

纳豆

段智变 著

抗氧化

降血脂

抗血栓



中国农业科学技术出版社

前 言

【P】 123 123 123 123 123 123 123 123 123 123

心脑血管疾病严重危害中老年人健康，栓塞性疾病日渐成为死亡率占首位的病症。流行病学、血液流变学及组织病理学等临床研究表明，栓塞性疾病突发死亡率高，但其病理形成过程是早期的、漫长的，其中主要与高胆固醇血、高甘油三酯血、血液黏稠度增高、血管内皮受损以及血小板功能异常等多种因素有关。

目前，国内外临床应用的溶血栓药物主要有尿激酶（Urokinase, UK）、链激酶（Streptokinase, SK）和组织型纤溶酶原激活剂（tissue-type plasminogen activator, t-PA）等，但由于它们在一定程度上存在副作用较大、在体内半衰期较短等缺陷，所以开发研制这方面的保健食品与治疗药物具有深远的意义。

纳豆（Natto）是由纳豆杆菌（*Bacillus subtilis natto*）发酵而成的日本传统豆制品，距今已有 2000 年以上的食用历史，其含有的钙、磷、钠、钾等矿物质和维生素 E、维生素 K 与维生素 B 等多种维生素以及纤维素、碳水化合物、亚油酸、卵磷脂、异黄酮、皂甙、纳豆激酶和水溶性蛋白质等生物活性物质，具有抗氧化、降血压、溶血栓、降血压、保持心血

② 纳 豆

管健康、抗肿瘤、防止骨质疏松、调整肠道助消化、提高免疫力、预防感冒、壮体强身、延缓衰老和解酒等多种功能。

纳豆激酶 (*Nattokinase*) 是由纳豆杆菌在发酵大豆的过程中分泌到细胞外的、存在于纳豆黏性物质中, 具有纤溶作用和类似枯草杆菌蛋白酶的单链多肽丝氨酸蛋白酶。研究表明, 纳豆激酶可溶解纤维蛋白平板, 溶解血凝快, 对纤溶酶的作用底物 H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251) 有特异性。血栓模型动物口服或静脉注射纳豆激酶后, 纤溶酶原激活系统 (tissue-type plasminogen activator, t-PA 等) 活性增强, 纤溶系统功能增强, 表现为优球蛋白溶解时间 (Euglobulinlysis time, ELT) 缩短、优球蛋白溶解活性 (Euglobulinlysis activity, ELA) 增高及纤维蛋白降解产物 (Fibrin (ogen) degradation products, FDP) 含量增高等, 表现了明显的溶栓作用。自从 1987 年发现了纳豆激酶后, 各国学者从不同角度对纳豆激酶进行了广泛研究, 优化了发酵生产条件, 分离纯化了纳豆激酶, 并对其理化性质、分子生物学特性、结构与功能特性、药理作用等进行了深入研究。跟传统的溶栓药物相比较, 来源于纳豆杆菌产的纳豆激酶具有许多优点: 可通过食品发酵得到, 安全可靠; 对纤维蛋白的特异性强, 溶栓效率高; 半衰期长、药效时间长; 分子量小, 粗酶液在 pH 值为 3.0 下仍有一定活性, 可通过消化道吸收; 可通过液体发酵获得, 生产成本较低。

大豆是我国重要的经济作物之一, 含有大豆异黄酮、大

豆皂甙、大豆低聚糖、大豆磷脂、大豆植酸和大豆多肽化合物等多种生物活性物质而具有抗氧化、降血脂、抗血栓、防治动脉粥样硬化等多种生物功效；而以大豆为载体的发酵制品，通过微生物的发酵赋予豆制品新的、更强的生物活性功能。近年来，大豆深加工产品正渗透于食品、保健、医药等众多领域，因此，在我国开发以大豆为载体的纳豆与纳豆激酶具有丰富的物质基础，将纳豆与纳豆激酶开发成为防治心脑血管疾病的保健食品与口服型溶栓药物具有重要意义。

