

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.07

FGM 发酵黄芪液安全性初步评价

王 恒¹, 张 宏², 张 凯³, 王 磊³, 张 康³, 马玉俊³, 李建喜³, 杨孝朴^{1*}, 张景艳^{1,3*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省兽药饲料监察所, 兰州 730000;

3. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050)

[收稿日期] 2020-02-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0049-08 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为了评价 FGM 发酵黄芪液的安全性, 本实验用 FGM 菌发酵黄芪液及其发酵菌株 FGM 菌悬液经口灌胃进行小鼠急性毒性试验, 试验分为 FGM 活菌组 (FGM)、FGM 发酵液组 (FAL)、阴性对照组 (NG), 分别连续灌胃 3 d, 每天 2 次, 7 d 后处死小鼠, 解剖观察。结果显示, 试验各组小鼠无中毒反应和死亡。依据小鼠一般体征评价, 各组试验小鼠精神状态良好, 食欲正常, 可判定为 I 级。解剖小鼠后, 脏器未发现病变; FGM 组、FAL 组与阴性对照组相比, 小鼠体重, 脏器指数、血液指标无显著性差异 ($P > 0.05$); 对主要脏器病理组织切片显微观察, 各组小鼠无明显的病理变化。研究表明, FGM 菌株及其发酵黄芪液饲喂小鼠, 无毒副作用和不良反应。

[关键词] 发酵黄芪液; FGM 菌株; 安全性

Preliminary Safety Evaluation of the Fermented Astragalus Liquid by FGM Strain

WANG Heng¹, ZHANG Hong², ZHANG Kai³, WANG Lei³, ZHANG Kang³, MA Yu-jun³,

LI Jian-xi³, YANG Xiao-pu^{1*}, ZHANG Jing-yan^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. The monitoring institute of Veterinary drug and feed of Gansu province, Lanzhou 730000, China;

3. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: YANG Xiao-pu, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn; ZHANG Jing-yan, E-mail: zwzh1223@126.com

Abstract: In order to evaluate the safety of the fermented Astragalus liquid by FGM strain, The mice were divided into 3 groups which include FGM group (FC), the fermented Astragalus liquid group (FAL) and negative control group (NC), were administrated orally with Astragalus fermentation, FGM stain and normal saline. The mice

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31602101); 中国农业科学院基本科研业务费专项所级统筹项目 (1610322020013); 中国农业科学兰州畜牧与兽药研究所科技创新工程所级重点任务 (CAAS-LMY-02); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目 (GNSW-2016-12)

作者简介: 王 恒, 硕士研究生, 从事兽医方向研究。

通讯作者: 杨孝朴, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn; 张景艳, E-mail: zwzh1223@126.com

were sacrificed after 7 days of continuous gavages for anatomical observation. The results showed the mice in all groups didn't have any toxic reaction and death. According to the standard of general health appearance score of mice, the mental state and appetite of tested mice was normal, and the health level of tested mice was judged as I level. There were no obvious pathological changes for anatomic observation on mice, and no significant difference in body weight, viscera index and blood index between FAL, FC and NC ($P > 0.05$). The histological sections of the main organs were observed microscopically without obvious pathological changes. The test showed that the fermented Astragalus liquid and its fermentation strains don't have no side effects and adverse reactions on mice as feed additive.

Key words: fermented Astragalus liquid; FGM strain; security

发酵(Fermentation)是一种从原料或低级底物中产生高价值产品的微生物驱动过程。更具体地说,发酵在微生物酶的作用下分解或转化非所需底物为可共处的成分,通过生产和改进具有生物活性的化合物,进而改善底物性质^[1]。传统中药发酵一般多在天然的条件下去进行的,而现在的中药发酵制药技术是在充分吸收了近几年新兴的微生物生态学和生物工程学的研究成果而逐渐形成的。其先进发酵工艺特点是:以优选的有益菌群中的一种或几种,加入中药提取液中,再按照现代发酵工艺制成产品,它是一种含有中药活性成分、菌体及其代谢产物的全组分发酵液的新型中药发酵加工制剂^[2]。中药发酵具有可使活性成分大量释放、产生新的活性成分、降低毒副作用等优点。同时,乳酸菌具有巨大的生物转化功能,菌体本身和其代谢产物也具有很好的益生特性。因此,开发新型乳酸菌和中药益生元微生物制剂十分必要并具有广阔前景。

