

Bacillus subtilis var. natto 不同液態培養條件對其代謝物生成之影響

吳尉禎、陳明造

E-mail: 9510765@mail.dyu.edu.tw

摘要

納豆為日本傳統的大豆發酵食品，一般都以大豆作為納豆菌生長之基質，是為固態發酵。本研究以6%濃縮大豆蛋白(72%粗蛋白)添加不同比例之蔗糖與麩胺酸鈉做為基質培養Bacillus subtilis var. natto，並以不同轉速振盪培養，經發酵24、28、32、36、48小時，比較各發酵時間之各組培養基的代謝物包括乾菌重、-PGA、蛋白?及澱粉?活性、水解率、游離胺基酸之含量差異性。由結果顯示：10%蔗糖添加6%麩胺酸鈉以轉速175rpm發酵48小時乾菌重達117%；5%蔗糖添加6%麩胺酸鈉以轉速175rpm發酵48小時之 -PGA達206.1mg/100mL；5%蔗糖添加0.5%麩胺酸鈉以轉速125rpm下發酵48小時蛋白?活性達114.0 × 102U/100mL；15%蔗糖添加不同比例麩胺酸鈉以轉速125rpm、150rpm、175rpm發酵24小時澱粉?活性為整個處理組中最高；15%蔗糖添加0.5%麩胺酸鈉以轉速125rpm發酵36小時之水解率最高約為42.68%；5%蔗糖添加0.5%麩胺酸鈉以轉速150rpm發酵48小時之酪胺酸、麩胺酸產量分別達933mg/100mL、1200mg/100mL。綜合上述所言，建議5%蔗糖添加3%麩胺酸鈉以轉速125rpm發酵48小時為較好的發酵條件。

關鍵詞：納豆菌、濃縮大豆蛋白、液態培養、代謝物成分及活性

目錄

授權書iii 中文摘要iv 英文摘要v 誌謝vi 目錄vii 圖目錄xiii 表目錄xv 第一章 緒言1 第二章 文獻回顧2 2.1大豆蛋白質2 2.1.1大豆之簡介2 2.1.2大豆蛋白之種類3 2.1.3大豆蛋白之胺基酸組成4 2.1.4大豆蛋白之組成4 2.2納豆9 2.2.1納豆菌之命名9 2.2.2納豆之介紹10 2.2.3納豆之功效11 2.2.3.1溶解血栓及預防血栓作用11 2.2.3.2抗菌、消毒11 2.2.3.3預防骨骼疏鬆症12 2.2.3.4抗氧化及抗12 2.2.3.5預防高血壓12 2.2.3.6提高蛋白質的消化率13 2.3蛋白質水解13 2.4聚麩胺酸14 第三章 材料與方法17 3.1實驗藥品與設備17 3.1.1材料17 3.1.2藥品17 3.1.3設備17 3.2實驗方法18 3.2.1 Bacillus subtilis var. natto培養18 3.2.1.1 菌種活化18 3.2.1.2 試驗處理18 3.3化學成分分析19 3.3.1?菌重19 3.3.2 -PGA含量19 3.3.2.1萃取液製備19 3.3.2.2 -PGA含量測定21 3.3.3蛋白?活性測定21 3.3.4澱粉?活性22 3.3.4.1酵素液之製備22 3.3.4.2澱粉?活性測定22 3.3.5蛋白質水解率23 3.3.6游離胺基酸含量測定24 3.3.6.1藥品24 3.3.6.2游離胺基酸之萃取25 3.3.6.3高效能液相層析儀之流動相、配備與分析條件25 3.3.6.4衍生物製備及分析26 3.4統計分析與繪圖27 第四章 結果與討論28 4.1振盪轉速對乾菌重的影響28 4.1.1添加不同比例蔗糖與麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之乾菌重比較28 4.1.2添加不同比例蔗糖與麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之乾菌重比較32 4.1.3添加不同比例蔗糖與麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之乾菌重比較36 4.2不同轉速對 -PGA產量的影響41 4.2.1不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之 -PGA產量比較41 4.2.2不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之 -PGA產量比較41 4.2.3不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之 -PGA產量比較42 4.3在不同震盪轉速下蔗糖和麩胺酸鈉添加對蛋白?活性影響47 4.3.1不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之蛋白?活性比較47 4.3.2不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之蛋白?活性比較47 4.3.3不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之蛋白?活性比較50 4.4在不同震盪轉速下蔗糖和麩胺酸鈉添加對水解率影響52 4.4.1不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之澱粉?活性比較52 4.4.2不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之澱粉?活性比較52 4.4.3不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之澱粉?活性比較55 4.5在不同振盪轉速下蔗糖和麩胺酸鈉添加對水解率的影響57 4.5.1不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之水解率比較57 4.5.2不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之水解率比較57 4.5.3不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之水解率比較58 4.6不同震盪轉速下蔗糖和麩胺酸鈉添加對游離胺基酸含量影響62 4.6.1不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之游離胺基酸含量比較62 4.6.2不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之游離胺基酸含量比較66 4.6.3不同比例蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養Bacillus subtilis var. natto之游離胺基酸含量比較70 第五章 結論75 參考文獻77 圖目錄 圖 2.1 -Polyglutamic acid的化學結構16 圖 4.1 添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉125rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較29 圖 4.2 添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉125rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較30 圖 4.3 添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉125rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較31 圖 4.4 添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉150rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較33 圖 4.5 添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉150rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較34 圖 4.6 添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉150rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較35 圖 4.7 添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉175rpm振盪培養24-48小時之乾

