳源即可順利發酵產酸，顯示 TLC 分析呈現之寡醣可被乳酸菌利用。
 9. 以電泳圖觀察蜆與牡蠣煮汁發酵前後的水溶性蛋白質降解的情形，結果發現經乳酸菌發酵的蜆與牡蠣煮汁之較大分子蛋白質降解快速且明顯，在發酵前存在的高分子量蛋白質於發酵 4 hr 後幾乎完全未被觀察到，應均已降解成為胺基酸或寡胜肽等小分子水解物。
 10. 蜆煮汁乳酸發酵後 GABA 與 Taurine 含量略為增加至 0.010 mg/mL 與 0.096 mg/mL，而蜆煮汁雙胜肽 Anserine 含量為 0.003 mg/mL 發酵後顯著增加至 0.335 mg/mL，另外 Carnosine 於蜆或牡蠣煮汁乳酸發酵後測得含量各為 0.031 mg/mL 與 0.210 mg/mL。
 11. 將已發酵至 pH = 4.40-4.60 左右之蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品，置於 4°C 下貯藏 0、4、7、14 天，結果顯示二組於 4 天內 pH 值仍持續下降各為 4.41-3.78 與 4.35-4.05，此外因蜆煮汁乳酸發酵液之殘糖較牡蠣組為高，使得蜆煮汁乳酸發酵組於 4 天後 pH 值仍能持續下降，可滴定酸度也有相似的結果，於 4 天內仍持續增加各為 0.14-0.23% 與 0.14-0.17%。
 12. 而另外將蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品置於 25°C 下貯藏 0、1、2、3 天，觀察貯藏期間 pH 值與可滴定酸度之變化，二組於 2 天內 pH 值仍持續下降各為 4.41-3.30 與 4.35-4.02，但在第 2 天後則為持平的現象，而蜆煮汁乳酸發酵 3 天內可滴定酸度持續增加 0.14-0.59%，但牡蠣煮汁乳酸發酵組於第 1 天後可滴定酸度則為持平的現象 0.14-0.18%。
 13. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品之儲藏試驗於 4°C 時，乳酸菌數隨著儲藏天數的增加有下降的趨勢 8.77-8.27 log CFU/mL 與 8.67-7.68 log CFU/mL，顯示 4°C 儲藏下可能減緩乳酸菌的生長，而 25°C 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵製品 1-2 天內仍會生長 8.77-9.24 log CFU/mL 與 8.67-8.76 log CFU/mL，但 25°C 下乳酸菌代謝較 4°C 快，因此 2 天之後菌數便開始下降。

七、評估指標：

1. 期中審查標準：
乳酸菌發酵蜆與牡蠣煮汁最適發酵條件之確定。
2. 期末審查標準：
確立乳酸菌發酵蜆與牡蠣煮汁產品保健生理活性。

八、參考文獻：

- 林子青。2004。貝類熱水抽出物與水解物中胜肽對血管升壓素轉換酶之抑制與其純化。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 林柏全。2005a。蜆、文蛤與花蛤熱水抽出物對吳郭魚 (*Oreochromis mossambicuss*) 體外與體內低密度之蛋白氧化之影響。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 林國泰。2005b。蜆抽出物之抗氧化活性與其季節及產地之變動。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 於柏伸。2005。牡蠣抽出物之抗氧化與其季節與產地之變動。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 柯登議。2005。文蛤酵素水解物對培養細胞氧化壓力之保護作用。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 侯明君。2004。牡蠣產地處理與物流過程品質衛生控管之探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 梁惠如。2005。蜆抗癌有效成分之分離及化學結構鑑定。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 國家標準 (CNS) 3441。1996。乳品檢驗法-酸度之滴定。經濟部標準檢驗局。臺北。<http://www.cnsonline.com.tw>。
- 陳佳伶。2005。文蛤水解物中胜肽對血管升壓素轉換酶之抑制與其純化。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 陳長堅。2003。蜆粉或蜆精對四氯化碳誘發之肝障害大白鼠肝臟脂質過氧化的影響。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 張源義。2005。乳酸菌發酵牡蠣風味乳製品產製技術與其生理活性功能之探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 劉雨如。2003。益生菌與其發酵乳抗氧化能力和免疫功能之探討。國立中興大學畜產學系碩士學位論文。臺中。
- 劉怡青。2004。文蛤抽出物之抗氧化活性與其季節及產地之變動。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。
- 謝孟荔。2004。乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶之抗致突變性。國立臺灣大學食品科技研究所碩士學位論文。臺北。

- Carroll, N. V., R. W. Longley, and J. H. Roe.** 1956. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 59: 583-593.
- Dinis, T. C. P., V. M. C. Madeira, and L. M. Almeida.** 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161-169.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Duckworth, M., and W. Yaphe.** 1970. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. *Chemistry and Industry* 23: 747-748.
- Gyamfi, M. A., M. Yonamine, and Y. Aniya.** 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia samuinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology* 32: 661-667.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Maron, R. M., and B. N. Ames.** 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215.
- Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai, A. Okubo, S. Yamazaki, and T. Takano.** 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science* 78: 777-783

