

第九屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA9-024

作品名稱：以冷泉菌水解鯖魚蒸煮液製備去粉刺乳液

姓名：張任瑩

關鍵字：冷泉菌、鯖魚蒸煮液、化妝品

摘要

研究係利用蘇澳冷泉菌(杜勒氏桿菌, BCRC 17925)水解鯖魚加工蒸煮液, 期由食品工廠排放廢水中開發高價值與高功能的健康食品來源, 提高魚肉罐頭業者回收蒸煮廢液意願, 減少對環境的影響。結果顯示, 蒸煮液經冷泉菌發酵 10~30 分鐘, 可顯著地降低鯖魚蒸煮液的揮發性鹽基態氮由 135 降至 99 mg%, 添加冷泉菌於魚肉水解液中, 亦可抑制金黃色葡萄球菌的生長, 而此水解液並不會影響腸內大腸桿菌的生長。添加冷泉菌水解液凍乾後的總色差與市售奶粉並無明顯差異。鯖魚蒸煮液去除 DPPH 能力可達 92.26%, 冷泉菌的添加並不會降低其高去除能力。冷泉菌對亞鐵離子能力的去除效果最好, 殘留率 31.29%。添加冷泉菌組的鯖魚肉蒸煮水解液, 其亞麻油酸過氧化物降低的能力, 高達 98.20%, 本研究之成果顯示冷泉菌水解液具抗氧化性。以此水解液所製備的多重相乳液對志願者的皮膚保水力可達 60 分鐘以上, 且其顆粒均低於 30um, 可以在 20 分鐘內完全滲透進入皮膚中, 並且可以去除皮膚毛孔內的污垢, 其最適添加濃度為 0.05%(w/w)

關鍵詞：冷泉菌、鯖魚蒸煮液、化妝品

Abstracts

The studies will focus on the functional properties cooking drip obtained from canned mackerel which digested by Suao Cold-Spring Bacterial (BCRC 17925) in different formation times. In order to developing a high value functional food resource, these by-products can increase the cooking drips recycle intensity and reduce their effects to environment. After 10-30 min digestion, the VBN of mackerel cooking drip decreased from 135 to 99 mg%. The hydrolysates inhibited *Staphylococcus aureus* colony but it could not inhibited *E. coli*. There were no significantly difference between hydrolysate and commercial milk powders on chromatic aberration. The DPPH remove ability of mackerel hydrolysate could up to 92.26% and the fermentation processing would not reduce the ability. The Cold-Spring bacterial fermented hydrolysates could oxidize ferric ions to 31.29% and inhibited linoleic acid peroxidation products up to 98.20%. The present studies showed these Cold-Spring bacterial hydrolysates with antioxidation ability. Using multiple emulsion technology, the hydrolysate emulsion had skin water capacity until 60 min. The particle sizes of hydrolysates emulsion were less than 30 um. The emulsion can complete passage to inner layer of volunteer's skin and remove the dust from skin pores. The suitable ratio of hydrolysate in cosmetic formula were 0.05% (w/w)

Key words : Cold spring bacterial, Mackerel cook drips, Cosmetic emulsion

壹、研究動機

為減少鯖魚罐頭製作後，所產生的蒸煮液，排放到河川中，造成河川的優養化等環境保護問題，將這些高蛋白質來源以微生物水解的方式，作為天然抗氧化劑來源，是目前環境工程中頗受注目的方向之一。吳(2005)以日本白鰻廢棄物之蛋白質抽出物為原料，利用商業酵素水解後，探討抑制亞麻油酸自氧化、捕捉 DPPH 自由基及螯合鐵離子等被使用來等抗氧化性指標，結果顯示魚肉酵素水解物具有較強的抗氧化能力，此一酵素水解物抗氧化能力之強弱與胜肽類的含量有關。其有效的胜肽數目約為五胜肽到十胜肽間。

此類蛋白質水解液還能發揮抑制病原菌的效果，黃(1995)就認為，乳酸菌就可以降低 pH 值，產生乳酸，降低 pH 值，而有抑制腐敗菌的生長。產生抗菌性物質（如 nisin）、過氧化氫、有機酸（如乳酸、醋酸、蟻酸及丙酸），使氧化還原電位（Eh）及水活性降低，阻礙一般微生物生長。且對沙門氏菌，金黃色葡萄球菌及肉毒桿菌均有抑制生長之作用，而阻止其毒素的產生。吳(1998)的研究指出，幾丁聚醣水解液均可有效抑制牛乳中大腸桿菌，李斯德菌，沙門氏菌，金黃色葡萄球菌之生長。幾丁聚醣水解液可有效抑制生乳中中溫菌數及低溫菌數，減緩牛乳 pH 值之下降，且有效抑制金黃色葡萄球菌與沙門氏菌之生長，增加生乳 4°C 貯存時間至少 4 天以上。

陳等人(2008)認為，利用蘇澳冷泉常在菌的蛋白質分解能力與澱粉分解能力，將市售羊奶粉分解，利用產物來探討抑制麵包發黴，培養皿發黴的可行性，並且製備了具可接受的風味產品，以減輕羊乳本身的特殊風味。結果顯示，以冷泉菌發酵羊奶粉 48 小時凍乾成粉末。這種水解羊奶粉的粉末的確可以延緩麵包表面黴菌生長的時間達兩天以上，並且使得培養皿的黴菌生長速率減少約一半。陳等人(2003)回顧了乳酸菌的抑菌功能，他們認為以 *L. johnsonii* 生產所得之發酵液具有殺菌能力，對於人體內的幽門螺旋桿菌也有部份抑制作用，但其抑菌效果和所產生的酸並無直接關係，而是一種因為乳酸菌分解牛乳後產生的一種寡胜肽—細菌素所產生的效果。曾(2006)把乳酸菌加入麵糰中作為麵包的抑菌劑，在儲藏六天後土司的總生菌數，添加乳酸菌的土司（3.46 log CFU/g）的總生菌數明顯比白土司（7.85 log CFU/g）低。從以上的研究都可以看出，將牛乳或是羊乳利用益生菌發酵後，的確有產生抑制細菌等微生物生長的可能性。

陳等人(2008)用豆鼓分離 *Enterococcus faecium* 菌株，開發成為抑菌噴霧劑可應用於傳統市場或食品工廠的肉類、豆乾等食品保存；而豆鼓乳酸菌株

所產生的細菌素，本質屬於蛋白質胜肽，容易被人體腸胃道分解，不會累積體內、產生毒素。

貳、研究目的

本研究係利用添加不同量的冷泉菌，水解蒸煮後之鯖魚肉所得的水解液，其揮發性鹽基態氮的變化情形，對金黃色葡萄球菌或是大腸桿菌的抑制效果。並將此水解液凍乾後，以色差儀與市售奶粉比較其色差，並以探討此水解液的抗氧化作用機制，進一步了解冷泉菌的生理功能，利用鯖魚罐頭工廠加工後的廢棄物中所含的蛋白質，開發一種類似多用途的胜肽來源，探討其對皮膚上污垢的去除，皮膚保濕效果的增加與皮膚穿透效率的影響之水產新產品，增加魚罐頭工廠的收益，減少對環境的負荷。

參、研究設備及器材

儀器：全波段分光光度計，均質機，色差儀，凍結乾燥機，冰箱。可控溫培養箱(已報廢)，電磁攪拌器(SP131825, Thermo Sci. Co. Ltd., USA)，攪拌機(市售品)，正立位相差顯微鏡(Eclipse 50i, Nikon Co. Ltd., Japan)，均質機(PT3100, Polytron, Switzerland)，皮膚保濕度檢測器(Corneometer CM 825)

設備：燒杯，三角瓶，攪拌子，攪拌機，電子天平，載玻片，數位相機，吸管，滴管。



圖一 鯖魚肉蒸煮液的分離。

肆、研究過程或方法

1. 本研究所採用的水解菌株，係採集自宜蘭縣蘇澳冷泉源頭處，取樣溫度為攝氏 11 度，取樣時間為 2007 年 1 月 14 日，原水取樣後，經以 parafilm 密封後，在冷藏狀態下迅速送回實驗室，進行純種培養，經過光學顯微鏡確認其為單一菌種後，測量其 16s rDNA 序列，透過 Blast 軟體比對目前已知菌株的基因序列，確認其為草酸桿菌屬之 *Duganella* spp. 株（以下簡稱冷泉菌）。冷泉菌的大量培養：購買洋菜培養基(Difco, USA)，取 14 g 洋菜培養基粉末，加入 1 L 逆滲透水，攪拌均勻後，在 121°C 下加壓滅菌 30 分鐘，將所取得的冷泉菌劃線培養後，取 10 g 和培養基 500 g 混合後，放置在冷藏庫中(7-10 °C)下培養 14 天備用。
2. 魚肉來源係採集花腹鯖(*Scomber australasicus*)後，冷凍送回實驗室，流水解凍 1 小時，去頭去尾後採取魚肉，經過蒸煮 45 分鐘後，收集蒸煮液與魚肉，冷凍備用(如圖一)。
3. 魚肉水解處理：取出魚肉後，在流水下解凍 30 分鐘，使之完全解凍，秤取魚肉 30g，加入逆滲透水 70 g 後，另外秤取 10, 20, 30, 40, 50, 60 g 之冷泉菌，加入魚肉中，並以果汁機進行攪拌約 10 秒，將均質後的魚肉，倒入 250 mL