我国关于纳豆和纳豆激酶的研究始于 20 世纪 90 年代，但是，至今国内还没有关于纳豆和纳豆激酶系统性研究的书籍出版。

本人多年从事纳豆的抗氧化、降血脂、抗血栓功能及其机理研究，尤其是对纳豆激酶的溶栓作用及其肠道吸收机制做了系统研究。在本书的出版过程中，作者将近年来关于纳豆和纳豆激酶的科研成果进行了融合和整理，并对纳豆和纳豆激酶的研究现状进行了概述，对纳豆中的各种营养素和生物活性物质及其功能进行了总结，对纳豆激酶溶血栓作用和机理进行了详细阐述和总结，同时还介绍了纳豆和纳豆激酶的开发应用前景，是一本关于纳豆和纳豆激酶研究的系统性图书。

本书适合于生物学、畜牧学、兽医学、功能性食品科学、医学领域的研究生、科研人员和其他科学爱好者阅读。

作 者

2009 年 5 月

第一章 纳豆及其功能

第一节 纳豆制作工艺	(3)
一、纳豆制作工艺	(3)
二、纳豆制作工艺研究现状	(6)
第二节 纳豆杆菌	(7)
一、纳豆杆菌分类地位及特点	(7)
二、纳豆杆菌基本特性	(9)
三、纳豆杆菌与纳豆激酶活性	(10)
第三节 纳豆生理功能	(14)
一、消化系统保健功能	(14)
二、抗突变、抗癌	(15)
三、抗氧化	(16)
四、调节血脂	(21)
五、降血压	(31)
六、溶血栓	(31)
七、防止骨质疏松症	(32)

② 纳 豆

第二章 纳豆营养素

- 一、纳豆中的部分氨基酸及营养素组成 (36)
- 二、纳豆蛋白质含量测定 (38)

第三章 纳豆生物活性物质

- 第一节 纳豆杆菌** (42)
 - 一、整肠功能 (42)
 - 二、抗菌作用 (44)
 - 三、增强营养代谢，提高生产性能 (46)
 - 四、增强免疫功能 (47)
 - 五、其他 (48)
- 第二节 纳豆异黄酮** (49)
 - 一、概述 (49)
 - 二、含量测定 (50)
 - 三、生理功能 (52)
- 第三节 纳豆激酶** (56)
 - 一、纳豆激酶的体外溶栓作用 (57)
 - 二、纳豆激酶的体内溶栓作用 (57)
 - 三、健康人口服纳豆激酶的纤溶活性 (58)

第四节 纳豆卵磷脂	(59)
一、卵磷脂营养保健功能	(59)
二、纳豆脂肪酸含量	(62)
第五节 纳豆皂甙和低聚糖	(64)
一、纳豆皂甙	(65)
二、纳豆低聚糖	(71)
第六节 超氧化物歧化酶	(75)
第七节 纳豆黏性物质	(76)

第四章 纳豆激酶分离纯化及酶学特性

第一节 概述	(80)
第二节 分离纯化	(81)
一、分离纯化步骤	(81)
二、纯度鉴定	(83)
三、新型纯化方法	(83)
第三节 纳豆激酶的结构	(87)
一、基因结构	(87)
二、蛋白质结构	(88)
第四节 纳豆激酶理化性质	(90)
一、稳定性	(90)
二、分子量	(91)
三、等电点	(92)

4 纳 豆

四、特异性底物	(92)
五、影响纳豆激酶活性的因素	(93)
第五节 纳豆激酶活性测定方法	(94)
一、纤维蛋白平板法	(94)
二、纤维蛋白凝块溶解时间法	(95)
三、四肽底物法	(95)
四、三明治式酶联免疫吸附法 (ELISA)	(96)
五、其他方法	(96)

第五章 纳豆激酶溶栓功能及其机理

第一节 血栓性疾病及其防治研究	(100)
一、血栓的形成	(100)
二、血栓性疾病的防治	(103)
第二节 纳豆激酶体外溶栓功能	(111)
纳豆激酶粗制液对血凝块的溶解作用	(112)
第三节 纳豆激酶对栓塞模型动物的溶栓作用	
机理	(117)
一、血栓动物模型制作	(118)
二、纳豆激酶对脏器组织中血栓的影响	(119)
三、纳豆激酶对凝血系统的影响	(119)
四、纳豆激酶对纤溶系统的影响	(121)
五、纳豆激酶在血浆中的吸收	(125)

