

富硒益生菌的筛选及其富硒条件的优化

梁丛丛, 孙宇杰, 胡治铭, 国洪旭, 邓先余, 林连兵*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 为了获得能耐受较高亚硒酸钠质量浓度和具有富硒能力的益生菌菌株, 对 7 株酵母菌和 12 株乳酸菌进行了筛选。结果表明, 所有菌株均能在亚硒酸钠质量浓度为 20~80 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上生长, 乳酸菌 YQRS 菌株和酵母菌 FJYJM3 菌株具有较高的耐受性和富硒能力。对它们进行发酵条件的优化, 表明 YQRS 菌株在亚硒酸钠添加量为 15 $\mu\text{g/mL}$ 、添加硒的时间为对数期前期时, 富硒效果最好, 菌体生物量为 2.66 g/L, 总硒含量能达到 2 300.26 $\mu\text{g/L}$ 。而 FJYJM3 菌株在亚硒酸钠添加量为 20 $\mu\text{g/mL}$ 、添加硒的时间为对数期前期时, 富硒效果最显著, 生物量能达到 4.86 g/L, 总硒含量能达到 5 790.99 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词: 乳酸菌; 酵母菌; 富硒; 亚硒酸钠

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)06—0667—05

Screening of Se-Enriched Probiotics and the Optimization of Se-Enriched Conditions

LIANG Congcong, SUN Yujie, HU Zhiming, GUO Hongxu, DENG Xianyu, LIN Lianbing*

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to obtain the Se-enriched probiotics strains which could tolerate high NaSeO_3 concentration, 7 strains of yeast and 12 strains of *Lactobacillus* were screened in this study. Results showed that all strains could grow on the plate with NaSeO_3 concentrations of 20~80 $\mu\text{g/mL}$. Among them, strains of yeast FJYJM3 and *Lactobacillus* YQRS had higher tolerance and se-enriched ability. The optimization fermentation conditions showed that strain of YQRS had the highest se-enrichment when the addition concentration of NaSeO_3 was 15 $\mu\text{g/mL}$ and it was added at beginning of logarithmic phase. The biomass was 2.66 g/L and the total selenium content could reach to 2 300.26 $\mu\text{g/L}$. However, strain of FJYJM3 had the highest se-enrichment when the addition concentration of NaSeO_3 was 20 $\mu\text{g/mL}$ at beginning of logarithmic phase. Its biomass was up to 4.86 g/L and the total selenium content could reach to 5 790.99 $\mu\text{g/L}$.

Keywords: *Lactobacillus*, yeast, selenium enrichment, sodium selenite

硒是体内谷胱甘肽过氧化物酶的重要组分, 曾被列为有毒物质, 直到 1957 年才被证实为机体必需微量元素^[1]。具有抗自由基, 抑癌抗癌, 延缓衰老,

提高机体免疫力, 解除重金属中毒, 维持正常繁殖等各种功能^[2]。同时还可以提高热应激和运输应激, 以及奶牛抗氧化酶能力, 从而减缓并改善奶牛因为

收稿日期: 2014-12-03

* 通信作者: 林连兵(1969—), 男, 湖南通道人, 教授, 主要从事应用微生物学研究。E-mail: linlb@sohu.com

应激而引起的氧化损伤^[3-4]。富硒的菌株能通过生物转化把有毒的无机硒转变成无毒的有机硒,其具有成本较低、生物利用率较高、硒含量较高、对环境污染小等优势^[5]。

有机硒相对于无机硒来说毒性较小,吸收率更高^[6]。酵母菌生长繁殖快,并且发酵周期短,以及富集和转化微量元素比如硒元素能力高等特点。有研究表明,啤酒酵母的富硒效果比较好^[7]。与富硒酵母相比,益生菌中富硒乳酸菌的研究报道较少,宋照军等^[8-9]对保加利亚乳杆菌等3类常见乳酸菌的富硒能力做了相关的研究。

我国约72%的地区存在低硒或缺硒的情况,2/3以上地区饲料和牧草中硒的含量小于0.05 mg/kg,不能满足动物的正常生理需要。因此,饲料中补硒亦成为一种必要的措施。富硒益生菌在动物饲养中的使用,无疑给绿色养殖提供了新的途径^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 7株酿酒酵母菌株,12株乳酸菌菌株,均由作者所在实验室分离保存。

1.1.2 培养基 种子培养基和发酵培养基。

YPD培养基:葡萄糖2.0 g/dL,蛋白胨2.0 g/dL,酵母粉1.0 g/dL,调节pH为6.8,用于培养酵母菌。

MRS培养基:葡萄糖2.0 g/dL,蛋白胨1.0 g/dL,牛肉膏1.0 g/dL,酵母粉0.5 g/dL,乙酸钠0.5 g/dL,磷酸氢二钾0.2 g/dL,柠檬酸氢二铵0.2 g/dL,硫酸镁0.02 g/dL,硫酸锰0.005 g/dL,调节pH值为6.0,用于培养乳酸菌。