实验利用分离于土鸡盲肠的厌氧菌株 FGM (GenBank accession number JX435470, 专利号: ZL20120141827.5) 为发酵菌株,在体外建立了发酵黄芪及多糖提取的技术工艺,结果显示多糖提取率是发酵前的 2.7 倍^[3,4]。结合 16S rDNA 序列分析、形态学观察及生理生化鉴定,确定 FGM 菌株为芽孢杆菌纲,乳杆菌目,链球菌科,链球菌属非解乳糖链球菌(*Streptococcus*)^[5]。目前研究表明,发酵黄芪具有免疫调节^[6,7]、保肝^[8]、抗氧化^[9,10]、抗糖尿病^[11]、抗肿瘤^[12]及抗疲劳保健^[13]等的活性。此外,秦俊杰^[14]等发现,黄芪和党参发酵产物具有调

节黄羽肉鸡生化指标的作用,对机体生理机能和促进生长发育方面具有实践意义。因此,为进一步开发发酵黄芪液和发酵黄芪多糖产品,对鸡肠道源 FGM 菌株及黄芪发酵物进行安全性评价是非常有必要的。本试验对 FGM 菌液和 FGM 发酵黄芪液进行了急性毒性试验,测定了小鼠体重、脏器指数、血常规以及病理组织学观察,旨在明确 FGM 发酵黄芪液的安全性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 厌氧培养箱 1029 型((Thermo Fisher 公司);Sysmex pocH-100 iv 全自动三分类血液分析仪(日本希森美康株式会社);Leica 全自动组织切片系统(德国 Leica 公司);奥林巴斯研究级倒置显微镜 1X71(日本奥林巴斯株式会社)。苦味酸、生理盐水、10% 中性福尔马林、石蜡(熔点 52~54℃、54~56℃)、梯度酒精、冬青油、二甲苯、苏木素、伊红、中性树胶等。

1.2 试验动物 清洁级昆明小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半,购自中国农业科学院兰州兽医研究所;全价小鼠颗粒饲料购于兰州大学 GLP 试验楼。

1.3 菌悬液和发酵液的制备 快速复苏冻存的菌株 FGM,接种于 50 mL 的 MRS 肉汤中,37℃ 厌氧培养 24 h。将复壮的细菌按 2%(v/v)的量接种到新的 MRS 肉汤中,37℃ 厌氧培养。用血细胞计数器对细菌计数,调整菌液浓度为 10^9 CFU/mL,使菌体均匀分散,制成菌悬液备用。

菌株 FGM 活化传 3 代后分别按体积分数 3%(菌量约 4×10^8 个/mL)的接菌量接入 100 mL 发

酵培养基(已用 Na₂CO₃ 调初始 pH 值至 7.4)中, 100 r/min、37 ℃ 厌氧发酵培养 48 h。发酵结束后, 取发酵液备用。

1.4 试验动物分组及观察指标 常规观察 5 d 后, 将小鼠随机分为 3 组:FGM 活菌组、FGM 发酵液组、阴性对照组。每组 10 只,雌雄各半。禁食 12 h 称重,各组小鼠每次灌胃 0.5 mL,连续 3 d,观察 7 d,阴性对照组同时给予等量的生理盐水。依据表 1 的评判标准记录小鼠的日常采食饮水、死亡情

况、被毛色泽、精神状态、粪便性状和精神状况等表现。在试验第 8 d,称取各组小鼠体重,对比试验前后小鼠体重变化;摘眼球采血,肝素钠抗凝全血后,检测血液生理指标:白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞比容(HCT)、平均血红蛋白浓度(MCHC);剖检小鼠,观察各组织脏器的外观和颜色等特征,对心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏进行称重,并计算脏器系数(脏器系数=脏器重量×100/体重)。

