

豆腐廢水特性及其應用於乳酸菌培養之評估

張敏修¹、王淑珍^{2*}、陳錦樹^{1*}

¹ 國立中興大學食品暨應用生物科技學系

² 嘉南藥理大學食品科技系

* 共同通訊作者

摘要

本研究主要利用豆腐製作過程所產生之廢水(豆腐水, TFW)作為乳酸菌的培養基, 並探討乳酸菌發酵豆腐水上清液(SCS)之抗氧化及抗菌活性。將植生型乳酸菌 B0106 及 BCRC 10069 培養於豆腐水中, 其生長曲線於第 20 小時趨近於菌數穩定, 可獲得菌數達 $9 \log \text{CFU/mL}$ 。添加 1~4% glucose 及 2% peptone 於豆腐水中, 結果顯示 B0106 及 BCRC 10069 培養後之菌數並無顯著增加。豆腐水之抗氧化力具有 $58.41 \pm 0.1\%$ 清除 DPPH 自由基之能力、總多酚含量相當於沒食子酸 $323.01 \pm 10.05 \text{ ppm}$, γ -aminobutyric acid (GABA) 含量為 $191.57 \pm 6.77 \text{ ppm}$; 而乳酸菌 B0106、BCRC 10069 發酵豆腐水分別具有 $59.89 \pm 0.57\%$ 及 $60.30 \pm 0.01\%$ 清除 DPPH 自由基之能力, 總多酚含量則相當於沒食子酸 $339.36 \pm 8.96 \text{ ppm}$ 及 $307.27 \pm 10.47 \text{ ppm}$ 之含量, 而 GABA 含量分別為 $189.76 \pm 23.36 \text{ ppm}$ 及 $228.82 \pm 5.30 \text{ ppm}$ 。進一步將乳酸菌發酵豆腐水應用於抗耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(BCRC 15211)之抑制, 結果顯示 B0106 於第二小時即達到抑制 BCRC 15211 50% 的能力, 且 B0106 與 BCRC 10069 分別於第六小時及第八小時達到抑制金黃色葡萄球菌 BCRC 15211 90% 以上之能力。因此豆腐水不僅含有豐富的營養成份與胜肽適合乳酸菌生長, 乳酸菌發酵液亦具有良好的抗氧化活性及增加 GABA 含量之能力, 同時也具有抑制抗藥性金黃色葡萄球菌生長的能力, 將來應用於保健食品及化妝品則有著無限潛力。

關鍵詞：豆腐水、抗氧化、抗藥性金黃色葡萄球菌、植生型乳酸菌

Assessment of the Characterization in Tofu Wastewater and Application in Lactic Acid Bacteria Cultivation

Min-Hsiu Chang¹、Shu-Chen Wang^{2*}、Chin-Shuh Chen^{1*}

¹ Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University,
Taichung, R.O.C. Taiwan.

² Department of Food Science and Technology, Chia Nan University of Pharmacy and
Science, Tainan, R.O.C. Taiwan.

* Corresponding author

Abstract

The purpose of this study is to use the waste water (tofu waste water, TFW) obtained from the tofu production process as media for the cultivation of lactic acid bacteria (LAB). Then, antioxidative, antibacterial activity of the spent culture supernatant (SCS) of LAB were investigated. B0106 and BCRC 10069 strains were cultured in TFW, and their growth curve was stable at the 20th hour and the bacteria number was $9 \log \text{CFU/mL}$. 1 ~ 4% glucose or 2% peptone were added into TFW, the results showed that B0106 and BCRC 10069 bacteria number did not increase significantly. The ability of TFW to scavenge DPPH free radicals was $58.41 \pm 0.1\%$, the total phenolics content was equal to gallic acid $323.01 \pm 10.05 \text{ ppm}$ and the content of γ -aminobutyric acid (GABA) was $191.57 \pm 6.77 \text{ ppm}$. The SCS of B0106 and BCRC 10069 cultivated in TFW had the ability to scavenge DPPH free radicals to $59.89 \pm 0.57\%$ and $60.30 \pm 0.01\%$, respectively. The total phenolics content were 339.36 ± 8.96 and $307.27 \pm 10.47 \text{ ppm}$, GABA contents were 189.76 ± 23.36 and $228.82 \pm 5.30 \text{ ppm}$, respectively. In addition, SCS of B0106 and BCRC 10069 were used to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BCRC 15211) growth, the results showed that B0106 achieved 50% inhibitory activity against BCRC 15211 at the second hour, and inhibited BCRC 15211 growth more than 90% after the sixth hour. From the above results, tofu water is rich in nutrients for the growth of B0106 and BCRC 10069, the SCS of B0106 and BCRC 10069 have good antioxidant activity, high GABA content and strong inhibitory activity against BCRC 15211 growth.

