

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以 *Bacillus natto* 發酵黑豆製造高血纖維蛋白水解活性及
高抗氧化力之納豆製品

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-034-004-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國文化大學食品營養學系

計畫主持人：楊開聰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以 *Bacillus natto* 發酵黑豆製造高血纖維蛋白水解活性及高抗氧化力之納豆製品

High fibrinolytic and antioxidative activity natto products made from black soybean fermented with *Bacillus natto*

計劃編號：NSC 91-2313-B-034-004

執行期限：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

主持人：楊開聰 執行機構及單位名稱：中國文化大學食品營養學系

一. 中文摘要

本研究利用反應曲面法之實驗設計，探討接種菌數與發酵時間對納豆製品之血纖維蛋白水解活性、抗氧化力及硬度的影響，以獲得以青仁黑豆製做全豆納豆、碎納豆及豆渣納豆之最適加工條件。研究結果顯示全豆納豆製做之最適條件為接種菌數量 10^8 cells/100g，發酵時間為 25 小時；碎豆納豆為接種菌量 10^4 cells/100g，發酵時間為 15 小時；豆渣納豆為接種菌量 10^8 cells/100g，發酵時間為 24 小時。

關鍵字：黑豆、豆渣、黑豆納豆、高血纖維蛋白水解活性、納豆激酶、溶血活性、抗氧化力

Abstract

In this research, the optimum processing conditions for whole bean natto, broken bean natto, and okara natto were studied by using response surface methodology (RSM). The effects of the inoculated bacteria populations and fermentation time on the fibrinolytic activity, antioxidative activity and hardness were studied to obtain the optimum process for the three natto products. The results of this research showed that the

optimum processing conditions of inoculated bacteria populations and fermentation time for whole bean natto, broken bean natto and okara natto are 10^8 cells/100g, 24 hours; 10^4 cells/100g, 15 hours; 10^8 cells/100g, 24 hours, respectively.

Keyword: Black soybean, Okara, Natto, Fibrinolytic activity, nattokinase, antioxidative activity

二. 緣由與目的

納豆在日本是一種具有悠久歷史的傳統發酵食品，是經枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 發酵而成的食品，以特殊的香味與拉絲為其主要特徵，其在民間自古即被認為具有多項療效⁽¹⁾。Esaki 等⁽²⁾與 Hattori 等⁽³⁾發現，納豆中含有抗氧化物質，且此抗氧化物質有強力避免生物體內過氧化物推積及防止細胞受損之功效。Yokota 等⁽⁴⁾亦發現納豆抗氧化物質之區分物可降低實驗兔子的動脈硬化情形。納豆除具有許多已為人所熟知之生理功能性，最近 Sumi⁽⁵⁾及 Sumi⁽¹⁾⁽⁵⁾發現大豆含有大量蛋白酶，可水解血纖維蛋白，稱為納豆激酶(nattokinase)。納豆激酶之效果與尿

激酶(ureokinase)相似，但尿激酶太昂貴，而納豆可大量生產，長期服用具安全性，長期食用納豆具有防止血栓效果。納豆粗萃取之納豆激酶口服食用，可在血漿中長時間促進血纖維蛋白水解活性⁽⁵⁾。納豆為一製備口服血栓治療酵素之極佳天然食品。

納豆之製作一般包括浸泡、蒸/煮、接種及發酵^{(6) (7) (8)}。納豆之品質和浸泡、蒸、煮、發酵及大豆品種有關^{(8) (9)}。Miyamura 等人⁽¹⁰⁾以 *Bacillus subtilis* 發酵黃豆豆渣，結果發現蛋白酶活性及血纖維蛋白水解活性隨著發酵時間之不同而不同，在 25~30 小時發酵結果，豆渣納豆以上二種活性都比納豆高出 2.5 倍之多。豆渣水分含量、接種菌數以及發酵溫度均會影響血纖維蛋白水解活性。