第四节 兔抗纳豆激酶血清的制备	(128)
一、动物免疫及抗血清制备	(129)
二、抗血清效价测定	(130)
第五节 兔小肠吸收纳豆激酶定位分布	(131)
第六节 纳豆激酶临床溶栓功能	(139)

第六章 纳豆与纳豆激酶的开发应用

第一节 纳豆开发应用	(142)
一、食品加工开发应用	(142)
二、农业生产开发应用	(144)
三、医疗保健开发应用	(145)
四、环境保护开发应用	(146)
第二节 纳豆激酶的开发应用	(147)

附录

附录1 纳豆激酶氨基酸序列	(150)
附录2 纳豆激酶核苷酸序列	(151)
参考文献	(154)



第一章

纳豆及其功能

② 纳 豆

发酵食品和调味品是亚洲与非洲饮食主要的组成部分 (Beaumont M. , 2002)。枯草杆菌是发酵豆制品的主要菌株之一, 它可将大豆高分子物质降解成水溶性低分子量化合物, 易于人体吸收, 此类产品包括纳豆 (Japanese natto, 日本)、Chungkook-jang (Korea, 大韩民国)、Soubbala (African, 非洲)、Dawadawa (African, 非洲) 和 Thua-nao (Thai, 泰国) [Kiers J. L. , 2000; Steinkraus K. H. , 1994]。

纳豆是日本传统发酵大豆制品之一, 起源于日本江户时代 (渡边笃二, 昭和 46 年, M), 在日本已有 2000 年以上的食用历史, 它不仅有丰富的营养价值, 而且含有多种医学保健功能, 是一种百姓非常喜爱的民间传统药、食两用大豆制品 (李麒, 2002)。纳豆富含钙、磷、钠、钾等矿物质和维生素 E、维生素 K、维生素 B 等多种维生素以及纤维素、碳水化合物、亚油酸、卵磷脂、异黄酮、皂甙、纳豆激酶、水溶性蛋白质等生物活性物质。

纳豆具有抗氧化、降血压、溶血栓、降血脂、保持心血管健康、抗肿瘤、防止骨质疏松、调整肠道助消化、提高免疫力、预防感冒、壮体强身、延缓衰老以及解酒等多种功能。

第一节

纳豆制作工艺

纳豆是日本居民饮食的重要组成部分之一，据不完全统计，有 90% 的日本人在食用纳豆。除工业化生产外，很多家庭还自制纳豆。新鲜的纳豆色泽金黄、口感酥软，用筷子挑起有很长很长的拉丝样黏液物质。

一、纳豆制作工艺流程

纳豆是由纳豆杆菌（*Bacillus natto*）发酵大豆制成的，其发酵生产工艺过程如下（中野政弘，昭和 42 年，M）：精选颗粒饱满、蛋白质含量高的新鲜小粒大豆→流水浸泡 14h→泡胀大豆，蒸煮→冷却，接种→发酵成熟→4℃、24h 再成熟→成熟的纳豆具有豆香气味，表面具有苍白色、乳白色、有丰富的黏质物质（图 1-1、图 1-2、图 1-3 和图 1-4）→冰箱或冷库保藏。