Key words: Tofu waste water, Antioxidant, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,

Lactic acid bacteria

前言

隨著環保與保健的風氣與日俱增，越來越多人提倡不吃肉類，進而促進黃豆製品的產量增加，由亞洲逐漸向全球擴張，尤其是以眾多豆類加工品的基質「豆腐」占最大宗。豆腐含有豐富的營養物質，包含了大豆異黃酮、胺基酸、不飽和脂肪酸、卵磷脂、維生素 E、醣類、植物油、豆固醇、礦物質和豐富的大豆蛋白，具有「植物肉」之美稱。食用豆腐或豆類製品不但能降低體內膽固醇，還具有抗癌、治療心血管疾病、抗老化之幫助。豆腐不僅可以直接烹煮食用，也可以做成許多的豆類加工食品，例如：豆乾、豆花、素雞、素肉、豆腐乳、豆腐皮、豆腐絲、臭豆腐、油豆腐、素火腿、素肉脯、百頁豆腐等(周政輝、吳淑靜、柯易昌，2001)，具有高度的營養與加工食用價值。

傳統板豆腐的製作過程中，往往會伴隨著大量廢棄物的生成，可分成黃豆泡水後研磨去渣的產物為固態的豆渣與豆腐加壓去水製程中的產物為液態的廢水兩部份。由於傳統板豆腐的經濟價值較低，因此廢棄物的回收利用率很低，固態豆渣大多當作「飼料」及「廢棄物」，近年來也有多項研究豆渣水解做為發酵培養基生產聚甘露糖酶(黃欣珮，2001)，以及豆渣替代小麥或大豆粉來增加食物纖維和蛋白質含量(Li, Qiao, & Lu, 2012)。另一廢棄物豆腐廢水(TFW)，為製作傳統豆腐的流程中，在煮熟的豆漿中加入凝固劑(鹽滷)後，經過壓榨所產生具有豐富營養物質的廢水，若加工 1 噸大豆原料，約會產生 2~3 噸的豆腐水。近幾年，對於豆腐水的研究大多著重於利用酵母發酵豆腐廢水(Wei, Sun, Zhao, & Qu, 2013)，不僅能降解高濃度的有機污染物，亦可增加酵母細胞的產量，實現資源再循環(Lu, Zhang, & Zhou, 2014)，以及調整豆腐廢水的營養成分讓 *Lactobacillus bulgaricus* 利用產生 γ -aminobutyric acid(Yao & Wu, 2013)，培養綠藻(Rizkytata, Gumelar, & Abdullah, 2014)、葡萄藻(Yonezawa, Matsuura, Shiho, Kaya, & Watanabe, 2012)等等。

γ -胺基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)，為一種廣泛存在於大自然中的非蛋白質胺基酸，具有降低血壓、降低血糖、抑制癌細胞、利尿、抗憂鬱與鎮定等多種生理活性(唐嘉偉，2014)。有研究使用乳酸菌進行發酵靈芝米麴研發高 GABA 含量之乳酸菌發酵飲品(洪唯真，2014)、乳酸菌發酵黑豆奶生產 GABA(柯智元，2011)及探討發芽糙米產製過程中微生物調控發酵 GABA 累積變化之影響(洪建龍，2006)等。本研究中所探討的豆腐廢水中約含有 99% 的水分，其餘的 1% 為蛋白質、胜肽、糖類、維生素、脂類、胺基酸等各種營養成分。在傳統豆腐食品加工廠所產生之豆腐廢水，因投資成本及回收技術等條件限制下，使得大量的廢水被排放至下水道中，造成汙水中的(Cheical Oxygen Demand, COD)增加，進而使得環境的負荷也跟著上升，因此豆腐水極為適合做為本研究之材料。

植生型乳酸菌為生活在植物環境中的微生物族群和生活在動物環境中大不相同，而且環境因子相對較為複雜，因為在植物環境中充滿高濃度的單寧酸、生物鹼等殺菌物質，營養素成份種類與濃度也都很多變，所以動物性乳酸菌多半只能利用乳糖，而植物性乳酸菌則是對葡萄糖、果糖、蔗糖等皆可利用，對胺基酸與維生素的需求也較低，所以對於植物性蛋白質與胜肽的利用能力相較之下會比動物性乳酸菌來的佳(曾上賢，2013)。據文獻指出，由植物環境中分離出來的 *Lactobacillus plantarum* 具有多種生產細菌素的基因(plantaricin gene)，並能有效的抑制 *Escherichia coli* 與 *Staphylococcus aureus* (Chang et al., 2016)。乳酸菌 MSMC64-1 具有產生 reuterin 之能力，並且有效的抑制 *Salmonella typhi* DMST 5784 及 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 的生長(Chimchang, Theparee, Ladda, Tanasupawat, Wongsatayanon, & Taweechotipatr, 2015)。根據全國微生物抗藥性監測計劃的數據顯示，金黃色葡萄球菌為國內醫學中心及區域醫院病人中，僅次於大腸桿菌之最常見致病菌，且造成院內感染之金黃色葡萄球菌中，有 70% 以上是抗藥性金黃色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)。有研究顯示在人類感染 MRSA 與發病率、死亡率和住院的時間增加皆具有相關性，而且這種 MRSA 已經被認為是全世界醫院內部常見的主要病原菌(Karska-Wysocki, Bazo, & Smoragiewicz, 2010)。因 MRSA 可寄居於人體不同部位，包含鼻腔內及皮膚上，並且可藉由感染受傷的皮膚傷口，潛伏在體內長達數個星期至幾年的時間，MRSA 帶菌者是造成此菌傳播之主要途徑之一，若免疫系統受損的病人受到感染，則會有著更大的危險，然而醫療機構抗生素使用之增加是造成 MRSA 增加之原因之一。故本篇的研究目的為評估豆腐水是否具有做為植生型乳酸菌培養基的條件，並加以探討植生型乳酸菌發酵豆腐水後的發酵液，是否具有抗氧化、產生 γ -aminobutyric acid 及抑制 MRSA 的能力，進而使豆腐水增添更多的商業價值。