Table 1. 於不同條件下蜆與牡蠣煮汁之生菌數、蛋白量、與總糖量

Sample ¹	Condition	APC ² (log CFU/mL)	Portein (mg/mL)	Sugars (mg/mL)
Freshwater clam extract	80°C, 10 min	2.05 ± 0.61	1.83 ± 1.45 ^a	6.89 ± 1.68 ^a
	80°C, 20 min	< 2.00	1.41 ± 0.74 ^a	6.63 ± 2.42 ^a
	80°C, 30 min	< 2.00	1.76 ± 1.17 ^a	7.74 ± 3.50 ^a
	80°C, 40 min	< 2.00	1.63 ± 1.17 ^a	5.96 ± 3.64 ^a
	90°C, 10 min	2.10 ± 0.06	2.19 ± 1.50 ^a	7.45 ± 4.17 ^a
	90°C, 20 min	< 2.00	1.99 ± 1.28 ^a	6.47 ± 3.52 ^a
	90°C, 30 min	< 2.00	2.09 ± 0.99 ^a	8.63 ± 3.19 ^a
	90°C, 40 min	< 2.00	2.15 ± 1.23 ^a	9.64 ± 3.97 ^a
	100°C, 10 min	2.67 ± 1.94	1.97 ± 1.14 ^a	5.75 ± 1.88 ^a
	100°C, 20 min	< 2.00	2.06 ± 1.20 ^a	5.36 ± 3.32 ^a
	100°C, 30 min	< 2.00	2.18 ± 1.07 ^a	9.63 ± 3.59 ^a
	100°C, 40 min	< 2.00	1.91 ± 0.62 ^a	11.28 ± 0.03 ^a
Oyster extract	80°C, 10 min	< 2.00	1.00 ± 0.09 ^b	7.51 ± 6.35 ^a
	80°C, 20 min	< 2.00	1.50 ± 0.75 ^{ab}	6.05 ± 5.29 ^a
	80°C, 30 min	< 2.00	1.71 ± 0.59 ^{ab}	6.75 ± 5.31 ^a
	80°C, 40 min	< 2.00	1.93 ± 0.25 ^{ab}	3.09 ± 1.44 ^a
	90°C, 10 min	< 2.00	2.11 ± 0.29 ^{ab}	3.72 ± 1.54 ^a
	90°C, 20 min	< 2.00	2.18 ± 0.62 ^a	3.48 ± 2.10 ^a
	90°C, 30 min	< 2.00	2.11 ± 0.71 ^{ab}	4.79 ± 0.96 ^a
	90°C, 40 min	< 2.00	1.88 ± 0.27 ^{ab}	3.40 ± 2.52 ^a
	100°C, 10 min	< 2.00	1.88 ± 0.50 ^{ab}	5.57 ± 5.48 ^a
	100°C, 20 min	< 2.00	1.96 ± 0.25 ^{ab}	6.25 ± 5.14 ^a
	100°C, 30 min	< 2.00	2.07 ± 0.37 ^{ab}	4.99 ± 4.17 ^a
	100°C, 40 min	< 2.00	2.26 ± 0.19 ^a	9.35 ± 2.32 ^a

¹: Freshwater clam: water = 1: 1 (w/v). Oyster: water = 1: 1 (w/v).

²: APC, aerobic plate count.

Table 2. 牡蠣煮汁¹ 各別接種三組乳酸菌發酵過程之 pH 值、可滴定酸度、與微生物菌數變化

Starters ³	Fermented time (hr)	pH value	Titratable acidity (%)	Microbial count ² (log CFU/mL)	
				APC	LAB
10696+12268	0	5.67 ± 0.48 ^a	0.10 ± 0.07 ^a	7.51 ± 0.06 ^b	7.61 ± 0.13 ^b
	2	5.01 ± 0.12 ^{bc}	0.11 ± 0.07 ^a	8.35 ± 0.27 ^a	8.10 ± 0.47 ^{ab}
	4	4.62 ± 0.02 ^c	0.15 ± 0.07 ^a	8.32 ± 0.36 ^a	8.45 ± 0.25 ^a
	24	4.09 ± 0.01 ^d	0.20 ± 0.01 ^a	7.91 ± 0.02 ^a	7.99 ± 0.12 ^{ab}
10069+12250	0	5.45 ± 0.80 ^a	0.11 ± 0.06 ^a	7.71 ± 0.41 ^b	7.63 ± 0.30 ^c
	2	4.91 ± 0.44 ^{ab}	0.13 ± 0.08 ^a	8.14 ± 0.42 ^{ab}	8.09 ± 0.28 ^{bc}
	4	4.25 ± 0.18 ^{bc}	0.19 ± 0.07 ^a	8.62 ± 0.24 ^a	8.66 ± 0.27 ^a
	24	3.63 ± 0.01 ^c	0.35 ± 0.01 ^a	8.70 ± 0.11 ^a	8.67 ± 0.07 ^a
MFL+MFS	0	5.55 ± 0.62 ^a	0.09 ± 0.03 ^a	8.21 ± 0.33 ^b	7.94 ± 0.25 ^b
	2	4.94 ± 0.28 ^{ab}	0.13 ± 0.07 ^a	8.68 ± 0.06 ^a	8.73 ± 0.06 ^a
	4	4.34 ± 0.12 ^{bc}	0.19 ± 0.01 ^a	8.86 ± 0.17 ^a	8.90 ± 0.16 ^a
	24	3.94 ± 0.01 ^c	0.26 ± 0.01 ^a	8.58 ± 0.25 ^{ab}	8.56 ± 0.09 ^a

¹: Oyster: water = 1: 1 (w/v) at 100°C, 40 min.

²: APC, aerobic plate count; LAB, lactic acid bacteria count.

³: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BCRC 10696 (2%); *Streptococcus thermophilus* BCRC 12268 (2%); *Lb. plantarum* BCRC 10069 (2%); *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%); *Pediococcus pentosaceus* MFL (2%); *Ped. pentosaceus* MFS (2%).