黑豆為大豆之一種，大豆之栽培品種之種皮多為黃色，故通稱黃豆，而黑豆之種皮為黑色，種仁則可分為黃色及青色。青仁黑豆的總抗氧化力>黃仁黑豆>黃豆⁽¹¹⁾⁽¹²⁾，同時黑豆對於抑制 LDL 的氧化敏感性顯著高於黃豆^{(11) (13)}。尤其是台南三號(青仁黑豆)水相及有機相萃取物可顯著抑制健康人和動脈粥狀硬化病人 LDL 之 MDA 生成量。

本研究中，以生理活性優於黃豆之省產青仁黑豆為原料，利用反應曲面法 (RSM) 探討最適全豆納豆、碎納豆、及豆渣納豆發酵之接種菌量及發酵時間的組合，並使用中心旋轉組合設計 (Central composite rotatable design, CCRD) 加以實驗。全豆納豆使用之接種菌量 ($X_1, 10^4 \sim 10^8$ cells/100g)，發酵時間 ($X_2, 15 \sim 35$ 小時)；碎納豆使用接種菌量 ($X_1, 10^1 \sim 10^5$ cells/100g)，發酵時間 ($X_2, 6 \sim 18$ 小時)；豆渣納豆使用之接種菌量 ($X_1, 10^4 \sim 10^8$ cells/100g)，發酵時間 ($X_2, 6 \sim 36$ 小時)。

所得結果經由統計分析後，畫出等高線圖。全豆納豆及碎納豆所測之應變數包括溶血活性 (Y1)，DPPH 清除自由基能力 (Y2) 及硬度 (Y3)。豆渣納豆所測之應變數為溶血活性 (Y1)。藉由重疊各等高線圖之方式，以得到最適黑豆納豆製品發酵條件。

浸泡為使大豆組織軟化，以使其易蒸、煮，充分吸水有其必要性。黑豆經 30，16 小時浸泡可充分吸水，其重量增為浸漬前 2.1~2.3 倍。根據郭⁽¹⁴⁾，黑豆經殺菌釜 121，110 分鐘之蒸、煮，可得最適納豆製品，故本研究採用殺菌釜 110 分鐘之蒸、煮時間。發酵溫度經納豆菌之生長曲線試驗，以在 95 % RH，40~50 之生長情形最佳，故選擇 45 為發酵溫度。蒸、煮過的黑豆於 80 接種後，迅速降溫至 45，並置於 45，95 % RH 培養箱中培養。發酵完的納豆在 4 冰箱中經 24 小時的熟成。

碎納豆是以果汁機破裂成 1/4~1/2 大小碎粒，為免破碎過程中黑豆變為泥狀，故蒸、煮時間不宜太長，經 30、40、50 分鐘之蒸、煮試驗結果，以 40 分鐘蒸、煮較適宜。豆渣納豆是以磨漿機加八倍水磨漿後取其豆渣部份，豆渣水分含量約為 80 %，根據 Miyamuro 等⁽¹⁰⁾，豆渣採 121，20 分鐘之蒸、煮時間。

本研究之目的在探討製造高血纖維蛋白水解活性及高抗氧化力之黑豆全豆及碎豆納豆之最適條件，並利用副產物豆渣來發酵以得到高血纖維蛋白水解活性之豆渣納豆，此產品可進一步分離出納豆激酶供製作成保健食品。

三. 結果與討論

(一) 全豆納豆

以反應曲面法 (RSM) 探討最適製

造全豆納豆之接種菌量及發酵時間的組合，結果如表 1 所示。將表 1 結果經變方分析後，所得結果如表 2 所示。藉由統計所獲得之迴歸係數，歸納成如下之迴歸方程式：

$$\begin{aligned} Y1(\text{溶血活性}) &= 49.56+8.16X_2-5.30X_2^2 \\ Y2(\text{清除 DPPH 自由基能力}) \\ &= 47.01+5.23X_1+7.18X_2 \\ Y3(\text{硬度}) &= 811.46-164.63X_2 \\ &\quad -183.40X_1X_2 \end{aligned}$$

