

纳豆芽孢杆菌及其在食品生产中的应用研究进展

李梦丹¹, 谢艳华¹, 陈力力^{1,2*}, 郭华^{1,2}

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 长沙 410128; 2. 食品科技和生物技术湖南省重点实验室, 长沙 410128)

摘要: 纳豆芽孢杆菌是日本传统发酵食品纳豆的生产菌种, 它不仅能分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质, 使发酵产品中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的营养因子, 而且能够产生纳豆激酶、杆菌肽、2,6-吡啶二羧酸和 γ -多聚谷氨酸等多种生理活性物质, 具有溶血栓、降血压、抑菌、抗氧化等保健功能。纳豆作为健康食品在日本已经食用了两千多年, 纳豆芽孢杆菌是对人体安全、无病原性的功能性微生物。本文旨在概述纳豆芽孢杆菌的特点、功能成分以及应用研究进展, 为人们进行功能性食品开发研究提供参考。

关键词: 纳豆芽孢杆菌; 功能成分; 食品保鲜; 菌种改良

Research advances of *Bacillus natto* and its application in food production

LI Meng-Dan¹, XIE Yan-Hua¹, CHEN Li-Li^{1,2*}, GUO Hua^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: *Bacillus natto* was isolated from the Japanese traditional fermented food of natto. It could degrade macromolecules such as proteins, carbohydrates, fats, and fermentation products were rich in amino acids, organic acids, oligosaccharides, and other nutriment that easy to be absorbed by the body. In addition, it was capable of producing nattokinase, bacitracin, 2,6-pyridine-dicarboxylic acid, γ -polyglutamic acid and other physiologically active substances, which had thrombolytic, hypotensive, antibacterial, antioxidant and other health functions. Natto as a kind of health food in Japan have been eaten for more than 2000 years, and *Bacillus natto* is the safety nonpathogenic strain for human. This paper summarized *Bacillus natto* characteristics, function compositions and application research progress, so as to provide references for functional foods researches.

KEY WORDS: *Bacillus natto*; function composition; food preservation; strain improvement

1 引言

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)属于芽孢杆菌科、芽孢杆菌属、枯草芽孢杆菌的1个亚种, 是20世纪中期从日本传统食品中分离得到的。纳豆芽孢杆菌在生长繁殖过程中能够分解蛋白质、碳水化合物和脂肪等大分子物质, 使

其成为更易被人体吸收的氨基酸、有机酸和寡聚糖等小分子成分, 同时能够产生纳豆激酶、血管紧张素转化酶(ACE)、 γ -多聚谷氨酸、异黄酮、皂苷素、生育酚、维生素K2等生理活性成分, 这些成分具有溶栓、降压、抑菌、抗氧化、防止骨质疏松等功效^[1,2], 因此得到广泛的研究和应用。本文对纳豆芽孢杆菌的生物学特性和在食品生产的应

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2013AA102107)

Fund: Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2013AA102107)

*通讯作者: 陈力力, 教授, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。E-mail: chenlili001@tom.com

*Corresponding author: CHEN Li-Li, Professor, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, No.1, Nongda Road, Furong District, Changsha 410128, China. E-mail: chenlili001@tom.com

用进行综述。

2 纳豆芽孢杆菌的生物学特性

2.1 纳豆芽孢杆菌的一般特点

纳豆芽孢杆菌为嗜氧型革兰氏阳性杆菌, 细胞呈长杆状, 大小约为(0.7~0.8) μm ×(2.0~3.0) μm ; 其芽孢呈椭圆形或柱状, 中生或偏中生, 然而即使孢囊膨大, 也不显著; 有鞭毛, 能运动; 具有耐酸、耐热的特性, 在胃酸环境中均能保持高度稳定性, 可以4 h 100%存活, 并且在肠道上段迅速发育转变成具有新陈代谢作用的营养型细胞。生长温度最高为45~55 $^{\circ}\text{C}$, 最低为5~20 $^{\circ}\text{C}$, 尤以芽孢耐热性强^[3]。可以在人体肠道中定殖, 对人体肠道中微生态的平衡具有很重要的作用。另外, 人们以营养消耗法制备纳豆芽孢杆菌芽孢悬液, 以涂平板计数菌落法比较不同温度、pH值、盐含量、体外模拟动物胃肠道环境对纳豆芽孢杆菌营养体及其芽孢的影响, 并采用药敏试纸法检测两者的药物敏感性, 研究了纳豆芽孢杆菌营养体和芽孢之间的生物学特性。结果表明, 纳豆芽孢杆菌呈二次生长, 其芽孢对温度、酸碱、盐和模拟胃肠道环境等不利环境的耐受性均明显强于营养体, 但对抗菌药物(除杆菌肽外)较营养体敏感^[4]。

自1934年北海道大学农学部半洵教授首次成功地将分离的纯种纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto* No.1)应用于纳豆的工业化生产以来, 至今已知与纳豆生产相关的主要纯菌种^[5]包括: *Bacillus subtilis* IFO 3007、*Bacillus natto* Sawamura 06、*Bacillus natto* Sawamura IFO 3339等。在我国也有多种用于纳豆发酵的纯种发酵剂上市, 如川秀纳豆芽孢杆菌(高纯度)纳豆发酵剂、比优特纳豆芽孢杆菌纳豆发酵剂、生物力纳豆芽孢杆菌粉、纳豆发酵剂等。