Table 3. 不同水比例的牡蠣煮汁之總糖量與蛋白量

Sample ¹	Portein (mg/mL)	Sugars (mg/mL)
1: 2	2.47 ± 0.44 ^a	8.18 ± 3.07 ^a
1: 4	1.89 ± 0.12 ^a	5.33 ± 1.11 ^a

¹: Oyster: water (w/v), at 100°C, 40 min.

Tabel 4. 以 *Lb. plantarum* BCRC 10069 (2%) 和 BCRC 12250 (2%) 發酵不同水比例的牡蠣煮汁 (w/v) 之 pH 值、可滴定酸度、與微生物菌數變化

Sample ¹	Fermented time (hr)	pH value	Titratable acidity (%)	Microbial count ² (log CFU/mL)	
				APC	LAB
1: 2	0	5.38 ± 0.70 ^a	0.07 ± 0.02 ^d	7.61 ± 0.34 ^c	7.54 ± 0.34 ^c
	2	5.05 ± 0.61 ^a	0.08 ± 0.02 ^{cd}	8.07 ± 0.32 ^b	7.76 ± 0.45 ^{bc}
	4	4.42 ± 0.41 ^{ab}	0.14 ± 0.03 ^{bcd}	8.52 ± 0.10 ^{ab}	8.43 ± 0.20 ^a
	24	3.84 ± 0.37 ^a	0.29 ± 0.10 ^a	8.67 ± 0.09 ^a	8.57 ± 0.19 ^a
1: 4	0	5.07 ± 0.74 ^a	0.08 ± 0.03 ^c	7.75 ± 0.60 ^b	7.81 ± 0.38 ^b
	2	4.62 ± 0.62 ^{ab}	0.11 ± 0.04 ^{bc}	8.31 ± 0.25 ^{ab}	8.26 ± 0.39 ^a
	4	4.16 ± 0.27 ^{ab}	0.16 ± 0.05 ^{abc}	8.60 ± 0.25 ^a	8.58 ± 0.19 ^a
	24	3.81 ± 0.16 ^b	0.24 ± 0.08 ^a	8.55 ± 0.14 ^a	8.43 ± 0.10 ^a

¹: Oyster: water = 1: 2 and 1: 4 (w/v), at 100°C, 40 min.

²: Refer to Table 2.

Table 5. 添加不同比例蔗糖之蜆煮汁總糖量與蛋白量

Sample ¹	Portein (mg/mL)	Sugars (mg/mL)
Without adding sucrose	2.22 ± 0.36 ^a	5.31 ± 4.04 ^c
0.25% sucrose	1.82 ± 0.25 ^{ab}	6.00 ± 2.63 ^{bc}
0.50% sucrose	1.90 ± 0.17 ^{ab}	6.78 ± 1.30 ^{abc}
1.00% sucrose	1.55 ± 0.21 ^b	11.27 ± 0.81 ^a

¹: Freshwater clam: water = 1: 2 (w/v), at 100°C, 40 min.

Table 6. 添加不同比例蔗糖之蚬煮汁¹接種乳酸菌 10069 (2%) +12250 (2%) 發酵之 pH 值、可滴定酸度、與微生物菌數變化

Sample	Fermented time (hr)	pH value	Titratable acidity (%)	Microbial count ² (log CFU/mL)	
				APC	LAB
0.25% sucrose	0	6.47 ± 0.07 ^a	0.03 ± 0.00 ^d	8.00 ± 0.10 ^d	7.98 ± 0.24 ^d
	2	5.95 ± 0.10 ^b	0.04 ± 0.00 ^{cd}	8.57 ± 0.05 ^{bcd}	8.16 ± 0.13 ^{cd}
	4	4.65 ± 0.08 ^c	0.11 ± 0.01 ^{bcd}	9.20 ± 0.18 ^a	9.06 ± 0.11 ^a
	24	3.52 ± 0.18 ^d	0.47 ± 0.37 ^a	8.38 ± 0.12 ^{cd}	8.29 ± 0.11 ^{bcd}
0.50% sucrose	0	6.54 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^d	7.95 ± 0.11 ^d	7.70 ± 0.24 ^d
	2	5.73 ± 0.06 ^b	0.04 ± 0.00 ^{cd}	8.73 ± 0.31 ^{cd}	8.07 ± 0.09 ^{cd}
	4	4.60 ± 0.06 ^c	0.11 ± 0.01 ^b	9.33 ± 0.08 ^a	9.32 ± 0.22 ^a
	24	3.02 ± 0.01 ^d	0.46 ± 0.02 ^a	8.93 ± 0.12 ^{bcd}	8.84 ± 0.09 ^{bcd}
1.00% sucrose	0	6.50 ± 0.15 ^a	0.03 ± 0.00 ^d	7.81 ± 0.22 ^d	7.80 ± 0.17 ^c
	2	5.56 ± 0.20 ^b	0.05 ± 0.01 ^{cd}	8.28 ± 0.05 ^{cd}	8.27 ± 0.17 ^{bc}
	4	4.46 ± 0.08 ^c	0.13 ± 0.01 ^b	8.88 ± 0.06 ^a	8.83 ± 0.26 ^a
	24	3.18 ± 0.26 ^d	0.48 ± 0.04 ^a	8.81 ± 0.05 ^{bcd}	8.73 ± 0.16 ^{abc}

¹: Refer to Table 5.

²: Refer to Table 2.