表 1 小鼠一般健康体征外观评价

Tab 1 Features of general health appearance score	
一般健康表现	等级
小鼠两眼有神,被毛光洁,对刺激敏感,对环境感兴趣	I
被毛微乱,失去光泽,小鼠仍然警觉活跃	II
被毛显著凌乱,部分成簇,小鼠不再警觉活跃,对笼外环境缺少兴趣,当触摸时出现强力呼吸体征	III
小鼠弯腰驼背,困倦,对环境毫无兴趣,被毛凌乱成丛	IV
小鼠对刺激无反应,被毛成“瓶刷”状,站立不稳,小鼠弯腰、倦怠、嗜睡,触摸皮毛、爪子反应麻木	V

1.5 病理学检查 取心脏、肝脏、脾脏、肾脏和小肠等脏器组织,用 10 % 的中性福尔马林溶液浸泡固定脏器,制作石蜡切片,苏木精-伊红(H.E.)染色后,进行病理组织学检查。

1.5.1 组织切片制备方法

1.5.1.1 取材与固定 用锐利的刀片将脏器组织修为 5×5×3 mm 左右的组织块。经生理盐水清洗后,用纱布包裹小心放入 10 % 中性福尔马林中进行固定,做好各组标记。

1.5.1.2 脱水与透明 取出固定好的组织块,装入包埋盒,流水缓慢冲洗 3 h,置换出组织中的福尔马林固定液,然后将包埋盒放入盛有不同浓度乙醇的脱水缸中,进行逐级梯度脱水,脱水步骤依次为:

70% 乙醇 I 60 min→70 % 乙醇 II 60 min→80 % 乙醇 I 过夜→80 % 乙醇 II 60 min→90 % 乙醇 I 60 min→90 % 乙醇 II 60 min→95 % 乙醇 I 60 min→95 % 乙醇 II 60 min→100 % 乙醇 I 60 min→100 % 乙醇 II 60 min→100 % 乙醇 III 60 min 脱水步骤完成后,放入冬青油中过夜,对组织块进行透明处理,透明过程的具体步骤如下:

冬青油 I 95 min→冬青油 II 95 min→冬青油 III 过夜

1.5.1.3 浸蜡与包埋 透明操作结束后,将包埋盒取出,放入融好的石蜡中进行浸蜡处理,操作步骤依次为:

石蜡 I (熔点 52 ~ 54 ℃):二甲苯(1:1) 60 min→石蜡 II (熔点 54 ~ 56 ℃) 60 min→石蜡 III (熔点 54 ~ 56 ℃)60 min

将浸好蜡的组织块从包埋盒中取出,放入包埋槽内,快速加入 54 ~ 56 ℃ 的石蜡,进行组织包埋。包埋操作要快,以防止组织块因局部冷却速度不同、温度不均而与蜡块出现分层,影响切片质量。

1.5.1.4 修块与切片 从包埋槽中取出冷却的蜡块,简单修整,去掉组织周围多余的石蜡,将蜡块固定在切片机的卡槽中,进行切片操作,先进行 20 μm 粗切,使蜡块表面平整光滑,然后再调整切片厚度到 4 ~ 6 μm,连续切片。用小镊子夹起切出的组织片,小心放入摊片烤片机的水槽内,使蜡片在 45 ~ 49 ℃ 的温水中缓慢展开,然后用经多聚赖氨酸处理过的载玻片轻轻挑起组织切片,注意组织

部分不要重叠,不要有气泡,将载玻片放在摊片烤片机的烤片区,37℃烤片过夜。

1.5.1.5 脱蜡 二甲苯Ⅰ10 min→二甲苯Ⅱ10 min→100%乙醇Ⅰ5 min→100%乙醇Ⅱ5 min→95%乙醇Ⅰ5 min→95%乙醇Ⅱ5 min→80%乙醇5 min→70%乙醇5 min→蒸馏水2 min

1.5.1.6 染色封片镜检 染色后用滤纸擦去组织周围多余二甲苯,在组织上滴一滴中性树胶,盖上盖玻片(避免气泡),37℃烤片过夜,最后在显微镜下观察组织病理变化情况。