材料與方法

一、豆腐水(TFW)之製備

本試驗使用的黃豆為加拿大非基改黃豆(WangLaiXiang, Tainan, Taiwan)，首先將黃豆以清水浸泡過夜後，將水濾除秤重，加入溼豆重3倍水研磨去除豆渣後，將生豆漿加熱至攝氏九十至一百度之間，冷卻加入熟石灰攪拌均勻，待豆漿靜置凝固成豆腐腦後，放入模具中加壓，收集豆腐廢水，分裝大量以 121℃滅菌 20分鐘，冷卻後放置於 -20℃冰箱備用，於使用前先進行退冰小量分裝後，再次以 121℃滅菌 20分鐘，放置 4℃冰箱備用。

二、實驗用菌株及培養條件

本研究中所使用的植生型乳酸菌是從台灣南部的傳統發酵酸菜樣品中分離出來，將分離純化得到的菌株進行觸酶試驗、革蘭氏染色、鏡檢及乳酸定性試驗。挑選觸酶試驗

陰性、革蘭氏染色陽性及乳酸定性試驗陽性的菌落，作為初步篩選，再以產酸能力試驗挑選出產酸能力較佳之 B0106 菌株。標準菌株的使用為乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (BCRC 10069)及抗耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BCRC 15211)皆購自台灣新竹食品工業發展研究所。乳酸菌標準菌以 *Lactobacilli* MRS Broth (Acumedia, Taipei, Taiwan)於 37°C 培養 24 小時；金黃色葡萄球菌以 Tryptic soy broth (Acumedia, Taipei, Taiwan)於 37°C 培養 24 小時。

三、豆腐水之蛋白質及胜肽含量測定

豆腐水之蛋白質含量測定是參考 Bio-Rad Protein Assay 方法，首先取 5 μ L 測試樣品至 96 孔盤中，再加入 195 μ L 20% Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent，震盪後於室溫下反應 5 分鐘，以酵素免疫分析儀波長 595 nm 進行吸光值判讀，並以去離子水取代測試樣品，做為空白組，以牛血清蛋白(BSA) (SIGMA, Tainan, Taiwan)做為標準品，計算樣品之蛋白質含量(mg /mL)。

胜肽含量測定為參考(Bah, Carne, McConnell, Mros, & Bekhit, 2016)等人之方法。配製 OPA 呈色劑：取 2.5 mL 20% (w/v) SDS、25 mL 100 mM 四硼酸鈉、1 mL OPA (40 mg /mL)與 100 μ L 2-mercaptoethanol (MERCK, Tainan, Taiwan)，再以去離子水定量至 50 mL。取 50 μ L 測試樣品與 2 mL 呈色劑混合均勻，於室溫下反應 2 分鐘，測定 340nm 吸光值，並以去離子水取代測試樣品，做為空白組，以大豆蛋白胨(Soy peptone)做為標準品，計算樣品之胜肽含量(mg /mL)。

四、以豆腐水做為培養基之乳酸菌生長曲線測定

將二次活化之乳酸菌 B0106、BCRC 10069 接種 1%菌液至豆腐水中，於 37°C 恆溫培養箱進行培養，由不同時間點取出菌液經適當稀釋後，取 100 μ L 加入至 96 孔盤中，以酵素免疫分析儀測定 595 nm 吸光值，並取菌液做 10 倍序列稀釋塗抹於 MRS Agar 上，於 37°C 恆溫培養箱培養 24-48 小時，記錄菌數。另將乳酸菌 B0106、BCRC 10069 接種於 MRS broth 與豆腐水添加 glucose、peptone 培養基中，於 37°C 恆溫培養箱進行培養 20 小時後，取菌液做 10 倍序列稀釋塗抹於 MRS Agar 上，於 37°C 恆溫培養箱培養 24-48 小時，記錄菌數。

五、抗氧化試驗

(一) 清除 DPPH 自由基能力測定

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)自由基清除能力為參考(Hammi, Jdey, Abdelly, Majdoub, & Ksour, 2015)等人的方法加以修改。分別取 120 μ L 測試樣品至 96 孔盤中，再加入 80 μ L 0.5mM DPPH (ALDRICH, Tainan, Taiwan)，震盪後於室溫下避光反應 15 分

鐘，以酵素免疫分析儀波長517 nm進行吸光值判讀，並以去離子水取代測試樣品，做為空白組。自由基清除活性（抑制百分比）按下列方程式計算：抑制率（%）=（1-（測試樣品之吸光值/空白組之吸光值））× 100。