在发酵过程中，充分利用了微生物所分泌的多种酶，其中最主要的是蛋白酶和淀粉酶。在蛋白酶的作用下，分子较大的蛋白质逐步降解成胨、肽、多肽和氨基酸。内肽酶切断

4 纳 豆

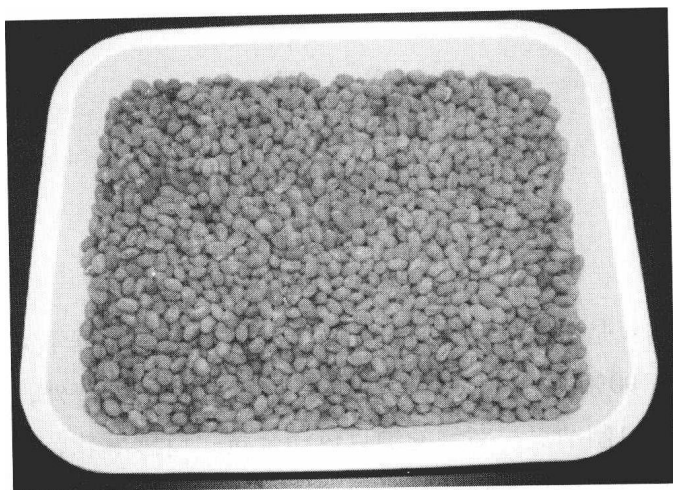


图 1 - 1 成熟纳豆

Figure 1 - 1 Ripe natto

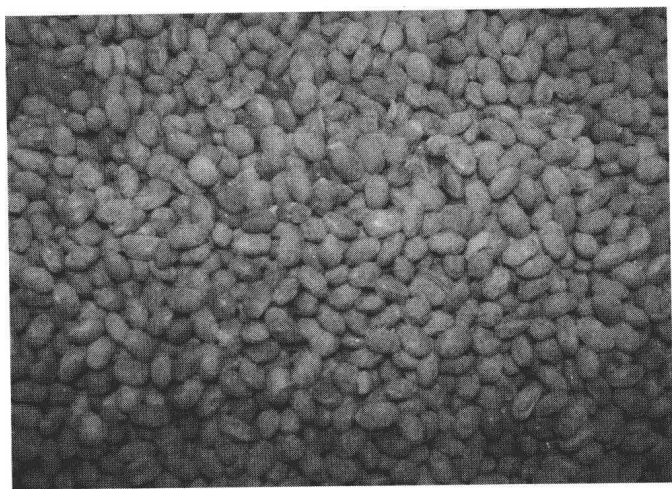


图 1 - 2 成熟纳豆表面

Figure 1 - 2 Surface of natto

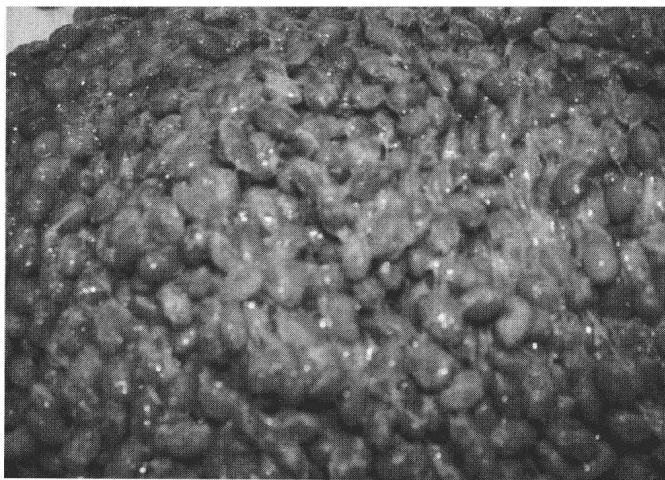


图 1-3 搅拌后的纳豆

Figure 1-3 Natto after mixed

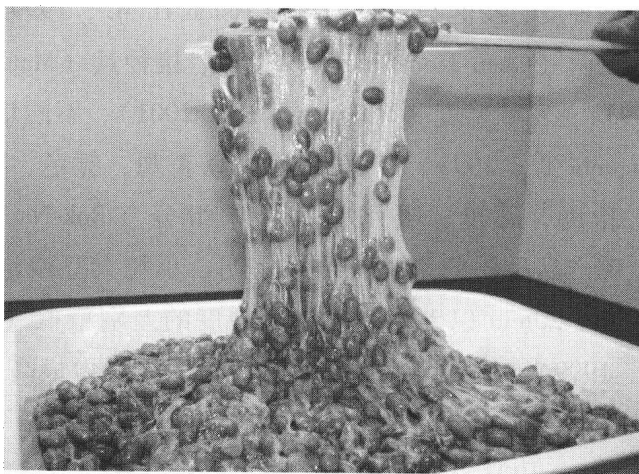


图 1-4 纳豆黏物质

Figure 1-4 Mucosity substance of natto

6 纳 豆

蛋白质大分子肽链内部的肽键，生成分子量较小的肽、肽和多肽等中间产物，从而增加蛋白质的溶解度；而端肽酶则从多肽的游离的羟基末端和氨基末端逐一切断肽键，水解生成氨基酸。淀粉酶则把淀粉分解成糖类，主要是单糖类，除葡萄糖外，还含有果糖和五碳糖等，糖类进入菌体而被消耗，产生热和二氧化碳（李麒，2002）。