纳豆芽孢杆菌的营养要求不高, 普通细菌培养基均可生长。传统纳豆采用稻草上的纳豆芽孢杆菌作为菌种来源, 将煮熟的黄豆冷却后用稻草包裹后于温湿度比较高的地方自然发酵1~2 d, 即可有大量菌体生长并产生代谢产物。但是在不同培养条件下产生的生理活性成分有所不同, 例如, 只有纳豆芽孢杆菌宫城菌在含有20%豆渣培养基中能产生2,6-吡啶二羧酸, 液体培养基培养时, 可随着大豆煮汁粉的增加, 2,6-吡啶二羧酸增加; 同样的液体培养条件, 纳豆芽孢杆菌高桥菌比宫城菌能分泌更多的维生素K2(MK-7)^[6]。目前报道利用豆渣、米糠、菜籽饼粕等食品加工副产物作为基料, 均可发酵生产纳豆芽孢杆菌保健药品、调味品以及微生态制剂等^[7-10]。另外, 枯草芽孢杆菌的重要特点是能够分泌各种胞外酶, 包括蛋白酶、淀粉酶、谷氨酸转氨酶(GTP)、脂肪酶、果聚糖蔗糖酶和植酸酶, 而纳豆芽孢杆菌分泌的酶比其他枯草芽孢杆菌分泌同样活性的酶高几十倍^[11]。

2.2 纳豆芽孢杆菌的生理功能

2.2.1 溶血栓功能

1987年日本学者须见洋行等首次在日本传统食品纳豆中发现并提取出由纳豆芽孢杆菌产生的具有强烈溶栓功能的蛋白酶, 定名纳豆激酶(nattokinase, NK; 也称subtilisin NAT, subtilisin BSP)。随后人们详尽地研究纳豆激酶的理化特性、溶血栓作用机制及生产工艺^[12,13]。

纳豆激酶属于一种丝氨酸蛋白酶, 相对分子质量为27728, 是由275个氨基酸残基组成的单链多肽, 其序列与枯草芽孢杆菌蛋白酶相似度极高。酶活性中心在Asp32, His64和Ser221, 与底物的结合部位在Ser125, Leu126和Gly127处。研究表明, 纳豆激酶在pH 6.0~12.0范围内稳定, pH低于5.0则极不稳定; 在温度低于45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 活性相对稳定, 但温度超过50 $^{\circ}\text{C}$ 则活力逐渐丧失, 若添加明胶, 可使其热稳定性提高5倍以上; 冻融对纳豆激酶活性影响不大, 反复冻融5个循环, 酶活性仍保持95%以上^[14-16]。纳豆激酶不像尿激酶(urokinase, UK)、链激酶(streptokinase, SK)、组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)等属于纤溶酶原激活剂型, 需激活纤维蛋白溶酶原(plasminogen)转变为纤维蛋白溶酶, 再与纤维蛋白(fibrin)结合才能发挥溶栓作用, 它直接作用于纤维蛋白, 尤其是交联形式的纤维蛋白, 将其水解成小肽和氨基酸。据报道^[17-19], 纳豆激酶体外纤维蛋白平板溶栓效果显著, 应用于狗的血栓模型实验及健康人群的体内试验时, 不仅可以抑制血栓的形成, 还可迅速降解纤维蛋白, 增加纤维蛋白降解产物(FDP)的量, 明显缩短血浆中优球蛋白的溶解时间(ELT), 提高优球蛋白的纤溶活性(EFA), 降低PAI等纤溶酶原激活因子抑制子的活性, 从而激活静脉内皮细胞, 引起t-PA的继发性增加, 同时激活尿激酶原(pro-UK)转变为尿激酶, 使内源性纤溶酶量和活性间接增强, 具有双重功能。研究结果表明, 纳豆激酶的溶栓效果远大于纤溶酶和弹性蛋白酶, 活性是纤溶酶的4倍。

另有研究报道当纳豆激酶与胃黏液蛋白、血清蛋白以及煮沸过的小麦或大米提取液和肉汤混合后, 纳豆激酶的稳定性显著增加, 甚至在酸性条件下, 酶活性也不会完全丧失, 这说明纳豆激酶能在胃酸环境中保持一定的活性, 可通过口服达到溶栓目的^[20]。

2.2.2 抗菌抑菌功能

纳豆芽孢杆菌可产生多粘菌素、杆菌肽和2,6-吡啶二羧酸等多种生理活性物质, 具有广谱抗菌作用。

研究表明, 纳豆芽孢杆菌产生的多粘菌素属于多肽类抗生素, 具有表面活性, 含有带正电荷的游离氨基, 能与革兰氏阴性菌细胞膜磷脂中带负电荷的磷酸根结合, 增加细胞膜通透性, 引起胞内磷酸盐、核苷酸等成分外漏, 导致细菌死亡。对大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、痢疾杆

菌、绿脓杆菌等致病菌有强烈的抑制作用^[21]。杆菌肽主要是抑制革兰氏阳性菌胞浆内的肽聚糖前体转变为焦磷酸萆醇, 从而起到抑菌作用^[22]。对耐药的金黄色葡萄球菌、肠球菌、链球菌有效, 对螺旋体和放线菌也有效, 但对革兰氏阴性菌无效。2,6-吡啶二羧酸是纳豆菌发酵大豆产生的黏性物质成分之一, 对包括大肠杆菌在内的其他细菌具有更强烈的抑制效果。目前对于其抗菌作用机制还未完全研究清楚^[23]。

