

### 摘要

由於近年來乾酪消費量激增，此酵素已不敷使用，因此類似仔牛凝乳?之代用品已被許多人所研究。納豆是日本傳統的大豆發酵食品，由蒸煮過的大豆接種納豆菌 (*Bacillus subtilis*) 發酵而成，以獨特黏質及特殊風味為其特徵。然而天貝為印尼蛋白質飲食來源，以去殼蒸煮過之大豆包裹香蕉葉利用根黴(*Rhizopus oligosporus*) 發酵而成，棉花狀菌絲的生長使大豆結合成緻密的糕狀，且具有令人喜愛的香氣。本研究在探討*Bacillus subtilis* var. natto和*Rhizopus oligosporus* 發酵大豆凝乳?的純化和凝乳活性分析。於蒸煮大豆中分別接種*Bacillus subtilis* var. natto 和 *Rhizopus oligosporus* 培養20小時後，將粗酵素液與rennet酵素液分別加入牛乳中進行凝乳試驗。結果發現：添加rennet酵素液不論是在凝乳時間、黏度、張力都較其他二者為佳；而添加*Rhizopus oligosporus*之粗凝乳酵素液次之。由SDS-PAGE圖譜發現，三者之乳塊皆有四個片段。將三者之凝乳塊進行顯微結構之分析比較，可發現 *Bacillus subtilis* var. natto之凝乳表面結構顯得最為鬆散，孔洞較大；而rennet凝固之凝乳塊結構則較緻密。相較於犢牛凝乳?，細菌凝乳?仍有蛋白質分解力較強，易產生苦味與質地不良等缺陷。目前，黴菌所生產之凝乳?已被商品化並應用於乾酪之生產；而細菌凝乳?則需進行更進一步之研究。

關鍵詞：天貝;根黴菌;納豆;納豆菌;凝乳

### 目錄

1. 前言	12																																																																					
2. 文獻回顧	2.1 酵素性凝乳	2.2 凝乳之凝固機制	2.3 凝乳之凝析現象	2.4 凝乳?之種類	2.5 凝乳?之適用性	2.6 微生物性凝乳?之商業化	2.7 微生物生產之蛋白?	2.8 2.3.1 <i>Bacillus subtilis</i> 蛋白?	2.9 2.3.2 <i>Rhizopus</i> 蛋白?	3. 材料與方法	3.1 實驗藥品與儀器	3.1.1 材料	3.1.2 藥品	3.1.3 儀器	3.2 實驗方法	3.2.1 發酵方法	3.2.1.1 納豆製備	3.2.1.2 天貝製備	3.2.2 萃取液之製備	3.3 分析項目	3.3.1 凝乳試驗	3.3.2 黏度測試	3.3.3 張力測試	3.3.4 凝乳活性	3.3.5 蛋白分解活性	3.3.6 凝乳?之純化	3.3.7 蛋白質濃度測定	3.3.8 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	3.3.9 掃描式電子顯微鏡觀察	3.4 統計分析	4. 結果與討論	4.1 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto和 <i>Rhizopus oligosporus</i> 粗凝乳酵素液之特性	4.1.1 溫度與pH值對凝乳時間之影響	4.1.2 溫度與pH值對凝乳黏度之影響	4.1.3 溫度與pH值對凝乳張力之影響	4.2 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto 和 <i>Rhizopus oligosporus</i> 凝乳?之純化	4.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto凝乳?之純化	4.2.2 <i>Rhizopus oligosporus</i> 凝乳?之純化	4.3 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto、 <i>Rhizopus oligosporus</i> 粗凝乳酵素液與 rennet對牛乳凝乳作用之比較	4.3.1 凝乳時間、黏度與張力之比較	4.3.2 凝乳活性及蛋白質分解活性比之比較	4.3.3 凝乳塊中牛乳蛋白的電泳行為	4.3.4 掃描式電子顯微鏡觀察	5. 結論	6. 參考文獻	7. 圖目錄	圖4.1 溫度與pH值對 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳黏度之影響	圖4.2 溫度與pH值對 <i>Rhizopus oligosporus</i> 發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳黏度之影響	圖4.3 溫度與pH值對 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳張力之影響	圖4.4 溫度與pH值對 <i>Rhizopus oligosporus</i> 發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳張力之影響	圖4.5 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto發酵大豆凝乳?DEAE-Sepharose CL-6B管柱層析圖	圖4.6 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto凝乳?之Sephacryl S-100HR膠體層析圖	圖4.7 <i>Rhizopus oligosporus</i> 發酵大豆凝乳?之DEAE-Sepharose CL-6B管柱層析圖	圖4.8 <i>Rhizopus oligosporus</i> 凝乳?之Sephacryl S-100HR膠體層析圖	圖4.9 凝乳塊之電泳圖	圖4.10 凝乳塊之顯微構造圖	表目錄	表2.1 植物性凝乳劑之來源	表2.2 細菌凝乳劑之來源	表2.3 黴菌凝乳劑之來源	表2.4 商業化真菌粗凝乳?	表3.1 安佳脫脂即溶奶粉之營養成分	表3.2 分離膠組成	表3.3 排列膠組成	表4.1 溫度與pH值對 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳時間之影響	表4.2 溫度與pH值對 <i>Rhizopus oligosporus</i> 發酵大豆粗凝乳酵素液凝乳時間之影響	表4.3 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto凝乳?之純化結果	表4.4 <i>Rhizopus oligosporus</i> 凝乳?之純化結果	表4.5 <i>Bacillus subtilis</i> var. natto 和 <i>Rhizopus oligosporus</i> 粗凝乳酵素液與rennet對凝乳時間、黏度、張力之比較	表4.6 凝乳活性與蛋白質分解活性比之比較