二、纳豆制作工艺研究现状

目前，各国学者已对纳豆制造工艺过程从不同角度进行了研究，研究了大豆品质（Geater C. W.，2000）、豆粒大小、有无种皮、浸泡与灭菌时间（Hsieh H. M.，1999）、不同的纳豆菌（Chen-Tien-Chang，2000）、接种量（Matsumoto I.，1993）、发酵温度（Muramatsu K.，2001）、不同培养基（Yamaguchi T.，1993）等条件对纳豆表观、颜色、硬度、调味、黏度、硬度、吸水性、风味组分（Bok-Nan-Kim，1995）等产品品质的影响，结果表明，小粒大豆浸泡至少14h并烹饪20min以上，纳豆产品硬度的差别最低（Hsieh H. M.，1999），42~47℃的范围内纳豆发酵活力最高（Muramatsu K.，2001），产黏性物质的最佳条件为35~45℃（Akimoto T.，1993），平均蛋白质含量为30.4%~34.2%，总氮含量为5.15%~5.92%。蛋氨酸、缬氨酸、异亮氨酸含量低的大豆适于制纳豆（Zarkadas C. G.，1997），且不同基

因型大豆的总糖、游离糖、蜜三糖、水苏四糖、蔗糖、蛋白质、油、纤维等种质特征与纳豆品质显著相关 (Geater C. W., 2000), 这些研究为纳豆生产企业提供了选择标准。

第二节

纳豆杆菌

纳豆杆菌 (*Bacillus subtilis natto*) 在发酵大豆的过程中, 可生产出许多营养因子和功能因子, 可用于保健药品生产、防腐剂、调味品、微生态制剂以及畜牧业中, 是美国 FDA 公布的 40 种益生菌之一。国内外学者对纳豆杆菌进行了全面而深入系统的研究, 以下主要从纳豆杆菌的分类地位和特点、纳豆杆菌的基本特性及菌株对其活性因子的影响等方面进行了阐述。

一、纳豆杆菌分类地位及特点

纳豆杆菌的发现与研究迄今已百年之久, 关于纳豆杆菌分类一直存在不同观点。1905 年, 日本沢村从产黏稠物质的纳豆中分离、鉴定并命名了纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto sawamuta*), 后来研究发现纳豆杆菌属于枯草芽孢杆菌属,

⑧ 纳 豆

为需氧型革兰氏阳性菌。自从 1934 年北海道大学农学部半询教授首次成功地将分离的纯种纳豆杆菌（*Bacillus natto* No. 1）使用于纳豆的工业化生产后，至今已知与纳豆生产相关的主要菌种有：*Bacillus subtilis* IFO 3007、*Bacillus natto* Sawamura 06、*Bacillus natto* Sawamura IFO 3339 等。1984 年纳豆杆菌作为一个新的菌种正式命名为 *Bacillus Natto* Sawamura，后来通过比较纳豆杆菌和枯草杆菌的 DNA 碱基组成和排列，发现两者间发生了形质转换和形质导入，采用 DNA 杂交法也发现两者的同源性非常高，而且生理生化等性质也很相似，所以在 Bergel's manual of Determinative Bacterology 第 6 版中将其分类地位归在枯草杆菌中（RE 布坎南，1986，M），但因为纳豆杆菌对生物素有专一的需求性，用纳豆杆菌以外的枯草杆菌发酵大豆时，不产生纳豆特有的黏性物质，所以习惯上仍称之为纳豆杆菌。目前，对枯草杆菌与纳豆菌质粒的特性研究可为纳豆杆菌的进化提供线索，且纳豆菌是无人体寄生性的高度安全的菌类，因此，人们对利用枯草杆菌的有益宿主载体的开发寄予厚望。

纳豆杆菌的特点：①纳豆杆菌具有枯草芽孢属的重要特点，能够分泌各种胞外酶，包括蛋白酶、淀粉酶、谷氨酸转氨酶、脂肪酶、果聚糖蔗糖酶和植酸酶，但比其他枯草芽孢杆菌分泌同样活性的酶的能力高几十倍。②纳豆杆菌具有芽孢，芽孢结构多层且致密，各种理化因子不易透入；芽孢含水量少，蛋白质受热不易变形；芽孢内还含有一类特殊的酸