

# 發酵時間與不同基因對納豆的機能性成分之影響

魏伯修、陳明造

E-mail: 345519@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

納豆(natto)是日本傳統的大豆發酵食品，以蒸煮過的黃豆接種納豆菌(*Bacillus subtilis* var. natto)固態發酵而成，以獨特黏質及特殊風味為其特徵。本研究以蒸煮過的黃豆與薏仁、紫色甘薯及紫色山藥混合為基質，接種*Bacillus subtilis* var. natto 進行發酵，比較不同發酵條件下所產生的機能性物質。經不同時間進行發酵後將產品進行下列分析：包括水分、pH 值、納豆菌數、超氧歧化?活性、蛋白質的SDS-PAGE 模式、納豆激?、 $\gamma$ -聚麩胺酸、 $\gamma$ -胺基丁酸，探討發酵前後及不同時間的差異。依產生機能性物質、抗氧化活性及其他物質高低決定較好的混合發酵基質及時間。結果顯示：經發酵過後水份均會減少，菌數生長方面因pH 值及產品水分含量而受到影響。超氧歧化?抗氧化特性在發酵後均有明顯的增高，在發酵期間*Bacillus subtilis* 代謝產物中，納豆激?、 $\gamma$ -聚麩胺酸及 $\gamma$ -胺基丁酸含量均有增加。