2.2.3 降血压功能

纳豆菌生长中可产生有降血压作用的 ACE 抑制肽, 并且在其周围的粘性物质中含量更高。ACE 是 1 种膜结合的二肽羧基酶, 在体内肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)和激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)这对相互拮抗体系中, 对血压的调节起到重要作用^[24,25]。

2.2.4 抗氧化功能

祁红兵等^[26,27]研究表明纳豆芽孢杆菌发酵豆渣能产生较强的抗氧化活力, 当接种量为 4% 时, 豆渣发酵上清液对羟自由基的清除率可达 76.3%。分离提取纳豆芽孢杆菌米糠发酵物的各成分, 检测其抗氧化活性成分主要是烯丙基甲基硫醚、3,5-二甲基苯酚、2,4-二叔丁基苯酚和二氢吡啶等。相关人员研究纳豆中粗抗氧化剂提取物对不饱和脂肪酸和细胞显示的抗氧化效果与相同质量的维生素 E 相当或效果更好。

2.2.5 其他生理功能

纳豆芽孢杆菌类似于人和动物体内的益生菌, 生长繁殖过程中能够分泌 γ -多聚谷氨酸、维生素 K2、纳豆激酶, 除了与钙协同作用预防和治疗骨质疏松外, 还是合成与血液凝固有关蛋白的必需因子, 具有防治骨质疏松症及促凝血作用^[28,29]; 纳豆发酵产品中含有大量的染料木素(genistein)和染料木苷(genistin), 而染料木素是抗癌的主要活性成分, 因此认为纳豆芽孢杆菌具有抗癌作用^[30]。另外, 小鼠实验表明用纳豆芽孢杆菌发酵姜黄根粉的发酵产物有利于保护肝脏和降低血脂^[31]。

3 功能性食品开发方面的应用

目前, 除利用纳豆芽孢杆菌生产传统纳豆食品外, 还进行了多种新型功能性食品的开发研究^[32,33]。人们以纳豆冻干粉为主要原料, 添加奶粉、甘露醇等, 采用现代制药压片技术, 研制出纳豆咀嚼片和纳豆奶咀嚼片, 既改善了纳豆的外观和口感, 又增加了保质期, 而且食用方便^[34]。将黄豆纳豆粉 1 kg、绿茶粉 30 g、食用油 500 mL 和木糖醇 350 g 混合入模成型研制出茶香木糖醇纳豆糕, 产品具有特殊的茶香, 并且保持了纳豆较高的纳豆激酶(nattokinase, NK)活力和大量的纳豆芽孢杆菌活菌数, 而且对产品有一定的除臭、除臭和保鲜的作用^[35]。另外人们以

大豆为原料进行发酵并以其发酵液为主体添加柠檬酸、白砂糖、 β -环糊精调配生产出纳豆发酵型饮料, 此饮料呈乳黄色、光泽度好、富含纳豆激酶, 风味独特^[36]。以保健红曲和纳豆冻干粉为原料制成保健食品纳豆红曲胶囊, 对纳豆红曲胶囊进行安全性功能性评价, 结果表明, 进行的小鼠经口急性毒性试验、30 d 喂养试验、Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸变试验未显示毒性和致突变性; 建立大鼠脂代谢紊乱模型, 证明纳豆红曲胶囊有辅助降血脂的作用^[37]。

为了在保证营养功能的同时, 使纳豆的口味特点更加适合中国人的饮食习惯, 人们通过添加新的发酵原料和调味料来改善发酵过程中产生的氨味。如王署文等^[38]在完成发酵工序的纳豆中加入调味剂, 生产出色泽金黄、入口细腻、香鲜浓郁, 既保留了纳豆营养, 又具有传统酿造豆酱风味特点, 符合中国人饮食习惯的纳豆风味酱。王丽娜^[39]从纳豆的工艺入手, 原料上添加了花生, 优化原料浸泡时间、蒸煮时间、接种量和发酵时间等工艺参数进行发酵生产, 然后添加大蒜调味料调制成适合国人口味的蒜味花生纳豆成品。董岳峰等^[40]利用糖质含量较高的薏米与大豆混合接种纳豆芽孢杆菌, 在发酵纳豆的过程中, 薏米的糖质与大豆中较高的蛋白质转化为纳豆中碳水化合物, 减少了纳豆游离氨的形成从而纳豆口感得以改善。近年来有薏米纳豆、黑豆纳豆饮料、纳豆-茶树菇深层发酵液果冻等纳豆开发产品的报道。然而, 以上功能性食品大多处于研究试制阶段, 真正投放市场的产品报道很少。

