

纳豆芽孢杆菌的相关研究进展

吉美萍, 肖志婷, 那 日, 郭九峰, 庞艳波, 付丽丽

(内蒙古大学 物理科学与技术学院; 内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘 要:纳豆芽孢杆菌是一种好氧型革兰氏阳性益生菌,具有较强的热、酸碱稳定性,进入肠道后迅速发育成营养性细胞,抑制肠杆菌、肠球菌、致病菌等的生殖,促进双歧杆菌、乳酸杆菌和梭菌等厌氧菌的生长,调节微生态平衡,代谢分泌出多种促进营养物质消化吸收的酶类,强化消化机能,同时刺激机体内的免疫系统产生干扰素等抗菌物质和高强溶栓功效的纳豆激酶,增强动物细胞免疫功能.纳豆芽孢杆菌可作为天然防腐剂、微生态制剂、饲料添加剂、酶活性增强剂、免疫增强剂,提高食品的保藏期、动物的日增重和产奶率,运用到水体中可起到净化水质、改良底质等的作用.本文对纳豆芽孢杆菌的菌落结构、生长曲线、发酵产物及其功能应用进行综述,为充分发挥纳豆芽孢杆菌的功能,生产新型绿色国民生活所需品,降低生产成本提供理论支撑.

关键词:纳豆芽孢杆菌;纳豆激酶;微生态制剂; γ -PGA

中图分类号:Q819

文献标志码:A

纳豆芽孢杆菌是经纳豆发酵后筛选出的一种益生菌.纳豆芽孢杆菌不仅可分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质,也可使发酵产物中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体消化吸收的成分,自身代谢还能分泌出多种消化酶和维生素,从而促进小肠黏膜细胞的增殖,保证正常的肠道功能.纳豆芽孢杆菌多用于医药和食品中,近几年也将其制成微生态制剂和饲料添加剂,但我国对纳豆菌功能特性的探究基本上仍处于实验室小规模研究阶段,本文结合本实验小组对纳豆芽孢杆菌的诱变处理和发酵产物对纳豆芽孢杆菌的结构、功能和应用进行综述,为我国充分利用该菌株来生产制造国民生活所需品、降低生产成本提供理论依据,同时也为我国实现大规模工业化大生产提供理论支撑.

1 纳豆芽孢杆菌的基本概况

1.1 纳豆芽孢杆菌的结构特点

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)简称纳豆菌,属细菌科、芽孢杆菌属,是枯草芽孢杆菌的一个亚种,我国秦汉年间已有应用,民间传统的做法是将煮熟的大豆用稻草包起来,在40℃的温度下发酵而成的一种食品.其大小通常为(0.7~0.8) μm ×(2.0~3.0) μm ,嗜氧型革兰氏阳性,即先用龙胆紫将所有菌株都染成紫色,并用碘液涂加强龙胆紫染料与菌体的结合,接着用95%的酒精脱色,时间大约进行20~30s,这时菌株脱色完全变成无色,最后用沙黄或潘红复染,时间1min,这说明纳豆芽孢杆菌是革兰氏阳性菌^[1].芽孢呈椭圆形或柱状,中生或偏中生,即使孢囊膨大,也不显著,有鞭毛,能运动,其菌落形态如图1所示.

纳豆菌生长的最高温度为45~55℃,最低为5~20℃,最适生长温度37℃;pH 7.0~7.5,最适生长pH 7.3.孢子耐热性强,可在肠道内萌发.1990年Moir等^[2]报道了肠道内营养丰富环境是促使芽孢萌发的原因之一.2001年Hoa等^[1]研究结果表明给试验鼠饲喂纳豆芽孢杆菌后,其粪便的芽孢量远超过了接种量,但实际上芽孢并不可能穿透粘膜表面而散播,这只能是由于芽孢在肠道内萌发了.本实验组采用*Bacillus*

收稿日期:2016-05-20;修回日期:2016-08-01.

基金项目:国家自然科学基金(51267014)

第1作者简介:吉美萍(1990—),女,山西大同人,内蒙古大学在读硕士研究生,研究方向为环境生物物理学,E-mail:1107438174@qq.com

通信作者:那 日,教授,硕士生导师,研究方向为环境生物物理、电场和离子束生物效应,E-mail:nari6363@sina.com.

natto20646 作为出发菌株,对其进行高压电晕电场诱变处理,可获得高产 γ -聚谷氨酸的优良性状的菌株,并对其进行相关生物学分析,均表现出很强的稳定性.

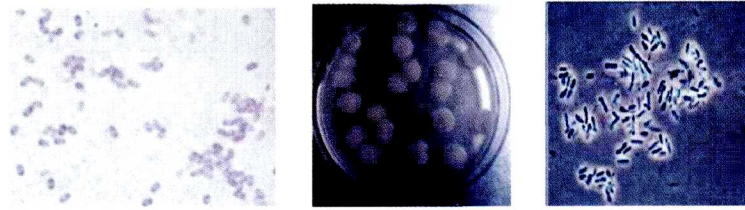


图1 纳豆芽孢杆菌的菌落结构

1.2 纳豆芽孢杆菌的特性

纳豆菌的抵抗力较强,其芽孢具有耐酸、耐碱、耐高温(100℃)、耐挤压的高度稳定性,易与保存,实验室可在-70℃的冰箱中长久保存,在胃酸4h后的存活率为100%。黄占旺等^[4]分别探究了温度的高低、pH值的大小、培养时间的长短、通气量和接种量的多少、盐的不同浓度对纳豆菌生长的影响,结果显示实验菌株在温度30~45℃、pH值7.0、培养时间24h、500mL三角瓶的装液100mL、接种量2%~5%时,其有利于菌株生长,是该菌株生长的最适条件,且该菌种在盐浓度为8%的培养基中,仍能较好生长,其耐盐性较强。

杨郁等^[5]研究表明,纳豆菌表现出很高的耐酸性,且其耐酸性高于乳酸菌的耐酸性,同时纳豆菌能使发酵液保持相对稳定的pH。

纳豆芽孢杆菌在肠道以最快的速率发育成有益代谢的营养型细胞,使肠道酸化,促进Fe、Ca、维生素D等营养物质的吸收^[6],增强厌氧性菌株的生长发育,且抑制肠道内异常发酵的痢疾等腐败菌,促进有益菌乳酸菌的繁殖,调节肌体肠道内菌群的平衡,预防肠炎、便秘、痢疾等疾病等的发生,增强机体免疫力。本身生长繁殖过程中可产生多种优质活性抗菌物质(如: γ -PGA、 β -糖苷酶、2,6-吡啶二羧酸、杆菌肽、细菌素、干扰素、多粘菌素和类细菌素等)和维生素类物质(如:维生素K₁、K₂、E、B₂、B₆等),同时也能够分泌出高强溶栓功效的单链多肽碱性纤维酶——纳豆激酶,且经摇床发酵可产生一种高分子阴离子聚合物—— γ -聚谷氨酸。