(二) 總酚化合物含量測定

本試驗條件藉由修改(Kujala, Loponen, Klika, & Pihlaja, 2000)等人的方法進行之，先將 1 N 磷鉬酸酚試劑(Folin-Ciocalteu's phenol reagent)(MERCK, Tainan, Taiwan) 10μL 加入至 96 孔盤中，再加入等量的測試樣品，最後加入 2% Na₂CO₃ 200 μL 震盪均勻後，於室溫下避光反應 30 分鐘，以酵素免疫分析儀波長 750 nm 進行吸光值判讀，並以去離子水取代測試樣品，做為空白組，以沒食子酸(Fluka, Tainan, Taiwan)做為標準品。

六、γ-aminobutyric acid (GABA)含量測定

本測定方法為參考(李俊霖，2003)的試驗條件，並加以修改後進行 γ-aminobutyric acid 的含量測定。將二次活化之乳酸菌 B0106、BCRC 10069 接種 1%菌液至豆腐水中，於 37°C 恆溫培養箱進行培養 20 小時後，取菌液以 13200 × g 4 °C 離心 10 分鐘，吸取上清液以 0.45μm 無菌濾膜過濾後，取 100μL 至烘箱中使其水分揮發至乾，再以乙醇:水:三乙胺(2:2:1) 20μL 回溶後進行乾燥，再加乙醇：水：三乙胺：異硫氰酸苯酯(PITC)以 (7:1:1:1) 30μL 回溶，震盪 20 分鐘後乾燥。再將乾燥物以 100μL 移動相回溶，以 0.45μm 濾膜過濾後進行 HPLC 分析，並以 GABA 標準品進行檢量線之製作，計算 GABA 之濃度。

七、豆腐水發酵液對抗藥性金黃色葡萄球菌之影響

本方法是依(Lin, Tsai, Lin, Tsen, & Tsai, 2008)等人的方法修飾而成，首先將二次活化之 B0106 與 BCRC 10069 接種於豆腐水(TFW)中，於 37°C 恆溫培養箱培養 20 小時，以 13200 × g 於 4 °C 離心 10 分鐘，取上清液以 0.45μm 無菌濾膜過濾後放置於 4 °C 冰箱備用。抗耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 BCRC 15211 則接種於 TSB 中，於 37°C 恆溫培養箱培養 20 小時，取 1mL 菌液以 13200 × g 於 4 °C 離心 10 分鐘，去除上清液，以磷酸鹽緩衝溶液(PBS)清洗菌體後離心，重複三遍，最後以過濾後的 TFW、B0106 與 BCRC 10069 上清液 1mL 回溶菌體，培養於 37°C 恆溫培養箱培養 2、4、6、8、10 個小時，個別取出塗抹於 TSA 上，於 37°C 恆溫培養箱培養 24-48 小時，並記錄菌數。本實驗所試驗之 B0106、BCRC 10069 及 BCRC 15211 菌數均需為 9 log CFU/ mL 以上之菌量。

八、統計分析

所有試驗皆進行三重複，並以平均值±標準偏差表示，所得之數據使用STATISTICA 7.1版統計分析軟體進行統計分析，以單因子單變異數分析(One-way ANOVA)及多元全

距檢定分析(Duncan's Multiple Range Test)進行檢測組間差異分析，並設定顯著水準為 $p < 0.05$ ，比較其顯著性之差異。

結果與討論

一、豆腐水(TFW)的蛋白質與胜肽含量

本研究模擬一般小型傳統豆腐加工廠製作豆腐，在其過程中收集所排放的豆腐廢水，經分析所收集到的廢水中，蛋白質與胜肽含量分別為 $0.35 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ 與 $3.6 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ (表一)。於本研究中，以收集到廢水溶液中的蛋白質含量 0.35 mg/mL 做為後續研究之基準，目的將製作豆腐的流程標準化，並控制豆腐品質的一致性與控制廢液中蛋白質的含量，進而達到減少調整蛋白質濃度的成本耗費及後續研究之實驗誤差。乳汁中的酪蛋白凝結後所產生的液體成分稱為乳清，在製作奶酪的過程中所產生的乳清蛋白，一般是依乳汁的濃度與含水量而有所不同，在羊乳清與牛乳清中的蛋白質含量分別為 15.9 mg/mL 與 3.8 mg/mL (陳德祐, 2010)，另有研究指出，豆豉中可萃取出 40.7% 的胜肽及 87.1% 的總蛋白質，其中胜肽與游離胺基酸在抗氧化化合物中扮演著重要的角色(Wang et al., 2008)。本研究中之豆腐水，雖然不像動物性乳清蛋白質含量及全豆中所含的蛋白質與胜肽含量多，但以黃豆經加水磨製成豆腐，其中蛋白質含量經過大量的稀釋後所產生的廢水，其中蛋白質濃度 0.35 mg/mL 與胜肽濃度 3.6 mg/mL ，亦屬含量高。

二、乳酸菌於豆腐水之生長曲線與添加糖類與蛋白質對乳酸菌生長之影響

本實驗將乳酸菌 B0106、BCRC 10069 接種至豆腐水中，於 37°C 進行培養，結果如圖一所示，B0106 與標準菌 BCRC 10069 的生長情形皆在第 10 小時趨近於穩定，且 B0106 在第 10-20 小時具有最高的吸光值，顯示 B0106 菌數比 BCRC 10069 來的好。另表一的結果顯示，B0106 與 BCRC 10069 培養於豆腐水中 20 小時後，蛋白質含量並無顯著的變化，胜肽含量卻有顯著的下降，這表示 B0106 與 BCRC 10069 先利用豆腐水中的胜肽，顯示豆腐水是適合乳酸菌生長的基質。