4 食品保鲜研究方面的应用

纳豆芽孢杆菌在发酵过程中能产生杆菌肽、多粘菌素和 2,6-吡啶二羧酸等多种抗菌抑菌物质, 并且这些成分安全、无毒、高效、适用性广、性能稳定, 可以作为一种天然绿色的食品防腐剂。研究报道^[41]纳豆芽孢杆菌抗菌肽 APNT-6 对凡纳滨对虾腐败菌具有抑制作用, 在凡纳滨对虾(4±1) °C 贮藏过程中添加 APNT-6 具有保鲜效果。试验中采用纳豆芽孢杆菌抗菌肽 APNT-6 对凡纳滨对虾中假单胞菌、希瓦氏菌等 8 株腐败菌进行抑菌试验, 均有良好的抑菌效果, 但不同菌株间略有差别。凡纳滨对虾经 0.5 mg/mL 抗菌肽保鲜剂处理后, 保鲜剂组在(4±1) °C 贮藏过程中 pH、挥发性盐基氮(TVB-N)和细菌总数增加缓慢, 货架期延长了 2~3 d。另有研究证明^[42]纳豆芽孢杆菌可作为食用菌的保鲜剂, 从食用菌的色泽、香味、浑浊度、形态 4 个方面, 比较纳豆芽孢杆菌液与传统保鲜剂焦亚硫酸钠、食盐的保鲜效果, 得出纳豆芽孢杆菌液在保持食用菌的色泽和香味效果更佳, 浑浊度指标较差, 亚硫酸钠 4 个指标相对平均效果也较好; 氯化钠在香味指标中表现较差。

纳豆芽孢杆菌不仅可以用于固形食品的抑菌保鲜, 同样可应用于液体食品, 张丽靖等^[43,44]研究中表明在豆浆

中添加纳豆芽孢杆菌抗菌粗提液可以达到显著的抑菌效果,保温 24 h 的处理样品中活菌数比对照少 3 个数量级。纳豆芽孢杆菌抗菌蛋白对消毒牛奶在 4 °C 和 37 °C 贮藏时都有较好的防腐效果;在新鲜猪肉的保存中,抗菌蛋白与乳酸钠复合处理,保存至 9 d 时,样品中的细菌数比对照低 4 个数量级。

纳豆芽孢杆菌可以产生多种抗菌活性物质,研究认为,纳豆芽孢杆菌产生的聚- γ -谷氨酸可作为益生菌制剂的冻干保护剂,用 10% 的聚- γ -谷氨酸保护乳酸菌的效果明显优于 10% 的蔗糖,同时在保护长双歧杆菌、短双歧杆菌都有很好的效果^[45]。

5 在生物工程方面的应用

微生物菌种是提高发酵生产效率的关键因素之一,人们采用多种育种方法通过分离纯化出纳豆菌,对其发酵所产的纳豆激酶活力进行测定,从中筛选出产纳豆激酶活性较高的菌株用于发酵生产^[46,47]。同时对培养基等发酵条件进行优化,通过确定最佳发酵条件,获得优良菌种^[48,49]。为了减少纳豆菌发酵食品中的氨臭味,从产物代谢特点入手,研究发现纳豆芽孢杆菌发酵产物的氨味主要来自发酵过程中产生的氨和短链脂肪酸等异味物质,而氨的主要形成途径是联合脱氨基作用和转氨作用,其中的关键酶之一为谷氨酸脱氢酶(GDH)。为此,人们应用 PCR 技术扩增出纳豆芽孢杆菌 GDH 编码基因,构建表达载体对其进行体外表达,并对表达的蛋白谷氨酸脱氢酶活性进行了分析,此分析结果为进一步研究酶的活性位点,通过定点突变改变发酵菌株 GDH 酶活,生产低氨味纳豆奠定了基础^[50,51]。

近年来,研究者在纳豆激酶的分子生物学研究取得了很大的进展。黄磊等^[52,53]以纳豆芽孢杆菌 HL-1 全基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增编码信号肽、前导肽及成熟肽的序列,构得了大肠杆菌表达载体 pET28a-NK,实现了纳豆激酶基因在大肠杆菌中的表达;编码前导肽、成熟肽的序列和只编码成熟肽的序列,构得了大肠与枯草杆菌穿梭表达载体 pHT-NK,实现了纳豆激酶基因在枯草杆菌中的表达。余凤云等^[54]利用 PCR 体外扩增技术从纳豆芽孢杆菌基因组 DNA 中扩增纳豆激酶原基因,构建了纳豆激酶原基因的表达载体 pFY002,转化乳酸乳球菌 NZ9000,得到活性表达纳豆激酶的重组菌乳酸乳球菌 NZ9000/ pFY002,获得具有溶栓活性的乳酸菌,并进行相关表达产物活性分析;并且通过摇瓶培养探究诱导剂链球菌肽的浓度、温度和诱导时间对重组产酶的影响,优化菌株发酵条件,为新型溶血栓保健乳酸饮料的开发打下了基础。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种简单的单细胞真核生物,无毒素,无致病性,兼具真核表达系统的优势及原核表达系统的快速、操作方便和价格低廉的特点,

目前将酿酒酵母作为一种蛋白表达系统得到越来越广泛的应用。通过对纳豆芽孢杆菌 1.1086 进行克隆和测序,构建克隆重组子 pMD18T-NK 以及表达重组子 pYES2-NK,实现了酿酒酵母的表达,活性检测表明酿酒酵母发酵液上清液具有纤溶酶活性,但其溶栓活性比纳豆芽孢杆菌低^[55]。同时,纳豆激酶基因同样实现了在巴斯德毕赤酵母和粟酒裂殖酵母中的表达^[56]。由此说明,纳豆芽孢杆菌纳豆激酶基因能在酵母菌中表达,而要保持或提高纤溶酶活性则有待于进一步研究。