1.2.1 纳豆激酶的简述

纳豆激酶(nattokinase, NK)是纳豆芽孢杆菌自身生殖过程中分泌的一种单链多肽碱性蛋白酶。无二硫键,溶于水,呈白色或淡黄色,在280nm处有吸收峰。根据不同的测定方法,其分子量有明显差异,在27300~35000之间。1987年日本Sumi等^[7]对溶血栓药物进行研究时发现纳豆激酶是一种溶栓功效较强的纤溶酶。随后又在1990年的体内外实验证明了NK可催化血纤维蛋白原转化为有活性的血纤维蛋白原溶酶,使纤维蛋白凝块水解^[8]。1992年Nakamura等^[9]首次采用鸟枪法克隆并测定了菌株NC2-1纳豆激酶的全基因序列,全长1473bp,基因从第181个碱基开始,起始密码子是GTG,之后是长为1473bp的阅读框,这段序列是由前序列、信号序列和成熟序列3部分构成,可编码381个氨基酸序列,其中77个氨基酸构成前肽,29个氨基酸构成N端信号肽,275个氨基酸构成成熟肽,3c末端是3个连续的终止密码子TAA、TAG和TAA,且分子内不存在二硫键,分子量为27.7kD(准确为27728)。位于起始密码子上游17bp处是S-D序列(核糖体结合位点):AAAGGAG。终止密码子后且位于成熟蛋白区域C端下游7bp处可形成茎环结构的一段序列是Q因子非依赖性终止序列,其序列为:TAAAAAGAAGCAGGTTTCCTCCATACCTGCTTCTTTTA。

1995年Fujita等^[10]发现NK也可通过直接溶解交联的血栓,使肌体内外血栓的溶解活性增强。Martin等^[11]对200种可口服的纤溶物质进行了研究,结果发现NK是最具开发潜力和应用前景最好的溶纤蛋白酶。2014年Dabbagh等^[12]发现NK具有治疗老年痴呆症和玻璃体视网膜疾病的奇特功效。吴杰忱等发现NK对预防和治疗骨质疏松和糖尿病发挥着重要作用^[13]。2014年蔡玉华和胥振国^[14]提出了这种纤溶酶是一种碱性丝氨酸蛋白酶。孙军德等发现NK发酵液和纳豆浸提液对人工血栓都有溶解作用,两者对鸡血块的溶解率分别是60%和52%,且NK发酵液对人工血栓的溶解作用比纳豆浸提液的溶解作用强^[15]。

1.2.2 纳豆芽孢杆菌的发酵产物 γ -聚谷氨酸

本实验组将纳豆芽孢杆菌在 37 °C 的摇床中液态发酵 36 h 或 48 h 后,经高速冷冻离心可分离出淡黄色的 γ -聚谷氨酸溶液,添加 4 倍无水乙醇后便可析出。 γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)是由 D-或 L-谷氨酸通过 α -氨基和 γ -羧基通过 γ -酰胺键结合而成的高分子阴离子多肽聚合物。在 γ -PGA 分子侧链含有活性较高的羧基,因此有很好的保湿和吸水特性,易与一些大分子物质形成稳定复合物。 γ -PGA 具备良好的生物相容性、生物可降解性、低免疫原性及无毒无污染性,故被广泛用于药物载体、医药粘合剂、土壤、沙地的蓄水保湿膜、食品的水凝胶、防冻剂、金属絮凝剂以及高强度纤维等合成材料^[16]。Northern 的杂交实验显示 γ -PGA 合成所必要基因是 *ywsC* (*pgsB*)、*ywtA* (*pgsC*) 和 *ywtB* (*pgsA*),它们协同构成了合成 γ -PGA 的一个操纵子^[17]。在纳豆芽孢杆菌体内存在完整的 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA* 基因簇,控制着 γ -PGA 的合成^[18]。本实验小组的新吉乐图^[19]在高压电晕场中处理后 *natto01* 培养 24 h 后菌落褶皱增多,接种时拉丝明显增多,冷冻干燥后产量是原菌株的 1.3 倍,之后以不同计量的 N 离子束注入进行二次诱变,结果显示最佳注入量是 3.9×10^{15} ions \cdot cm⁻² 时,复合诱变的纳豆菌产量提高了 52.62%,且传代 5 次后,诱变菌株发酵生产的 γ -PGA 仍是出发菌的 4 倍,高产性状可稳定遗传。王志永^[20]将纳豆芽孢杆菌在 3 kV, 4 kV 的高压电晕电场中均处理了 15 min 和 30 min,结果发现处理菌株的生物学性状基本不变,且 γ -PGA 的产量较原出发菌株的产量提高了 8.15 倍,经多次传代后,其高产性状几乎保持不变,为实现工业化大生产提供理论支撑。

1.3 纳豆芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌的差异

纳豆芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的一个亚种,钟青萍等^[21]从日本纳豆中筛选出抗菌活性高的纳豆菌,并对其进行了生理生化特性分析,菌种鉴定结果为枯草芽孢杆菌纳豆亚种。2007 年马明等^[22]从纳豆中筛选出纳豆芽孢杆菌,并对比了挑选菌株与枯草芽孢杆菌的形态和生理特征,发现二者在形态和大部分生理生化特征极其相似,其中两者 16S rRNA 序列高度同源,同源程度在 99% 以上。

但两者在生理生化特征方面仍存在差异:(1)生物素是纳豆芽孢杆菌生长所需要(如:VB),而枯草芽孢杆菌则不需要;(2)纳豆菌易受到纳豆菌噬菌体的侵蚀作用,而枯草芽孢杆菌不受噬菌体作用;(3)纳豆菌和枯草菌生长都需氨基酸,但氨基酸的利用率存在差异;(4)纳豆芽孢杆菌可产生纳豆激酶(NK)。(5)纳豆菌分泌的谷氨酸转氨酶(GTP)、脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、果聚糖蔗糖酶等相关酶的活性高十几倍。(6)纳豆菌通过刺激机体内的免疫系统诱发产生干扰素,可有效破坏、杀死癌细胞,对癌症的发生起到抑制作用。(7)纳豆菌在肠道内可通过抑制肠道中肠杆菌(*Enterobacter*)和肠球菌(*Enterococcus*)等嗜氧菌的生长,而促进双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、乳酸杆菌(*Lacticacidbacteria*)和梭菌(*Clostridium*)等厌氧菌的生长,使得肠道中正常菌群生长发育繁殖,最终调节机体内微生态的平衡。陈兵等的实验论证这一点^[23],他们将纳豆芽孢杆菌添加到 SD 大白鼠饲料中,对其进行养殖,结果显示白鼠肠道内的 *Lacto Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* 和 *Bacteroid* 等厌氧菌群数量均有增加,而 *Enterococcus*, *Enterobacter* 等需氧菌群数量显著降低,同时在体外也探究了竞争实验,结果与其拥有很高的相似度。