關鍵詞：納豆、發酵時間、基質

## 目錄

中文摘要.....	iii	英文摘要.....	iv	誌謝.....	v
目錄.....	vi	圖目錄.....	x	表目錄.....	xi
緒言.....	1	2. 文獻回顧.....	2	2.1 大豆.....	2
2.1.1 大豆簡介.....	2	2.1.2 黃豆之機能性.....	2	2.1.2.1 大豆蛋	
白.....	2	2.1.2.2 大豆異黃酮.....	3	2.2 薏仁.....	5
2.2.1 薏仁簡介.....	5	2.2.2 薏仁組成成分.....	5	2.2.1 薏	
仁組成成分.....	5	2.2.3 薏仁之機能		性.....	6
2.2.3.1 改善血脂.....	6	2.2.3.2 調節血糖.....	6	2.3 甘	
2.2.3.2 調節血糖.....	6	2.3 甘		蒟.....	8
2.3.1 甘蒟簡介.....	8	2.3.2 甘蒟之機能性.....	9	2.4 山	
2.3.2 甘蒟之機能性.....	9	2.4 山		藥.....	11
2.4 山藥.....	11	2.4.1 山藥簡介.....	11	2.4.2 山藥成	
2.4.1 山藥簡介.....	11	2.4.2 山藥成		分.....	12
2.4.2.1 一般成份.....	12	2.4.2.2 山藥之生理作用.....	12	2.5 納	
2.4.2.2 山藥之生理作用.....	12	2.5 納		豆.....	13
2.5 納豆.....	13	2.5.1 納豆菌.....	13	2.5.2 納豆簡	
2.5.1 納豆菌.....	13	2.5.2 納豆簡		介.....	14
2.5.2 納豆簡介.....	14	2.5.3 納豆之醫療保健效果.....	16	2.5.3.1 納豆降低血膽固醇功	
2.5.3 納豆之醫療保健效果.....	16	2.5.3.1 納豆降低血膽固醇功		能.....	16
2.5.3.1 納豆降低血膽固醇功		2.5.3.2 納豆溶解血栓功能.....	16	2.5.3.3 納豆抗氧化作用.....	16
2.5.3.2 納豆溶解血栓功能.....	16	2.5.3.3 納豆抗氧化作用.....	16	2.5.3.4 納豆的抑菌功能.....	17
2.5.3.3 納豆抗氧化作用.....	16	2.5.3.4 納豆的抑菌功能.....	17	2.5.3.5 納豆的預防骨質疏鬆功能.....	17
2.5.3.4 納豆的抑菌功能.....	17	2.5.3.5 納豆的預防骨質疏鬆功能.....	17	2.5.3.6 納豆中	
2.5.3.5 納豆的預防骨質疏鬆功能.....	17	2.5.3.6 納豆中		-PGA 的應用.....	18
2.5.3.6 納豆中		-PGA 的應用.....	18	2.5.3.7 納豆的調節腸道功能.....	19
-PGA 的應用.....	18	2.5.3.7 納豆的調節腸道功能.....	19	2.5.3.8 納豆提高蛋白質消化功	
2.5.3.7 納豆的調節腸道功能.....	19	2.5.3.8 納豆提高蛋白質消化功		能.....	19
2.5.3.8 納豆提高蛋白質消化功		2.5.4 納豆所含酵素.....	20	2.5.4.1 納豆激?(nattokinase).....	20
2.5.4 納豆所含酵素.....	20	2.5.4.1 納豆激?(nattokinase).....	20	2.5.4.2 凝乳?.....	21
2.5.4.1 納豆激?(nattokinase).....	20	2.5.4.2 凝乳?.....	21	2.5.4.3 蛋白?.....	22
2.5.4.2 凝乳?.....	21	2.5.4.3 蛋白?.....	22	2.5.4.4 $\gamma$ -胺基丁	
2.5.4.3 蛋白?.....	22	2.5.4.4 $\gamma$ -胺基丁		酸.....	22
2.5.4.4 $\gamma$ -胺基丁		2.5.4.5 血管收縮素轉化?抑制物.....	23	2.5.4.6 超氧歧	
2.5.4.5 血管收縮素轉化?抑制物.....	23	2.5.4.6 超氧歧		化?(SOD).....	23
2.5.4.6 超氧歧		化?(SOD).....	23	3. 材料與方法.....	25
2.5.4.6 超氧歧化?(SOD).....	23	3. 材料與方法.....	25	3.1 實驗藥品與儀器.....	25
3. 材料與方法.....	25	3.1 實驗藥品與儀器.....	25	3.1.1 材料.....	25
3.1 實驗藥品與儀器.....	25	3.1.1 材料.....	25	3.1.2 藥品.....	25
3.1.1 材料.....	25	3.1.2 藥品.....	25	3.1.3 儀	
3.1.2 藥品.....	25	3.1.3 儀		器.....	26
3.1.3 儀		器.....	26	3.2 實驗架構.....	27
3.1.3 儀器.....	26	3.2 實驗架構.....	27	3.3 發酵方法.....	28
3.2 實驗架構.....	27	3.3 發酵方法.....	28	3.4 一般成份分析.....	28
3.3 發酵方法.....	28	3.4 一般成份分析.....	28	3.4.1 水分.....	28
3.4 一般成份分析.....	28	3.4.1 水分.....	28	3.4.2 納豆菌	
3.4.1 水分.....	28	3.4.2 納豆菌		數.....	29
3.4.2 納豆菌		數.....	29	3.4.3 pH 值.....	29
3.4.2 納豆菌數.....	29	3.4.3 pH 值.....	29	3.5 機能性成分分析.....	29
3.4.3 pH 值.....	29	3.5 機能性成分分析.....	29	3.5.1 萃取液之製備.....	29
3.5 機能性成分分析.....	29	3.5.1 萃取液之製備.....	29	3.5.2 $\gamma$ -PGA 含量測定.....	30
3.5.1 萃取液之製備.....	29	3.5.2 $\gamma$ -PGA 含量測定.....	30	3.5.3 超氧歧化?活性測	
3.5.2 $\gamma$ -PGA 含量測定.....	30	3.5.3 超氧歧化?活性測		定.....	30
3.5.3 超氧歧化?活性測		定.....	30	3.5.4 納豆激?活性測定.....	31
3.5.3 超氧歧化?活性測定.....	30	3.5.4 納豆激?活性測定.....	31	3.5.5 蛋白質電泳分析.....	32
3.5.4 納豆激?活性測定.....	31	3.5.5 蛋白質電泳分析.....	32	3.5.5.1 蛋白質電泳試劑配置.....	32
3.5.5 蛋白質電泳分析.....	32	3.5.5.1 蛋白質電泳試劑配置.....	32	3.5.5.2 鑄膠.....	33
3.5.5.1 蛋白質電泳試劑配置.....	32	3.5.5.2 鑄膠.....	33	3.5.5.3 樣品萃	
3.5.5.2 鑄膠.....	33	3.5.5.3 樣品萃		取.....	35
3.5.5.3 樣品萃		取.....	35	3.5.5.4 電泳流程.....	35
3.5.5.3 樣品萃取.....	35	3.5.5.4 電泳流程.....	35	3.5.5.5 膠片染色及退色.....	35
3.5.5.4 電泳流程.....	35	3.5.5.5 膠片染色及退色.....	35	3.5.6 GABA( $\gamma$ -胺基丁酸).....	36
3.5.5.5 膠片染色及退色.....	35	3.5.6 GABA( $\gamma$ -胺基丁酸).....	36	3.5.6.1 GABA 之萃取.....	36
3.5.6 GABA( $\gamma$ -胺基丁酸).....	36	3.5.6.1 GABA 之萃取.....	36	3.5.6.2 GABA 濃度之	
3.5.6.1 GABA 之萃取.....	36	3.5.6.2 GABA 濃度之		測定.....	36
3.5.6.2 GABA 濃度之		測定.....	36	3.5.6.3 GABA 之HPLC 分析條件.....	38
3.5.6.2 GABA 濃度測定.....	36	3.5.6.3 GABA 之HPLC 分析條件.....	38	3.6.6 統計分	
3.5.6.3 GABA 之HPLC 分析條件.....	38	3.6.6 統計分		析.....	38
3.6.6 統計分		析.....	38	4. 結果與討論.....	39
3.6.6 統計分析.....	38	4. 結果與討論.....	39	4.1 產品性狀.....	39
4. 結果與討論.....	39	4.1 產品性狀.....	39	4.2 不同基質發酵期間水份之變化.....	39
4.1 產品性狀.....	39	4.2 不同基質發酵期間水份之變化.....	39	4.3 不同基質發酵期間酸鹼值之變化.....	41
4.2 不同基質發酵期間水份之變化.....	39	4.3 不同基質發酵期間酸鹼值之變化.....	41	4.4 不同基質	
4.3 不同基質發酵期間酸鹼值之變化.....	41	4.4 不同基質		發酵期間菌數之變化.....	43
4.4 不同基質		發酵期間菌數之變化.....	43	4.5 不同基質發酵期間 $\gamma$ -PGA 之變化.....	45
4.4 不同基質發酵期間菌數之變化.....	43	4.5 不同基質發酵期間 $\gamma$ -PGA 之變化.....	45	4.6 不同基質發酵期間超	
4.5 不同基質發酵期間 $\gamma$ -PGA 之變化.....	45	4.6 不同基質發酵期間超		氧歧化?活性之變化.....	47
4.6 不同基質發酵期間超		氧歧化?活性之變化.....	47	4.7 不同基質發酵期間納豆激?活性之變化.....	49
4.6 不同基質發酵期間超氧歧化?活性之變化.....	47	4.7 不同基質發酵期間納豆激?活性之變化.....	49	4.8 不同基質發酵期間蛋白	
4.7 不同基質發酵期間納豆激?活性之變化.....	49	4.8 不同基質發酵期間蛋白			