纳豆激酶基因也可以作为一种外源基因,导入植物生物反应器,使得纳豆激酶在植物果实中表达,获得具有溶血栓保健功能的水果蔬菜。韩岚等^[57]通过农杆菌渗透法将纳豆激酶基因注射到甜瓜品种河套蜜瓜果实中并实现瞬时表达,并用实时荧光定量 PCR 法和纤维蛋白平板法均检测到瞬时表达样品中具有纤溶酶活性,同样方法也实现了纳豆激酶基因在番茄中的表达。田晓玲^[58]将纳豆激酶基因构建到 pBI-121 质粒中,用冻融法导入根癌农杆菌,再通过叶盘法转化到植物反应器生菜的基因组中,用 PCR 和 RT-PCR 分析证明得到了转基因植株。还有研究报道了纳豆激酶基因在莴苣植株和烟草的瞬时表达^[59]。

6 在提高食品加工副产物附加值方面的应用

纳豆芽孢杆菌在生长过程中能够分泌多种酶,如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等,应用于食品加工副产物中,可以大大提高副产物的营养价值和保健功能,为食品加工副产物的加工提供新的开发途径。蔡凯凯等^[60,61]利用米糠作为发酵纳豆芽孢杆菌的主要培养基原料,采用酶水解工艺把米糠中的淀粉和蛋白质水解出来,作为纳豆芽孢杆菌液态发酵的碳源和氮源,制备出一种纳豆芽孢杆菌微生态制剂,纳豆芽孢杆菌活菌数可达 4.05×10^{10} cfu/g、芽孢数为 1.81×10^{10} cfu/g。邹正^[62]以啤酒糟作为发酵原料,接种纳豆芽孢杆菌进行发酵,采用 -18 °C 丙酮沉淀发酵液,制备出抗氧化肽粗品。此抗氧化肽在 5 mg 时,可以清除 75.04% 的超氧阴离子。仓义鹏等^[63]用纳豆芽孢杆菌固态发酵苹果渣制备纳豆激酶,得到尿素添加量 2.58%、培养基加水量 84.06 mL、氧化钙添加量 2.65%,纳豆激酶产率可达到 2150 IU/g。杨学娟等^[64,65]利用纳豆芽孢杆菌固态发酵低温豆粕,并对发酵豆粕的提取物进行体外及体内抗氧化活性考察。结果表明,发酵豆粕抗氧化活性强于未发酵豆粕,发酵豆粕提取物能够显著促进健康小鼠及抗生素诱导的腹泻模型小鼠肠道中厌氧菌群的生长,抑制好氧菌群的增殖,其调节肠道菌群作用强于未发酵豆粕。

7 小结

纳豆芽孢杆菌不仅可以用于生产功能性食品,还可以用于食品的保鲜、菌种的改良以及提高食品加工副产物

附加值等。但是大部分研究仅仅是在试验阶段, 而且对具体的作用机制研究不深。目前食品保鲜大都是依靠化学保鲜, 效果明显, 但对人体有一定的副作用, 纳豆芽孢杆菌绿色天然, 必然会成为未来食品保鲜行业的研究方向。通过将纳豆激酶基因在酿酒酵母、乳酸菌或嫁接到植物植株上, 可以生产更加具有保健性能的食品。此外, 经纳豆芽孢杆菌固发酵的副产物营养成分丰富, 不管是作为食品加工原料、饲料还是制作微生态制剂, 都很大程度上降低了成本, 增加了副产物的附加值。因此, 纳豆芽孢杆菌不管用于开发新型食品、还是用作保鲜剂、基因工程等方面, 都将成为研究的一个热点, 具有广阔的市场前景。