1.4 纳豆芽孢杆菌的生长规律

纳豆芽孢杆菌的生长同一般细菌群体的生长规律基本一致:(1) 0~4 h 过程中,菌体形态为链状,且数量较,处于生长的延滞期;(2) 4~4 h 过程中,菌株形态变为单杆菌,数量明显增加,处于生长的对数期,是菌株选育的最佳时期;(3)在 14~20 h 过程中,产生大量芽孢处于生长的稳定期,是微生态生产利用的最佳时期,2005 年 Hong 等^[24]报道了这主要是由于该时期产的芽孢耐受性强,且在肠道中的萌芽率高;(4)20 h 后,菌株进入衰亡期。但胡雪萍等对纳豆菌营养体和芽孢间的生物学特性的研究发现,菌株 0~4 h 生长缓慢,4~20 h 快速增长,20~28h 菌体生长数量下降,在 28~32 h 数量再次增长,48 h 后数量基本保持不变,较为平稳,呈现二次生长曲线,这可能是由于菌体生长的同时芽孢开始萌发^[25]。

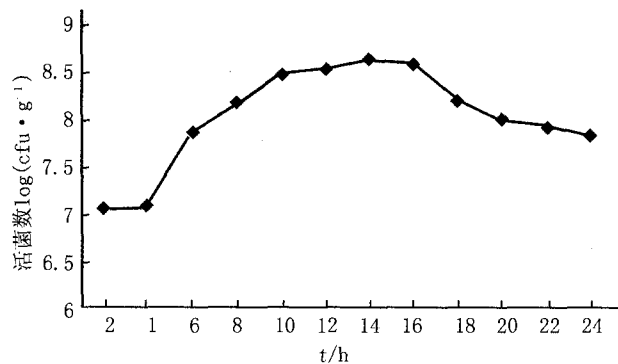
金燕飞等报道了豆粕固体培养基中纳豆芽孢杆菌的发酵生长曲线,如图 2 所示,0~4 h,处于生长延滞期;在 4~10 h,处于对数生长期;在 10~16 h,处于生长稳定期;16 h 后进入生长衰亡期^[26]。

2 纳豆芽孢杆菌的功能及应用

纳豆芽孢杆菌是可作为饲料微生物添加剂的一种绿色环保益生菌。美国已将 40 多种微生物用于饲料微

生物添加剂的生产,而我国农业部也于1999年6月公布了12种可直接饲用的饲料级微生物添加剂,主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、粪链球菌(*Enterococcus faecium*)和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等^[27]。

纳豆芽孢杆菌具有较强的耐高温性、耐酸性、耐胆盐和人工胃液等特点,可作为一种饲用有益微生物。在食品中添加纳豆芽孢杆菌,表现出良好的热稳定性和酸碱稳定性,能够帮助食物抵御胃酸等的分解和杀灭,菌落进入肠道内,降低肠道pH,生物夺氧,抑制肠道中肠杆菌、肠球菌、致病菌等的生长,而促进双歧杆菌、乳酸杆菌和梭菌等厌氧菌的生长,使菌落在肠道中定植,调节机体内微生态的平衡,自身代谢可分泌出多种促进营养物质的消化吸收的酶类,促进营养物质消化吸收,强化消化机能,同时刺激机体内的免疫系统产生干扰素,增强动物细胞免疫功能。纳豆芽孢杆菌代谢产物具有显著地抑菌功能,对食品加工具有远大的发展前景。



(引自: 金燕飞^[26]等饲用纳豆芽孢杆菌固体发酵和干燥工艺研究)

图2 豆粕固体培养基中纳豆芽孢杆菌的发酵生长曲线

2.1 天然防腐剂

天然有机防腐剂简称天然防腐剂,是生物体内本身具有或分泌的一种抑菌物质,人为加以提取或加工而制成食品防腐剂。纳豆菌防腐剂就是一种天然防腐剂,对人体、动物体等无毒害,并能提升食品的口感、增进食品品质,因此被视为一类具有广阔发展前景的食品防腐剂。纳豆芽孢杆菌的抗菌蛋白对食品起到一定的防腐保藏作用。

1979年Ozawa等发现纳豆芽孢杆菌可抑制白色念珠菌的生长^[28]。1997年Osawa等在探究纳豆芽孢杆菌的抗菌作用时发现,纳豆芽孢杆菌产生的胞外蛋白酶和芽孢杆菌蛋白酶可将葡萄球菌肠毒素分解成小肽^[29]。

钟青萍等^[30]考察了纳豆菌抗菌蛋白对鲜牛奶和鲜瘦猪肉的防腐效果。研究结果显示,纳豆菌抗菌蛋白在消毒牛奶的保藏中表现出显著的防腐效果,样品4℃保存2个月后,细菌总数仍低于100 CFU · mL⁻¹,而对照样品14 d时,微生物总数已超标;在37℃贮存时,同样表现出良好的防腐效果。在新鲜猪肉的保存中,0.06%抗菌蛋白粗品的防腐效果与0.02%尼萨普林的相近。抗菌蛋白与乳酸钠、山梨酸钾和甘氨酸有一定的协同作用。张丽靖等^[31]将纳豆菌运用于豆浆的保鲜中,结果显示其对豆浆的保鲜有显著的抑菌效果,且将处理后的样品保温24 h后,样品的活菌数比对照明显降了3个数量级。2012年王东等^[32]探究了低温条件下的纳豆菌抗菌肽APNT-6对凡纳滨对虾的保鲜效果的影响,结果发现样品用0.5 mg · mL⁻¹的抗菌肽保鲜剂处理后,在(4±1)℃贮藏条件下,添加保鲜剂组的pH、挥发性盐基氮(TVB-N)和细菌总数的增加速率放缓,使得货架期延长了2~3 d。杜磊等^[33]研究发现纳豆菌菌悬液与乳糖、甘露醇、麦芽糊精和L-抗坏血酸钠形成的复合保护剂混合,在-20℃冷冻48 h后,其存活率仍可高达84.25%,这说明纳豆菌是有一种高效冷冻保护剂。

2.2 抗菌剂

纳豆芽孢杆菌具有极强的稳定遗传抗菌作用,其代谢产生的抗菌物质同样表现出良好的热稳定性和酸碱稳定性。纳豆芽孢杆菌次生代谢可产生2,6-吡啶二羧酸(Dipicolinic acid)、多粘菌素、杆菌肽等抗菌素,对食品中常见的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等污染菌和沙门氏菌、伤寒菌、痢疾菌等致病菌具有极强的抑菌效果。

1967年日本龟田教授发现纳豆菌对动物的生长无害,同时可抑制癌细胞的生长^[34]。董尚智等分别将纳豆芽孢杆菌置于高温、酸性、不同浓度胆盐和人工胃液的环境中,纳豆菌对这些环境均体现了不同程度的耐受力,特别是对致病性的 *Clostridium* 和 *Staphylococcus aureus* 有显著抑制作用,且可将饲料中的抗营养因子(半纤维素、植酸盐和果胶)分解掉。同时也指出在饲料中添加纳豆芽孢杆菌时必须控制 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的浓度,应避免将纳菌和抗生素(如:Lincomycin, Pefloxacin, CPFX—Ciprofloxacin, Amoxicillin 等)同时加入饲料中^[35]。2003年杨晓斌等报道了 *Bacillus natto* 对 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* DM423 和 *Lactobacillus acidophilus* 这3种革兰氏阳性益生菌不显示抑制作用,对脂肪芽孢杆菌和黑曲霉的抑制性很小,但对 *Salmonella*, *Escherichia coli* 和 *Staphylococcus aureus* 这3种致病菌有显著的抑制作用^[36]。

