

利用納豆菌生產納豆激?之研究

蘇偉迪、張耀南

E-mail: 9417950@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究將市售日本納豆製品中已篩選出具有高活性納豆激?(Nattokinase; NK)之*Bacillus subtilis*作為生產菌株，並利用液態醱酵培養方式進行其納豆激?粗酵素活性等培養條件之探討。結果顯示，最佳培養基組成分為8.0%葡萄糖、3.0%大豆脫脂粉、2.0%酵母抽出物、0.4%磷酸氫二鉀、0.2%碳酸鈣時，在300rpm轉速與2vvm通氣量調控下，溫度與酸鹼值分別控制在37與pH 6.5，培養48 hrs後，其醱酵液中的NK粗酵素活性可達900~1000 FU/mL。另外，發現NK粗酵素液之最適反應溫度與pH分別在50~60 與pH 6.5~10之間；在酵素貯存安定試驗結果顯示，NK粗酵素液在0~4 貯存30天後，其粗酵素活性仍可維持在80%左右。以口服粗酵素液之粉末飼食大白(SD)，並進行急性毒性之動物安全性試驗，其飼食劑量至5000 mg/Kg仍未造成大白鼠任何明顯毒性症狀。

關鍵詞：納豆菌；液態醱酵；納豆激?；酵素活性；動物安全性急性毒性試驗

目錄

目錄	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	v	誌謝	vi	目錄	vii	圖目錄	x	表目錄	xi	第一章	前言	1	第二章	文獻回顧	3	2.1	納豆	3	2.2	納豆之功效	3	2.2.1	納豆富含豐富營養物質	3	2.2.2	調整腸道功能	4	2.2.3	降低血膽固醇	4	2.2.4	預防高血壓	5	2.2.5	預防骨質疏鬆	6	2.2.6	抗菌作用	9	2.2.7	抗癌作用	9	2.2.8	溶解血栓	12	2.3	納豆菌的命名	12	2.4	納豆激?	13	2.5	血栓的形成與溶解	13	2.6	納豆激?溶解血栓之原理機轉	16	2.7	納豆食品的相關開發與市場預測	17	第三章	材料與方法	20	3.1	材料	20	3.1.1	儀器設備	20	3.1.2	藥品	20	3.2	研究方法	21	3.2.1	菌種之分離	21	3.2.2	菌種之篩選	21	3.2.3	固態培養	24	3.2.4	酵素活性之分析方法	24	3.2.5	液態三角搖瓶培養基之探討	27	3.2.6	不同pH控制及醱酵時間對生產NK之影響	27	3.2.7	不同通氣量控制對生產NK之影響	29	3.2.8	酵素作用最適溫度與熱穩定度探討	29	3.2.9	酵素作用最適pH探討	29	3.2.10	酵素活性貯存安定性試驗	30	3.2.11	大鼠口服急性毒性測試	30	3.3	結果與討論	32	3.3.1	菌種的分離與篩選	32	3.3.2	菌種的鑑定	37	3.3.3	不同氮源濃度對納豆菌生產NK活性之影響	37	3.3.4	不同碳源濃度對納豆菌生產NK活性之影響	41	3.3.5	不同pH控制及醱酵時間對生產NK之影響	41	3.3.6	不同通氣量控制對生產NK之影響	44	3.3.7	酵素作用最適溫度與熱穩定度探討	47	3.3.8	酵素作用最適pH探討	47	3.3.9	酵素活性貯存安定性試驗	50	3.3.10	大鼠口服急性毒性測試	52	第四章	結論	54	參考文獻	56	圖目錄	圖2.1	納豆激?對血壓值之影響	7	圖2.2	血清中Vit K2的變化	8	圖2.3	納豆菌的抗菌作用	10	圖2.4	納豆激?對血栓溶解的變化情形	14	圖2.5	納豆激?的分子結構(胺基酸序列圖)	15	圖2.6	納豆激?在血栓溶解機制中所扮演的角色	18	圖3.1	血纖維蛋白平板製作流程	25	圖3.2	血纖維蛋白平板透明圈	26	圖3.3	血纖維蛋白平板透明圈大小	33	圖3.4	納豆分離菌株之16S rDNA部份序列	38	圖3.5	納豆分離菌株之菌體內生孢子顯微照片	39	圖3.6	不同大豆蛋白氮源濃度對納豆激?活性之影響	40	圖3.7	不同酵母抽出物氮源濃度對納豆激?活性之影響	42	圖3.8	不同葡萄糖碳源濃度對納豆激?活性之影響	43	圖3.9	培養基質之不同pH值控制對納豆激?活性之影響	45	圖3.10	不同通氣量控制對納豆激?活性之影響	46	圖3.11	納豆激?粗酵素液之反應溫度及熱穩定性試驗	48	圖3.12	納豆激?粗酵素液之反應pH條件試驗	49	圖3.13	納豆激?粗酵素液在不同貯存溫度下之安定性試驗	51	表目錄	表2.1	納豆菌的抗菌作用	11	表3.1	PCB培養基組成	22	表3.2	PCA培養基組成	23	表3.3	<i>Bacillus subtilis</i> 之培養基組成分	28	表3.4	大鼠實驗分組及納豆粗酵素投予劑量一覽表	31	表3.5	血纖維溶解酵素對血纖維蛋白平板作用之透明圈大小	34	表3.6	<i>Bacillus</i> 菌屬之納豆激?活性	35	表3.7	納豆相關製品之主要菌種	36