1.5.2 H.E. 染色方法 苏木素5 min→蒸馏水冲洗10 s→分化(1%盐酸乙醇,用70%乙醇配制)10 s→自来水返蓝15~20 min→水溶性伊红3 min→70%乙醇5 s→80%乙醇10 s→95%乙醇Ⅰ2 min→95%乙醇Ⅱ2 min→100%乙醇Ⅰ5 min→100%乙醇Ⅱ5 min→100%乙醇Ⅲ5 min→二甲苯

Ⅰ10 min→二甲苯Ⅱ10 min→二甲苯Ⅲ5 min

1.6 数据统计方法 所有数据均以平均值±标准差表示,应用SPSS 17.0软件进行方差分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 死亡情况与一般体征 在试验期间,各组小鼠采食采水正常,两眼有神,警惕性高,运动情况和精神状态良好,无异常分泌物出现,且没有死亡病例。对照表1的评判标准可知,各组小鼠的一般健康体征外观等级相同,均为Ⅰ级。

2.2 体重变化 如表2所示,各组小鼠体重增长和波动在正常范围内,其中阴性对照组体增重最高,FGM发酵液组和活菌组次之。但是通过方差分析可知,各实验组小鼠的体重变化差异不显著($P>0.05$)。因此,判定FGM菌株及其发酵黄芩液对小鼠体重无影响。

表2 菌悬液和发酵液对小鼠体重的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 2 The effect of bacterial suspension and fermentation broth on the mice body weight			
组别	前体重(g)	后体重(g)	体增重(g)
阴性对照组	26.50±1.79	35.10±3.89	8.60±2.67
FGM 活菌组	23.79±2.25	31.45±5.32	7.66±3.32
FGM 发酵液组	24.41±1.96	32.95±4.88	7.99±3.96

2.3 脏器系数 剖解后肉眼观察试验小鼠的脏器,发现各组小鼠主要器官色泽正常,位置、形状与体积均正常,主要器官之间无肿大、粘连、包块等病理变化,胃、肠未见溃疡和出血点。如表3所示,各组小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及胸腺的脏

器系数,与阴性对照组相比差异均不显著($P>0.05$),且均在正常范围内。此外,FGM活菌及发酵液组小鼠免疫器官(脾脏和胸腺)的脏器系数高于阴性对照组。结果提示,FGM菌株及其发酵黄芩液对小鼠组织无不良影响。

表3 菌悬液和发酵液对小鼠脏器系数的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 3 The effects of bacterial suspension and fermentation broth on the organ index of mice						
组别	心脏系数	肝脏系数	脾脏系数	肺脏系数	肾脏系数	胸腺系数
阴性对照组	0.45±0.04	6.04±0.58	0.34±0.06	0.66±0.10	1.17±0.08	0.41±0.10
FGM 活菌组	0.53±0.08	6.62±0.94	0.48±0.13	0.73±0.06	1.32±0.18	0.48±0.17
FGM 发酵液组	0.46±0.05	4.56±1.56	0.42±0.08	0.68±0.07	1.23±0.12	0.51±0.17

2.4 血液学指标 外周血红白细胞、红细胞相关参数是反映小鼠免疫系统和炎症损伤的重要指标。本试验中,FGM 菌悬液组和 FGM 发酵液组小鼠血液中 RBC、WBC、HGB、HCT、MCHC 数值有一定波