参考文献

- [1] Sonoda T, Nagata Y, Mori M, et al. Acase-control study of diet and prostate cancer in Japan :possible protective effect of traditional Japanese die t [J]. Cancer Sci, 2004 , 95(3): 238–242.
- [2] 齐凤兰, 奚锐华, 陈有容. 纳豆中营养与活性成分的分析研究[J]. 中国食物与营养, 2004, (3): 33–35.
Qi FL, Xi RH, Chen YR. Study on the nutrition and activities of natto [J]. Food Nutr China, 2004, (3): 33–35.
- [3] Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, et al. Antifibrinolytic role of a beeenom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32269.
- [4] 胡雪萍, 王萍, 孙晓鸣. 纳豆杆菌营养体及其芽孢的生物学特性比较研究[J]. 中国食品学报, 2007,7(6): 27–32.
Hu XP, Wang P, Sun XM. Studies on the biological characteristics of the *Bacillus natto* vegetative cells and its spores [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2007, 7(6): 27–32.
- [5] Dabbagh F, Negahdaripour M, Berenjian A, et al. Nattokinase: production and application [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(22): 9199–9206.
- [6] 翟金霞, 陈野. 纳豆菌生产微量生理活性物质的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 220–222.
Zhai JX, Chen Y. Studies on the trace physiological substances produced by *Bacillus subtilis* var.*natto* [J]. Food Sci, 2005, 26(1): 220–222.
- [7] Tsuji S, Tanaka K, Takenaka S, et al. Enhanced secretion of natto phytase by *Bacillus subtilis* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79(11): 1906–1914.
- [8] Cabralde-Melo FC, Borsato D, Júnior FC, et al. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis natto* by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach [J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(6): 1917–1926.
- [9] Zhou XJ, Jin EH, Li SH, et al. Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality [J]. Turkish J Vet Anim Sci, 2015, 39(2): 203–210.
- [10] Ashiuchi, Makotol, Oike, et al. Rapid purification and plasticization of d-glutamate-containing poly- γ -glutamate from Japanese fermented soybean food natto [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 116: 90–93.
- [11] 王旭冰, 姜永江. 纳豆芽孢杆菌的开发与利用[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 28–31.
Wang XB, Lou YJ. Development and application advances of *Bacillus natto* [J]. China Cond, 2010, 35(4): 28–31.
- [12] Ma YY, Liu QB, Yang HW, et al. Study on the improvement of natto-production process [J]. Adv J Food Sci Technol, 2015, 7(9): 704–708.
- [13] Ravi-Kumar M, Sandip P, Sharon JP, et al. Production, optimization and characterization of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* RJAS19 [J]. Pakistan J Biol Sci, 2014, 17(4): 529–534.
- [14] 王怡鑫, 尹宗宁, 张霞. 纳豆激酶体外活性测定及影响因素考察[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(3): 168–172.
Wang YX, Yin ZN, Zhang X. Detemination of nattokinase activityin vitro and investigation on influential factors [J]. Chin J Biochem Pharm, 2008, 29(3): 168–172.
- [15] Berenjian A, Mahanama R, Kavanagh J, et al. Nattokinase production: medium components and feeding strategy studies [J]. Chem Ind Chem Eng Quart, 2014, 20(4): 541–547.
- [16] 谭焕波, 张国俊, 徐明恺, 等. 纳豆激酶基因的克隆表达以及活性分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 195–198.
Tan HB, Zhang GJ, XU MK, et al. Cloning, expression of the nattokinase gene and the activity assay [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(18): 195–198.
- [17] 杨敏, 梅余霞, 梁运祥. 纳豆激酶粗提液抗血栓作用的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 197–200.
Yang M, Mei YX, Liang YX. Effect of nattokinase extraction on anti-thrombosis function [J]. Food Sci Technol, 2013, 38(9): 197–200.
- [18] 宁树成, 李冀, 李丹丹, 等. 纳豆激酶的体外溶栓作用研究[J]. 山东医药, 2006, 46(32): 16–17.
Ning SC, Li Y, Li DD, et al. Study of nattokinase thrombolysis role *in vitro* [J]. Shandong Med J, 2006, 46(32): 16–17.
- [19] 黄俊峰, 宋洁琼, 吴威, 等. 血栓弹力图体外评估纳豆激酶对人体凝血系统的影响[J]. 中国临床医学, 2015, 22(6): 718–721.
Huang JF, Song JQ, Wu W, et al. Assessing the effect nattokinase on human coagulation system *in vitro* by thromboelastography [J]. Chin J Clin Med, 2015, 22(6): 718–721.
- [20] Sumi H, Yanagisawa Y, Yatagal C, et al. *Bacillus natto* as an oral fibrinolytic agent: nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis natto* [J]. Food Sci Technol Res, 2004, 10(1): 17–20.
- [21] 陈茜, 汪建明, 胡可眉. 纳豆芽孢杆菌发酵液抑菌物质的提取与初步分析[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(5): 12–15.
Chen Q, Wang JM, Hu KM. Extraction and preliminary analysis of antibacterial substance from *Bacillus natto* fermentation [J]. Food Ferment Technol, 2014, 50(5): 12–15.
- [22] 王继伟, 葛英亮, 于晋, 等. 纳豆芽孢杆菌次生代谢产物抑菌功能的研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 94–100.
Wang JW, Ge YL, Yu J, et al. Study on bacteriostatic effect of *Bacillus natto* metabolic product [J]. Food Mach, 2013, 29(3): 94–100.
- [23] 曾祥燕, 赵良忠. 纳豆芽孢益生菌的筛选鉴定及耐受性抑菌能力的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 35(1): 160–165.
Zeng XY, Zhao LZ. Study on screening and identification, endured abilities and restraining the nocuous abilities of *Bacillus subtili natto* [J]. Food Ind Sci Technol, 2015, 35(1): 160–165.
- [24] Lee BH, Lai YS, Wu SC. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis*