表二結果顯示，培養 20 小時 B0106 菌數為 $9.27 \pm 0.04 \text{ log CFU/mL}$ 、BCRC 10069 為 $9.07 \pm 0.10 \text{ log CFU/mL}$ ，B0106 與 BCRC 10069 接種至 MRS broth 培養基，培養 20 小時測得的菌數分別為 $9.65 \pm 0.05 \text{ log CFU/mL}$ 與 $9.11 \pm 0.03 \text{ log CFU/mL}$ ，顯示 B0106 與 BCRC 10069 培養於 MRS broth 培養基具有比培養於豆腐水有較高的菌量。於陳德祐(2010)的研究中顯示，極具豐富營養之羊乳清與牛乳清用於培養乳酸菌 19 小時後，菌數並沒有比單獨培養在 MRS broth 中高，但在 MRS broth 中混合對等體積之羊乳清與牛乳清，則有助於乳酸菌菌數的增加。但由於商業培養基 MRS 成本高，且本研究中豆腐水做成的培養基，其菌數高於 9 log CFU/mL ，基於經濟效益、環保及菌數的考量，豆腐水是具有良好的培養基的潛力。

此外，為了測試豆腐水中增加碳源及氮源對於乳酸菌生長之影響，本試驗添加 glucose 或 peptone 於豆腐水中，測試乳酸菌 B0106 與 BCRC 10069 是否會因糖類或胜肽的增加而提升其菌數。添加 2-4% glucose 或 2% peptone 於豆腐水中，經培養 20 小時後所測得的菌數如表一結果顯示，添加 glucose 或 peptone 於豆腐水中與不添加之豆腐水，乳酸菌菌數皆無顯著的差異。林芝仔(2011)的研究中指出 *Lactobacillus plantarum* BCRC10069 發酵豆渣，乳酸菌數可達 8.9 log CFU/mL 以上。由本研究結果顯示，豆腐水中的營養物質能使 B0106 與 BCRC 10069 分別達到 9.27 及 9.07 log CFU/mL 的菌數，相對於乳酸菌發酵豆渣達到 8.9 log CFU/mL，乳酸菌生長於豆腐水有更高的菌數，因此可推測豆腐水與豆渣皆具有發展為乳酸菌培養基之潛力。

二、乳酸菌發酵豆腐水之抗氧化活性分析

(一) DPPH 清除自由基能力

豆腐水清除自由基的能力，蛋白質濃度在 0.35 ± 0.01 mg/mL 的條件下，具有 $58.41 \pm 0.10\%$ 之清除活性，在經過乳酸菌發酵之後 B0106 與 BCRC 10069 的自由基清除率分別為 $60.30 \pm 0.01\%$ 及 $59.89 \pm 0.57\%$ ，相較於豆腐水具有顯著的差異(如表三)。李勝森等人(2016)以乳酸菌 LYC4 24 發酵大豆，在發酵 72 小時後菌數達到最高值 7.80 log CFU/ml，在 60 小時後，發酵液之自由基清除能力為 41.79%。本實驗的結果，B0106 與 BCRC 10069 發酵豆腐水後，其 DPPH 清除自由基清除能力，皆較乳酸菌發酵全豆來得高，顯示豆腐水中的營養物質更適合乳酸菌的生長，且豆腐水為廢棄物，更符合環保及經濟效益。

(二) 總酚化合物含量測定

多酚類化合物能幫助人體消除自由基，也具有抗老化、抗發炎及防止心血管病變、糖尿病、癌症的發生，總酚的含量多寡與抗氧化能力也具有正相關性，為一種很好的抗氧化物質(陳佳惠、黃秋菁、陳雅筑、王曉芬、易光輝，2013)。沒食子酸普遍存在於植物中，為天然的植物酚且穩定性高，可捕捉過氧化氫，避免 DNA 受到損傷，達到抗氧化之效果，故以此表示樣品中總酚化合物之含量(呂珮嘉，2009)。由表三的結果顯示，豆腐水所測得相當沒食子酸含量為 323.01 ± 10.05 ppm，經 BCRC 10069 發酵之豆腐水相當於沒食子酸含量為 307.27 ± 10.47 ppm、B0106 發酵後相當沒食子酸含量為 339.36 ± 8.96 ppm，分析比較後發現 BCRC 10069 發酵豆腐水後的總多酚含量有下降的趨勢，相較之下 B0106 發酵豆腐水所測得的總多酚含量明顯高於 BCRC 10069。其中的原因推測可能為乳酸菌發酵豆腐水所產生的酵素，催化酚類化合物的生成及種類皆會影響到總多酚的含量(葉容安，2010)。