質SDS-PAGE 電泳圖譜.....	51	4.9 不同基質發酵期間之GABA 含量比較.....	53	5. 結
論.....	55	參考文獻.....	56	圖目錄 圖2.1 黃豆的組成成
分.....	3	圖2.2 大豆異黃酮化學結構.....	4	圖2.3 雌激素化學結
構.....	4	圖2.4 薏仁種仁各部名稱.....	6	圖2.5 花青素結構.....
圖2.6 不同結構花青素呈現不同顏色.....	10	圖2.7 -PGA 的化學結構.....	19	圖3.1 GABA 標
準曲線.....	37	圖4.1 不同基質發酵中蛋白質之SDS-PAGE 電泳分析圖譜.....	51	圖4.2 不同基質納豆於
不同發酵期間其發酵產物GABA 之含量比較....	52	表目錄 表2.1 薏苡中特殊生理機能性成分含量.....	7	表3.1 分離
膠組成.....	34	表3.2 排列膠組成.....	34	表4.1 不同基質納豆於不同發酵期間對水
分含量之變化.....	40	表4.2 不同基質納豆於不同發酵期間對酸鹼值之變化.....	42	表4.3 不同基質納豆於不同發酵期
間對納豆菌數之比較.....	44	表4.4 不同基質納豆於不同發酵期間 -PGA 含量之比較.....	46	表4.5 不同基質納豆於不
同發酵期間超氧歧化?活性之比較.....	48	表4.6 不同基質納豆於不同發酵期間納豆激?活性之比較.....	50	