- (natto)-fermented pigeon pea [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(4): 750–757.
- [25] Sachie IBE, Yoshida K, Kumada K, *et al.* Antihypertensive effects of natto, a traditional Japanese fermented food, in spontaneously hypertensive Rats [J]. *Food Sci Technol Res*, 2009, 15(2): 199–202.
- [26] 祁红兵, 宋军霞. 纳豆芽孢杆菌发酵豆渣上清液的抗氧化功能研究[J]. *中国食品添加剂*, 2014, (3): 104–108.
Qi HB, Song JX. Study of antioxidation capacity in fermented beandreg's supernatant of *Bacillus natto* [J]. *China Food Addit*, 2014, (3): 104–108.
- [27] 祁红兵, 宋军霞, 陈钧. 纳豆芽孢杆菌米糠发酵物中抗氧化成分分析[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(12): 7414–7416, 7419.
Qi HB, Song JX, Chen J. Study on the antioxidant component in rice bran fermentation of *Bacillus natto* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2012, 40(12): 7414–7416, 7419.
- [28] 朱丹, 邹水洋, 康建雄. 纳豆芽孢杆菌液态发酵生产 γ -聚谷氨酸[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(7): 151–154.
Zhu D, Zou SY, Kang JX. Production of poly- γ -glutamic acid by submerged fermentation with *Bacillus subtilis natto* [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2012, 33(7): 151–154.
- [29] Nie GJ, Zhu ZB, Liu F, *et al.* Co-production of nattokinase and poly(γ -glutamic acid) under solid-state fermentation using soybean and rice husk [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2015, 58(5): 718–724.
- [30] Xu X, Huang Q, Mao YL, *et al.* Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis (natto)* B4 spores on murine macrophages [J]. *Microbiol Immunol*, 2012, 56(12): 817–824.
- [31] Jae Ku Kang, Hyo Jin Kang, Ji Hye Seo, *et al.* Effects of fermented turmeric (*Curcuma longa*) by *Bacillus natto* supplementation on liver function and serum lipid parameters in mice [J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2009, 38(4): 38–42.
- [32] 甄珍, 刘晓兰. 甜味、咸味纳豆制备方法的研究[J]. *中国调味品*, 2015, 40(5): 64–67.
Zhen Z, Liu XL. Research on preparation method of sweet and salty natto [J]. *China Cond*, 2015, 40(5): 64–67.
- [33] 金爽, 谭金燕, 白秀云, 等. 响应面法优化固载纳豆菌发酵鹰嘴豆工艺[J]. *食品与发酵科技*, 2016, 52(3): 28–32.
Jin S, Tan JY, Bai XY, *et al.* Optimization of the fermentation of chickpea with immobilized *Bacillus natto* by response surface methodology [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2016, 52(3): 28–32.
- [34] 麻秀芳, 李小进, 董岳峰, 等. 纳豆系列咀嚼片产品工艺研究[J]. *食品工程*, 2014, (2): 29–31.
Ma XF, Li XJ, Dong YF, *et al.* Research on preparation technology on natio series chewable tablets [J]. *Food Eng*, 2014, (2): 29–31.
- [35] 赵倩楠. 四种豆子纳豆发酵工艺条件的研究及产品开发[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
Zhao QN. Fermentation conditions for four kinds of legumes natto and product development [D]. Xi'an: Shanxi University Science and Technology, 2014.
- [36] 葛英亮, 谢玉锋, 赵全, 等. 纳豆发酵型饮料的研制[J]. *饮料工业*, 2013, 16(5): 29–30.
Ge YL, Xie YF, Zhao Q, *et al.* A study on a fermented natto beverage [J]. *Bever Ind*, 2013, 16(5): 29–32.
- [37] 杨艳. 纳豆红曲胶囊的活性成分及其降脂效应研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
Yang Y. Study on the active constituents and lipid-lowering effect of natto monascus capsules [D]. Fuzhou: Fujian medical University, 2014.
- [38] 王薯文, 马珮霞, 姜媛媛, 等. 纳豆酱的研制[J]. *中国调味品*, 2008, (3): 57–58.
Wang SW, Ma SX, Jiang YY, *et al.* Study on the natto jiang [J]. *China Cond*, 2008, (3): 57–58.
- [39] 王丽娜, 付华峰, 张永清, 等. 花生纳豆的研究及风味改良[J]. *中国调味品*, 2014, 39(6): 9–12.
Wang LN, Fu HF, Zhang YQ, *et al.* Research and flavor improvement of peanut natto [J]. *China Cond*, 2014, 39(6): 9–12.
- [40] 董岳峰, 麻秀芳, 李晓艳, 等. 薏米纳豆发酵工艺及其营养成分分析[J]. *中国酿造*, 2014, 33(12): 142–145.
Dong YF, Ma XF, Li XY, *et al.* Fermentation process and nutritional components of coixseed-natto [J]. *China Brew*, 2014, 33(12): 142–145.
- [41] 王东, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌肽 APNT-6 对凡纳滨对虾的低温保鲜效果[J]. *水产学报*, 2012, 36(7): 1133–1139.
Wang D, Sun LJ, Wang YL, *et al.* Effect of antimicrobial peptide APNT-6 produced by *Bacillus natto* on fresh-keeping of *Litopenaeus vannamei* at low temperature [J]. *J Fish China*, 2012, 36(7): 1133–1139.
- [42] 杨激心. 纳豆芽孢杆菌对食用菌保鲜作用的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2012.
Yang JX. *Bacillus subtilis natto* the preservation effect of media of edible fungi [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2012.
- [43] 张丽靖, 陈志良, 杨郁. 纳豆菌体外抑制大肠杆菌的培养基优化[J]. *生物技术*, 2009, 19(1): 40–42.
Zhang LJ, Chen ZL, Yang Y. Optimization of medium for inhibition of *Bacillus natto* to *Escherichia coli* in vitro [J]. *Biotechnology*, 2009, 19(1): 40–42.
- [44] Weng TM, Chen MT. Effect of drying methods on γ -PGA, isoflavone contents and ace inhibitory activity of natto (a fermented soybean food) [J]. *J Food Proc Pres*, 2012, 36(6): 483–488.
- [45] Bhat AR, Irerere VU, Bartlett T, *et al.* *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria [J]. *AMB Express*, 2013, 3(1): 36–44.
- [46] 方祥, 周焕彩, 王忠霞. 纳豆菌分离、鉴定及纳豆激酶高产菌株的正向选育[J]. *食品工业与发酵*, 2006, 32(2): 25–28.
Fang X, Zhou HC, Wang ZX. Isolation and forward breeding of *Bacillus subtilis natto* with high fibrinolytic activity nattokinase [J]. *Food Ind Ferment*, 2006, 32(2): 25–28.
- [47] 刘新梅, 高宇, 赵静. 纳豆菌原生质体制备与再生条件的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(5): 231–236.
Liu XM, Gao Y, Zhao J. Study on conditions for protoplast production and regeneration of *Bacillus subtilis natto* [J]. *Food Sci*, 2007, 28(5): 231–236.
- [48] 蔡玉华, 胥振国. 纳豆激酶高产菌株发酵条件的优化[J]. *中国生物制品学*, 2014, 27(11): 1481–1484.
Cai YH, Xu ZG. Optimization of fermentation conditions of nattokinase high-producing strain [J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(11): 1481–1484.
- [49] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(10): 22–25.
Yang Y, Zhang LJ. Amachi. Selection of high nattokinase-producing strains and optimization of the fermentation conditions [J]. *Mod Food Sci*