的錐型瓶中，以鋁箔紙覆蓋後，放置於 28°C 的烘箱中，發酵水解 24 小時，取出後以紗布粗過濾，續以二號濾紙過濾後，倒入封口袋中，冷凍待用。另外製備沒有添加冷泉菌的魚肉溶液，同樣於 28°C 下發酵 24 小時，冷凍待用，作為本實驗的對照組。每組均有三重複。



圖二 鯖魚肉水解發酵中。

4. 取水解後的魚肉，進行揮發性鹽基態氮的定量。其方法如下：

- (1) 稱取 5g 樣品，置入均質杯中，加入 2.2% TCA 溶液 45mL，以果汁機均質。
- (2) 倒入燒杯中，以鋁箔紙覆蓋，靜置 10 分鐘。
- (3) 以濾紙 (Whatman No. 1, 9cm) 過濾於 50 ml 錐形瓶，再以鋁箔紙密封，此即為檢液。
- (4) 在康威氏皿磨砂面塗上適量凡士林。
- (5) 取硼酸吸收液 1 ml 於內室，以蓋子蓋住內室，露出有橫溝之外室。
- (6) 取飽和碳酸鉀溶液 1 ml 於外室一側，再取 1 ml 檢液於外室的另一側，並使兩液體分置兩旁不接觸。
- (7) 加蓋密合並以固定器固定之，輕輕轉動使外室之溶液充分混合。
- (8) 平放於 37°C 恆溫器中，靜置 90 分鐘後取出。取出或置入時均應保持平穩。
- (9) 於室溫中以 0.02N 鹽酸溶液滴定內室液，以清潔之玻棒輕輕攪拌之，初呈粉紅色時，讀取 0.02N 鹽酸溶液之消耗 ml 數。
- (10) 空白試驗：

空白試液以 5 ml 去離子水加入 2.2%TCA 溶液 45 ml。試藥之添加及操作方法同上述之步驟，但係以 1 ml 空白試液代替檢液加入外室。

(11)計算方式：

結果係以試樣 100g 中之揮發性鹼基態氮之毫克數表示。

$$\text{VBN (mg/100g)} = 0.28 \times (A-B) \times F \times 100/S$$

A: 試樣滴定數(ml)

B: 空白試樣滴定數(ml)

F: 0.02N HCl 之力價

S: 待測之樣品重



圖三 魚肉水解液揮發性鹽基態氮測定中。

5. 魚肉水解液對金黃色葡萄球菌的抑制：

配置 NA(Nutrient Agar)培養基：秤取 1.8 g 之 NA 培養基溶於 500 ml 的無菌水中，放入直式滅菌釜後，121℃滅菌 60 分鐘。取魚肉水解液 0.5 ml 與放涼後之 NA 培養基攪拌均勻，後將培養基倒入塑膠培養皿中，以微量吸管吸取金黃色葡萄球菌菌液 0.5 ml 倒入培養皿中，以玻璃塗抹棒塗抹均勻，密封後，置於 37

°C 培養箱中培養 72 小時後，以菌落計數器點數培養皿上的菌落數。

6. 魚肉水解液對大腸桿菌的抑制：

配置 NA(Nutrient Agar)培養基：秤取 1.8 g 之 NA 培養基溶於 500 ml 的無菌水中，攪拌均勻後，放入直式滅菌釜後，121°C 滅菌 60 分鐘。取魚肉水解液 0.5 ml 與放涼後之 NA 培養基攪拌均勻，後將培養基倒入塑膠培養皿中，以微量吸管吸取大腸桿菌液 0.5 ml 倒入培養皿中，以玻璃塗抹棒塗抹均勻，密封後，置於 37°C 培養箱中培養 72 小時後，以菌落計數器點數培養皿上的菌落數。

7. 色差儀分析：取水解後的魚肉，冷凍後進行凍結乾燥，將凍結乾燥的粉末以色差儀進行其顏色差異性的判斷。測定方式為先將色差儀開機後，以標準白板歸零，將凍結乾燥後的粉末平均鋪放在樣品室中，按下機器上的 Means 鈕，電腦會紀錄樣品的亮度(L)，紅綠度(a)值與黃藍度(b)後，進行統計分析。並以下列公式計算總色差：色差公式：

$$\Delta E_{ab} = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2}$$

ΔL = L 樣品 - L 標準明度差異

Δa = a 樣品 - a 標準紅/綠差異

Δb = b 樣品 - b 標準黃/藍差異

ΔE 總色差的大小

ΔL 大表示偏白， ΔL 小表示偏黑

Δa 大表示偏紅， Δa 小表示偏綠

Δb 大表示偏黃， Δb 小表示偏藍

範圍色差 (容差)

0 - 0.25 ΔE

非常小或沒有；理想匹配

0.25 - 0.5 ΔE

微小；可接受的匹配

0.5 - 1.0 ΔE

微小到中等；在一些應用中可接受

1.0 - 2.0 ΔE

中等；在特定應用中可接受

2.0 - 4.0 ΔE

有差距；在特定應用中可接受

4.0 ΔE 以上

非常大；在大部分應用中不可接受



A



B

圖四 魚肉水解液凍乾粉末外觀(A)色差儀(B)。(國立台灣海洋大學食品科學系提供儀器)

8. 冷泉菌水解魚肉蒸煮液凍乾粉末 DPPH 自由基清除能力測定

- 將先前所製備的凍乾粉末配置一定濃度的樣品液後，放置-20 度冰箱，備用。
- DPPH 配置方法：配置 0.1mM DPPH 之酒精溶液(C₂H₅OH 95%)，定容至 100ml 超音波震盪 2-3 分鐘，裝入褐色瓶中待用。
- 空白組加入蒸餾水 1ml 二次，其餘實驗組先加入樣品 1ml。
- 實驗組的試管加入 1ml DPPH 溶液，加入 DPPH，震盪混合均勻。
- 30 分鐘後，於 517 nm 下測吸光值，越低表示清除能力越強。

DPPH 自由基清除能力計算公式如下：

$$\text{【(空白組吸光值-樣品組吸光值) / 空白組吸光值】} \times 100\%$$

9. 冷泉菌水解魚肉蒸煮液凍乾粉末抑制亞麻油酸過氧化能力測定

- 將先前所製備的凍乾粉末配置一定濃度的樣品液後，放置-20 度冰箱，備用。
- 亞麻油酸配置方法：配置 78mM 亞麻油酸之酒精溶液(C₂H₅OH 95%)，定容至 50ml 超音波震盪 2-3 分鐘，裝入褐色瓶中待用。另外配置 0.1 M 磷酸緩衝溶液，0.6%鹽酸酒精溶液，0.02 M 氯化鐵溶液，30%的氰化胺溶液待用。
- 空白組加入去離子水 200 μ l，其餘實驗組加入樣品 200 μ l，加入緩衝溶液 150 μ l，攝氏 37 度水浴 3 分鐘後，加入緩衝溶液 20 μ l 後，繼續放置 10 分鐘，加入鹽酸酒精溶液 5 ml，加入 0.1 ml 氯化鐵溶液，加入 0.1 ml 氰化胺溶液後，震盪混合均勻。
- 5 分鐘後，於 480 nm 下測吸光值，越低表示清除能力越強。

10. 冷泉菌水解魚肉蒸煮液凍乾粉末螯合亞鐵離子測定

- 將先前所製備的凍乾粉末配置一定濃度的樣品液後，放置-20 度冰箱，備用。
- 亞鐵離子配置方法：配置 2mM 氯化亞鐵溶液，定容至 100ml，5 mM ferrozine，定容至 100ml。HPLC 級的甲醇。
- 空白組加入去離子水 1 ml，其餘實驗組加入樣品 1 ml，加入甲醇 3.7 ml，震盪均勻，加入氯化亞鐵溶液 100 μ l 後，5 mM ferrozine 溶液 200 μ l，繼續放置 10 分鐘，以超過濾膜抽氣過濾以去除雜質。
- 於 480 nm 下測吸光值，越低表示樣品清除亞鐵離子的能力越強。

11. 冷泉菌水解魚肉蒸煮液凍乾粉末還原能力測定

- 將先前所製備的凍乾粉末配置一定濃度的樣品液後，放置-20 度冰箱，備用。
- 赤血鹽配置方法：配置 1% 赤血鹽溶液，定容至 100ml。此藥品必須實驗當場配置，不可使用舊藥。會導致實驗誤差。另外配置 0.2 M 磷酸緩衝溶液，10% 三氯醋酸溶液，0.1%氯化鐵溶液待用。

c. 實驗組加入樣品 1 ml，加入緩衝溶液 1 ml，加入 1% 赤血鹽溶液 1 ml，攝氏 50 度水浴 20 分鐘後，10%三氯醋酸溶液 1ml 後，混合均勻後，取 1 ml 混合液加入 1 ml 去離子水，0.1%氯化鐵溶液 0.2 ml，震盪混合均勻。

d. 10 分鐘後，於 700 nm 下測吸光值，越高表示還原能力越強。

12. 多重相乳液的製備與乳液穿透時間試驗：將先前所製備的凍乾粉末 0.2g，加入 50 ml 海洋深層水後，以均質機打碎後，過濾汁液作為樣品液；另外以甘油 20 ml 加入 PGPR，10 ml，並以均質機在 8000 rpm 下均質 2 分鐘，作為油層液；加入樣品液後，以均質機在 8000 rpm 下均質 5 分鐘，此為第一步乳化，另外配置 1%的 Tween 20 溶液，在 12000 rpm 下以兩步法製備多重相乳化乳液，均質時間兩分鐘。並以正立式顯微鏡觀察是否成功製備。並將乳液塗抹在志願者皮膚表面，以攜帶式顯微鏡觀察乳液需要多少時間才能完全滲透進入皮膚內。