### 參考文獻

1. 王聖耀。1997。利用根黴菌株凝乳?試製扣碗酪。台灣大學畜產學研究所。碩士論文。台北市。
2. 吳疆、龐廣昌、凌雪萍。2003。酪蛋白巨?的生物特性及應用前景。食品研究與發展。24:9~10。
3. 林慶文。1987。乳品加工學。華香園出版社。台北市。
4. 林慶文。1993。乳製品之特性與機能。華香園出版社。台北市。
5. 周俊清、林親錄、趙謀明。2005。產高效凝乳?菌株獲得方法的探討。食品科學。26:253~256。
6. 姜峰、張蘭威。2003。我國凝乳?特性及替代的研究現狀。食品研究與開發。24:3~6。哈爾濱。
7. 張南玲。1993。胃腸系統內 一胺基酸研究的進展。國外醫學:生理病理科學與臨床分冊。13:139-142。
8. 陳淑華。1987。微生物酵素的生產分離與

純化。食品工業。19:36-44。9. 陳小玲。2000。酒釀菌元篩選與其凝乳特性。國立台灣大學畜產學研究所。博士論文。台北市。10. 陳妍。2004。生薑蛋白活性之影響因子及其應用於牛乳凝膠製品之試製。國立台灣大學畜產學研究所。碩士論文。台北市。11. 張富新、田呈瑞。1997。木瓜蛋白酶凝乳特性的研究。西北農業大學學報。102-105。12. 駱承庫。1987。乳與乳製品工藝學。北京農業出版社。13. 滕國新、李里特。2006。Rhizopus sp. 052 凝乳的部分學性質。食品與發酵工業。32:12-15。14. Arima, K., J. Yu, and Iwasaki, S. 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pursillus* var. Lindt. In *Methods in Enzymology*, Vol. 19, G. E. Perlmann and L. Lorand (Eds.), pp. 446-459. Academic Press, New York. 15. Bernard, F. G. Alexandre, Z. Robert, M. and Catherine, M. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research Int.* 37:123-131. 16. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. 17. Cheryan, M., van Wyk, P. J., Olson, N.F. and Richardson, T. 1975. Secondary phase and mechanism of enzymatic milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 58:477-481. 18. Dalgleish, D. G. 1987. The enzymatic coagulation of milk. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. In general aspects, Vol. I, P. F. Fox. (Ed.), pp. 63-96. Elsevier Applied Science, London. 19. Dalgleish, D. G. and A. J. R. Law. 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* 55: 529-538. 20. Garg, S.K. and Johri, B.N. 1944. Rennet: Current trends and future research. *Food Res. Int.* 10:313-355. 21. Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies*. pp636-69, pp685. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 22. Hesseltine, C. W. 1965. A millennium of fungi food and fermentation. *Mycol.* 57: 149-197. 23. Hesseltine, C. W., Smith, M., Wang, H. L. 1967. New fermented cereal products. *Devel. Ind. Micro.* 8: 179-186. 24. Kannan, A. and R. Jenness. 1961. Relation of milk serum proteins and milk salts to the effects of heat treatment on rennet clotting. *J. Dairy Sci.* 26: 808-822. 25. Kawai, M. and Mukai, N. 1970. Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes, Part I. Screening tests of Basidiomycetes for the production of milk-clotting enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 34: 159-168. 26. Labropoulos, A. E., Collins, W. F. and Stone, W. K. 1984. Effects of ultra-high temperature and vat processes on heat-induced rheological properties of yogurt. *J. Dairy Sci.* 67: 405-409. 27. Lagoueyte, N., Lablee, J. and Tarodo de la Fuente, B. 1994. Temperature affects microstructure of renneted milk gel. *J. Food Sci.* 59: 956-959. 