- Technol, 2007, 23(10): 22–25.
- [50] 陈丽丽, 潘玉兰, 张建华. 纳豆芽孢杆菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆、表达及酶活性测定[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(1): 82–86.
Chen LL, Pan YL, Zhang JH. Gene cloning, expression and enzyme activity assay of a glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis natto* [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci), 2010, 28(1): 82–86.
- [51] Kamada M, Hase S, Fujii K, *et al.* Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of bacillus subtilis strains isolated from non-salted fermented soybean foods. [J]. PLoS One, 2015, 10(10): 1–21.
- [52] 黄磊, 谢玉娟, 李申, 等. 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 199–202.
Huang L, Xie YJ, Li S, *et al.* Molecular clone and expression of nattokinase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Food Sci, 2007, 28(5): 199–202
- [53] He N, Peng CG, Wei LJ, *et al.* Expression of nattokinase in *Escherichia coli* and renaturation of its inclusion body. [J]. J Biotechnol, 2016, 16(4): 265–267.
- [54] 余凤云, 冯浩, 许芳, 等. 具有溶栓活性的重组乳酸乳球菌的构建[J]. 中国酿造, 2011, (1): 100–103.
Yu FU, Yeng H, Xu F, *et al.* Construction of recombinant *Lactococcus lactis* with fibrinolytic activity [J]. China Brew, 2011, (1): 100–103.
- [55] 王开敏, 赵敏, 王福新, 等. 纳豆激酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 51–56.
Wang KM, Zhao M, Wang FX, *et al.* Expression of nattokinase gene in *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2009, 9(4): 51–56.
- [56] 敬俊锋, 陈斌, 李莹, 等. 纳豆激酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 生物学, 2012, 28(5): 55–57, 59.
Jing JF, Chen B, Li Y, *et al.* Cloning of nattokinase gene and its expression in *Pichia pastoris* [J]. J Biol, 2012, 28(5): 55–57, 59.
- [57] 韩岚, 王欢, 王佳琪. 密码子优化的纳豆激酶基因在番茄果实中的瞬时表达 [J]. 内蒙古大学学报, 2016, 17(1): 79–85.
Han L, Wang H, Wang JQ, *et al.* Transient expression of codon optimized nattokinase genes in tomato fruits [J]. J Inner Mongolia Univ (Nat Sci Edit), 2016, 17(1): 79–85.
- [58] 田晓玲. 纳豆激酶基因转化生菜的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
Tian XL. Study of transformation of nattokinase into lettuce [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007.
- [59] 刘靓蕾, 张妍, 孙晓蕾, 等. 人工合成的纳豆激酶基因转化烟草的研究 [J]. 生物技术通报, 2014, (10): 94–100.
Liu JL, Zhang Y, Sun XL, *et al.* Research of transferred synthetic nattokinase gene in tobacco genome [J]. Biotechnol Bull, 2014, (10): 94–100.
- [60] 蔡凯凯. 以米糠为基质纳豆芽孢杆菌微生态制剂的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
Cai KK. Research on *Bacillus natto* microecological preparation by using rice bran as the matrix [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013.
- [61] 祁红兵, 陈玉栋, 陈钧. 纳豆芽孢杆菌发酵米糠提取物的合生素研制 [J]. 食品科学, 2010, (6): 96–100.
Qi HB, Chen YD, Chen J. Optimization of formulation of compound lyophilization protectant for production of synbiotics from supernatant of *Bacillus natto* fermented rice bran [J]. Food Sci, 2010, (6): 96–100.
- [62] 邹正. 以啤酒糟为基质发酵纳豆芽孢杆菌及其抗氧化肽研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012
Zou Z. Studies on *Bacillus natto* and its oxidation peptide by brewer's spent grain fermentation [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.
- [63] 仓义鹏, 张宏志, 董明盛. 苹果渣固态发酵产纳豆激酶的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, (15): 181–185.
Cang YP, Zhang HZ, Tong MS. Optimization of fermentation conditions for nattokinase production in solid-state fermentation by *Bacillus subtilis natto* using apple pomace as substrate [J]. Food Sci, 2010, (15): 181–185.
- [64] 杨学娟. 纳豆芽孢杆菌固体发酵低温豆粕的功能活性及机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.
Yang XJ. Activities and mechanisms of low-temperature soybean meal solid-fermented by *Bacillus natto* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2013.
- [65] 令狐青青, 张雪, 童晓倩, 等. 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)发酵鲑鱼碎肉的工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 148–152.
Linghu QQ, Zhang X, Tong XQ, *et al.* Optimization of fermentation conditions of minced squid meat by *Bacillus natto* [J]. Food Sci, 2015, 36(19): 148–152.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



李梦丹, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。
E-mail: 499235712@qq.com



陈力力, 教授, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。
E-mail: chenlili001@tom.com