Table 7. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後之清除 DPPH 效果

Sample ¹		DPPH scavenged (%)	Equivalent ascorbic acid (ppm)
Sucrose added			
Freshwater clam extract	-	23.34 ± 6.87 ^c	27.05 ± 11.78 ^c
	0.25%	28.35 ± 1.32 ^{abc}	35.64 ± 2.26 ^{abc}
	0.50%	28.45 ± 1.60 ^{abc}	35.82 ± 2.74 ^{abc}
	1.00%	23.48 ± 11.07 ^{bc}	27.29 ± 18.97 ^{bc}
Fermented Freshwater clam extract ²	0.25%	33.08 ± 0.32 ^{abc}	43.75 ± 0.56 ^a
	0.50%	34.18 ± 1.96 ^a	45.64 ± 3.36 ^a
	1.00%	30.76 ± 6.82 ^{abc}	39.77 ± 11.68 ^{abc}
Oyster extract	-	42.27 ± 12.82 ^a	59.49 ± 21.97 ^a
Fermented Oyster extract ²	-	41.07 ± 9.47 ^a	57.44 ± 16.22 ^a

¹: Freshwater clam extract: freshwater clam: water = 1: 2 (w/v) at 100°C, 40 min. Fermented freshwater clam extract: *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 (2%) + *Lactobacillus plantarum* BCRC 12250 (2%). Oyster extract: oyster: water = 1: 4 (w/v), at 100°C, 40 min. Fermented oyster extract: *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 (2%) + *Lactobacillus plantarum* BCRC 12250 (2%).

²: Fermented freshwater clam extract: pH 4.60-4.46, fermented time 4-5 hr. Fermented oyster extract: pH 4.16, fermented time 4 hr.

Table 8. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後螯合亞鐵離子之測定

Sample ¹		Fe ²⁺ chelating effect (%)	Equivalent EDTA (ppm)
Sucrose added			
Freshwater clam extract	-	92.91 ± 20.03 ^{bcd}	76.65 ± 1.29 ^{bcd}
	0.25% sucrose	74.16 ± 13.06 ^d	61.40 ± 10.62 ^d
	0.50% sucrose	64.16 ± 18.99 ^c	53.27 ± 15.44 ^c
	1.00% sucrose	76.3 ± 16.54 ^{cd}	63.25 ± 13.45 ^{cd}
Fermented Freshwater clam extract	0.25% sucrose	179.80 ± 14.55 ^a	147.30 ± 11.83 ^a
	0.50% sucrose	142.81 ± 32.38 ^a	117.22 ± 26.33 ^a
	1.00% sucrose	146.86 ± 42.68 ^a	120.52 ± 34.71 ^a
Oyster extract	-	69.12 ± 14.21 ^b	57.30 ± 11.55 ^b
Fermented Oyster extract	-	171.69 ± 17.39 ^a	140.71 ± 14.14 ^a

¹ Refer to Table 7.

² Refer to Table 7.

Table 9. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後之抑制 ACE 能力

Sample ¹	ACE inhibition percentage (%)	Peptide contain (mg/mL)
Freshwater clam extract	47.67 ± 4.40 ^b	0.43 ± 0.05 ^d
Fermented Freshwater clam extract ²	58.14 ± 3.03 ^a	0.57 ± 0.12 ^{cd}
Oyster extract	25.26 ± 2.75 ^d	1.28 ± 0.06 ^{bc}
Fermented Oyster extract ²	35.03 ± 7.76 ^c	2.05 ± 0.69 ^a

¹: Refer to Table 7.²: Refer to Table 7.Table 10. *Salmonella typhimurium* TA 98 及 TA 100 之基因形態

Test	TA 98	TA 100	Comment
Bio/His	+ ¹	+	The strains are histidine dependent by virtue of a mutation in the histidine operon
<i>rfa</i>	-	-	The strains lack of lipopolysaccharide on cell membrane and increase permeability to large molecules such as crystal violet that inhibites the growth of cell
<i>uvrB</i>	-	-	A deletion of a gene coding for the DNA excision repair system, resulting in greatly increase sensitivity in detecting many mutagens
R-factor	+	+	Plasmid contains the gene of ampicillin resistance

¹: +: growth; -: no growth.

Table 11. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 *Salmonella typhimurium* TA 98 及 TA 100 之毒性評估

Sample ¹	His ⁺ revertants/plate (log CFU/mL)	
	TA 98	TA 100
Control	7.48 ± 0.01 ^a	7.05 ± 0.25 ^a
Freshwater clam extract	7.44 ± 0.03 ^a	7.15 ± 0.15 ^a
Fermented freshwater clam extract ²	7.50 ± 0.03 ^a	7.20 ± 0.12 ^a
Oyster extract	7.43 ± 0.06 ^a	7.05 ± 0.06 ^a
Fermented oyster extract ²	7.48 ± 0.03 ^a	7.11 ± 0.09 ^a

¹: Control: only contains sterile water. Refer to Table 7.

²: Refer to Table 7.

Table 12. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 *Sal. typhimurium* TA 98 之致突變性評估

Sample ¹	His ⁺ revertants/plate	
	- S9	+ S9
Spontaneous revertants	34 ± 3 ^a	62 ± 14 ^a
Freshwater clam extract	28 ± 2 ^a	61 ± 6 ^a
Fermented freshwater clam extract ²	34 ± 5 ^a	54 ± 2 ^a
Oyster extract	34 ± 7 ^a	61 ± 5 ^a
Fermented oyster extract ²	37 ± 5 ^a	59 ± 11 ^a

¹: Spontaneous revertants: only contains sterile water. Refer to Table 7.

²: Refer to Table 7.