藉由上述方程式了解影響產品品質因素之最主要加工變數為發酵時間。再由以上迴歸方程式歸納出黑豆納豆之最適加工條件為接種菌量 10^8 cells/100g、發酵時間 25 小時為最佳。

由實驗結果看出不論接種何種菌數，溶血活性均隨著發酵時間的增加而增加，但接種菌數為 10^4 及 10^8 cells/100g，發酵時間至 25 小時之後及接種菌數為 $10^5\sim 10^7$ cells/100g，發酵時間至 30 小時之後，則呈下降趨勢，當接種菌數為 10^8 cells/100g，發酵時間 25 小時時溶血活性即溶血面積達最大值。清除 DPPH 自由基能力隨接種菌數愈多而愈強，發酵時間為 30 小時為最強 硬度值於接種菌數較低時，隨發酵時間的增加而增加，接種菌數較高時則呈相反結果。當接種菌數， 10^7 cells/100g，發酵時間 20 小時時最接近市售納豆之硬度。

(二) 碎豆納豆

以反應曲面法 (RSM) 探討最適製造碎豆納豆之接種菌量及發酵時間的組合，結果如表 3 所示。將表 3 結果經變方分析後，所得結果如表 4 所示。藉由統計所獲得之迴歸係數，歸納成如下之迴歸方程式：

$$\begin{aligned} Y1(\text{溶血活性}) &= 52.81+18.68X_1 \\ &\quad +27.24X_2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y2(\text{清除 DPPH 自由基能力}) \\ &= 44.13+3.75X_1-2.01X_1^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y3(\text{硬度}) &= 2263.84-939.41X_2 \\ &\quad +354.26X_2^2 \end{aligned}$$

藉由上述方程式了解影響產品品質因素之最主要加工變數為接種菌數及發酵時間。再由以上迴歸方程式歸納出碎豆納豆之最適加工條件為接種菌量 10^4 cells/100g 發酵時間 15 小時為最佳 當接種菌數 $10^2\sim 10^4$ 時，發酵時間至 9 小時，接種菌數 10^1 cells/100g 時，發酵時間至 12 小時，仍無溶血活性之出現，之後則隨著發酵時間的增加而增加。清除 DPPH 自由基能力隨著接種菌數的增加而增加，隨著發酵時間的增加而先增加，至 15 小時之後則下降。碎納豆之硬度隨著發酵時間之增加而降低，其中以接種 10^2 cells/100g，發酵時間 15 小時達最低硬度，與市售碎納豆之硬度最接近。

碎納豆由於發酵面積較大且營養物質較快被微生物利用，故產生最大溶血活性時間比全豆納豆減少約一半的時間，且溶血活性高出約一倍。

(三) 豆渣納豆

以反應曲面法 (RSM) 探討最適製造豆渣納豆之接種菌量及發酵時間的組合，結果如表 5 所示。將表 5 結果經變方分析後，所得結果如表 6 所示。藉由統計所獲得之迴歸係數，歸納成如下之迴歸方程式：

$$\begin{aligned} Y1(\text{溶血活性}) &= 23.82+5.38X_1+5.41X_2 \\ \text{藉由上述方程式了解影響產品品質因素之加工變數為接種菌數及發酵時間。再由以上迴歸方程式歸納出豆渣納豆之最適加工條件為接種菌量 } &10^8\text{cells/100g、} \\ \text{發酵時間 } &24 \text{ 小時為最佳。} \end{aligned}$$

當接種菌數太低(10^4 cells/100g)當發酵時間至 18 小時時仍無溶血活性之出現，當發酵時間僅達 6 小時時，不論接種何種菌數，均無法出現溶血活性，之後溶血活性隨著接種菌數及發酵時間之增加而增加，在 24 小時時達最大值，之後則下降。