菌重比較38 圖 4.8 添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉175rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較39 圖 4.9 添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉175rpm振盪培養24-48小時之乾菌重比較40 圖 4.10添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於125rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較63 圖 4.11添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於125rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較64 圖 4.12添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於125rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較65 圖 4.13添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於150rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較67 圖 4.14添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於150rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較68 圖 4.15添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於150rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較69 圖 4.16添加5%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於175rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較72 圖 4.17添加10%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於175rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較73 圖 4.18添加15%蔗糖及不同比例麩胺酸鈉之液態培養基於175rpm振盪培養24-48小時之游離胺基酸比較74 表目錄 表2.1 市售各種型態之大豆蛋白5 表2.2 胺基酸需要量和大豆產品的胺基組成6 表2.3 大豆中主要蛋白成分8 表3.1 *Bacillus subtilis* var. natto液態培養基之組成20 表4.1 不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉添加在轉速125rpm振盪培養24-48小時之 -PGA產量比較 (mg/100mL) 44 表4.2 不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉添加在轉速150rpm振盪培養24-48小時之 -PGA產量比較 (mg/100mL) 45 表4.3 不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉添加在轉速175rpm振盪培養24-48小時之 -PGA產量比較 (mg/100mL) 46 表4.4 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養24-48小時之蛋白?活性比較 (U/100mL) 48 表4.5 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養24-48小時之蛋白?活性比較 (U/100mL) 49 表4.6 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養24-48小時之蛋白?活性比較 (U/100mL) 51 表4.7 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養24-48小時之澱粉?活性比較 (U/100mL) 53 表4.8 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm震盪培養24-48小時之澱粉?活性比較 (U/100mL) 54 表4.9 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm震盪培養24-48小時之澱粉?活性比較 (U/100mL) 56 表4.10 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速125rpm振盪培養24-48小時之水解率比較 (%) 59 表4.11 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速150rpm振盪培養24-48小時之水解率比較 (%) 60 表4.12 添加不同比例之蔗糖及麩胺酸鈉在轉速175rpm振盪培養24-48小時之水解率比較 (%) 61

參考文獻

- 中文部份 1.中野政弘, 1967. 發酵食品. 光琳書院. 東京 2.朱燕華. 1994. 淺談大豆蛋白質及其應用. 食品工業26(1):15-18 3.林文彬. 2004. 納豆製造及養生利用. 傳統醫學雜誌16(2):8-23 4.凌美月、周正俊. 1995. *Aspergillus oryzae*在不同擠壓醬油發酵基質上之生長及酵素生產. 中國農業會誌 33:521-532 5.許元勳. 2005. 納豆菌發酵製品介紹及國內研發現況. 農業生技產業季刊3:45-52 6.許元勳. 2003. 神奇納豆菌. 生物產業14(1):53-59 7.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 8.黃龍三. 2005. 大豆蛋白質之凝膠與冷凝膠新技術. 食品工業37(10):13-21 9.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 10.邱思魁、曹惠霖、蕭泉源. 1996. 產地與魚種不同柴魚之呈味成分及品質差異. 食品科學 23:197-205 11.游芸悌. 2003. 以納豆菌生產生物性高分子之研究. 私立大葉大學環境工程所碩士論文. 彰化. 12.詹惠雯. 2005. 利用*Aspergillus oryzae* 固態發酵處理黃豆粕以去除寡糖暨過敏性蛋白質之研究. 國立中興大學食品科學研究所論文. 台中. 13.廖哲逸. 2003. 納豆激?之機能性. 食品資訊 198:66-71 14.劉毓蕙. 2004. 水解蛋白的特性及應用. 食品工業36(2):19-24 15.劉馨璘. 2004. *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論文. 彰化 16.陳仲仁. 1997. 黃豆蛋白的組織、功能特性及在食品上的應用. 食品工業29(3):19-28 17.陳秀瑩. 2002. 大豆之機能性與其分析方法. 食品工業34(10):18-25 18.謝秋玲、郭勇、林劍. 2000. 納豆激?活性測定方法. 廣東醫學6(10):1-4 19.鄭靜桂. 1997. 蛋白質之水解與水解液之利用. 食品工業31:19-28 20.蘇遠志, 2003. 聚麩胺酸(-PGA)之發酵生產與應用. 生物產業14(3):183-190 英文部份 1.B Gibbs, B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* 37 :123-131 2.Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric assay using -Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227 3.Clemente, A., Vioque. and Millan, F. 1999. Vegetable protein hydrolysates. *Nutricion y Obesidad* 2, 289-296 4.Esaki, H., Nohara, Y., Onozaki, H. and Osawa, T. 1990. Antioxdativ activity of natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37:474-477 5.Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* 48:86-88 6.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 7.M.C. Garciaa, M. Torre, F. Laborda, M.L. Marina. 1997. Rapid separation of soybean globulins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 758(1997)75-83 8.Grimble, G. K. and Silk, D. 1989. Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.* 2:87-108 9.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. 10.Ma, J., Igarashi, A., Yamakawa, K., Yamaguchi, M. Enhancing. 2001. Effect of Zinc and Vitamin K2 (Menaquinone-7) on bone components in the femoral tissue of female Elderly Rats. *Journal of Health Science*, 47 :40 – 45 11.Iijima, A., Sasaki, H., Wakamatsu, H., Watanabe, S. and Maeda, Y. 1999. Microcalorimetric analysis of fermentation of natto, a traditional Japanese food. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 46:279-284. 12.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 13.Kaneki M, Hedges SJ, and Hosoi T. 2001.