2007年张锦华等^[37]报道了纳豆芽孢杆菌培养液比纳豆激酶和纳豆抑菌物质的抑菌效果强。实验对6种目标菌进行抑制效果探究,发现纳豆菌对葡萄球菌、大肠杆菌等肠道菌的抑菌作用比沙门氏菌、产气杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌的抑制作用强。于萍等选取了8头犍牛进行试验,且在犍牛日粮中添加含菌量为 10^{10} CFU 的纳豆枯草芽孢杆菌菌液,通过提取瘤胃食糜中的DNA,采用种属特异性引物和实时荧光定量PCR计算菌群数量变化的方法探究了纳豆芽孢杆菌对断奶后犍牛瘤胃及肠道的主要纤维分解菌数量的影响,结果发现纳豆菌可促进溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、脂解厌氧弧菌(*Anaerovibriolipolytica*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、白色瘤胃球菌(*Ruminobacter albus*)和琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)和在其消化道中定植和生长^[38]。

王继伟等³⁹对发酵条件进行优化,初步探究了纳豆芽孢杆菌次生代谢产物对食品中常见污染菌及致病菌的抑制效果,并对比了纳豆芽孢杆菌和食品中常用的乳酸链球菌素(nisin)、那他霉素(natamycin)等生物抑菌剂的抑菌效果,结果显示:纳豆芽孢杆菌次生代谢产物的抑菌效果与乳酸链球菌素、那他霉素的效果类似,均具有广谱抗菌作用,且纳豆芽孢杆菌对革兰氏阳性菌具有显著地抑菌效果。尚沁沁等^[40]发现纳豆芽孢杆菌B4对Caco-2细胞并无毒性,对大肠杆菌K88和霍乱沙门氏菌黏附Caco-2细胞无阻断作用,可通过调节Caco-2细胞的细胞因子分泌发挥一定的免疫功能。而石广举等^[41]在饲料中添加一定量的纳豆芽孢杆菌NT-6抗菌脂肽后,发现凡纳滨对虾的生长和虾机体的非特异性免疫能力均显著提高了,这表示纳豆芽孢杆菌NT-6抗菌脂肽是一种抗生素饲料添加剂的有效替代物。

2.3 微生态制剂

微生态制剂(Probiotics),也叫活菌制剂(Bigone)或生菌剂,是指运用微生态学原理,利用对人类、动物、植物体有益无害的益生菌或益生菌的促生长物质,经培养、发酵、分离、干燥等特殊实验方法和工艺制成的一类只含活菌体或菌体代谢产物的制剂。纳豆菌活菌微生态制剂的稳定性高,可通过生物夺氧、生物拮抗、菌群调整,调节微生态平衡,同时也通过刺激免疫细胞,提高免疫力及增强酶活性促进营养物质的吸收和消化等达到防病、治病和促生长的作用。纳豆芽孢杆菌微生态制剂作为一种绿色新型高效的微生态制剂,具有广阔的开发、应用前景。

2003年陈有容等^[42]在最佳条件和培养基中摇瓶发酵益生菌纳豆菌制取微生态制剂,并对制剂的生理功能和相应的活性成分进行分析,研究结果表明:菌株发酵液可抑制沙门氏菌、大肠杆菌等致病菌和肿瘤细胞增殖,拥有抗氧化、溶解纤维蛋白型血栓的功能,同时该发酵液中存在一定量的氨基酸,且维生素B₂的含量较发酵前提高了23倍。菌株的活菌数是判断益生菌饲料性价比的主要质量指标。钟青萍等通过统计纳豆芽孢杆菌活菌的数量,分别探究了不同温度、pH值、胆盐浓度及消化酶的种类对纳豆芽孢杆菌微生态制剂的影响,同时也研究了纳豆菌制剂在保藏过程中表现出的稳定性。结果显示,温度对纳豆菌微生态制剂的影响并不显著,在80℃的环境中处理60min后,活菌数基本保持不变,保藏在室温下具有高度的稳定性,在4℃冷藏时,其稳定性相对室温下减弱,在-20℃冷冻保藏时的效果较差;温度设为37℃,改变pH(1~11)的范

围分别处理 1 h 后,活菌数量依然很高.当胆盐浓度为 0.5% 时,活菌数下降了 8.75%;且在高浓度的胆盐和低 pH 值的交互作用下,活菌数仅比对照下降了 15.63%.37 °C 时,用胃蛋白酶、胰蛋白酶分别处理 1 h,相应的活菌数分别下降了 5.92%、8.28%,可见,纳豆菌对胃蛋白酶和胰蛋白酶的耐受力很强,这就使得肠道中有足够数量的活菌定植并发挥作用^[43].此外,在纳豆菌制剂添加保护剂和未添加保护剂的均在室温中储存 90 d 后,两者的活菌数基本都保持不变,储存 120 d 时,菌株存活率仍分别为 90% 和 74%.可见保护剂对纳豆菌制剂的保藏稳定性有一定辅助作用.

金燕飞等^[44]研究发现在仔猪饲料中添加纳豆菌微生态制剂后,可在一定程度上抑制仔猪肠道内的 *Escherichia Coli* 的生长,而激发 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 的生长,促使仔猪迅速生长发育.胡雪萍等对纳豆菌营养体和芽孢间的生物学特性的研究发现纳豆杆菌几乎对所有抗生素(杆菌肽除外)都有敏感性,这就意味着将纳豆芽孢杆菌用作微生物制剂时,营养体和芽孢都应避免与抗生素同时使用^[24].Samanya 等^[45]在鸡的日食里添加纳豆芽孢杆菌,喂食鸡后,其体内的血氨含量有所降低,促进了鸡的生长发育,其绒毛的浓密度和高度、细胞的面积等肠道组织结构都有所增加,并提出了开发纳豆菌作为鸡营养代谢的微生态制剂具有远大的发展潜力和技术优势.

2.4 饲料添加剂

纳豆芽孢杆菌是优良的饲用微生物添加剂,可提高动物日增重、产奶量,近年来作为一种饲用益生菌被广泛应用到畜禽生产中.

1990 年 Jiraphocakul 等报道了,用芽孢杆菌芽孢饲喂动物后,动物肠道和粪便中的芽孢杆菌存活率依旧很高.这表明芽孢杆菌芽孢可在动物消化道内萌发繁殖^[46].1994 年向贵友等^[47]给小鼠和雏鸡饲喂芽孢杆菌培养物后,芽孢杆菌可明显拮抗肠道内的致病菌.1998 年聂志武等^[48]通过连续饲喂法,在仔猪的日粮中添加不同剂量的纳豆芽孢杆菌,结果发现,仔猪在不同生长阶段相对未添加纳豆芽孢杆菌的对照组,重量每日可增加 9%~12%,料肉比相应的下降了 6%~8%,其中低剂量添加组的效果较为显著.当给动物喂食纳豆芽孢杆菌的微生态制剂时,动物体内消化道酶活性显著提高了.