13. 以正立式位相差顯微鏡觀察乳化液滴：配置 0.01% Tween 20 溶液，在載玻片上滴幾滴 Tween 20 溶液，以吸管沾取乳化液滴，均勻塗抹在溶液上，蓋上蓋玻片，分別在 100X，400X 倍率下照相觀察，並以接物測微計做為對照尺規(每格 10 mm)，照相觀察後，洗成照片，取一支以公分作為單位的尺，人工計數照片中乳化顆粒的尺寸大小，再利用同一支尺對照接物測微計照片上的刻度，經換算 4.5 公分等於 100 μm ，則可知照片上的 1.0 公分相當於物鏡觀察下的 44.44 μm 長，就可以知道乳液顆粒的大小。

14. 皮膚保濕度變化：參考張(2009)的方法，受測試者將前手背分為四個區塊 (A、B、C 為測試組，D 為對照組)，樣品擦拭後一分鐘以皮膚保濕度檢測器 (Corneometer CM 825) 做檢測，之後每隔 20 分鐘作數值記錄，共計 120 分鐘。保持室內常溫 24-25°C 溼度 50%-60% 下，檢測出來的數值加以計算成保濕度變化百分比、與空氣濕度變化百分比做比較以評估其成效。

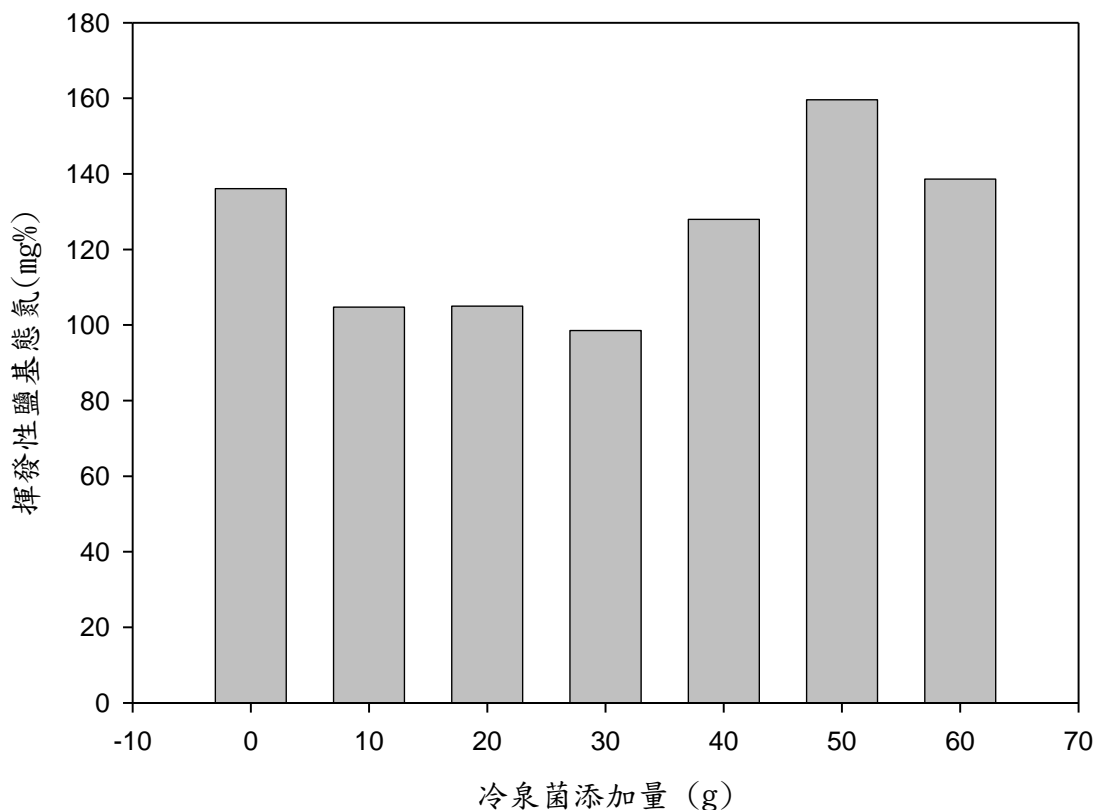
15. 面膜的製備：魚肉 0.2 g 加 60 g 海洋深層水加 30 g 甘油加 2.4 g Span 80 加 0.3 g 維生素 E，均質機攪拌的轉數為每分鐘 8000 轉，打 5 分鐘，剛攪拌完的水 50 g 加 0.5 g Tween 20 乳化劑加 2 g 褐藻粉，攪拌轉速為每分鐘 5000 轉，2 分鐘，再拿 10 g 褐藻粉加 5 g 的高嶺土加 5 g 的死海礦泥，再加 3 ml 的蒸餾水用研鉢攪拌完成



16. 去除污垢實驗：參考張(2009)的方法，以攜帶式顯微鏡先將志願者的鼻頭拍照，然後將 1 g 的面膜塗抹在鼻頭上 20 分鐘，用清水洗淨，再以攜帶式顯微鏡拍攝志願者的鼻頭，兩相對照。

伍、研究結果

1. 冷泉菌添加量對鯖魚蒸煮液揮發性鹽基態氮的影響



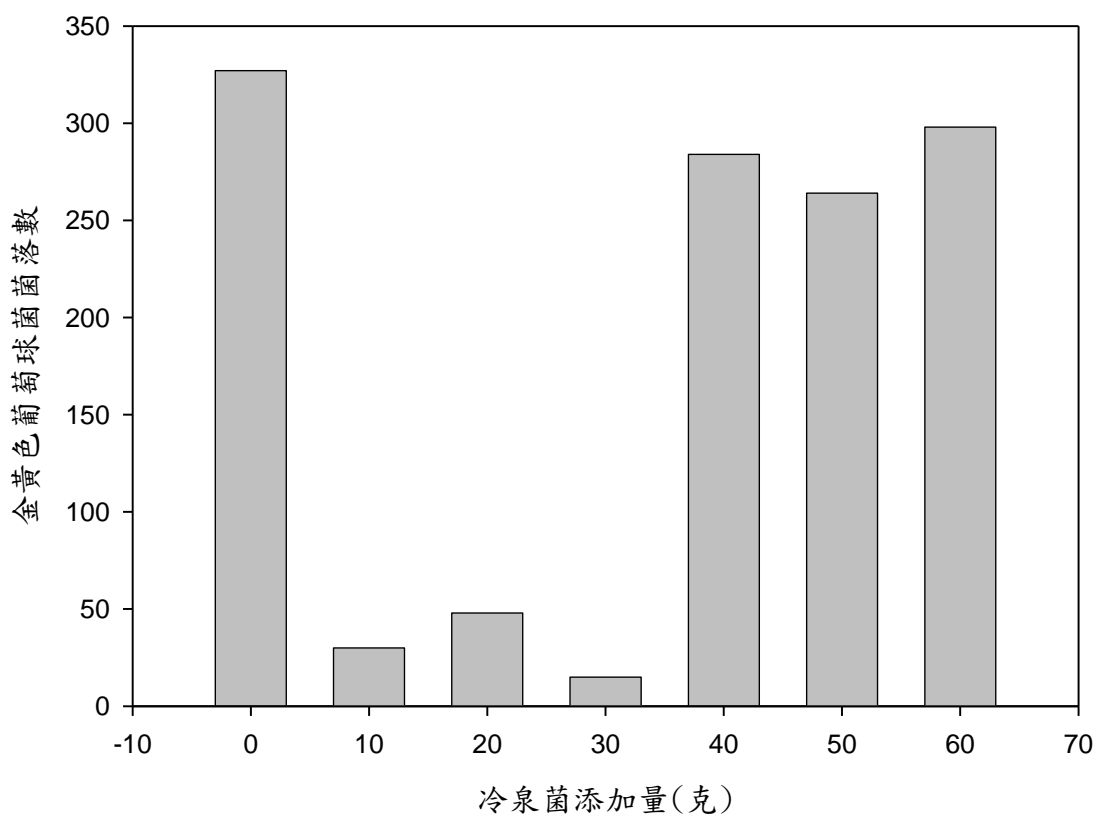
圖五 冷泉菌添加量對鯖魚蒸煮液揮發性鹽基態氮的影響

根據圖五的結果，我們可以看出，未發酵魚肉水解液其揮發性鹽基態氮已經達到 136 mg%，遠超過 CNS 規範之新鮮魚肉標準，顯示本研究設計在 28 度下發酵 24 小時，以模擬鯖魚罐頭工廠蒸煮廢棄液的環境已經達到。據此，冷泉菌發酵 10~30 分鐘，可以顯著地降低鯖魚蒸煮液的揮發性鹽基態氮達 99-105 mg% ($p>0.05$)。但隨著冷泉菌添加量的增加，揮發性鹽基態氮的產生又與對照組無顯著差異，添加 50 g 組更顯著地增加了揮發性鹽基態氮的生成量為 159.5 mg%，達 17.28% 以上。所以，我們的假設成立，添加冷泉菌的確可以降低鯖魚罐頭工廠蒸煮液的惡臭味，為了考量成本，我們建議的添加