Japanese fermented soybean food as major determination of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 17(4):315-321

14. Kanno, A. and Takamaisu, H. 1995. Determination of γ -Polyglutamic acid in Natto using cetyltrimethylammonium bromide. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 42(11): 878-887
15. 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
16. Kilara, A. and Sharkasi, T.W. 1986. Effect of temperature on food protein and its implications on functional properties. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 23:323-395
17. Konasu, S., K. Watanabe and T. Shimizu. 1974. Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40(9):909-915
18. Kruger, J. E. 1973. Change in the levels of proteolytic enzymes from hard red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chemistry* 5:122-131
19. Kunioka M. 1995. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl Microbiol biotechnol* 44:501-506
20. Kunioka M and Goto. 1994. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl Microbiol biotechnol* 40:867-872
21. Lahl, W. J and Braun, S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for use. *Food Technol.* 48:68-71
22. Meredith, C. N., Zackin, M. J., Frontera, W. R. and Evans, W. J. 1989. Dietary protein requirements and body proteins metabolism in endurance-trained men. *J. App. Physiol.* 66:2850-2856
23. Messina, M. 1995. Modern uses for an ancient bean: soy-food and disease. *Chem. Ind.* 11, 412-415.
24. Muramatsu, K., Nagai, T., Sato, S., Ochiai, Y., Ishimura, N., Ito, Y. and Kiuchi, K. 1997. Stimulative effect of phytone on the production of sticky materials in *Bacillus subtilis* (natto). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 44:812-815.
25. Ogawa, Y. Yamaguchi, F. Yuasa, K. and Thara, Y. 1998. Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1684-1687.
26. Okamoto A., Hanagata H., Kawamura Y., and Yangida F. 1995. Anti-hypertensive substrate in fermented soybean, natto. *Plant food for human nutrition*:39-47
27. Pedersen, H. E. 1995. Application of soya protein concentrated in processed meat products. *Fleishwirtsch.* 75:798-802
28. Peng, I. C., Quass, D. W., Dayton, W. R., and Allen, C. E. 1984. The physicochemical and functional properties of soybean 11S Globulin-a review. *Cereal Chem.* 61(6):480-490
29. Rakosky, J. 1988. Proteins Additives in Foodservice Application. AVI, Van Nostrand Reinhold, New York.
30. 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
31. Sarkar, P.K., Jones L.J., Craven G.S., Somerset S.M. and Palmer C. 1997. Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food. *Food chemistry*(59):69-75
32. Shih, I. L., and Van, Y. T., 2001. The production of poly (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technol.* 79:207-225
33. Siemnsma, A. D., Weijer, W. J and Bak, H. J. 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formula. *Trends in Food Science and Technology* 4:16-21
34. Spellman, D., McEvoy, E., Cuinn, O. G. and FitzGerald, R. J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein : Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods of quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal* 13: 447-453.
35. Urano, T., Ihara, H., Umemura, K., Suzuki, Y., Oike, M., Akita, S., Tsukamoto Y., Suzuki I and Takada A. 2001. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type1. *J Bio. Chem.* 276:24690-24696.
36. Wolf, W. J. 1970. Soy protein: their functional, chemical, and physical properties. *J. Agr. Food Chem.* 18(6):969-976
37. Yamaguchi, M., Taguchi H., Gao Y., Igarashi A., and Yoshinori Tsukamoto. 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
38. Yokota, T. 1996. The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Lebensm Wissu Technol* (29)751-75