黄俊文等研究表明,纳豆菌和甘露寡糖的协同作用可调节肠道内容物及黏膜的微生物区系,使得肠道 pH 值降低,仔猪的肠黏膜处于正常形态结构,改善仔猪断奶初期的生产性能^[49].Cartman 等^[50]证实了在鸡的胃肠道中芽孢杆菌的芽孢可以萌发,并对其代谢功能产生影响.杨郁等^[5]发现纳豆菌置于人工胃液 2 h 后的存活率基本都在 1% 以上.巨向红等测定了纳豆芽孢杆菌株 LBD-3 对高温、酸、胆盐和人工胃液的耐受力,及其发酵饲料的 pH、淀粉酶、蛋白酶和纤维酶活性.结果显示:该菌株在 100 °C 处理 10 min、pH 是 2 的水溶液和人工胃液均表现出较强的耐受力,高温下的存活率与对照组差异不大,pH 为 2 的水溶液菌株存活率可达 85% 以上,菌株在人工胃液培养基的存活率仍可达 70%,但在 1~5 g·L⁻¹胆盐环境中的相对存活率降低;经其发酵饲料的 pH 值显著降低($P < 0.05$),7 d 时淀粉酶活性增加 6%、蛋白酶活性增加 68%、纤维素酶活性提高 38%;15 d 时淀粉酶活性增加 20%,蛋白酶活性增加 370%,纤维素酶活性提高 200%.可见,纳豆芽孢杆菌可作为微生物型理想的饲料添加剂,其耐受胆盐应作为育种方向^[51].

程安春等^[52]证实给动物饲用芽孢杆菌后,可在体外拮抗多种动物致病菌.陈兵等^[53]报道了在 AA 鸡的日食中添加适量的纳豆芽孢杆菌剂可促使 AA 鸡的生长性能提升,当纳豆芽孢杆菌的最适添加量为 200 mg·kg⁻¹ 时,AA 鸡平均日增重(ADG)和平均日采食量(ADFI)较对照组分别提高了 2.47 g 和 5.11 g.这就意味着纳豆芽孢杆菌剂是一种可作为 AA 鸡的有效生长促进剂.2005 年缪东等将日粮添加纳豆芽孢杆菌制剂和常用添加剂的效果进行比较,发现相对 0.4% 常用添加剂来说,纳豆菌制剂的添加量为 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.4% 分别可使日增提高 9.2%、15.2%、18% 和 21%,说明纳豆芽孢制剂的效果较为明显,纳豆芽孢杆菌的添加量与日增重有一定的线性相关性.同期黄俊文等^[54]将纳豆芽孢杆菌按照 1 mg·kg⁻¹ 的比例添加到饲料后,饲喂 18 日龄的断奶仔猪,发现仔猪的血清尿素氮含量和胆固醇浓度及腹泻率均降低了,而日增重显著提高,改善了饲料在体内的有效转化率.张海涛等^[55]也探究了纳豆芽孢杆菌对 60 日龄左右的中国荷斯坦奶牛公犊牛断奶后的料重比、胴体率、生产性能等指标的影响,结果显示,纳豆芽孢杆菌不但提高了犊牛的 ADG 和 ADFI,且料重比有降低的趋势,但与对照组的差异并不显著($P > 0.05$),同时犊牛的胴体率也发生了显著提高($P = 0.01$).这可能是由于微生物的产酶量和种类、产酶和产酸能力发生了变化,导

致胃肠道的消化吸收能力发生了改变.周凌云等^[56]研究结果显示纳豆芽孢杆菌可使得牛犊提前断奶.2006年王丽娟等^[57]发现纳豆芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌(仙人掌杆菌)和地衣芽孢杆菌均可显著改善饲料的有效转化率.

王星等^[58]研究发现,用添加了纳豆芽孢杆菌的日粮饲喂黄羽肉鸡,可使肉鸡的脾脏、胸腺和法氏囊的相对重量显著提高及血清的特异性抗体水平显著增强($P < 0.05$).2008年刘宇等^[59]的研究结果表明,在饲料中添加纳豆芽孢杆菌、罗伊氏乳杆菌和双歧杆菌制成的复合型活菌制剂饲喂断奶仔猪,仔猪的平均日增重及对饲料的有效转化率发生了显著提高,同时仔猪的腹泻率也显著降低($P < 0.05$).栾广春等研究结果表明给正在泌乳期的奶牛饲喂纳豆芽孢杆菌可显著提高其产奶量、牛奶中的乳蛋白产量和干物质产量($P < 0.05$)及乳脂产量,可降低牛奶体细胞数的90%~95%,改善牛奶品质,且产奶量与纳豆芽孢杆菌的添加量呈正相关^[60].2012年Peng等^[61]发现给泌乳早期奶牛的TMR日粮中添加纳豆枯草芽孢杆菌固态发酵产品,可提高奶牛的日产奶量,同时可增加饲料效率,但对牛奶的品质几乎没有影响.而赵会利等^[62]通过在日粮中添加纳豆芽孢杆菌,研究了纳豆菌对犊牛断奶应激反应的影响,结果显示犊牛体重提高,且试验组犊牛的血清皮质醇,CRP,HP浓度、代谢物和IL-1 β ,IL-6在断奶当天和断奶后也都降低了,同时饲喂纳豆芽孢杆菌的犊牛腹泻率和腹泻频率显著降低,这说明日粮中纳豆芽孢杆菌不但能提高犊牛的生长性能,而且可缓解犊牛对断奶的应激反应.

2016年Lampe B J等^[63]研究发现在饲料中补充纳豆芽孢杆菌可显著改善TOPIGS猪的肉质,且补充量为0.1%时最为显著.Sun P等^[64]发现纳豆芽孢杆菌作为乳制品口粮益生菌对促进瘤胃发酵发挥着重要作用.

2.5 酶活性增强剂

1992年Jonsson等发现纳豆芽孢杆菌的代谢可分泌出多种促进营养物质的消化吸收的酶类,如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、凝乳酶、纤维素酶和脲酶等^[65].1995年Okamoto等^[66]发现,经纳豆芽孢杆菌发酵纳豆后,可产生一种热稳定性高、活性强、耐酸碱的血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI).Rintaro等^[67]发现,纳豆芽孢杆菌代谢产生的蛋白酶可使大豆过敏蛋白水解成小分子肽段,降低了动物对大豆的过敏应激反应.1997年Besson等^[68]将纳豆芽孢杆菌用来发酵大豆来生产吡嗪酰胺.1999年Hiroyuki^[69]报道了纳豆芽孢杆菌的摄入量对消化系统VK的产量有一定影响.

陈兵等^[53]研究发现给AA鸡饲喂添加了纳豆芽孢杆菌的日粮后,AA鸡的十二指肠消化酶的活力均有所提高,其中蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活力提高了一半以上.而熊峰等^[70]在AA肉仔公鸡的日粮中分别添加了不同浓度的大豆寡糖和纳豆芽孢杆菌,结果肉仔公鸡在42d后,十二指肠淀粉酶、胰蛋白酶活性均显著提高($P < 0.01$),且证实了在日粮中同时添加大豆寡糖和纳豆芽孢杆菌,对酶活性的提高是最为显著.2009年Shienh等^[71]在纳豆菌的发酵产物中发现了凝乳酶,且活性较高,可用来替代犊牛的粗制凝乳酶.