量是 30 g 的魚肉添加 10g 的冷泉菌。

本校所在地為全台灣僅剩的主要的魚肉罐頭工廠縣市，魚肉罐頭產業從當年的輝煌騰達到今天的人人喊打，追根究底，魚肉蒸煮調理的時候，產生的魚腥味惡臭，讓注重居住品質的台灣民眾無法接受是主要原因之一，利用冷泉菌的蛋白質水解能力，來降低揮發性鹽基態氮的生成，可以改善魚肉罐頭製作過程中蒸散的空氣品質，工廠排放水的品質。本研究已經達到原先實驗設計最主要的目的，擬將此一研究申請專利，技術轉移給魚肉罐頭廠商，提高這些廠商的環保技術水準。

2. 冷泉菌添加量對金黃色葡萄球菌的影響



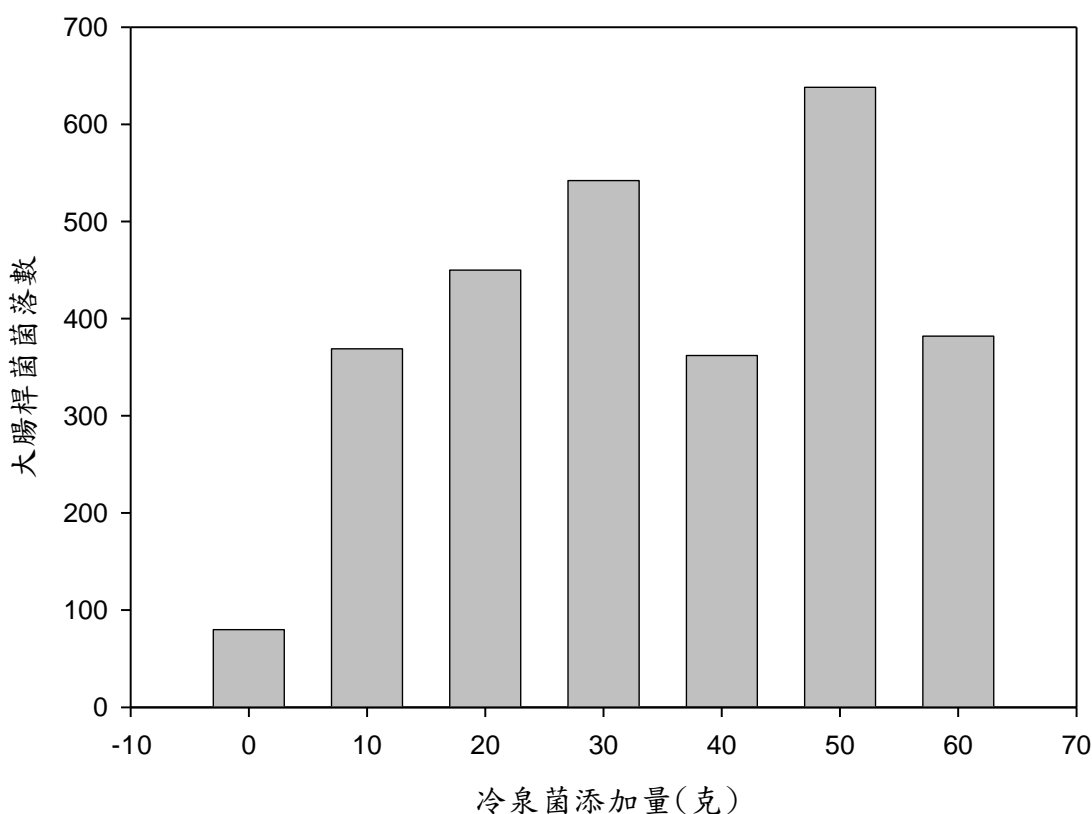
圖六 不同冷泉菌添加量對金黃色葡萄球菌的影響

圖六的結果顯示，未添加冷泉菌發酵鯖魚的水解液，無法抑制另外添加的金黃色葡萄球菌生長，其菌落數已超過微生物課本上定義的 TMTC 的數量 (250 個菌落/培養皿)，此一對照組顯示，我們所採用的金黃色葡萄球菌效力仍強，冷泉菌添加量 10~30g 組，可以將金黃色葡萄球菌菌落抑制到只剩不到 50 個菌落/培養皿，顯示此時水解液中應該含有可將其細胞壁溶解之寡肽，可以減少該菌的生長。但當冷泉菌添加量超過 40g 時，金黃色葡萄球菌

菌落數又增加到了超過 250 個菌落/培養皿，推測此一情形，可能是量太多的冷泉菌為了增生，分解出可供金黃色葡萄球菌的過多胺基酸，讓生長能力強過冷泉菌的金黃色葡萄球菌得以滋生。故我們建議，添加 30 g 冷泉菌於魚肉水解液中，即可抑制金黃色球菌的生長。

進一步與文獻比較，抑制微生物的生長，不是利用高溫，輻射照射讓細胞內蛋白質變性死亡來抑制，就是利用滲透壓來讓細胞壁破裂，使病原性微生物脹死或是乾死(如鹽漬或糖漬)等方式。寡胜肽在微生物細胞膜上應該也是扮演相同的角色，透過胜肽多醣滲入細胞內，導致細胞膜的膜電位降低，造成細胞膜的膨脹，導致鉀離子流出細胞，氫離子進入細胞液內，造成細胞內酸鹼值降低，使得細胞內的蛋白質變性，導致細菌死亡。所以圖六的結果並不是利用微生物間的競爭性而抑制金黃色葡萄球菌生長，而是利用冷泉菌水解魚肉水解液所產生的產物，寡胜肽來抑制其生長。

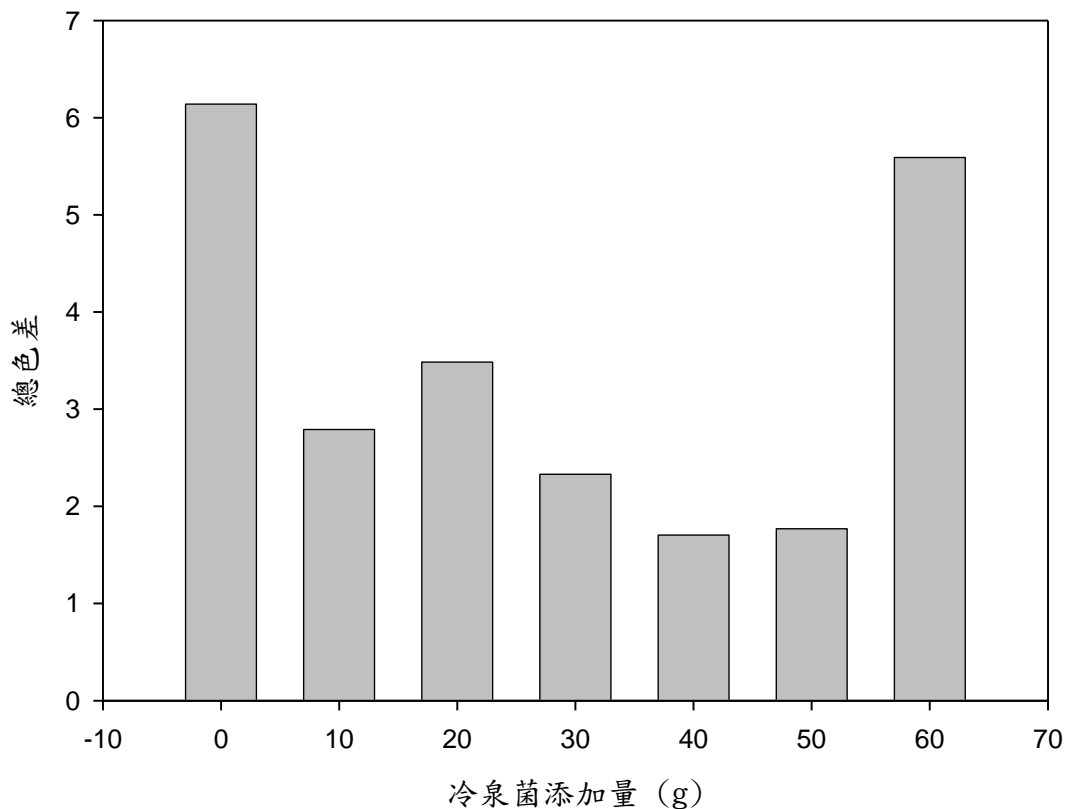
3. 冷泉菌添加量對大腸桿菌的影響



圖七 不同冷泉菌添加量對大腸桿菌的影響

圖七的結果顯示，未添加冷泉菌發酵鯖魚的水解液，在大腸桿菌的培養基上使大腸桿菌生長較少，不到 100 個菌落/培養皿，眾所皆知，人體腸道內必需要有適當量的大腸桿菌，否則人體將會缺乏葉酸等維生素的生合成能