三、乳酸菌發酵豆腐水之 GABA 含量變化

本研究分析了豆腐水及其經乳酸菌發酵後的 GABA 含量如表一，豆腐水為 $191.57 \pm$

6.77 ppm、BCRC 10069 發酵後之豆腐水為 228.82 ± 5.30 ppm 及 B0106 為 189.76 ± 23.36 ppm，豆腐水經 BCRC 10069 發酵後之 GABA 的含量有顯著的增加，而 B0106 則不具有增加 GABA 含量之能力。乳酸菌發酵豆漿 0 到 30 小時，GABA 可由 93.9 增加到 198.4 mg/100g(林寅申，2003)。利用五種混合乳酸菌於 42°C 下發酵豆漿 30 小時後，添加蛋白酶對大豆蛋白質進行水解，所製成之乳清凍乾粉末，其 GABA 含量最高可達到 504.3 mg/100g(陳俞伶，2005)，由以上的文獻可看出黃豆一直是優良的 GABA 來源。本研究使用的豆腐水，由於蛋白質與胜肽含量較低，而文獻中豆漿營養成分高，經乳酸菌發酵可得到較高的 GABA 含量，因此增改一些組成來促進 GABA 的含量增加，將為未來的研究方向。

四、乳酸菌發酵豆腐水抑制病原菌之能力

研究報告指出乳酸菌發酵產生的代謝產物中具有乳酸、過氧化氫、多醣類、細菌素(bacteriocin)...等多種抑菌物質，乳酸菌產生的細菌素在低pH值的環境下，具有抑制病原菌生長之能力(Chang et al., 2016)，本研究利用B0106、BCRC 10069發酵豆腐水後所產生之發酵液，將其與具有抗Methicillin藥性之金黃色葡萄球菌BCRC 15211共同培養，偵測其是否具有抑制此菌之能力。由圖二的結果得知，B0106發酵液作用兩小時就達到52.73%的抑制率，第六小時B0106及BCRC 10069分別達到95.94%及87.06%的抑制率，而且隨著共培養的時間增加，抑制病原菌的能力愈佳，在第10小時B0106與BCRC 10069的抑制率分別為99.14%與96.75%，而對照組豆腐水皆維持不到50%的抑制能力，由以上結果得知豆腐水本身具有些微的抑制BCRC 15211之能力，推測豆腐水本身可能具有抑制BCRC 15211生長的物質，而B0106與BCRC 10069的抑制效果比豆腐水佳，推測可能的因素為發酵產生的代謝產物中的乳酸、過氧化氫、多醣類、細菌素...等多種抑菌物質，在低pH值的環境下共同交互作用得到的加乘效力，而B0106抑制BCRC 15211的效果比BCRC 10069來的好，可能是因為B0106利用豆腐水的能力較佳、生長速度較快，因此產生的抑菌物質在交互作用下的效果比BCRC 10069具有優勢。

結論

現今食品加工所排放之廢棄物及廢水，最常被利用開發成為替代能源。因此藉由本研究，透過回收利用黃豆加工製作豆腐所產生的廢水，將毫無價值的豆腐廢水賦予其強大的發展潛力，一方面可幫助工廠解決廢水排放之問題，降低對環境的負荷，另一方面將廢水產生更高的經濟價值，甚至更可以發展成高單價之產品，而豆腐水即是一種極具經濟價值的培養基，不需額外添加其他營養物質即可使菌量達到 $9 \log \text{CFU/mL}$ ，且經過乳酸菌 B0106 及 BCRC 10069 發酵後亦具有抗氧化能力及抑制 MRSA 達 95% 以上之能力。由此顯示豆腐水是良好的乳酸菌培養基，及其發酵液具有良好之發展潛力。

參考文獻

- 李俊霖 (2003)。提高紅麴中monacolin K、GABA與降低citrinin生成量之研究。台北：國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 李勝森、陳怡文、吳峻瑋、謝鈞任、馬雅均、朱紀實、羅至佑、呂英震 (2016)。篩選以大豆為發酵基質生產血管收縮素轉換酶抑制能力最佳之乳酸菌株。嘉大農林學報，13，95-104。
- 呂珮嘉 (2009)。[6]-生薑醇美白活性及抗氧化能力之研究。台中：弘光科技大學化妝品科技研究所碩士論文。
- 林芝仔 (2011)。植物性乳酸菌發酵豆渣之研究。嘉義：國立嘉義大學食品科學系碩士論文。
- 林寅申 (2003)。發酵豆漿之乳清對血管升壓素轉換酶及脂氧合酶之抑制及其降低高血壓的效果。基隆：國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 柯智元 (2011)。乳酸菌發酵黑豆奶最適產 γ -胺基丁酸條件及以強迫游泳試驗探討其抗憂鬱效果。基隆：國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 洪建龍 (2006)。發芽糙米產製過程中微生物調控及其發酵生理活性產物之探討。台北：國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文。
- 洪唯真 (2014)。以天然農業作物為發酵原料固態培養靈芝菌絲體及所得靈芝菌絲米基開發富含 γ -胺基丁酸之乳酸菌發酵產品。基隆：國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 周政輝、吳淑靜、柯易昌 (2001)。市售黃豆加工食品之嘌呤含量分析。嘉南學報，27，185-194。
- 施佩禎、黃仲挺、汪文忠、楊朝成 (2012)。羥基取代之桂皮酸苯乙酯衍生物合成並探討其抗氧化能力與應用於化粧品之安全性。嘉南學報，38，61-67。
- 陳德祐 (2010)。牛與羊初乳乳清對益生菌生長影響及抗氧化作用之研究。台中：亞洲大學生物科技學系碩士論文。
- 陳佳惠、黃秋菁、陳雅筑、王曉芬、易光輝 (2013)。化妝品常用二十八種精油之總酚含量測定、清除DPPH自由基能力、總抗氧化能力及主要精油化學成分分析之研究。弘光學報，69，1-11。
- 陳俞伶 (2005)。發酵豆乳中活性胜肽之生產。基隆：國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 唐嘉偉 (2014)。以乳酸菌發酵生產含 γ -胺基丁酸之發酵乳及益生菌特性之分析。基隆：國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 黃欣珮 (2013)。利用大豆豆渣液態培養 *Aureobasidium pullulans* NCH-218 生產聚甘露糖酶及酵素特性分析。台中：中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
- 葉容安 (2010)。研究發酵與熱處理對金棗釀酒之機能性成分與其抗氧化性之影響。宜蘭：國立宜蘭大學食品科學系碩士論文。