28. Lee, Y. H. and Marshall, R. T. 1981. Microstructure and texture of process cheese, milk curds, and caseinate curds containing native or boiled soy protein. *J. Dairy Sci.* 64: 2311-2317. 29. McMahon, J. D. and Brown, R. J. 1984. Enzymatic coagulation of casein micelles: a review. *J. Dairy Sci.* 67:919-929. 30. Modler, H. W., Larmond, M. E., Lin, C. S., Froehlich, D. and Emmons, B. 1983. Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 422-429. 31. Nakamura, T., Matsubayashi, T., Kamachi, K., Hasegawa, T., Ando, Y., Omori, M. 2000.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* depresses the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 74: 907-909 (in Japanese). 32. Narahara, H., Y. Koyaa, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Uea, and H. Taguchi. 1982. Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* 60:311-319. 33. Parnli-Clunies, E. M. Y. Kauda and Deman, J. M. 1986. Influence of heat treatment of milk on the flow properties of yogurt. *J. Food Sci.* 51: 1459-1462. 34. Pearse, M. J. and Mackinlay, A. G. 1986. Biochemical aspects of syneresis: a review. *J. Dairy Sci.* 72: 1401-1407. 35. Rao. L. Krishna and Mathur D. K. 1979. Assessment of purified bacterial milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* K-26 for cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.* 62:378-383. 36. Reed, G. 1975. *Enzymes in food processing*. Universal Foods Corporation Milwaukee, Wisconsin. 2: 154-156. 37. Sardinas, J. L. 1972. Microbial rennets. *Adv. Appl. Micro.* 15: 39-73. 38. Smits, P. and van Brouwershaven, J. H. 1980. Heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.* 47:518-522. 39. Storry, J. E. and Ford, G. D. 1982. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *J. Dairy Res.* 49: 469-477. 40. Sushil Kumara, Neeru S. Sharmaa, Mukh R. Saharanb, Randhir Singh. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem.* 40: 1701 – 1705. 41. Wang, H. L., Ruttle, D. I. and Hesseltine, C. W. 1969. Milk-clotting activity of proteinases produced by *Rhizopus*. *Can. J. Microbiol.* 15: 99-104. 42. Wang, H. L., Vespa, J. B. and Hesseltine, C. W. 1974. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *Appl. Microbiol.* 27: 906-911. 43. Wilson, G. A. and Wheelock, J. V. 1972. Factors affecting the action of rennin in heated milk. *J. Dairy Res.* 39:413-419. 44. Zdenko, P. and Donald, M. I. 1969. Proteolysis by proteases of *Bacillus subtilis* used to make Canadian cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 56:317-322. 45. Zdenko, P. and Donald, M. I. 1969. Reduction of proteolytic activity of *Bacillus subtilis* proteases by acidification of milk before cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 56:323-327.