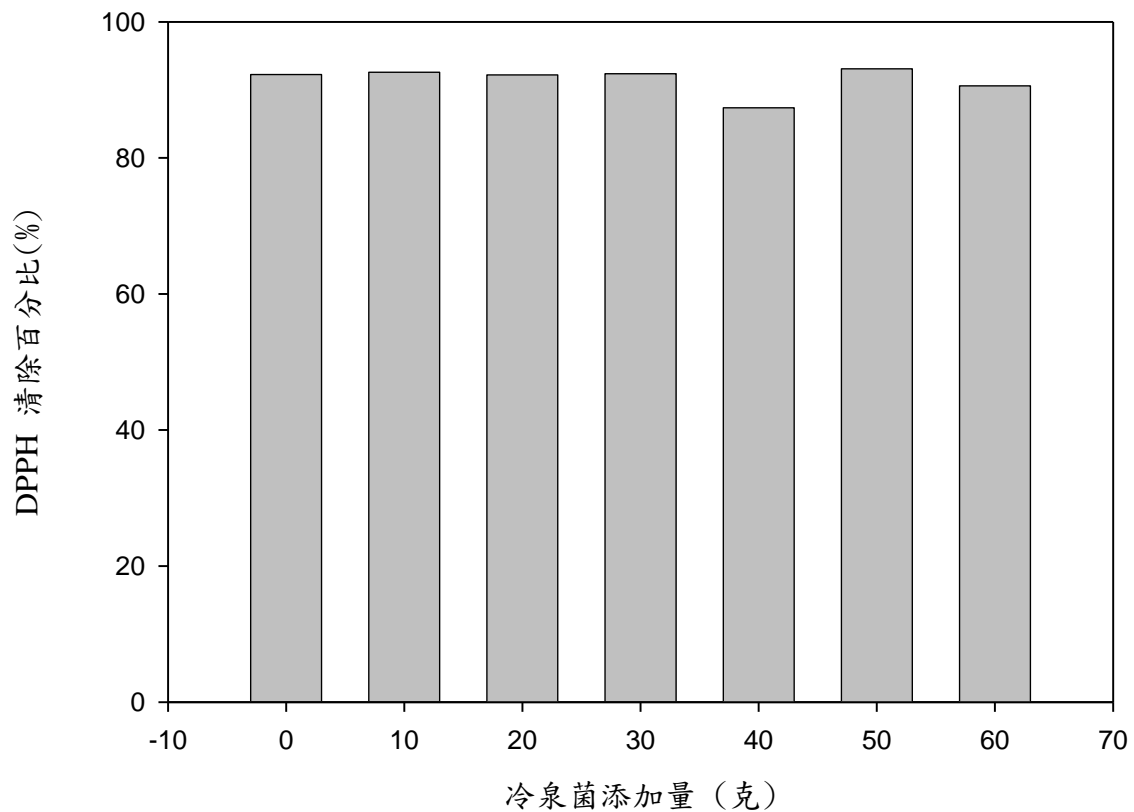
力，也會導致病原菌有了一個無菌競爭的環境，大量滋生而影響人體健康。所以大腸桿菌的生長數量是有其裨益的。此一對照組顯示，我們所採用的大腸桿菌效力也是在正常的情形下。因此，實驗結果顯示，冷泉菌添加數量的增加，大腸桿菌的生長也隨之增加，且各組都以達 TMTC 的數量，顯示冷泉菌所分解產生的寡胜肽至少可以維持腸道內大腸桿菌的數目，使身體內的正常代謝能夠被維持。



圖九 不同冷泉菌添加量對魚肉水解液總色差的影響。正向控制組：市售奶粉。

魚肉以不同重量的冷泉菌水解後，水解液的總色差結果如圖九，從圖九我們可以看出，隨著冷泉菌添加量增加到 50 g 時，凍乾粉末與市售奶粉之間的總色差逐漸減少，並以 40~50 g 的添加量效果最好，與市售奶粉的總色差達到中等，即所謂在特定應用中可接受。此結果也呼應了揮發性鹽基態氮的結果，當添加冷泉菌重量超過 50 g 後，產生了我們所不喜歡的反應，以色差這邊來看，冷泉菌添加量超過 50 g 後，冷泉菌中的其他酵素，如脂解酶可能就開始大量作用，促進了脂肪氧化，導致產品顏色劣變。

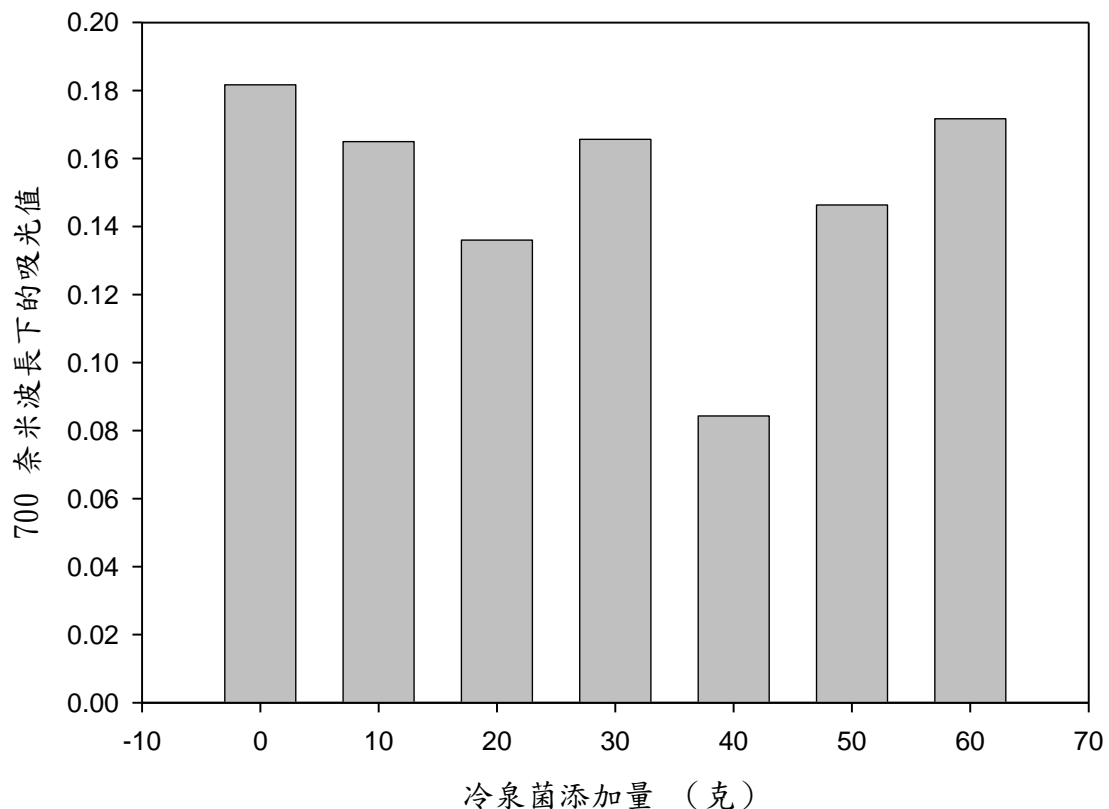
本研究的目的是，是想從魚肉罐頭工廠廢棄物中，回收高蛋白質的液體，製成類似奶粉的食品添加物，減少魚肉罐頭工廠的排放水中的污染來源，提高業者回收意願。從圖九的結果可以看出，本研究的假設成立，我們利用冷泉菌開發了一種和奶粉顏色差異不大的產品，可以提高業者的收益。最少可以將此冷泉菌水解後之魚肉蒸煮液粉末，提供做為飼料添加物，提高飼料的生物價，進而減少奶粉需求。所以，我們進一步探討其抗氧化能力，期望能發展一種具生理功能的粉末狀健康食品，同時提高冷泉菌與鯖魚蒸煮液的商業價值。