曾上賢 (2013)。乳酸菌抑制血管收縮素轉換酶活性之及不同素材對其抑制活性之探討。
台南：嘉南藥理科技大學生物科技系碩士論文。

- Anyogu, A., Awamaria, B., Sutherland, J.P., & Ouob, L.I.I. (2014). Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. **Food Control**, **39**, 119-27.
- Bah, C.S., Carne, A., McConnell, M.A., Mros, S., & Bekhit, Ael-D. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, **202**(1), 458-66.
- Chang, M.H., Hong, S.F., Chen, J.H., Lin, M.F., Chen, C.S., & Wang, S.C. (2016). Antibacterial activity *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricin genes. **African Journal of Microbiology Research**, **10**(22), 796-803.
- Chimchang J., Theparee T., Ladda B., Tanasupawat S., Wongsatayanon B.T., & Taweechotipatr M. (2015). Antimicrobial Properties of a Potential Probiotic *Lactobacillus* from Thai Newborn Feces. **Journal of the Medical Association of Thailand**, **98**(9), 116-22.
- Hammi, K.M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., & Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. **Food Chemistry**, **184**(1), 80-89.
- Karska-Wysocki B., Bazo M., & Smoragiewicz W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbiological Research**, **165**(8), 674-86.
- Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of phenolics and three individual compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48**(11), 5338-5342.
- Li, B., Qiao, M. & Lu, F. (2012). Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). **Food Reviews International**, **28**(3), 231-52.
- Lin, C.K., Tsai, H.C., Lin, P.P., Tsen, H.Y., & Tsai, C.C. (2008). *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. **Anaerobe**, **14**(5), 251-5.
- Lu, H.F., Zhang, G.M., & Zhou, J.J. (2014). Using Yeast to Treat Soybean Wastewater and Realize Resource Recovery. **Applied Mechanics and Materials**, **675-677**, 733-37.
- Rizkytata, B.T., Gumelar, M.T., & Abdullah, T.H. (2014). Industrial tofu wastewater as a cultivation medium of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Energy Procedia**, **47**, 56-61.
- Wei, Q., Sun, Y., Zhao, J., & Qu, P. (2013). Research on Resource Utilization of Wastewater from the Production of Soybean Products. **Journal of Biobased Materials and**

Bioenergy, 7(4), 529-32.

Wang, D., Wang, L.J. Zhu, F.X., Zhu, J.Y., Chen, X.D., Zou, L., Saito, M., & Li, L.T.

(2008). *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, **107**(4), 1421-28.

Yao, Z.P., & Wu, F. (2013). Enrichment of GABA in wastewater of tofu by lactic acid bacteria.

Food Science and Technology, **4**(16), 7-10.

Yonezawa, N., Matsuura, H., Shiho, M., Kaya, K., & Watanabe, M.M. (2012). Effects of soybean curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22. *Bioresource Technology*, **109**, 304-7.

附錄（圖表）

表一、豆腐水(TFW)發酵液之蛋白質、胜肽及 GABA 含量

	TFW	10069	106
Protein 含量(mg/mL)	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02
Peptide 含量(mg/mL)	3.60 ± 0.01 ^a	3.00 ± 0.15 ^b	2.95 ± 0.02 ^b
GABA 含量(ppm)	191.57 ± 6.77 ^a	228.82 ± 5.30 ^b	189.76 ± 23.36 ^a