Table 13. 蜆與牡蠣煮汁發酵對 *Sal. typhimurium* TA100 之致突變性評估

Sample ¹	His ⁺ revertants/plate	
	- S9	+ S9
Spontaneous revertants	71 ± 13 ^b	82 ± 12 ^a
Freshwater clam extract	84 ± 3 ^{ab}	80 ± 5 ^a
Fermented freshwater clam extract ²	99 ± 12 ^a	63 ± 2 ^a
Oyster extract	83 ± 3 ^{ab}	69 ± 17 ^a
Fermented oyster extract ²	103 ± 16 ^a	70 ± 9 ^a

¹: Spontaneous revertants: only contains sterile water. Refer to Table 7.

²: Refer to Table 7.

Table 14. 蜆與牡蠣煮汁發酵對間接型致突變劑 B[a]P 之抗致突變性評估

Sample ¹	His ⁺ revertants/plate (inhibition %)	
	TA 98	TA 100
Control	99 ± 15 ^a	226 ± 36 ^a
Spontaneous revertants	49 ± 7	117 ± 31
Freshwater clam extract	99 ± 14 ^a (—)	214 ± 48 ^a (—)
Fermented freshwater clam extract ²	57 ± 12 ^b (76.54 ± 29.02)	206 ± 43 ^a (—)
Oyster extract	90 ± 21 ^a (—)	216 ± 40 ^a (—)
Fermented oyster extract ²	114 ± 20 ^a (—)	198 ± 48 ^a (—)

¹: Control: sterile water + TA 98 or TA 100 + B[a]P + S9 mixed. Spontaneous revertants: only contains sterile water. Refer to Table 7.

²: Refer to Table 7.

Table 15. 蜆與牡蠣煮汁於發酵前後總糖、肝醣、與還原糖含量之變化

Sample ¹	Total sugar (mg/mL)	Glycogen (mg/mL)	Reducing sugar (mg/mL)
Freshwater clam extract	3.21 ± 0.61 ^b	2.69 ± 0.22 ^a	0.01 ± 0.01 ^b
Fermented freshwater clam extract ²	6.19 ± 0.58 ^a	2.97 ± 0.16 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
Oyster extract	1.59 ± 0.22 ^a	0.97 ± 0.06 ^a	0.07 ± 0.03 ^a
Fermented oyster extract ²	1.33 ± 0.25 ^a	0.94 ± 0.07 ^a	0.09 ± 0.04 ^a

¹: Refer to Table 7.

²: Refer to Table 7.

Table 16. 蜆與牡蠣煮汁乳酸發酵前後游離胺基酸組成¹

Free amino acid	Freshwater clam extract (mg/mL)	Fermented freshwater clam extract (mg/mL)	Oyster extract (mg/mL)	Fermented oyster extract (mg/mL)
1-methylhistidine	0.007	-	-	-
3-methylhistidine	0.0003	-	-	-
Alanine	0.082	0.226	0.895	0.563
Arginine	0.015	0.153	0.381	0.223
Aspartic acid	0.021	0.013	0.274	0.152
α -amino adipic acid (α -AAA)	0.003	-	-	-
α -amino-n-butyric acid (α -ABA)	0.0002	-	-	-
β -alanine	0.007	0.034	0.168	0.097
β -amino isobutyric acid (β -AiBA)	-	-	0.044	0.034
Citulline	-	0.001	-	0.007
Cystathionine	0.003	-	-	-
Cysteine	-	-	0.024	-
γ -aminobutyric acid (GABA)	0.006	0.01	0.011	0.021
Ethanolamine	-	0.002	0.003	-
Glutamic acid	0.003	0.081	1.624	0.926
Glycine	0.007	0.052	1.515	0.769
Histidine	-	0.036	0.086	0.037
Hydroxylysine	-	-	-	-
Hydroxyproline	-	-	-	-
Isoleucine	0.006	0.053	0.112	0.076
Leucine	0.011	0.107	0.191	0.163
Lysine	0.007	0.102	0.202	0.136
Methionine	-	0.0002	-	-
NH ₃	0.105	0.072	0.087	0.156
Ornithine	0.013	0.127	0.018	0.008
Phenylalanine	0.001	0.063	0.128	0.088
Phosphoethanolamine (PEA)	0.015	0.026	-	-
Phosphoserine	0.02	0.002	0.075	0.119
Proline	-	-	-	-
Sarcosine (N-methylglycine)	-	-	0.034	-
Serine	0.008	0.053	0.229	0.143
Taurine	0.042	0.096	4.96	2.898
Threonine	0.005	0.067	0.244	0.093
Trpptophan	-	-	-	-
Tyrosine	0.003	0.047	0.141	0.08
Urea	-	-	-	-
Valine	0.015	0.078	0.15	0.141
Anserine ²	0.003	0.355	0.096	-
Carnosine ²	-	0.031	-	0.21
Total	0.407	1.702	11.691	6.915

¹: Refer to Table 7.²: Anserine and carnosine are dipeptides.

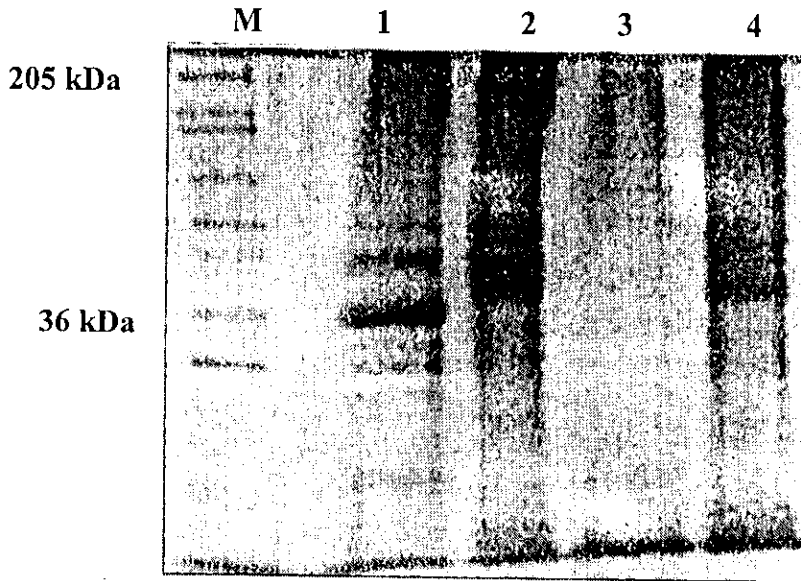


Fig. 1. 蜆與牡蠣煮汁發酵前後電泳圖¹。(M, marker; 1, freshwater clam extract; 2, oyster extract; 3, fermented freshwater clam extract; 4, fermented oyster extract)