圖十 冷泉菌添加量對魚肉水解液 DPPH 殘留量的影響

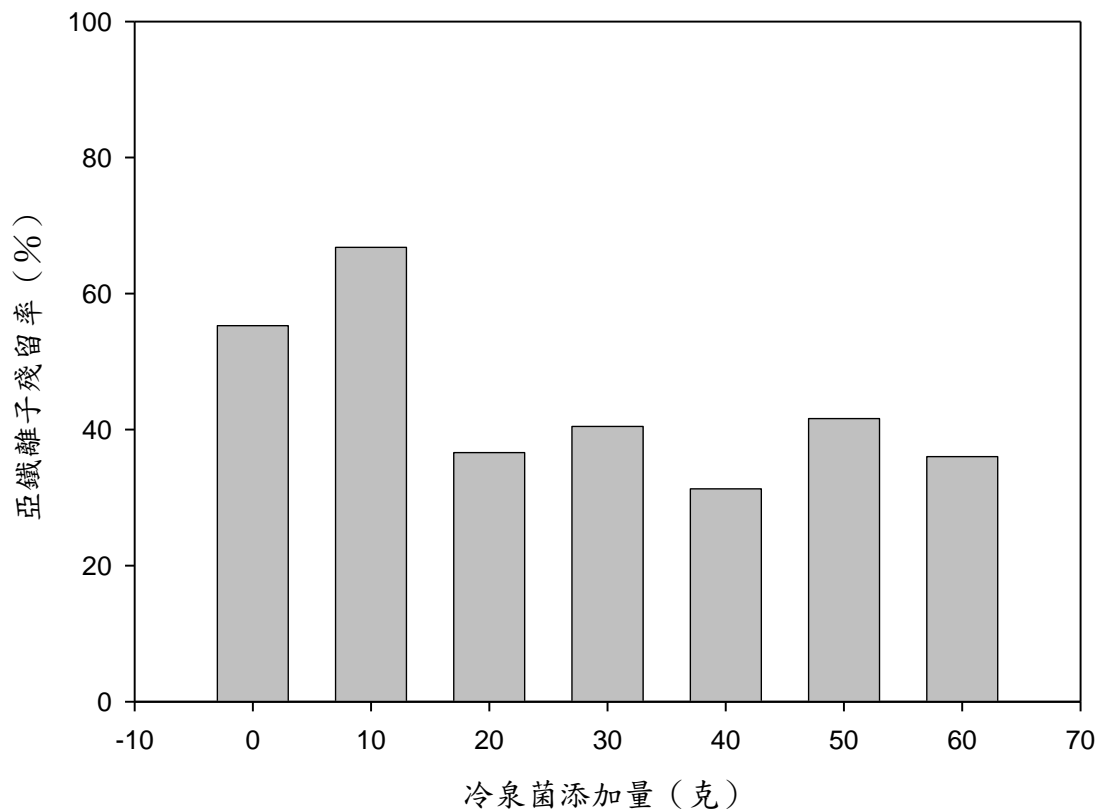
根據李與林(2008)指出，脂質氧化過程中會有自由基的形成，此一自由基所多餘的電子會自動尋找其他脂質分子，把電子丟給別人，讓自己的結構獲得穩定，因而在整個食品系統中引發連鎖反應，加速脂質本身的氧化。如果添加抗氧化劑如 BHT，BHA 或是維生素 E 等抗氧化劑，抗氧化劑能提供氫離子給 DPPH 自由基，進一步使此高能的化合物結構穩定。

本實驗結果顯示，鯖魚肉蒸煮液的去除 DPPH 能力非常的強，未添加冷泉菌即有接近 92.26% 的去除 DPPH 效果，顯示此一蒸煮液極具開發作為抗氧化健康食品的來源。隨著冷泉菌的添加量上升，此一去除能力也沒有受到影響，高達 83.37~93.10%，其中，除了添加 40 g 之實驗組，其去除 DPPH 能力略為下降，但仍在顯著水準之內($p < 0.05$)，所以，我們的結論是，冷泉菌的添加，並不會降低鯖魚肉蒸煮液的高 DPPH 去除能力。此一結果，與吳(2005)利用鰻魚蒸煮液的結果相近，顯示水產食品罐頭工廠，排放的蒸煮液中，的確是蘊藏了許多可供開發成高價值的抗氧化健康食品的廢棄物資源，期待我們的利用。



圖十一 冷泉菌添加量對魚肉水解液還原力的影響

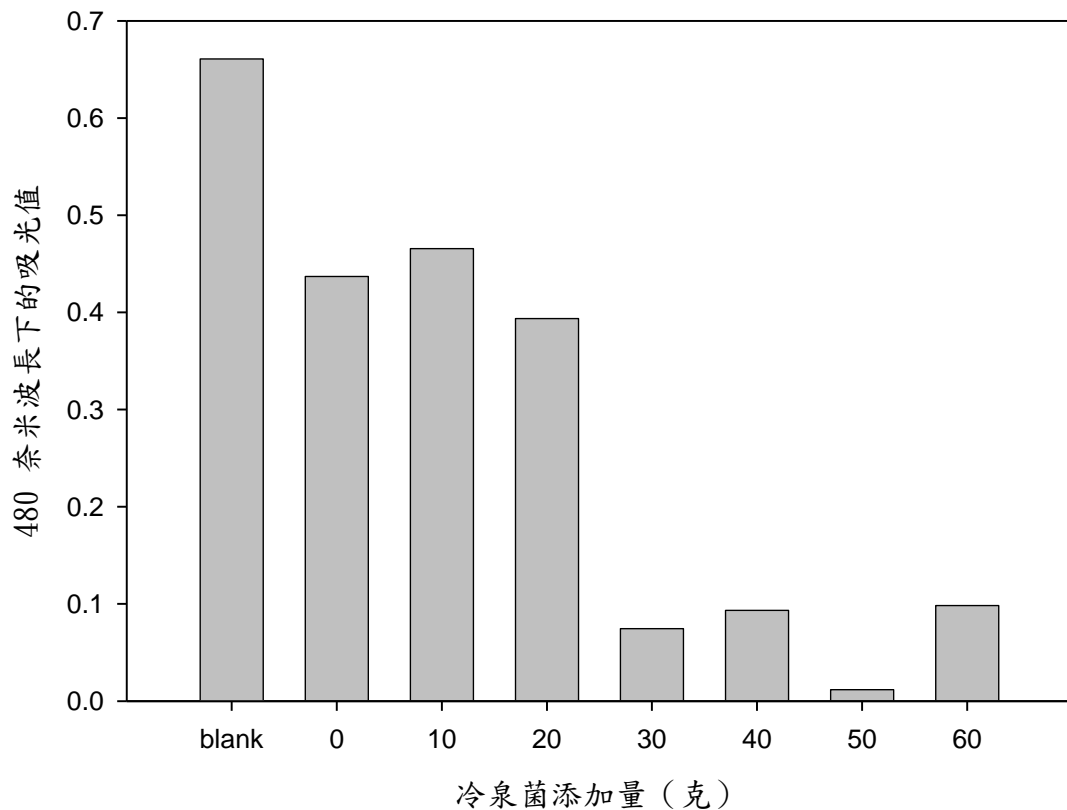
還原力測定是以赤血鹽還原成黃血鹽後，加入 FeCl_3 形成普魯士藍之生產量作為指標，由 700nm 之吸光值變化來測定還原力大小，吸光值愈高表示還原率愈強。實驗結果顯示，除了 40g 組顯著的低於其他各組外，鯖魚肉蒸煮液與其冷泉菌水解液間的還原力並無顯著差異。此結果與其他科展的研究學生的結果相近，亦即魚肉水解液的還原力並不比目前所使用的抗氧化劑的還原力好，水解後產生的寡胜肽並不能提高食品的還原力。根據李和林(2008)指出，油脂自氧化反應的三個階段中，終止期時始進行氧化還原反應，用來使兩個自由基化合物相互作用，產生非游離基的化合物，此時，不論是食品中的油脂，或是細胞上的脂質雙層均已產生了大量的電子擾動，破壞已經造成，所以，李和林(2008)指出，油脂自氧化反應的關鍵反應，為第一階段起始期的移去一個氫原子進一步產生多餘電子，反應速率慢，為油脂自氧化反應的決定步驟，此一決定步驟如能被抑制，後續反應就不容易產生。所以我們推論，冷泉菌水解鯖魚蒸煮液的抗氧化能力，並非是作用在終止期的氧化還原反應。



圖十二 冷泉菌添加量對魚肉水解液亞鐵離子結合能力的影響

根據李與林(2008)指出，脂質氧化過程中，金屬離子如銅，鐵，錳與鈷等金屬因為本身就在外層電子有多餘的電子，急於丟給別的化合物，使金屬本身的電子結構穩定，此一促進氧化作用，更是造成脂質氧化的主因，僅需少量的金屬離子便可產生自由基並加速脂質氧化反應，而亞鐵離子很容易出現在食品加工的過程中，所以最有促進氧化的機會與能力，故在食品加工過程中，經常添加螯合劑如檸檬酸或 EDTA 等將此類金屬離子反應成錯鹽，抑制油脂自氧化作用。但是這些化合物的安全性有疑慮，檸檬酸會將所有的二價離子均結合成錯鹽，降低必須礦物質的攝取量。

同樣的，鯖魚肉蒸煮液本身就可以去除超過 40% 的亞鐵離子，且隨著冷泉菌添加量的上升超過 10 克，其去除亞鐵離子能力就顯著的上升，其中 40 g 的去除效果最好，亞鐵離子殘留率 31.29%，其次為 20g(36.62%)與 60g(36.02%)，30g(40.45%)組與 50g 組(41.65%)與前兩組間無顯著差異，但是顯著的較 40 g 組為差。從此一結果可以看出，鯖魚蒸煮液經過冷泉菌水解後，產生了許多寡胜肽，這些寡胜肽所帶的電荷，結合了亞鐵離子，使其無法產生氧化還原反應，降低了亞鐵離子的促進脂質自氧化有效濃度。