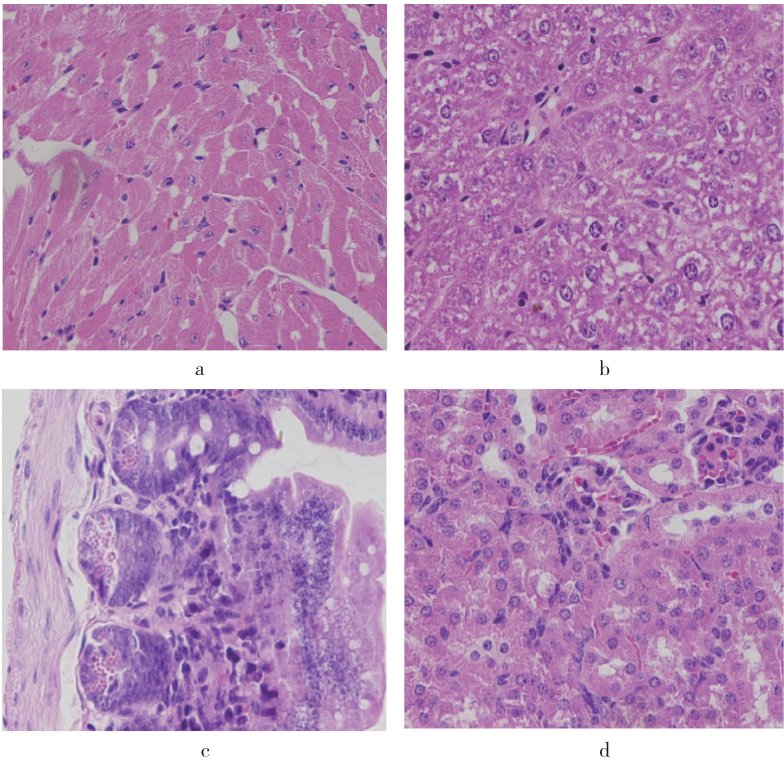
动,但与阴性对照组小鼠相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具体统计结果见表 4。结果提示,FGM 菌株及其发酵黄芩液对小鼠血液主要成分无不良影响。

表 4 菌悬液和发酵液对小鼠血液学指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 4 The effects of bacterial suspension and fermentation broth on the haematological index of mice					
组别	RBC($10^{12}/L$)	WBC($10^9/L$)	HGB(g/L)	HCT	MCHC(g/L)
FGM 阴性对照组	8.84 ± 2.01	3.24 ± 2.41	142.88 ± 11.69	0.46 ± 0.10	290.89 ± 7.94
FGM 活菌组	8.54 ± 1.73	2.67 ± 0.92	138.38 ± 10.10	0.44 ± 0.10	294.78 ± 12.09
FGM 发酵液组	8.30 ± 1.16	2.45 ± 1.01	134.00 ± 18.19	0.44 ± 0.06	300.62 ± 6.54

2.5 病理变化 文中图 1、图 2、图 3 分别为阴性对照组、FGM 活菌组和 FGM 发酵液组的组织切片镜检结果。由图可知:各试验组小鼠心脏组织结构清晰完整,心肌纤维排列整齐,心肌纤维细胞分布均匀,肌纤维染色均匀,未发现异常病变;肝脏结构正常,肝细胞

呈梁索状,以中央静脉为中心放射状整齐排列,无充血水肿和变性坏死现象;肾脏组织正常,肾小体及肾小管结构完整,细胞核分布均匀,无水肿和出血现象。肠道绒毛结构完整,固有层和粘膜上皮结构正常,中央脉管束结构清晰,镜下无可见病理变化。

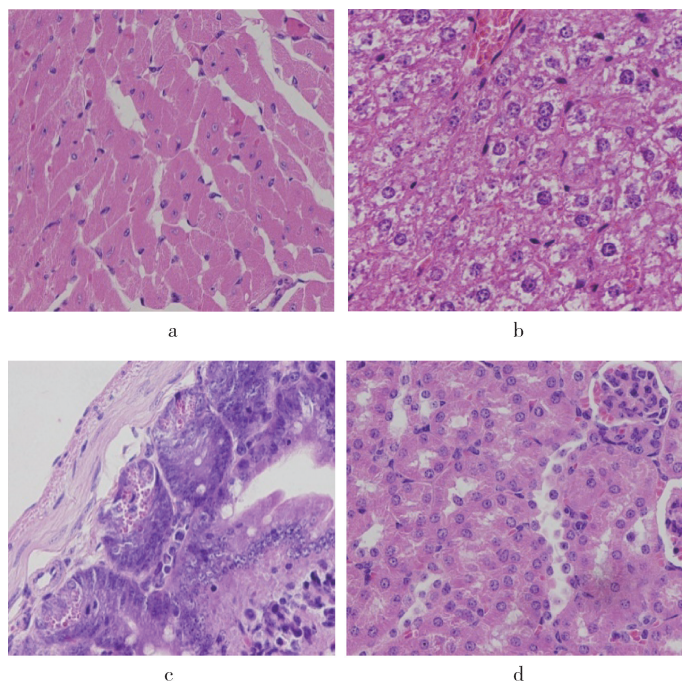


a:心脏;b:肝脏;c:小肠;d:肾脏。

a: Heart; b: Liver; c: Small intestine; d: Kidney.