¹: Freshwater clam extract: freshwater clam: water = 1: 2 (w/v) at 100°C, 40 min. Fermented freshwater clam extract: *Lb. plantarum* BCRC 10069 (2%) + *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%). Oyster extract: oyster: water = 1: 2 or 1: 4 (w/v), at 100°C, 40 min. Fermented oyster extract: *Lb. plantarum* BCRC 10069 (2%) + *Lb. plantarum* BCRC 12250 (2%) Fermented freshwater clam extract: pH 4.60-4.46, fermented time 4-5 hr. Fermented oyster extract: pH 4.16, fermented time 4 hr.

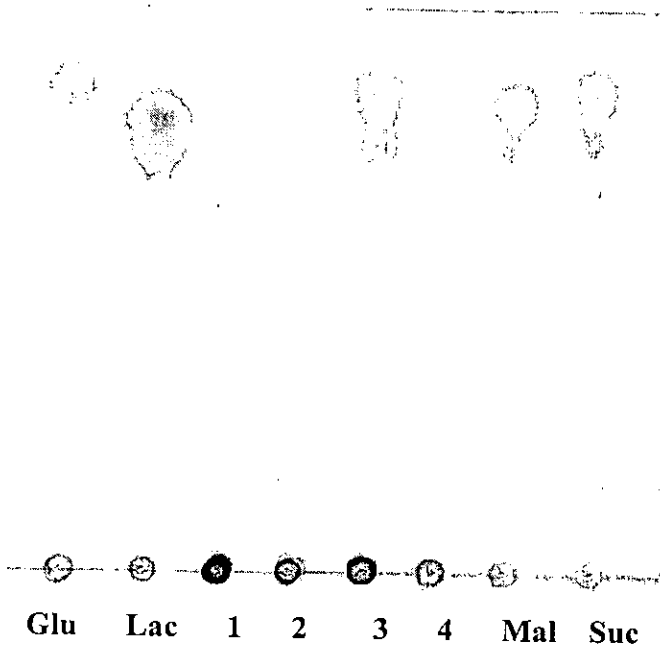


Fig 2. 發酵前後之蜆與牡蠣煮汁 TLC 圖¹。

(Glu, glucose; Lac, lactose; Mal, maltose; Suc, sucrose; 1, freshwater clam extract; 2, oyster extract; 3, fermented freshwater clam extract; 4, fermented oyster extract)

¹: Refer to Fig. 1.

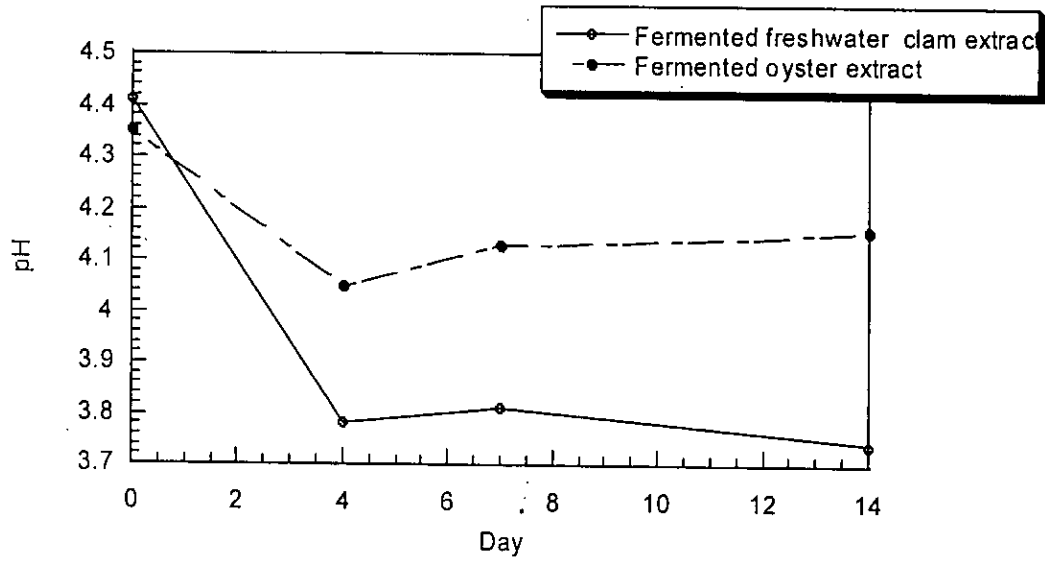


Fig 3. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 4°C 貯藏 2 週之 pH 值變化。^{1,2}

¹: Refer to Fig. 1.

²: Each date represents the mean \pm SD of three samples.