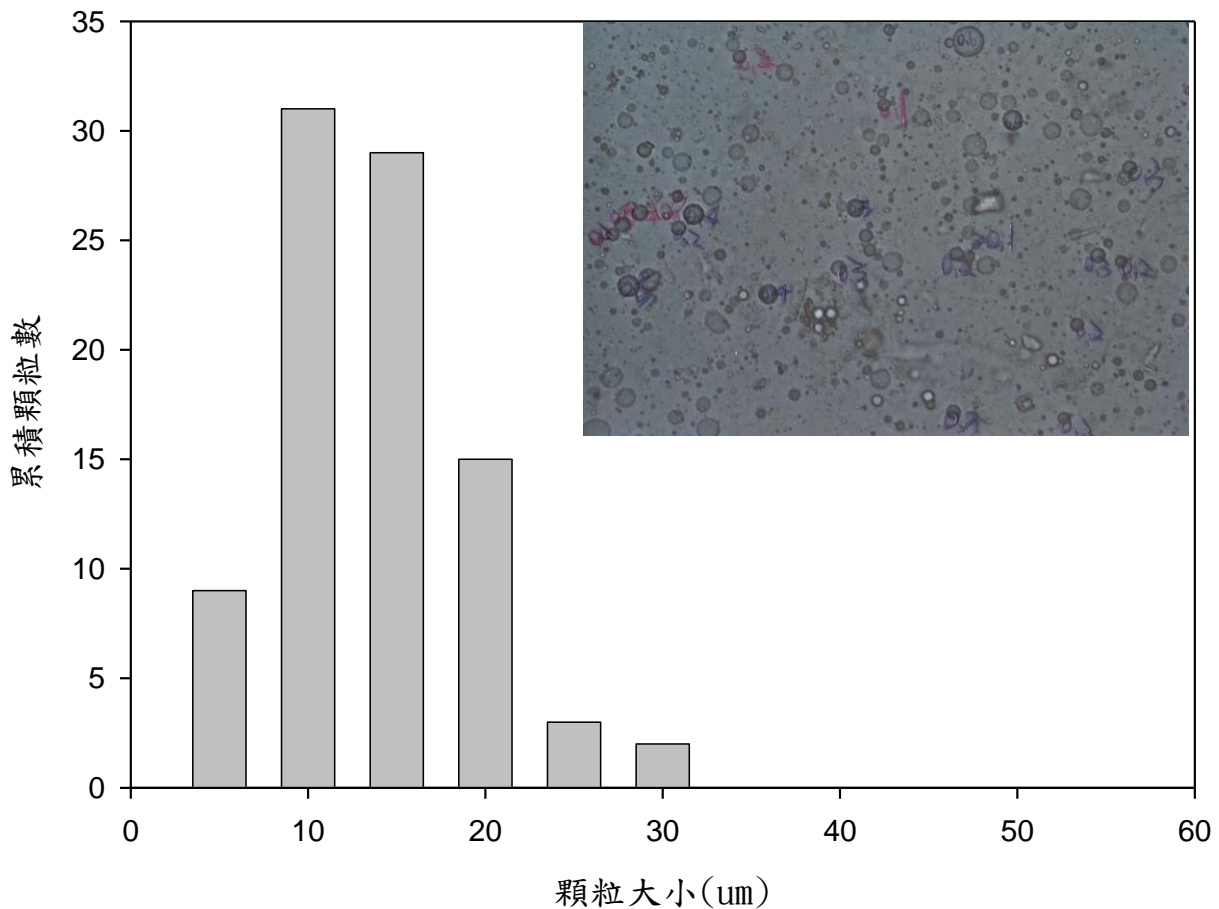


圖十二 冷泉菌添加量對魚肉水解液亞麻油酸過氧化抑制能力的影響

黃與張(2000)利用鹹鴨蛋探討其電透析液中寡胜肽的亞麻油酸過氧化抑制能力的影響，他們認為，其可能機制有三：(1)為自由基反應，脂質自由基轉給水解物。(2)為碳醯胺 (carbonylamine) 反應，由不飽和脂肪酸產生的醛類化合物，可與水解物的胺基以希夫鹼 (schiff base) 方式反應。(3)為水解物與反應系統中助氧化劑的金屬離子產生錯合物而抑制其催化反應的進行，所以適合用來篩選具抑制油脂自氧化反應起始期的小分子化合物。

我們的結果顯示，負向對照組(blank)其吸光值非常的高，顯示所採用的亞麻油酸在沒有水解液的保護下，大量的被氧化，生成了許多的過氧化物，所以我們進一步探討，鯖魚肉蒸煮液本身即可降低約 33.87%的亞麻油酸過氧化物形成，再次印證了先前的結果，此蒸煮液極具開發的價值，冷泉菌添加 10g 間，其 480 nm 下之吸光值與 0 分鐘組沒有顯著差異(29.87%)，20g 組就顯著地高於前兩組，達 40.42%；隨著冷泉菌添加量提高到 30 g 以上，其降低亞麻油酸过氧化物的能力，就大幅度地提高到 85.11~88.70%，而添加冷泉菌 40 g 組的鯖魚肉蒸煮水解液，其亞麻油酸過氧化物降低的能力，更高達 98.20%，所以綜合四組抗氧化的實驗結果，我們認為，冷泉菌添加 40 g 時，鯖魚肉蒸煮水解液的抗氧化能力最佳。

冷泉菌水解魚肉多重相乳液顆粒大小分布圖

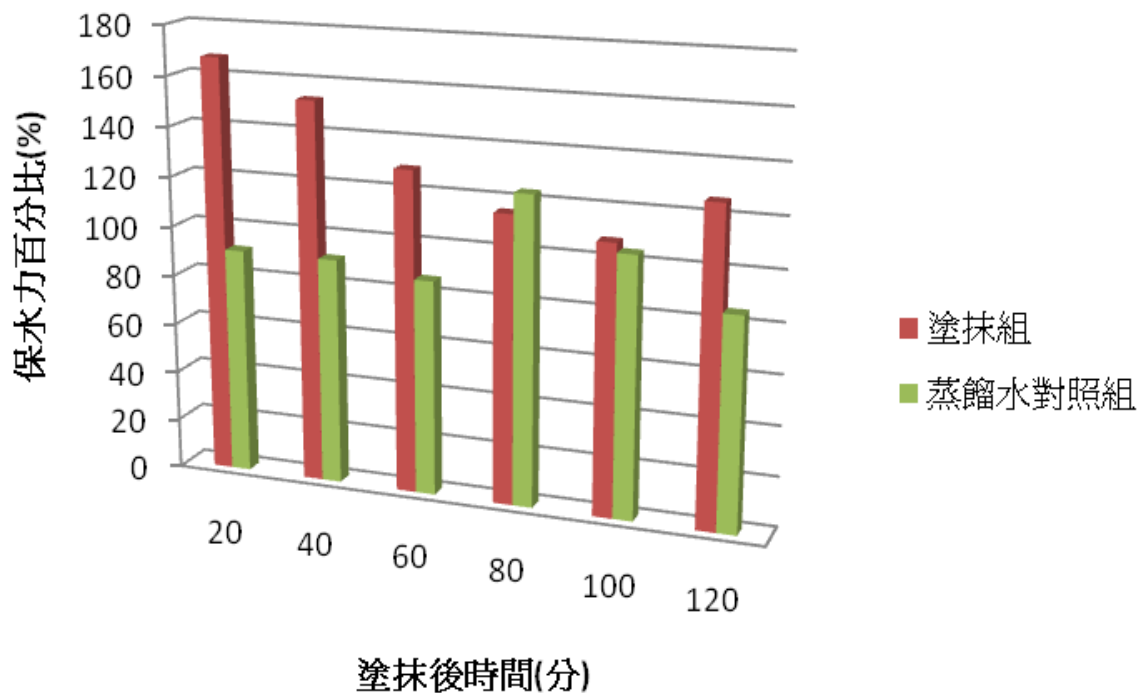


圖十三 冷泉菌水解魚肉凍乾粉末製備之多重相乳化乳液之液滴大小分布圖

從圖十三的結果顯示，乳液顆粒大小均低於 30 um 以下，而以 10~15 um 佔最多數，人體皮膚細胞的大小約 60 um，故可以推論，此配方製備之乳液可以完全的進入人體皮膚被吸收。另外以志願者之皮膚進行的塗抹實驗也顯示，本配方乳液塗抹皮膚 20 分鐘後，即完全被吸收，顯示本產品的吸收率良好，可以供作保水力化妝品良好來源之一。