豆渣發酵時並不會有全豆及碎豆發酵時黏性物質的產生，此結果應是豆渣中所含用以形成黏性物質之蔗糖及大豆寡糖溶於黑豆磨漿時所添加的水中所致。

四. 計劃成果自評

根據本實驗成果可得知黑豆全豆、碎豆及豆渣之最適加工條件，並可得知高血纖維蛋白水解活性，抗氧化力及硬度之變化。碎豆納豆所需發酵時間比全豆納豆短，且在全一半發酵時間時即可產生全豆納豆 2 倍之溶血活性，有關此部份尚未見到任何相關研究，故可供他人之參考。而豆渣納豆在和全豆納豆相同之發酵時間時所產生之溶血活性卻只有全納豆之一半，此部份和前人研究不太吻合，值得進一步探討。本研究之結果可供以黑豆製做不同納豆保健製品之參考，並可增加黑豆加工時廢棄物-豆渣之有效利用。

五. 參考文獻

1. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43:1110-1111.

2. Esaki, H., Onozaki H., Kawakishi S. and Osawa, T. 1996. New antioxidant isolated from tempeh. *J. Agric. Food Chem.* 44:696-700.
3. Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watanabe, K. 1995. Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*. *Lebensm. -Wiss. u.-Technol.* 28:135-138.
4. Yokota, T., Hattori, T., Ohishi, H., Hasegawa, K. and Watanabe, K. 1996. The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Leb. -Wiss. -und -Tech.* 29:751-755.
5. Sumi, H. 1990. Nattokinase. Properties and recent application for healthy food. *Bio. Ind.* 7:724-730.
6. Steinkraus, K. H. Ed. 1983. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods Section 5 in *Handbook of Indigenous Fermented Foods Microbiology series*. Vol 9 New York:Marcel Dekker Inc. pp.530-547.
7. Ohta, T. 1986. Natto. In *Legume-based fermented foods*, eds Reddy, N.R., Pierson, M. D. and Salunkhe, D. K. pp. 85-93. Boca Raton, FA:CRC Press.
8. Maruo, B., Yoshikawa, H. Ed. 1989. Industrial application of *B. subtilis*. Ch8 in *Topics in Secondary Metabolism I Bacillus subtilis: Molecular Biology and Industrial Application* B. Maruo

and H., Yoshkawa, Ed. New York:Elsevier Science Publishing Co. Inc. pp.143-161.

9. Sakurai, Y. 1960. Report of the research on the production of high protein food from fermented soybean products. Food Res. Inst. Ministry of Agric. And Forestry Fukagawn P O Tokyo Japan.
10. Miyamura, H., Takenaka, Y. and Takenaka, T. 1998. Fibrinolytic activity of okara fermented by *Bacillus subtilis*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 45:100-107.
11. 戴文禎。1997。黑豆萃取物之抗氧化效用。私立中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
12. 郭士榮。1998。黑豆豆腐及豆漿加工中抗氧化力與異黃酮之改變。私立中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
13. 戴文禎、胡雪萍、趙璧玉。1996。黑豆的抗氧化物質含量。中華民國營養學會雜誌 21:216。
14. 郭淑姿。2003。黑豆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。

表1. 全豆納豆旋轉式中心組合設計反應曲面法之實驗設計與各應變數值

Variable		Response		
		Scavenging effect of		
		Fibrinolytic activity	DPPH free radical	Hardness
X1	X2	(mm ²)	(%)	(g)
1	1	52.79	59.57	618.24
1	-1	40.12	42.59	1314.3
-1	1	49.55	46.49	801.5
-1	-1	29.59	34.76	763.97
2	0	51.44	57.62	1172.91
-2	0	37.68	36.72	805.84
0	2	44.69	56.59	556.46
0	-2	12.05	27.87	1214.99
0	0	49.56	47.01	811.46
0	0	49.56	47.01	811.46
0	0	49.56	47.01	811.46
0	0	49.56	47.01	811.46
0	0	49.56	47.01	811.46
0	0	49.56	47.01	811.46