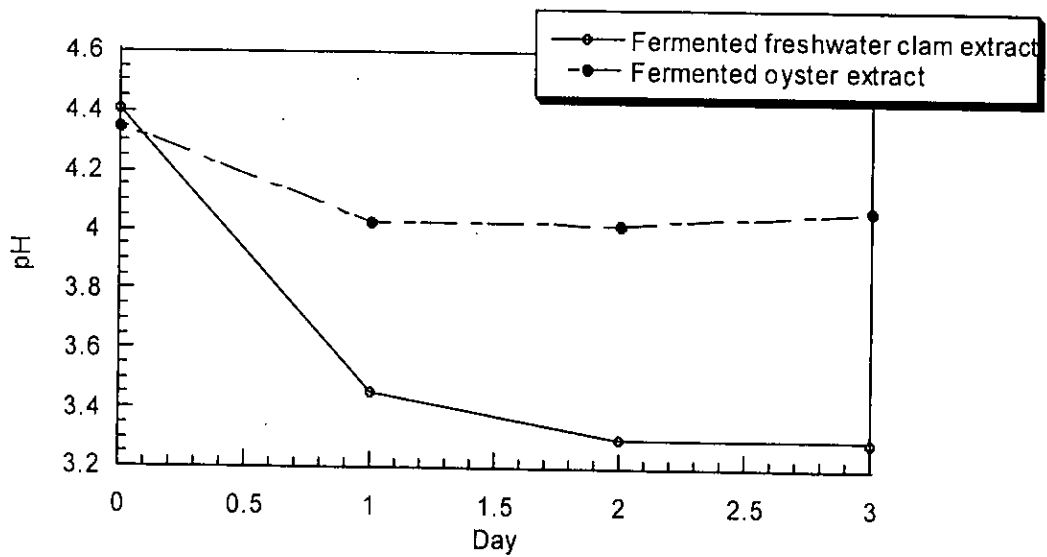


Fig 4. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 25°C 貯藏 3 天之 pH 值變化。^{1,2}

¹: Refer to Figure 1.

²: Refer to Figure 3.

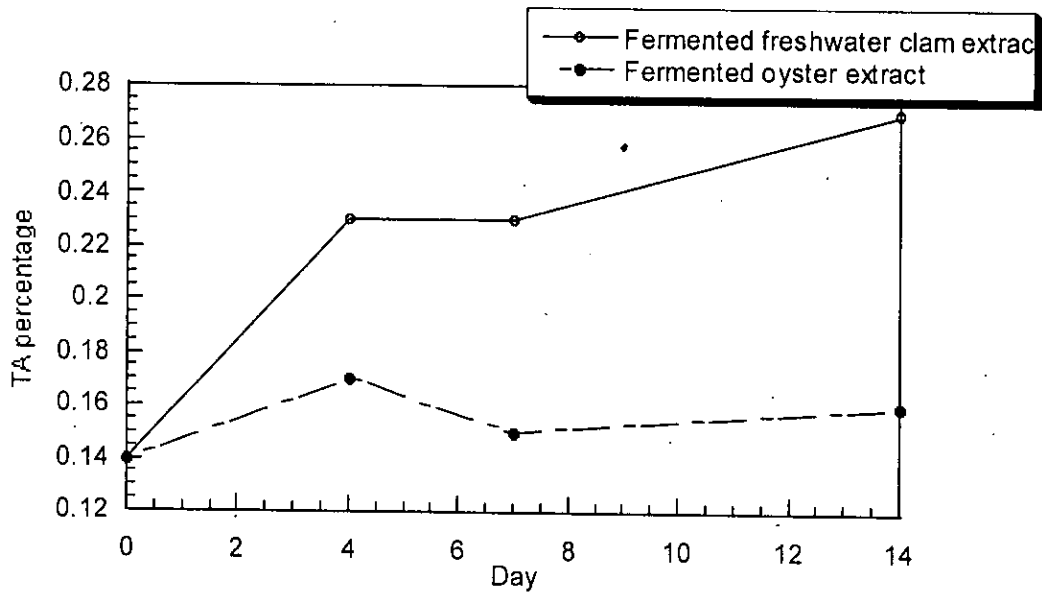


Fig 5. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 4°C 貯藏 2 週之可滴定酸度變化。^{1,2}
¹: Refer to the Figure 1.
²: Refer to the Figure 3.