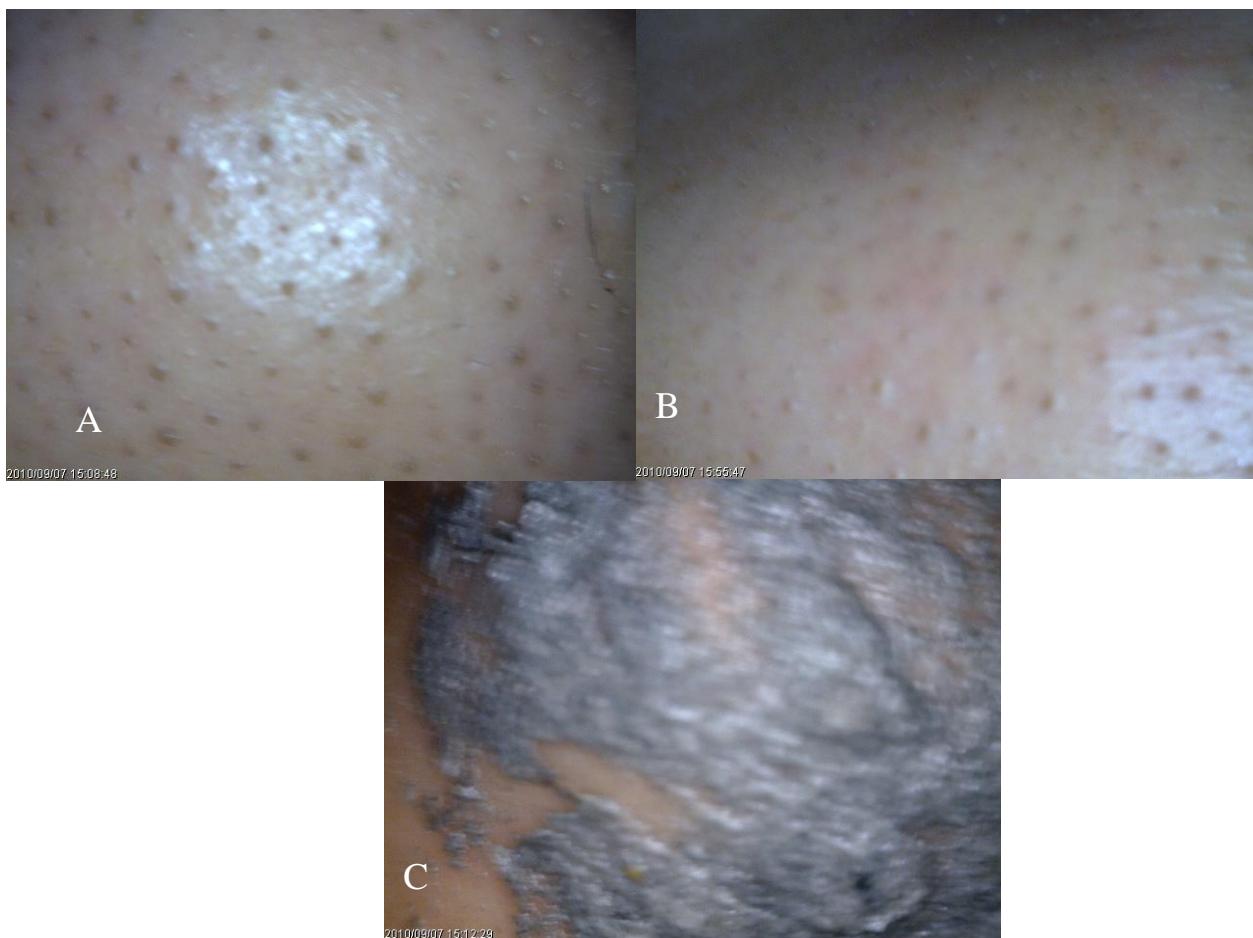
另外，我們也進行了四種不同濃度的化妝品配方的志願者皮膚試驗，2%,1%組均在塗抹 4 小時後，使志願者的皮膚產生了紅腫與搔癢的現象，但是 12 小時後症狀即排除，0.5%與 0.05%組則不產生任何紅腫反應，顯示冷泉菌水解魚肉粉末的抗氧化力很強，必須稀釋到很低的倍率才能發揮適當的抗氧化力效果。

冷泉菌水解液去粉刺乳液保水力試驗



以志願者皮膚上三點作為實驗對象，探討冷泉菌水解魚肉凍乾粉末製備之多重相乳化乳液之保水力，實驗進行圖如下，並以蒸餾水作為對照組，實驗結果顯示，實驗進行 60 分鐘內，塗抹樣品的保水力均顯著高於蒸餾水組，80-100 分鐘組與蒸餾水組無明顯差異，到了 120 分鐘又高於蒸餾水組，顯示本產品至少可以在一小時內顯著地提高皮膚的保水力，並延伸此效果到 120 分鐘。





圖十五 冷泉菌水解魚肉凍乾粉末製備之面膜去粉刺能力實驗，(A)塗抹前；(B)塗抹後；(C)敷臉中

經過 20 分鐘的敷臉(圖 C)，我們所製備的面膜的確可以把志願者的粉刺去除，從圖 A 可以看出，志願者的黑頭粉刺很多，很黑，使用後的鼻頭毛孔變的比較白，而且可以看出毛孔有收縮的情形，而且並沒有紅腫發炎的現象(如圖 B)，顯示添加 0.05%冷泉菌水解魚肉凍乾粉末的化妝品，此一配方較為安全。

陸、討論

許多疾病的發生被認為和自由基的傷害有關，例如心血管疾病、糖尿病、癌症與老化等，皮膚每天接受紫外線與冷氣吸收水分的氧化反應等更是愛美人士的最重視話題。因此自由基與抗氧化物質近年來已成為眾所矚目的焦點。忙碌緊張的生活及環境中各種污染物質充斥，使得人體中的氧化壓力增加，產生過多的自由基。許多學者利用商業化酵素嘗試製備蛋白質水解液用來作為抗氧化劑，他們認為，抗氧化活性的強弱與水解方式及酵素種類有

關，但與水解率之關係不大。所以，尋找一種安全，台灣本地生產的高蛋白酶產生的食品級微生物，用來生產具抗氧化的健康食品是非常重要的。一環。

本研究的結果顯示，冷泉菌除了可以去除羊乳的腥味外，的確可以作為乳酸菌的替代菌種，利用罐頭工廠蒸煮的廢棄液，產生具不同功能特性的胜肽類產品，應用在抗氧化健康食品與化妝品的組成成分上，大幅提高水產罐頭工廠製程中蛋白質回收的利用性，增加了廠商的收益，。

柒、結論

1. 30 g 的魚肉添加 10g 的冷泉菌的確可以降低鯖魚蒸煮液的惡臭味。
2. 添加 30 g 冷泉菌於魚肉水解液中，即可抑制金黃色球菌的生長。
3. 冷泉菌添加量增加 40~50 g 與市售奶粉的總色差在特定應用中可接受。
4. 鯖魚肉蒸煮液的去除 DPPH 能力非常的強，可達 92.26%。冷泉菌的添加並不會降低此一高去除能力。
5. 添加 40 g 冷泉菌對去除亞鐵離子效果最好，殘留率 31.29%。
6. 添加冷泉菌 40 g 組的鯖魚肉蒸煮水解液，其亞麻油酸過氧化物降低的能力，高達 98.20%。
7. 以海洋深層水為基質，水解液凍乾粉末所製備的乳液，可以在 20 分鐘內穿透皮膚，平均粒徑均在 30 um 以下，皮膚保水力可以維持 60 分鐘以上。
8. 以乳液為基礎所製備的面膜，可以有效的去除鼻頭的粉刺污垢，其最適添加濃度為 0.05%(w/w)

捌、參考資料及其他

謝誌

1. 本研究承教育部中部辦公室之國立高級中等學校充實實習教學設備實施計畫補助設備，始得完成，謹此致謝。補助計畫名稱：區域產業教學特色發展設備—宜蘭地區節能減碳產業教學特色發展計畫。
2. 本研究承財團法人石材暨資源產業研究發展中心(游禮晏研究員)提供海洋深層水樣品做為基材，謹此致謝。
3. 本研究之冷泉菌係承國立高雄海洋科技大學陳文明教授協助分離提供，抗氧化能力分析，承國立澎湖科技大學校長蕭泉源教授，化妝品功能分析則承經國管理與健康技術學院食品科學系蔡政融博士與化妝品應用系李仰川博士等教授提供儀器與協助指導，謹此致謝。

參考文獻

1. 經濟部(2005)「溫泉標準」。經濟部經水字第 09404605610 號令。
2. 李若歆，張淑貞，陳文明 (2007)由蘇澳冷泉中分離的 *Aquitalea* 菌株特性與探討。中華民國 96 年食品科學技術年會。大葉大學，第 213 頁。
3. 吳蕙君(2006)鰻魚蛋白質酵素水解物抗氧化成分及其分離純化之探討。行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告書。台北市。
4. 林杰樑(2005)食物與疾病—食品中防腐劑的毒。http://www.greencross.org.tw.
5. 許昺慕(2005) 台灣溫冷礦泉研究。行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫。http://www.cdc.gov.tw/file/39044_6389583333.pdf。
6. 曾永明，游雅雯，林麗雲，黃文哲(2006)以乳酸菌發酵製作吐司麵包其品質之探討。中華民國食品科學技術年會。海洋大學，第 271 頁。
7. 蔣力惠與郭俊欽(2006)乳鐵蛋白水解物及 EDTA 對豬後腿絞肉抗氧化性及抗菌性的探討。中華民國 95 年食品科學技術年會。海洋大學，第 271 頁。
8. 曹李宏(1999)。乳鐵蛋白對大腸桿菌和幽門螺旋桿菌抗菌作用之探討。國立中興大學獸醫微生物學研究所，碩士學位論文。
9. 陳婉婷，吳怡萱，胡均瑜，江雅涵(2008)抗黴新寵兒，立功冷泉菌。中華民國第四十八屆中小學科學展覽會第一區高職組，農業與生物科技科作品說明書。
10. 張麗卿(2009) 化妝品檢驗分析。華杏出版股份有限公司。臺北市。