^{a, b}分別表示屬於不同分群且具有顯著差異，顯著水準為 $p < 0.05$ 。

表二、乳酸菌培養於添加 glucose、peptone 之豆腐水(TFW)與 MRS 培養基之菌數比較

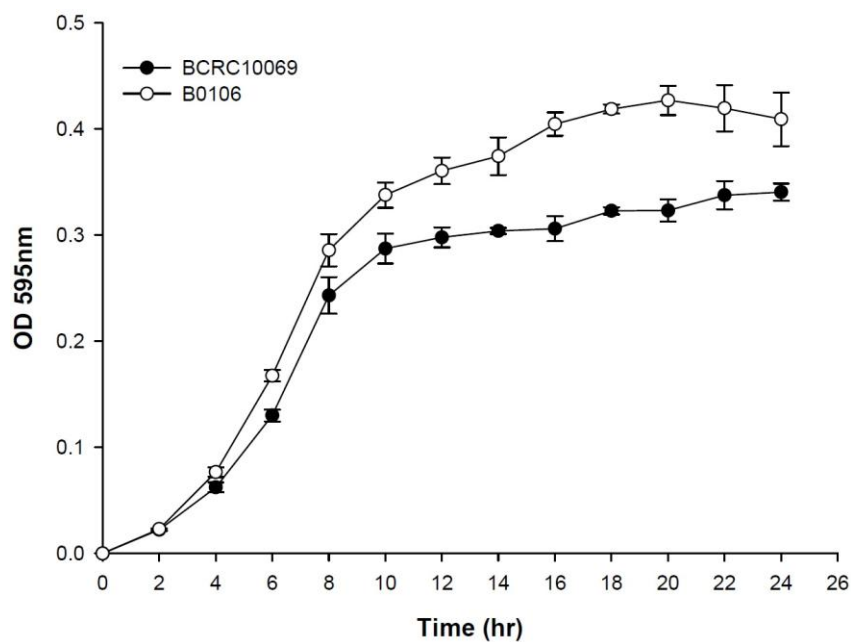
	TFW	TFW + 2% glucose	TFW + 3% glucose	TFW + 4% glucose	TFW + 2% peptone	MRS
B0106 (log CFU/mL)	9.27 ± 0.04 ^a	9.29 ± 0.04 ^a	9.27 ± 0.03 ^a	9.28 ± 0.03 ^a	9.31 ± 0.02 ^a	9.65 ± 0.05 ^b
BCRC 10069 (log CFU/mL)	9.07 ± 0.10 ^a	9.09 ± 0.04 ^a	9.07 ± 0.01 ^a	9.01 ± 0.02 ^a	9.06 ± 0.08 ^a	9.11 ± 0.03 ^a

^{a, b}分別表示屬於不同分群且具有顯著差異，顯著水準為 $p < 0.05$ 。

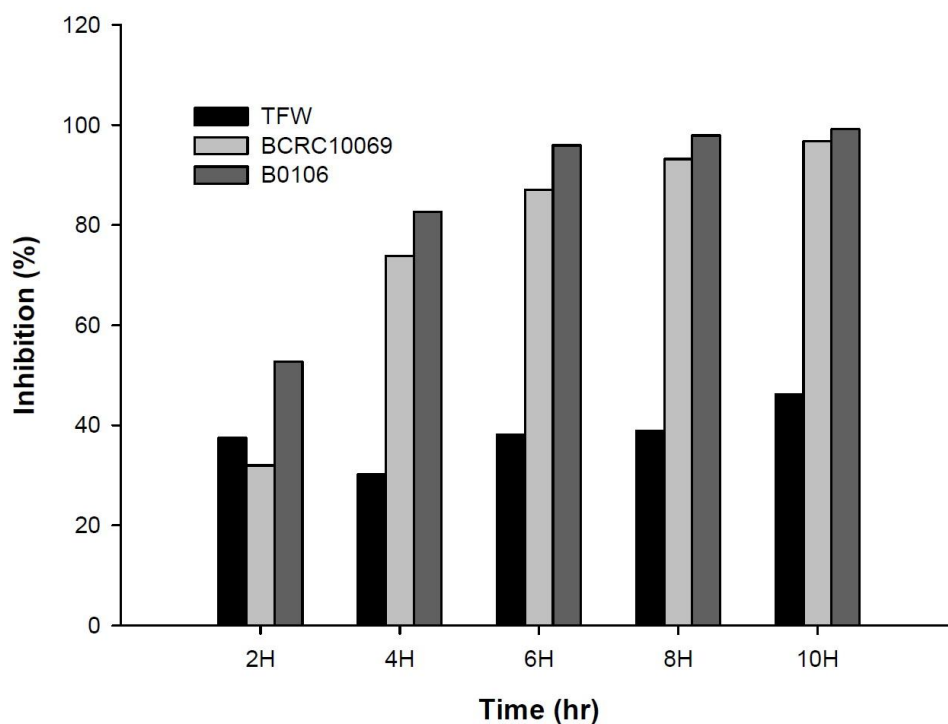
表三、豆腐水(TFW)發酵液之抗氧化能力

	TFW	10069	106
DPPH 自由基清除率 (%)	58.41 ± 0.10 ^a	60.30 ± 0.01 ^b	59.89 ± 0.57 ^b
總酚化合物含量 (ppm)	323.01 ± 10.05 ^{ab}	307.27 ± 10.47 ^b	339.36 ± 8.96 ^a

^{a, b}分別表示屬於不同分群且具有顯著差異，顯著水準為 $p < 0.05$



圖一、乳酸菌培養於豆腐水(TFW)之菌數吸光值與時間關係圖



圖二、乳酸菌發酵豆腐水(TFW)上清液抑制病原菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)之抑制率與時間之關係圖