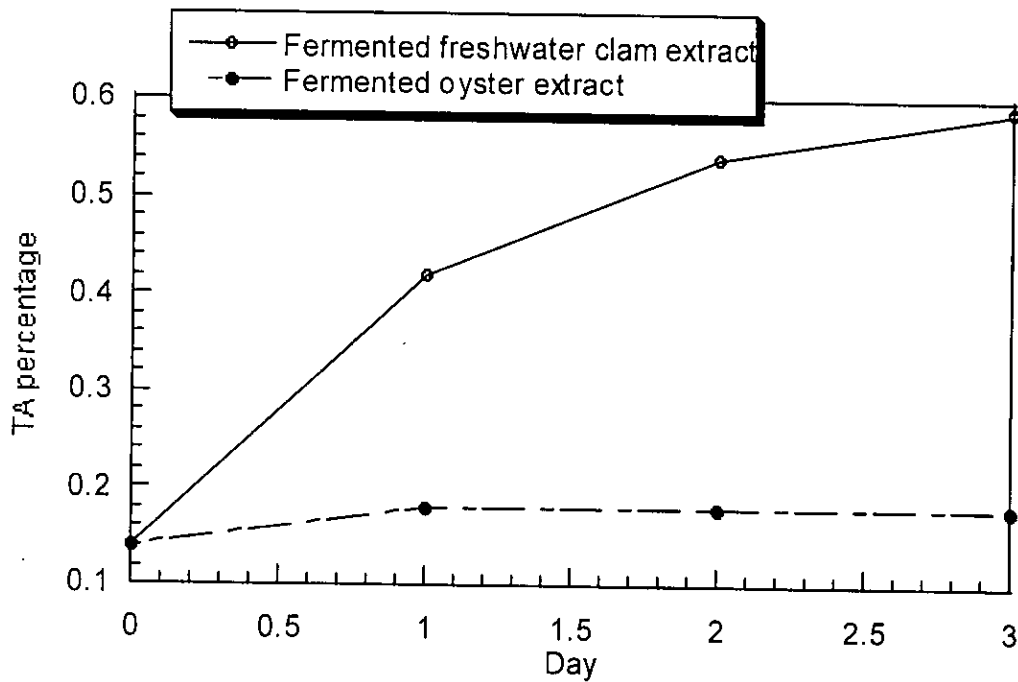


Fig 6. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 25°C 貯藏 3 天之可滴定酸度變化。^{1,2}
¹: Refer to Figure 1.
²: Refer to Figure 3.

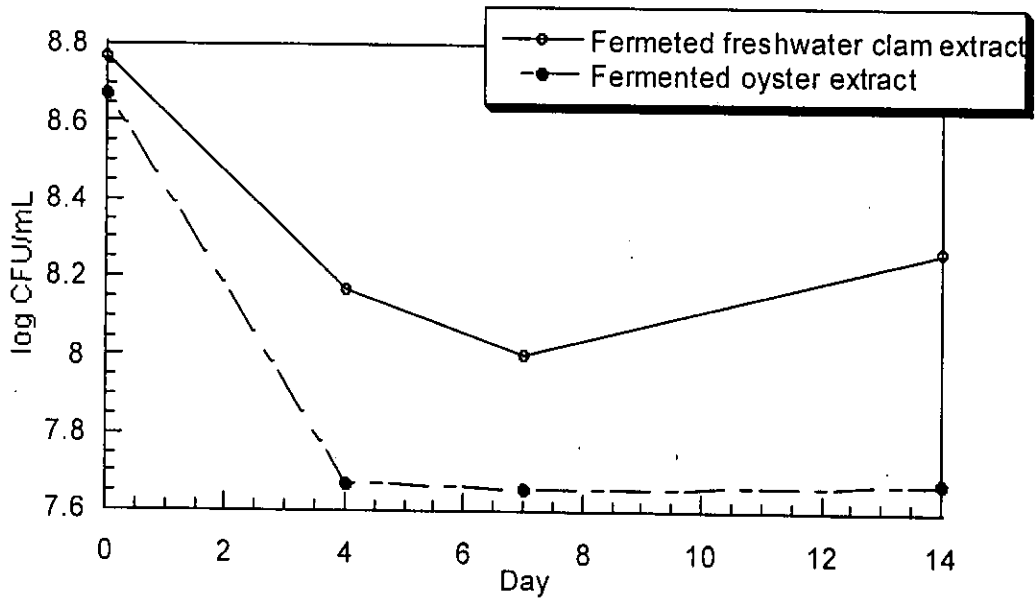


Fig 7. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 4°C 貯藏 2 週之乳酸菌數變化。^{1,2}
¹: Refer to Figure 1.
²: Refer to Figure 3.

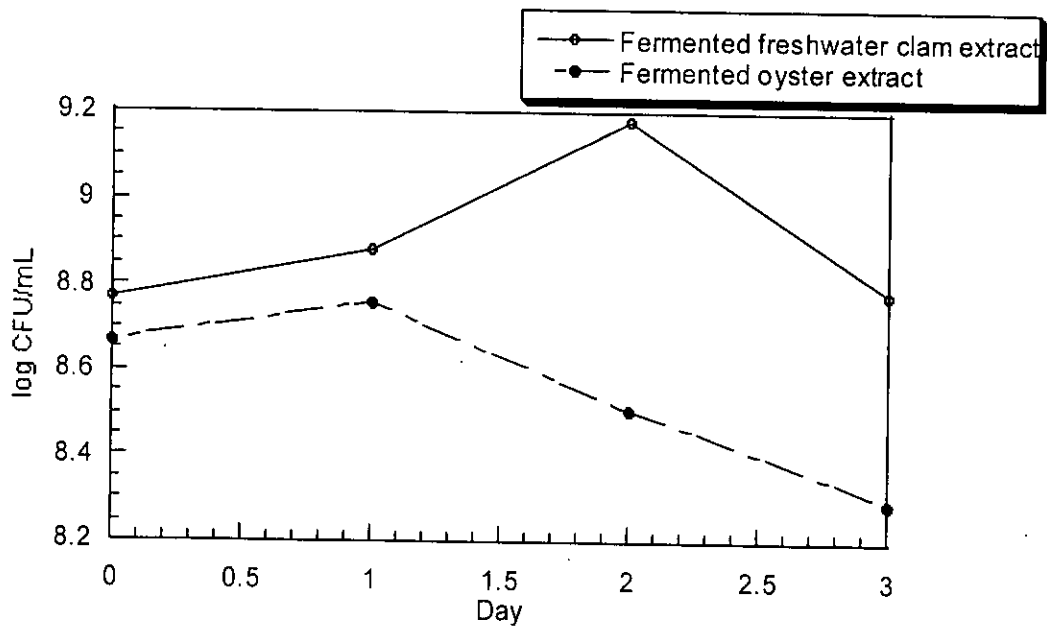


Fig 8. 以 *Lb. plantarum* BCRC 12250 和 BCRC 10069 發酵蜆與牡蠣煮汁於 25°C 貯藏 3 天之乳酸菌數變化。^{1,2}
¹: Refer to Figure 1.
²: Refer to Figure 3.