图 1 阴性对照组主要脏器病理切片 (H. E × 400)

Fig 1 Pathological sections of major organs on NG

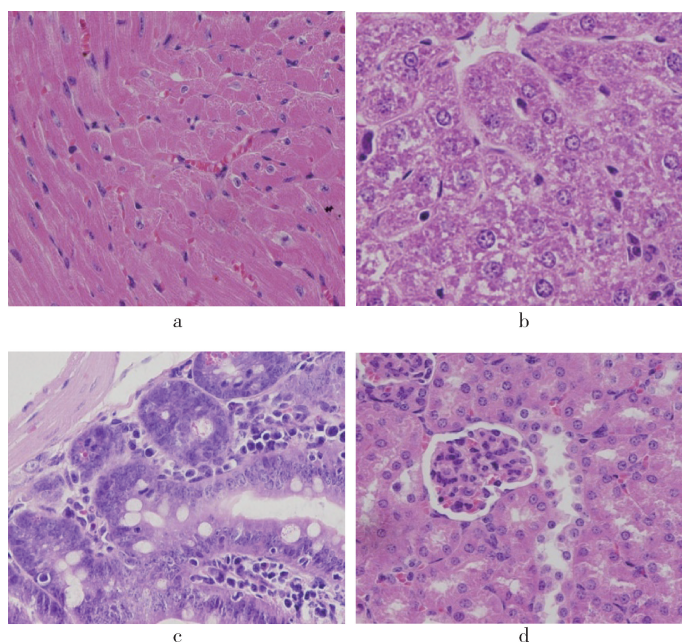


a: 心脏; b: 肝脏; c: 小肠; d: 肾脏。

a: Heart; b: Liver; c: Small intestine; d: Kidney.

图 2 FGM 活菌组主要脏器病理切片 (H. E $\times 400$)

Fig 2 Pathological sections of major organs on FGM



a: 心脏; b: 肝脏; c: 小肠; d: 肾脏。

a: Heart; b: Liver; c: Small intestine; d: Kidney.

图 3 FGM 发酵液组主要脏器病理切片 (H. E $\times 400$)

Fig 3 Pathological sections of major organs on FAL

3 讨论与结论

微生物转化型中兽药研发和应用的首要前提和必备条件应是安全性好、无毒副作用。当然,通过微生物二次分解转化后的发酵中药也应具备优良的生物学活性和功效。由于此类产品中含有活的细菌菌株,因此在对发酵产品进行安全性评价的同时,也应该考虑发酵菌株的致病性。益生性菌株的安全性是评价菌株生物学特性的关键,可以通过脏器指数、半数致死量、体重变化、菌株易位等试验进行评价^[15,16]。王苇^[17]等对筛选出的优良芽孢杆菌进行不同剂量菌液分别以不同方式感染小鼠,观察各脏器病理变化和测定主要脏器指数,结果显示小鼠脏器无病变,脏器指数无显著差异($P > 0.05$)。目前,对植物乳杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌等兽用益生菌的安全性研究已有报道^[18-20]。