2.6 免疫增强剂

纳豆芽孢杆菌在肠道中调节肠道微生物平衡、刺激机体做出免疫反应,产生免疫抵抗物质,强化免疫系统,提高机体抗病力,正被逐渐应用到畜禽的生产中.

1983年Inooka等^[72]研究结果显示,纳豆芽孢杆菌能够促进雏鸡的抗绵羊红细胞抗体的产生,且使得仔鸡脾脏T,B淋巴细胞比例显著提高,增强了鸡的细胞免疫功能.1999年Hosoi等^[73]报道了纳豆芽孢杆菌自身代谢产生的过氧化氢酶和枯草蛋白酶能够促进乳酸杆菌的生殖.2004年Duc等^[74]研究发现,小鼠口服芽孢杆菌可刺激小鼠全身的免疫IgG反应.2006年王丽娟等^[57]的研究发现,当肉鸡应对毒性较强的大肠杆菌时,肉鸡会迅速做出应激反应,提升了黏膜的免疫抵抗功能,使得肉鸡的抗病力显著增强.

周国勤等^[75]发现每日按一定剂量投饵饲喂鱼类,使其摄入纳豆芽孢杆菌及其发酵产物,受试鱼类血液的NBT阳性细胞数明显增多,且血清溶菌酶活力也显著增强,这就明显提升了鱼类的非特异性免疫功能.而黄俊文等^[49]研究结果发现,给早期断奶仔猪同时食用低剂量的纳豆芽孢杆菌和甘露寡糖时,仔猪血清中的CD3⁺,CD4⁺含量会明显增加($P < 0.05$),改善了仔猪的免疫机能.吴德华等^[76]研究发现给断奶仔犬的日粮中添加1%和2%的纳豆芽孢杆菌,可增加仔犬胃肠道有益菌的数量,改善其微生态环境,保持平衡,提高仔犬的抗病能力,从而促进仔犬的生长发育.

2.6 净化水质、改良底质

纳豆芽孢杆菌能与不同菌种相互作用快速高效分解水中和池底污泥的有机废物、氨氮、亚硝酸盐、 H_2S 等有害物质,改善池底的厌氧环境,降低氨氮、 H_2S 等有害物质的含量及有机物分解的耗氧量,从而提高养殖水体的溶氧量,给水生动物提供了一个良好的养殖环境,且可提高水生动物的免疫力和应激能力,同时有益菌体的大量繁殖给水生动物提供了充足优良的饵料,纳豆芽孢杆菌也富含许多促进水生动物生长的活性营养物质.其中胺类先转化为硝酸盐,再经一系列的化学变化,生成 N_2 ,分散挥发到空气中,对水体几乎无污染,表现出良好的绿色环保性能.朱光来等^[77]用纳豆芽孢杆菌处理里下河污水,结果表明:经纳豆芽孢杆菌处理污水72 h后,污水的COD由 $15.98\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降到 $8.44\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,污水总氮含量降低,对氮有一定的去除效果.

纳豆菌可分解纺织印染废水的多种特有成分,且对水体内的有害菌类有明显的抑制作用.张丽等^[78]通过对纳豆芽孢杆菌进行培养、驯化、投菌的强化生物工艺来预处理印染废水,对处理效果的观察显示该工艺可有效降低后续工段的污染负荷及化学药剂的投加量,且废水的 COD_{Cr} 值大大降低,对 COD_{Cr} 的平均去除率可达23.8%,具有高效、降低成本的双重作用.可见,纳豆菌强化生物工艺对印染废水的预处理是可行的.盛清凯等研究表明猪日粮中添加纳豆芽孢杆菌,可减少舍外粪便污染^[79].

3 展 望

随着社会的进步,人类对地球的保护意识已日渐升温,要求勤俭节约,以维持生态平衡,且由于人口数量的剧增,使得粮食成短缺态,那么,食品有长时间的保鲜期和防腐期及畜牧业在短期内高产,提供人类活动所必需的能量来源,同时满足绿色环保,无污染是关键.而纳豆芽孢杆菌皆具备这些生物学特点,很自然地进入眼球,成为研究的热点,而获得高质量的菌株是最关键的因素.

纳豆菌本身具有较强的稳定性,在实验过程中基本不会被其他菌株感染,影响其生物活性,遗传稳定,诱变菌株在多次传代后依然具有高产性能,可满足日益增长的物质文化需求,同时活菌制剂具备极强的稳定性,使得纳豆菌微生态制剂的生产、销售和应用更为方便,为生产节省成本,是一种新型高效的微生态制剂,具有良好的开发前景.近年来,绿色环保、无污染是社会生活密切关注的话题,而纳豆芽孢杆菌作为一种绿色益生菌就成为研究的热点.但目前对纳豆芽孢杆菌对生物体的益生作用机理、食品加工工艺和实际生活应用等方面的研究尚未完善,仍需利用物理、化学等诱变技术在分子水平上改良基因,或是通过基因重组、染色体融合、合成酶表面修饰、提高关键酶活性、增加正向调控蛋白浓度,选育出稳定遗传性高、酶活性高、耐高温、耐酸(胃液)、耐胆汁、高浓度、快速生殖等优良性状的菌株,优化培养基和培养条件、采用高密度发酵法来改进生产工艺及添加适当保护剂来改进包装工艺,以便扩展纳豆菌在食品和饲用等方面作用机理的研究.目前我国对纳豆芽孢杆菌的研究基本上处于实验室研究阶段,在我国实现大规模的工商业绿色化大生产将是今后研究发展的重点.

参 考 文 献

- [1] Liu Xuanya. Bacterial Endotoxin[J]. The Science and Teehnology of Gelatin,2013,33(1):44-47.
- [2] Moir A,Smith D A. The genetics of bacterial spore germination[J]. Annu Rev Microbiol, 1990,44:531-553.
- [3] Hoa T T, Duc L H,Isticato R,et al. Fate and dissemination of Bacillus subtilis spores in a murine model [J]. Environ Microbiol,2001,67(4):3819-3823.
- [4] Huang ZhanWang,Wei Ping,Liu HeiLing,et al. A Study on Biological Properties of Bacillus natto[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2004,26(1):83-85.
- [5] Yang Yu,Zhang Lijing,Singo Amachi. Comparison of Acid-resistant for Natto Bacillus and Lactobacillus[J]. Food Research and Development,2008,29(3):78-80.
- [6] Deng Lifang, Wang Jiaqi,Bu Dengpan,et al. A Review of the Bacillus Subtilis Natto as Probiotics in Animal Production[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2007,34(10):5-8.
- [7] Sumi H,Hamada H,Tsushima H,et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,1987,43(10):1110-1111.