----	-----	-----	-----	------	----	------	---	----	----	----	-----	-----	---	-----	----	-----	----	---	-----	------	---	-----	----	---	-----	-------	---	-------	------------	---	-------	--------	---	-------	--------	---	-------	-------	---	-------	--------	---	-------	------	---	-------	------	---	-------	------	----	-----	--------	----	-----	------	----	-----	----------	----	-----	---------------	----	-----	----------------	----	-----	-------	----	-----	----	----	-------	------	----	-------	----	----	-----	------	----	-------	-------	----	-------	-------	----	-------	------	----	-------	-----------	----	-------	--------------	----	-------	---------------------	----	-------	-----------------	----	-------	-----------------	----	-------	------------	----	--------	-------------	----	--------	------------	----	-----	-------	----	-------	----------	----	-------	-------	----	-------	---------------------	----	-------	---------------------	----	-------	---------------------	----	-------	-----------------	----	-------	-----------------	----	-------	------------	----	-------	-------------	----	--------	------------	----	-----	----	----	------	----	-----	------	-------------	---	------	--------------	---	------	----------	----	------	----------------	----	------	-------------------	----	------	--------------------	----	------	-------------	----	------	------------	----	------	--------------	----	------	---------------------	----	------	-------------------	----	------	----------------------	----	------	-----------------------	----	------	---------------------	----	------	------------------------	----	-------	-------------------	----	-------	----------------------	----	-------	-------------------	----	-------	------------------------	----	-----	------	----------	----	------	----------	----	------	----------	----	------	----------------------------------	----	------	---------------------	----	------	-------------------------	----	------	---------------------------	----	------	-------------	----