非解乳糖链球菌最早由 Farrow^[21]等从猪肠道和鸡粪便中分离发现,明确该类细菌为无鞭毛、无溶血性、成对或链状排列、兼性厌氧的乳白色革兰氏阳性球菌。随后,它被证明是鸡、猪、狗、鸭、鸽子和鱼等动物肠道中的主要可培养细菌^[22-23],但是对非解乳糖链球菌的安全性评价尚未见报道。利用土鸡盲肠源非解乳糖链球菌 FGM 菌株制备的发酵型黄芪既保留了 FGM 菌株的活性,同时还提升了黄芪的生物学活性。因此,该产品在改善畜禽早期肠道菌群结构、提高抗病性方面具有很好的应用前景。有鉴于此,本研究从发酵菌株和发酵产物 2 个方面入手,通过比较 FGM 活菌组、FGM 发酵黄芪液组小鼠与阴性对照组小鼠的体增重、血液生理指标和脏器指数的变化,并结合剖检和病理组织切片观察,明确了 FGM 发酵黄芪液及其发酵菌株对小鼠生长情况、血液成分及脏器均无不良影响,安全无毒。本研究为发酵黄芪的开发和应用提供了临床前毒理学背景信息,也填补了有关非解乳糖链球菌的安全性信息,后续研究将依照兽药研究技术指导进一步开展 FGM 发酵黄芪液的亚慢性毒性试验,完善该产品的安全性评价。

FGM 发酵黄芪液及其发酵菌株灌服小鼠,对

小鼠生长发育情况和主要脏器均无不良影响和毒副作用,表明非解乳糖链球菌 FGM 对小鼠无治病性、可用为发酵菌株;FGM 发酵黄芪液安全、可饲喂。

参考文献:

- [1] Hussain A, Bose S, Wang J H, *et al.* Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines [J]. Food Research International. 2016. 81: 1-16.
- [2] 王玉阁,曹军. 微生物发酵制药的研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2006,27(2):196.
Wang Y G, Cao J. Pharmaceutical research by microbial fermentation [J]. Journal of Qiqihar Medical College, 2006, 27(2):196.
- [3] 朱新术,杨志强,李建喜,等. 发酵黄芪的乳酸菌的驯化及其与黄芪相互作用研究[J]. 中国微生态学杂志,2008,20(5):450-451.
Zhu X S, Yang Z Q, Li J X, *et al.* Acclimation of *Lactobacillus* for fermenting radix astragalus and studies on the interaction between acclimated bacterial strains and radix astragalus [J]. Chinese Journal of Microecology, 2008, 20(5):450-451.
- [4] 尚利明,秦哲,张景艳,等. 种子液传代次数对益生菌 FGM 株发酵黄芪转化多糖的影响[J]. 中国畜牧兽医,2014(6):136-139.
Shang L M, Qin Z, Zhang J Y, *et al.* Effect of FGM strain passage times on the transformation of *Astragalus* polysaccharide from *Astragalus membranaceus* by fermentation [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(6):136-139.
- [5] 王龙. 发酵黄芪多糖的菌种生物学特性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
Wang L. Research on the biological characteristics of the strains for fermenting *Astragalus* polysaccharides [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [6] 王晓波,刘殿武,郭丽莉,等. 发酵黄芪对 BALB/C 小鼠免疫功能及细胞因子的作用[J]. 时珍国医国药,2010,(07):1849-1850.
Wang X B, Liu D W, Guo L L, *et al.* Effects of fermented astragalus on immune function and cytokines in BALB/C mice [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(07):1849-1850.
- [7] 张凯,李建喜,杨志强,等. 发酵型黄芪提取物对肉仔鸡生产性能及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(05):31-34.