- [8] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase[J]. *Acta Haematol*, 1990, 84, 139-143.
- [9] Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(11): 1869-18711.
- [10] Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18(9): 1194-1196.
- [11] Martin M, Kouhei M. Natto and its active ingredient nattokinase, a potent and safe thrombolytic agent [J]. *Alternative & complementary therapies*, 2002(9): 157-164.
- [12] Dabbagh F, Negahdaripour M, Berenjian A, et al. Nattokinase: Production and Application[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(22): 9199-9206
- [13] Wu Jiechen, Zhang Wei, Zhang Youjing. The Function of Natto and Nattokinase in the Prevention and Treatment of Disease[J]. *Hei Long jiang Medical Journal*, 2003, 16(1): 36-37.
- [14] Cai Yuhua, Xu Zhenguo. Optimization of Fermentation Conditions of Nattokinase High-producing Strain[J]. *Chin J Biologicals*, 2014, 27(11): 1481-1484.
- [15] Sun Junde, Li Siyi, Wu Baowan, et al. Bacillus Natto Fermented Liquid Thrombolysis Effect Test in Vitro [J]. *Agriculture Science & Technology and Equipment*, 2014, 6: 10-11.
- [16] Ju Lei, Ma Xia, Xu Yuhang. Optimization of γ -polyglutamic Acid Extraction Conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(4): 299-303.
- [17] Urutshibata Y, Toktvtatna S, Tahara Y. Characterization of the Bacillus subtilis ywsC gene, involved in γ -polyglutamic acid production [J]. *Journal of bacteriology*, 2002, 184(2): 337-343.
- [18] Dekie L, Toncheve V, Dubruel P, et al. Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy[J]. *Journal of controlled release*, 2000, 65(1/2): 187-202.
- [19] 新吉乐图. 电晕电场——离子束复合诱变对纳豆芽孢杆菌产 γ -聚谷氨酸产量的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2013.
- [20] 王志永. 针板电晕电场对纳豆芽孢杆菌合成 γ -聚谷氨酸的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015.
- [21] Zhong Qingping, Xie Junjie, Xu Shiwan, et al. Isolation and Identification of Natto Bacteria and its Antibacterial Activity[J]. *Food science*, 2002, 23(10): 109-112.
- [22] Ma Ming, Du Jinhua, Wang Nan, et al. Screening and Identification of a Strain Producing Nattokinase[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(5): 33-41.
- [23] Chen Bing, Zhu Fenxiang, Chen Qiaoyun, et al. Isolation and Purification of Bacillus Natto Sawamura and its Effect on the intestinal Microecology Systems of Rats[J]. *Acta Agriculturae Zhe Jiangensis*, 2003, 15(4): 223-227.
- [24] Hong H A, Duc L H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(4): 813-835.
- [25] Hu Xueping, Wang Ping, Sun Xiaoming. Studies on the Biological Characteristics of the Natto Bacillus Vegetative Cells and Its Spores[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(6): 27-32.
- [26] Jin Yefei, Shen Lirong, Feng Fenqing, et al. Solid Fermentation and Drying Technology of Feeding Bacillus Natto[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2006, 21(5): 120-123.
- [27] Hu Dongxing, Pan Kangchun. Mechanism and its Probiotics[J]. *China Feed*, 2001, 8(3): 14-16.
- [28] Ozawa K, Yagu-Uchi K, Yamanaka K, et al. Antagonistic effects of Bacillus natto and Streptococcus faecalis on growth of Candida albicans [J]. *Microbiol Immunol*, 1979, 23(12): 1056-1147.
- [29] Osawa R, Matsumoto K. Digestion of staphylococcal enterotoxin by Bacillus natto[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1997, 71: 307-311.
- [30] Zhong Qingping, Wang Bing. Application of Antimicrobial Protein of Bacillus Natto in Food Preservation[J]. *China Food Additives*, 2003(3): 66-69.
- [31] Zhang Lijing, Yang Yu. Progress to Bacillus Natto's Food Preservative[J]. *Food Research and Development*, 2008, 29(5): 188-189.
- [32] Wang Dong, Sun Lijun, Wang Yaling, et al. Bacillus Natto Antimicrobial Peptide APNT-6 Effect on Preservation of L. Vannamei at Low-temperature[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1133-1138.
- [33] Du Lie, Du Yang, Xi Jingling. Cryoprotectants of Natto Bacteria[J]. *Journal of Henan University of Technology*, 2015, 36(5): 87-91.
- [34] Yong Shen. The Health Care Efficacy of Natto and Nattokinase[J]. *Science of Travel Medicine*, 2008, 14(2): 10-12.
- [35] Dong Shangzhi, Chen Yianfen, Huang Yanhua, et al. Research on Feed Characteristics of Bacillus Natto[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2009, 21(3): 371-378.
- [36] Yang Xiaobing, Xie Yongkui, Wei Yanpeng, et al. Screening on Bacillus Subtilis Natto of Probiotics[J]. *Science and Technology of Guanzhou Food Industry*, 2003, 77(19): 9-131.
- [37] Zhang Jinhua, Wang Ping, He Houjun, et al. Studies of Natto Extract and Natto Bacteria in Vitro Bacteriostasis[J]. *Jiangxi Animal Husbandry and Veterinary Journal*, 2006, 6: 38-42.