X1 : Inoculated bacteria populations (cells/100g)

X2 : Fermentation time (hr)

表2. 全豆納豆加工自變數對應變數模式之變方分析

Source	Degree of freedom	Sum of Square		
		Fibrinolytic activity	Scavenging effect of DPPH free radical	Hardness
Model	5	1598.95 (3.98*)	989.65 (4.46*)	607055 (6.12*)
Linear	2	940.94 (5.85*)	946.41 (10.67**)	426303 (10.75**)
Quadratic	2	644.73 (4.04)	36.35 (0.41)	46209 (1.17)
Cross product	1	13.29 (0.17)	6.89 (0.16)	134542 (6.79*)
Total error	7	562.5	310.56	138797
Lack of fit	3	397.85 (3.22)	272.46 (9.54*)	95830 (2.97)
Pure error	4	164.66	38.10	42967
R square		0.74	0.76	0.81

**p<0.001 *p<0.05

表3. 碎納豆旋轉式中心組合設計反應曲面法之實驗設計與各應變數值

Variable		Response		
		Scavenging effect of		
		Fibrinolytic activity	DPPH free radical	Hardness
X1	X2	(mm ²)	(%)	(g)
1	1	111.65	44.94	1623.55
1	-1	14.55	51.72	3175.32
-1	1	31.65	38.73	1441.05
-1	-1	19.81	30.86	3646.95
2	0	71.21	40.14	1533.75
-2	0	-3.52	31.20	1822.88
0	2	92.66	40.55	1802.05
0	-2	-16.29	35.90	5559.71
0	0	52.81	39.86	2263.83
0	0	52.81	45.92	2263.83
0	0	52.81	43.28	2263.83
0	0	52.81	42.35	2263.83
0	0	52.81	47.63	2263.83

X1 : Inoculated bacteria populations (cells/100g)

X2 : Fermentation time (hr)

表4. 碎豆納豆加工自變數對應變數模式之變方分析

Source	Degree of freedom	Sum of Square		
		Fibrinolytic activity	Scavenging effect of DPPH free radical	Hardness
Model	5	15556 (8.85*)	340.06 (4.87*)	15155564 (7.35*)
Linear	2	13091 (18.61*)	177.37 (6.35*)	10652708 (12.91**)
Quadratic	2	648.26 (0.92)	109.04 (3.90)	4395885 (5.33*)
Cross product	1	1817.32 (5.17)	53.66 (3.84)	106971 (0.26*)
Total error	7	3461.92	97.83	2887635
Lack of fit	3	1481.74 (2.02)	60.77 (2.19)	584916 (0.34)
Pure error	4	980.18	37.06	2302719
R square		0.86	0.78	0.84

* *p < 0.001 *p < 0.05

表6. 豆渣納豆加工自變數對應變數模式之變方分析

Source	Degree of freedom	Sum of Square
		Fibrinolytic activity
Model	5	898.94 (4.43*)
Linear	2	699.2 (8.62*)
Quadratic	2	198.35 (2.44)
Cross product	1	1.39 (0.03)
Total error	7	283.92
Lack of fit	3	217.62 (4.38)
Pure error	4	66.31
R square		0.76

* p < 0.05

表5. 豆渣納豆旋轉式中心組合設計反應曲面法之實驗設計與各應變數值

Variable		Response
X1	X2	Fibrinolytic activity (mm ²)
1	1	30.77
1	- 1	18.76
- 1	1	18.83
- 1	- 1	9.18
2	0	28.08
- 2	0	6.56
0	2	23.40
0	- 2	1.74
0	0	23.82
0	0	23.82
0	0	23.82
0	0	23.82
0	0	23.82

X1 : Inoculated bacteria populations (cells/100g)

X2 : Fermentation time (hr)