- Zhang K, Li J X, Ynag Z Q, *et al.* Effects of fermented astragalus extract on performance and blood biochemical indexes of broilers[J]. Chinese journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2011, 38(05):31–34.
- [8] 陈雷, 张建梅, 孙合美, 等. 乳酸菌-芽孢菌发酵黄芪对小鼠免疫功能作用的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, (01):126–129.
- Chen L, Zhang J M, Sun H M, *et al.* Study on immune function of astragalus fermented by lactobacillus and bacillus in mice[J]. Chinese journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2014, (01):126–129.
- [9] 秦哲. 黄芪发酵后主要有效成分变化分析及多糖对大鼠实验性肝纤维化影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- Qin Z. Changes of main active components of astragalus after fermentation and effects of polysaccharides on experimental liver fibrosis in rats [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2012.
- [10] 张凯, 王学智, 李建喜等. 赤芍、何首乌和发酵黄芪提取物抗氧化作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, (15):125–127.
- Zhang K, Wang X Z, Li J X, *et al.* Study on antioxidant activity of extract of radix paeoniae alba, polygonum multiflorum and fermented astragalus[J]. Heilongjiang Animal Husbandry & Veterinary science, 2013, (15):125–127.
- [11] 刘必旺, 许凯霞, 解冬, 等. 黄芪及其发酵产物对免疫低下糖尿病大鼠的影响[J]. 山西中医学院学报, 2013, v. 14(6):26–28.
- Liu B W, Xu K X, Xie D, *et al.* Effects of astragalus membranaceus and its fermentation products on immunocompromised diabetic rats[J]. Journal of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2013, v. 14(6):26–28.
- [12] 郭羽. 黄芪酵母菌发酵液抗肿瘤活性研究[J]. 山西中医, 2013, (08):47–49.
- Guo Yu. Study on antitumor activity of fermentation broth of astragalus[J]. Shanxi Traditional Chinese Medicine, 2013, (08):47–49.
- [13] 王曦, 许晓燕, 郑林用, 等. 乳酸菌发酵黄芪的抗疲劳保健功能研究[J]. 时珍国医国药, 2011, (06):1422–1424.
- Wang X, Xu X Y, Zheng L Y, *et al.* Study on anti-fatigue health function of astragalus fermented by lactic acid bacteria[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, (06):1422–1424.
- [14] 秦俊杰. 发酵型黄芪党参饲料添加剂的评价研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- Qin J J. Study on the evaluation of the fermented feed additive of Astragalus membranaceus and Codonopsis pilosula[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [15] 王景会, 李达, 姜媛媛, 等. 枯草芽孢杆菌 JAASB4 的安全性评价[J]. 东北农业科学, 2015, 40(5):102–103.
- Wang J H, Li D, Jiang Y Y, *et al.* Safety evaluation of bacillus subtilis JAASB4[J]. Northeast Agricultural Sciences, 2015, 40(5):102–103.
- [16] 王岩, 陈楠楠, 侯美如, 等. 解淀粉芽孢杆菌 SSY1 株的安全性试验[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3):928–934.
- Wang Y, Chen N N, Hou M R, *et al.* Safety test of bacillus amylobacillus SSY1 strain[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 44(3):928–934.
- [17] 王苇, 秦瑶, 周霞, 等. 优良枯草芽孢杆菌的筛选及对小鼠安全性评价[J]. 动物医学进展, 2014, 35(12):41–44.
- Wang W, Qin Y, Zhou X, *et al.* Screening and safety evaluation of bacillus subtilis in mice[J]. Advances in Animal Medicine, 2014, 35(12):41–44.
- [18] Papadopoulos O S, Argyri A A, Varzakis E E, *et al.* Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a Lactobacillus plantarum, strain with probiotic potential[J]. Food Microbiology, 2018, 74.
- [19] 李金波, 和七一, 李恒, 等. 粪肠球菌 EF608 饲喂小鼠的安全性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(3):285–286.
- Li J B, He Q Y, Li H, *et al.* Safety of enterococcus faecalis EF608 in mice[J]. Chinese Journal of Biochemistry, 2012, 33(3):285–286. 2009(10):26–28.
- [20] 秦玉花, 倪学勤, 黄秀深, 等. 2 株芽孢杆菌饲喂小鼠的安全性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24):10472–10472.
- Qin Y H, Ni X Q, Huang X S, *et al.* Study on the safety of two strains of bacillus in feeding mice[J]. Journal of Anhui Agricultural sciences, 2008, 36(24):10472–10472.
- [21] Farrow, J A E, Kruze J, Phillips B A, *et al.* Taxonomic Studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*: Description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1984, 5(4):467–482.
- [22] Czerwinski, J, Hojberg O, Smulikowska S, *et al.* Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens[J]. Britain Poultry Science, 2010, 51(2):258–269.
- [23] Rinkinen, M L, J. Koort M K, Ouwehand A C, *et al.* Streptococcus alactolyticus is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(1):35–39.