參考文獻

1. 王文獻。1996。最新解剖生理學。合記圖書出版社。台北，台灣。
2. 王淑貞。1999。黃麴菌及枯草菌超氧歧化?之研究。靜宜大學食品營養系碩士論文。台中。
3. 毛玉玲。2002。人字科技成功利用發酵技術生產孢子性納豆菌。生物科技。第68-9頁。
4. 朱燕華。1999。分離大豆蛋白與大豆蛋白濃縮物之製造技術。食品市場資訊8807:15-8。
5. 林定國、黃暉光。1994。如何攝取食物纖維。生活醫學書房。台北。台灣。
6. 林志勳、游義德、顏宏達。1998a。枯草菌蛋白酵素活性之定性與定量分析。中華農業會報188:70-9。
7. 林志勳、陸勤、游義德、吳繼芳。1998b。澱粉來源與濃度對枯草菌澱粉酵素之產量和活性的影響。中華農業會報185:22-31。
8. 林麗菁。2004。納豆枯草菌之液態培養及其產生納豆激?之探討。屏科大食品科學所碩士論文。屏東。
9. 范敏慧。1994。枯草菌IMR-NK-1血纖維蛋白?之純化及性質研究。靜宜大學食品營養研究所碩士論文。台中。
10. 馬佩華。2000。納豆-天然的藥用食品。新世紀醫學。
11. 張永鍾、張鴻民。1996。等電點沈澱法自豬血中製備血纖維蛋白原。中國農業化學會誌34(3):364-70。
12. 張壽昌。2000。大豆蛋白健康機能解讀。食品資訊178:36-38。
13. 郭斐琪。1995。枯草菌IMR-NK-1強力血纖維蛋白?之特性研究。靜宜大學食品營養研究所碩士論文。台中。