## 參考文獻

- 呂鋒洲。2002。發酵大豆抗癌新希望。45-48。元氣齋出版社有限公司。台北。
- 余靜葭。2007。耐酸性納豆菌之納豆激?、基因選殖、表現與酵素活性分析。大葉大學生物產業科技學系所大學專題。
- 吳佳璇。2008。發酵溫度影響Bacillus subtilis BCRC 14715發酵黑豆中機能性成分之改變。國立台灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文。台北。台灣。
- 吳尉禎。2006。Bacillus subtilis var. natto 不同液態培養條件對其代謝物生成之影響。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 李家銘。2010。接種Rhizopus oligosporus 發酵之蒸煮黃豆與薏仁機能性成分之研究。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 何承穎。2009。紫薯優酪乳之抗氧化與調節血壓功能評估。弘光科技大學食品應用生物科技研究所。台中。台灣。
- 李幸芬。2007。時利用納豆菌及寡孢根黴菌發酵黃豆。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 林文彬。2004。納豆製造及養生利用。傳統醫學雜誌。33:521-532。
- 周祺鈞。2004。高生理活性黑豆及豆渣納豆最適加工條件之探討。私立中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。台北。台灣。
- 姜淑繡。2001。省產蘿蔔之抗氧化性研究。碩士論文。大葉大學食品工程學系研究所碩士論文。彰化。台灣。
- 高美丁、黃延君、張碧霞。2002。不同山藥品種山藥對脂質代謝之影響。保健植物產品開發與藥理機能性研討會。
- 莊荃與、林順生、謝實全。2006。Bacillus subtilis B-12 深層發酵生產超氧歧化?最適化之探討。台灣農業化學與食品科學。44:345-350。
- 翁添滿。2010。發酵與脫水技術對納豆天貝的酵素活性與機能性成分的影響。大葉大學分子生物科技學系博士論文。彰化。台灣。
- 張南玲。1993。胃腸系統內 -胺基丁酸研究的進展。國外醫學:生理病理科學與臨床分冊。13:139-142。
- 張啟霆。2007。培養基組成與液態培養條件對Rhizopusoligosporus 發酵產物之理化性質影響。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文。1995。食品化學。台北。台灣。
- 許元勳。2003。神奇納豆菌。生物產業。14:53-59。
- 許智強。2006。利用可逆溶解型擔體於 Bacillus sp. 所生產幾丁質?及蛋白?之固定化研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 許元勳。2005。納豆菌發酵製品介紹及國內研發現況。農業生產季刊3:45-52。
- 黃昭穎。2009。不同乾燥條件對紫色肉甘藷中機能性成分及其抗氧化活性的影響。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 黃士禮、陳瑤峰、江文章。1994。省產薏苡籽實中胺基酸、脂肪酸和一般組成成分分析。食品科學。21:67-74。
- 黃羌維、陳由強。1987。薏苡營養成分和產地環境條件的關係。植物生理學通訊。4:36-39。
- 黃鵬。1997。常形山藥栽培管理。農業世界。164:85-89。
- 黃貴豪。1996。把新鮮、營養及保健的山藥帶回家-訪省農試所農藝系山藥育種專家-劉新裕博士。豐年雜誌。46:10-11。
- 黃卓治、辛志勳、張文重。1977a。納豆菌之研究 納豆菌培養條件之檢討。屏東農專學報。18:69-75
- 黃宗慶。1999。攝食枯草菌發酵大豆、黑豆及薏仁對老鼠血液纖維蛋白水解活性、凝血作用之影響。私立靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。台灣。
- 須見洋行。1993。納豆治百病。培琳出版社。台北，台灣。
- 楊莉君、蔡敬民。1998。薏苡對倉鼠血漿脂質的影響。食品科學。25:638-650。
- 鄭心怡。1993。磷脂質與健康。名望出版社。台北。
- 劉新裕、張同吳、林義恭、王昭月。2000。優良保健植物山藥之開發與利用。行政院農業委員會農業試驗所。台中。
- 劉新裕、盧煌勝、林俊義。2000。2000 年山藥之生產與藥膳利用。P6-21。台灣省農業試驗所。台中。
- 劉馨璘。2005。Bacillus subtilis var. natto 及Rhizopus microsporus var. oligosporus 混合發酵對去種皮黑豆機能性成分生成之影響。私立大葉大學生物產業科技所碩士論文。彰化。台灣。
- 廖哲逸。2003。納豆激?-之機能性。食品資訊。198:66-71。
- 劉俊岳。2010。山藥酸酪乳的抗氧化能力及機能性成分之研究。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。台灣。
- 蔡孟貞。2001。大豆蛋白之凝膠機制。食品工業月刊。33:32-38。
- 盧訓、蔡金川、李世滄、高美丁。2002。山藥之預防保健-藥理及機能性評估。
- 蘇遠志。2003。聚酞胺酸(-PGA)之發酵生產與應用。生物產業。14:183-190。
- 蘇珮琪。1996。薏仁對高脂症和糖尿病患血漿脂質和血糖的影響。私立輔仁大學食品營養研究所碩士論文。台北。
- 蘇宗振、陳銓燦、張永欣。2003。台灣大豆及其加工產業之研究。科學農業。51:1-11。
- Akoi, M., and N. Tuzihara. 1984. Effects of the hatomugi (Coixlach ryma-jobi L. var.ma-yuen) on the blood pressure, cholesterol absorption and serum lipids level. Kaseigaku Zasshi. 35:98-96.
- AOAC. 1995. Cereal foods. In: Doris B, editor. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16th ed. Washington, D.C.
- Bernard Gibbs, B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Res. Int. 37: 123-131.
- Christel, Q. D. Bernard, G. Jacques, V. Thierry, D. Claude, B. Michel, L. Micheline, C. Jean-Cluade, C. Francois, B. Francis, T. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. J. Ethnopharmacology. 72: 35- 42.
- Esaki H, Onozaki H, Osawa T. 1994. Antioxidative activity of fermented soybeen products. ACS Symposium Series 546:353-60.
- 45.

Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* 48:86-88. 46. Fujii, H. 1962. On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part I. Factors affecting the formation of mucilage. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 37:615-618. 47. Garcia, M. C., M. Torre, M. L. Marina and F. Laborda. 1997. Composition and characterization of soybean and related products. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 361-391. 48. Garg, S. K., and B. N. Johri. 1994. Rennet: current trends and future research. *Food Reviews Int.* 10: 313-355. 49. Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies*. P.63-69, p.685. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 50. Hong, K. J., Lee, C. H., & Kim, S. W. (2004). *Aspergillus oryzae* GB 107 fermentation improves nutritional quality of food soybean and feed soybean meals. *Journal of Medical Food*, 7, 430-435. 51. Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K. and Kaminogawa, S. 1996. Changes on fecal microflora induced by incubation of mice with *Bacillus subtilis* (Natto) spores are dependent upon dietary components. *Can. J. Microbiology*. 45:59-66. 52. Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y., and Matsue, H. 2002. Inhibitory effect of natto, a kind of fermented soybean, on LDL oxidation in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 50:3592-3696. 53. Iwaki, K. and Kitata, Y. 2007. Availability of partially milled rice as a daily source of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Food Science and Technology Research*, 13:41-44. 54. Kanno, A. and Takamaisu, H. 1995. Determination of  $\gamma$ -Polyglutamic acid in Natto using cetyltrimethylammonium bromide. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 42(11): 878-887. 55. Kaneki M, Hedges SJ, and Hosoi T. 2001. Japanese fermented soybean food as major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 17(4):315-321. 56. Kiers, J. L., Van Laken, A. E., Rombouts, F. M., and Nout, M., 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int J Food Microbiol* 60:163-169. 57. Lahl, W. J. and Braun, S. D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48: 68- 71. 58. Matsuo, M. 1997. In Vivo antioxidant activity of okara koji, a fermented okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. And Biochem.* 61:1968-1972. 59. Messina, M, J. 1999. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 439S-450S. 60. Nikkuni, S., Okada, N. and Itoh, H. 1988. Effect of soybean cooking temperature on the texture and protein digestibility of miso. *J. Food Sci.* 53:445-449. 61. Ogawa, T, Samoto, M., and Takahashi, K. 2000. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46, 271-279. 62. Raumbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal of Biotechnology*. 174-187. 63. Roberto, M. L. Gabriella, C. Simon, M. C. and Martin, J. W. 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Veterinary Microbiology* 79: 133-142. 64. Saito, T., Iso, N., Mizuno, H., Kaneda, H., Suyuma, Y., Kawamura, S. and Osawa, S. 1974. Conformational change of a natto mucin in solution. *Agric. Biol. Chem.* 38:1941-1946. 65. Shih, I.L., and Van, Y.T. 2001. The production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technol.* 79:207-225. 66. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43:1110-1. 67. Sumi H. 1990. Nattokinase properties and recent application for healthy food. *Biology Industrial* 7: 724-30. 68. Tamura, Y. and Takenawa, T. 1999. Antioxidative activity of water soluble extracts from okara fermented with *Bacillus natto* and *Rhizopus oligosporus*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 46: 561-569. 69. Valeria, R. and Anna, L. 1996. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. 681:63-67. 70. Yamaguchi, M., Taguchi H., Gao Y., Igarashi A., and Yoshinori T. 2000. Prolonged intake of fermented soybean (natto) diet containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral metabolism*. 18:71-76. 71. Yokota, T. Hattori, T. Ohishi, H. Hasegawa, K. and Watanabe, K. 2002. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybean: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem* 50: 3597-3601.