- [38] Yu Ping, Wang Jiaqi, Bu Dengpan, et al. Effects of *Bacillus subtilis* natto in diets on quantities of Gastrointestinal Cellulytic Bacteria in Weaning Calves[J]. Journal of China Agricultural University, 2009, 14(1): 111-116.
- [39] Wang Jiwei, Ge Yuliang, Yujin, et al. Study on Bacteriostatic Effect of *Bacillus Natto* Metabolic Pruduct[J]. Food Machinery, 2013, 29(3): 94-100.
- [40] 尚沁沁, 黄琴, 徐歆, 等. 纳豆芽孢杆菌 B4 对 Caco-2 细胞活性、黏附与细胞因子分泌的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 279-286.
- [41] Shi Guangju, Sun Li Jun, Wang Yaling, et al. Effects of Antibacterial Lipopeptides Produced by *Bacillus Subtilis* NT-6 in Solid-state Fermentation on Growth Performance and Non-specific Immunity of *Litopenaeus Vannamei*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 22: 99-103.
- [42] Chen Yourong, Qi Fenlan, Chen Lihua. The Fermentation Broth of *Bacillus Natto* and its physiological functions and the active ingredient [J]. Food Industry, 2003, 4: 42-44.
- [43] 钟青萍, 王发祥, 钟士清. 纳豆菌微生态制剂的稳定性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 133-136.
- [44] 金燕飞. 饲用纳豆芽孢杆菌微生态制剂的研制与开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [45] Samanya M, Yamauchi K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var natto[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2002, 133(1): 95-104.
- [46] Jiraphocakul S, Sullivan T W. Influence of a dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacilli* cultures on intestinal microflora in turkeys[J]. Poultry Science, 1990, 69: 1966-1973.
- [47] Xiang Yougui, Xie Houqing, Liu Kelin, et al. A Study of Microbiological feed Additive Improving the Growth of Broiler[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 1994, 12(supplement): 602-605.
- [48] Nie Zhiwu, Wang Caixian, Hu Zhigao. Benefit Bacteria and Its Application in the Diet of Pig and Chicken[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 1998, 26(1): 85-89.
- [49] Huang Junwen, Lin Yingcai, Feng Dingyuan, et al. Effect of Natto and MOS on Intestinal pH, Colonic Microflora Population and Intestinal Membrane Shape of Early Weaning Piglet *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 1021-1027.
- [50] Cartman S T, Ragione R M L, Woodward M J. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal Tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5254-5258.
- [51] 巨向红, 谢晓杭, 张海燕, 等. 一株纳豆芽孢杆菌的饲科学特性研究[J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(4): 87-91.
- [52] Cheng Anchun, He Mingqing, Chen Xiaoyue. The Biological Test of *Bacillus cereus* SA₃₈ against several pathogens[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1994, 20(2): 12-13.
- [53] Chen Bin, He Shishan, Zhu Fenxiang, et al. Effects of *Bacillus natto* sawamur preparation on growth capability and duodenum digestive enzyme of AA broilers[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2003, 15(5): 289-292.
- [54] Miao Dong, Guo Zhaohui, Ding Xiangli, et al. The Test of Natto fungus as feed additive to feed fattening pig growth[J]. Feed Reserch, 2005, 18(11): 55-56.
- [55] 张海涛, 王加启, 卜登攀, 等. 日粮中添加纳豆芽孢杆菌对断奶后犊牛生长性能的影响[J]. 动物营养学报, 2008, 20(2): 158-162.
- [56] 周凌云. 纳豆芽孢杆菌作为奶牛饲用微生物效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [57] Wang Lijuan, Zhang Guangmin, Shun Wengzhi, et al. Effect of *Bacillus coli* under Stress Immunity of Broilers and Antioxidant Function [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2006, 8: 44-46.
- [58] Wang Xing, Tan Zonghua, Cai Jianping, et al. Effect of *Bacillus Natto* to Yellow Feather Broilers Performance and its Immune Function [J]. China Poultry, 2007, 29(22): 20-23.
- [59] 刘宇. 猪用乳酸杆菌、双歧杆菌、纳豆芽孢杆菌复合活菌制剂的研制[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [60] Luan Guangchun, Wang Jiaqi, Bu Dengpan, et al. Effects of supplementation of *Bacillus subtilis* Natto on milk production and quality of lactating cow[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(9): 58-61.
- [61] Peng H, Wang J Q, Kang H Y, et al. Effect of feeding *Bacillus subtilis* natto fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows[J]. J Anim Physiol Anim Nutr(Berl), 2012, 96(3): 506-512.
- [62] Zhao Hhuli, Cao Yufeng, Gao Yexia, et al. Effect of *Bacillus Natto* on Weaning Calves Growth Performance and Blood Biochemical Indices, 2013, 49(17): 67-69.
- [63] Lampe B J, English J C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. Natto[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 88(2): 87-99.
- [64] Sun P, Li J, Bu D, et al. Effects of *Bacillus subtilis* natto and Different Components in Culture on Rumen Fermentation and Rumen Functional Bacteria In Vitro[J]. Curr Microbiol, 2016, 72(5): 589-595.
- [65] Jonsson E, Conway P. probiotics for pigs[M]. In: Fuller R(Ed) Probitics: The Scientific Basis. Champion & Hall, London, 1992: 260-316.
- [66] Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, et al. Antihypertensive substances in fermented soybean, natto[J]. Plant Foods for Human Nutri-

- tion,1995,47(1):39-47.
- [67] Rintaro Y, Huang T, Hideaki T, et al. Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with *Bacillus natto*[J]. Food Science and Technology International,1995,1(1):14-17.
- [68] Besson I,Creuly C,Gros J B,et al. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,1997,47(5):489-495.
- [69] Hiroyuki S U M I. Accumulation of vitamin K (menaquinone-7) in plasma after ingestion of nattoand *Natto Bacillis* (*B. Subtilis natto*) [J]. Food Science and Technology Research,1999,5(1):48-50.
- [70] Xiong Feng,Wang Xiaoxia, Yu Xiong. Application of Soybean-oligosaccharides and *Bacillus Natto* in Broilers Diet[J]. Journal of Beijing University of Agriculture,2008,23(1):45-49.
- [71] Shienh C J,Thi L A P,Shih I L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*[J]. Biochemical Engineering Journal,2009,43(1):85-91.
- [72] Inooka S, Kimura M. The effect of *Bacillus natto* in feed on the sheep red blood cell antibody response in chickens[J]. Avian Dis, 1983, 27(4):1086-1089.
- [73] Hosoi T, Ametain A, Kiuchi K, et al. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus* (*natto*) spores are dependent upon dietary components [J]. CANADIAN journal of Microbiology,1995,45(1):59-66.
- [74] Le H D, Hong H A, Barbosa T M, et al. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use[J]. Applied and Environmental Microbiology,2004,70(4): 2161-2171.
- [75] Zhou Guoqin,Du Xuan,Wu Wei. Effect of *Bacillus Natto* to Fish Nonspecific Immune function[J]. Reservoir Fisheries,2006,26(1):101-104.
- [76] Wu Dehua,Du Li,Xu Hankun,et al. Effects of *Bacillus natto* on the Growth and Intestinal Microbiota in Weaning Canines Acta Ecologiae Animalis Domastici,2009,30(3):65-67.
- [77] Zhu Guanglai,Wang Jianguo,Feng Qi,et al. The Effect of *Bacillus Natto* and Head Hair Moina for Wastewater Purification[J]. Jiangsu Agricultural Sciences,2013,41(2):326-328.
- [78] Zhang Li, Guo Junwang, Lai Jingmei,et al. Intensive Pretreatment of Printing and Dyeing Wastewater by *Bacillus Natto*[J]. gdchem, 2010,37(4):163-164.
- [79] Sheng Qingkai,Jiang Dianwen,Liu Yeye,et al. Effect of *Bacillus Natto* in Diet on Odors and Microbes in Pig Manure Fermentation Broths in Vitro[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici,2014,35(10):36-40.

Related Progress of Research of *Bacillus Natto*

JI Meiping, XIAO Zhiting, NA Ri, GUO Jiufeng, PANG Yanbo, FU Lili

(Physical Science and Technology; key laboratory of ion beam bio-engineering in Inner Mongolia Autonomous region, Inner Mongolia University, Hohhot 010021,China)

Abstract: *Bacillus natto* is an aerobic Gram-positive probiotic, with a strong thermal and pH stability, that can rapidly transform into nutritional cells in the intestine. The reproductive of some colonies is inhibited, for example *E. coli*, *Enterococci* and *Bacteria*, the growth of anaerobic bacteria is promoted. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Clostridium* can regulate the microecological balance. The metabolism of *Bacillus natto* can secrete a variety of enzymes to promote the digestion and absorption of nutrients, strengthening digestive function, stimulating the body's immune system to produce antimicrobial substances and high-strength thrombolytic nattokinase, enhancing immune function of animal cells. *Bacillus natto* can be used as a preservative during storage, probiotics, feed additives, enzyme activity enhancers, immune enhancer, because it is able to improve food storage period, the rate of weight gain and milk production of animals, water purification and sediment.

Keywords: *Bacillus natto*; nattokinase; microecology; γ -PGA