14. 許元勳。2003。現代生物科技的新寵兒-神奇納豆菌。生物產業14(1):53-9。
15. 許元勳。2004。納豆菌的生理功能及其產業應用。生物產業15(4):73-78。
16. 黃卓治、辛志勳、張文重。1977a。納豆菌之研究I納豆菌培養條件之檢討。屏東農專學報18:69-75。
17. 黃卓治、黃世昌、張文重。1977b。納豆菌之研究II引絲納豆之製造。屏東農專學報18:76-80。
18. 黃卓治、辛志勳、張文重。1978。納豆菌之研究III納豆菌蛋白質分解酵素生產條件之探討。屏東農專學報19:92-8。
19. 黃宗慶。1999。攝食枯草菌發酵大豆、黑豆及薏仁對老鼠血液血纖維蛋白水解活性及凝血作用之影響。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。
20. 須見洋行。1993。納豆治百病。培琳出版社。台北，台灣。
21. 廖曉玲。2002。新世紀醫學-納豆天然的藥用食品。安立出版社。台北，台灣。
22. 鄭奕帝。1999。認識大豆異黃酮與骨質疏鬆症。食品資訊161:48-51。
23. 鍾青萍、余世望、梁性媛。2001。納豆菌的抗菌作用及其培養基的優化。食品工業科技5:20-22。
24. 盧義發、湯政宜。1995。大豆蛋白的降血膽固醇作用。輔仁民生學誌1(1):131-44。
25. 賴威安。2000。Bacillus sp. P-6中蛋白?的生產與性質分析。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中。
26. 蘇遠志。2003。納豆菌代謝產物的開發與應用。生物產業14(2):117-130。
27. Adnan, C., Adem, A., Erdem, H., Serap, I. 1997. The effect of urokinase in preventing the formation of epidural fibrosis and/or leptomeningeal arachnoiditis. *Surgery Neurology*. 47: 124-7.
28. Allagheny, N., Obanu, Z.A., Platt, G.C., Owens, J.D. 1996. Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Food Microbiology*. 29: 321-33.
29. Ammar, Y.B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Minamiura, N. 2002. Some properties of levansucrase of *Bacillus natto* stabilized with periodate oxidized glucomannan. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 875-82.
30. Beaumont, M. 2002. Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 75: 189-96.
31. Chang, C.T., Fan, M.H., Kuo, F.C., Sung, H.Y. 2000. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK-1. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3210-6.
32. Esaki, H., Onozaki, H., Osawa, T. 1994. Antioxidative activity of fermented soybean products. *ACS Symposium Series*. 546: 353-60.
33. Farag, A.M., Hassan, M.A. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 85-93.
34. Fossum, S., Hoem, N.O. 1996. Urokinase and non-urokinase fibrinolytic activity in protease-inhibitor-deprived plasma, assayed by a fibrin micro-plate method. *Immunopharmacology*. 32: 119-21.
35. Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., Nishimuro, S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and Biophysical Communications*. 197(3): 1340-7.
36. Fukao, H., Hagiya, Y., Ueshima, S., Kamiishi, H., Okada, K., Matsuo, O. 2000. Fibrinolytic system in the process of wound healing in rat. *Pathophysiology*. 6: 217-24.
37. Ichishima, E., Kato, M., Wada, Y., Kakiuchi, H., Takeuchi, M., Takahashi, T. 1982. Spore fatty acid composition in *Bacillus natto*, a food microorganism fermented soybean food. *Food Chemistry*. 8(1): 1-9.
38. Iversen, L.H., Ussing, O.T. 1996. Markers of fibrin formation in colorectal surgery: fibrinopeptide a and soluble fibrin. *Thrombosis Research*. 81(5): 569-76.
39. Kiers, J.L., A. E. A., Van, laeken, Rbouts, F. M., M. J. R., Nout. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International journal of Food Microbiology*. 60(2000): 163-169.
40. Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., OH, H., Kwon, I., Lee, S. 1996. Purification and Characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from Chungkook-Jang. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(7): 2482-8.
41. Kudo, T. 1990. Warfarin antagonism of natto and increase in serum Vitamin K by intake of natto. *Artery*. 17(4): 189-201.
42. Lacroix, K.A., Bean, C., Box, L., Anger, K. 1996. A study of the fibrinolytic response in healthy men and women following a brief exposure to venous occlusion. *Thrombosis Research*. 81(1): 133-43.
43. Maruyama, M., Sumi, H. 1998. Effect of natto diet on blood pressure. *Basic and Clinical Aspects of Japanese Traditional Food Natto II*. 1-3. Japan.
44. H. Mihara, H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, M. Maruyama 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jan. J. Physiol*. 41: 461-472.
45. Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R.H., Zhang, Y.Z. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 134: 45-52.
46. Samy, A., Aassar, E. 1995. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidroseum*. *Biotechnology Letters*. 17(9): 943-8.
47. Sato, T., Yamada, Y., Ohtani, Y., Mitsui, N., Murasawa, H., Araki, S. 2001. Production of Menaquinone (Vitamin K2)-7 by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(1): 16-20.
48. Sumi, H. 1990. Nattokinase properties and recent application for healthy food. *Biology Industrial*. 7: 724-30.
49. Sumi, H., Hamada, H., Mihara, H., Nakanishi, K., Hiratani, H. 1989. Fibrinolytic effect of the Japanese traditional food- Natto (Nattokinase). *Thrombosis Haemostas*. 62: 549.
50. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., Hiratani, H. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of Nattokinase I. *Acta Haematol*. 84: 139-43.
51. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. 1988. A novel strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese- Natto Fibrinolysis. 2: 67.
52. 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.
53. Sumi, H., Nakajima, N., Yatagai, C. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara,- a Japanese traditional fermented food. *Compound Biochemistry Physiological*. 112B(3): 543-7.
54. Sumi, H., Seiki, M., Seiki, N., Morimoto, H., Maruyama, M., Tsushima, M., Minara, H. 1985. Plasma fibrinolytic after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*. 33: 121-7.
55. Suzuki, Y., Kondo, K., Ichise, H., Tsukamoto, Y., Urano, T., Umemura, K. 2003. Dietary supplementation with fermented soybean suppresses Intimal thickening. *Basic Nutritional Investigation*. 19(3): 261-4.
56. T.Yokota, T. Hattori, H.Ohishi, K. Hasegawa and K. Katanabe, 1996. The Effect of Antioxigant – containing Fraction from Fermented Soybean Food on Atherosclerosis Development in Cholesterol-Fed Rabbits. *Lebensm, Wiss. U. Technol.*, 29:751-755.
57. Wei, Q., Hall, C.W., Chang, K.C. 2001. Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. *Journal of Food Science*. 66(1): 167-73.
58. Yeang, H.Y., Yusof, F., Abdullah, L. 1998. Protein purification for Lowry assay: acid precipitation of protein in the presence of sodium dodecyl sulfate and other biological detergents. *Analytical Biochemistry*. 265: 381-4.