以上培养基均在115℃高温灭菌。

1.1.3 试剂 亚硒酸钠,分析纯,硒质量分数45.5%;体积比1:1盐酸,分析纯;质量分数5%EDTA-2Na,二氨基联苯胺(DAB),质量分数5% NaOH,甲苯。消化液:V(高氯酸):V(双氧水):V(浓硫酸)=3:3:1;硝酸,分析纯。

1.2 方法

1.2.1 硒含量的测定方法

1) 硒含量标准曲线的绘制:硒含量采用3,3-二氨基联苯胺比色法测定^[11]。准确称取0.219 g亚硒酸钠,加入体积比1:1盐酸10 mL,加热使其溶解,冷却后转移至100 mL的容量瓶中,用体积分数10%

的硝酸溶液稀释定容,此溶液1 mL含1 mg硒,用时可稀释成1 μg/mL标准硒溶液。吸取1 μg/mL的标准硒溶液0、5、10、15、20、25 mL,分别加入分液漏斗中,加无菌双蒸水至35 mL,加入2 mL质量分数5% EDTA-2Na溶液,摇匀,用体积比1:1盐酸调节pH至2~3,各加5 mL质量分数0.5% 3,3-二氨基联苯胺(DAB)溶液,摇匀,放置在暗处反应30 min,再用质量分数5%的NaOH溶液调节pH至中性,加入10 mL甲苯振摇2 min左右,静置分层,弃去水层,甲苯层通过紫外分光光度计于420 nm波长处测定吸光度,绘制硒标准曲线。

2) 细胞内硒含量的测定:将一定量烘干的菌体置于50 mL的烧杯,加入20 mL消化液,在通风橱内用电炉缓慢加热至溶液澄清透明,此时菌体消化完毕。将以上反应液倒入分液漏斗,加水至35 mL,测定菌体中硒含量,确定菌株的富硒能力。

1.2.2 乳酸菌和酵母菌的硒耐受性筛选 从斜面保存的菌株上分别挑取一环菌株接种到相应的液体培养基中。乳酸菌接种到MRS培养基中,于37℃条件下摇瓶培养12 h,传代3次;酵母菌接种到YPD培养基中,于28℃条件下摇瓶培养16 h,传代3次,以活化菌株。制备一系列含亚硒酸钠的平板,使每个平板中亚硒酸钠的终质量浓度分别为20、40、60、80、100 μg/mL。吸取50 μL菌悬液,分别涂布于以上平板,培养24~48 h后观察菌落颜色变化,菌落在含亚硒酸钠的平板上一般能显红色,在较高亚硒酸钠质量浓度平板上菌落才呈红色的菌株为亚硒酸钠高耐受菌株。

1.2.3 不同乳酸菌及酵母菌富硒能力的比较 将乳酸菌接种到100 mL的MRS培养液中,于对数生长期加入亚硒酸钠溶液,使培养液中亚硒酸钠的终质量浓度为15 μg/mL,37℃培养24 h。对于酵母菌,则使其YPD培养液中亚硒酸钠的终质量浓度为20 μg/mL,28℃培养48 h。发酵液于5 000 g离心20 min收集菌体,用超纯水洗涤3次,在75℃烘箱烘干,称质量即为菌体生物量,并测其总硒含量。

1.2.4 不同硒添加量对富硒效果的影响 将乳酸菌于100 mL的MRS液体培养基培养至对数期,加入亚硒酸钠,使发酵液中亚硒酸钠的质量浓度分别为0、10、15、20、30、40 μg/mL,24 h后收集并干燥菌体,测定菌体的生物量和硒含量。同法测定酵母菌的生物量和总硒含量。

1.2.5 不同加硒时间对乳酸菌和酵母菌的影响
分别在乳酸菌和酵母菌的生长初期、对数生长前期、对数生长中后期加入亚硒酸钠,使 100 mL 发酵液中亚硒酸钠的质量浓度分别为 15 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$,摇瓶发酵再分别培养 24 h 和 48 h 后,收集并干燥菌体,测定菌体的生物量和总硒含量。

2 结果与分析

2.1 硒标准工作曲线绘制

硒标准工作曲线如图 1 所示。菌株的硒含量可从标准曲线上查出或者通过线性回归方程 $Y=82.678X-1.858$ 得出。

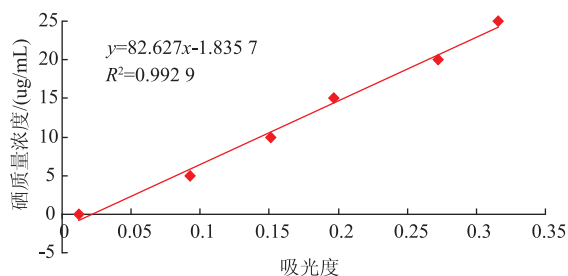


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

2.2 乳酸菌和酵母菌的耐受性及富硒效果比较

对 12 株乳酸菌和 7 株酵母菌进行耐性能力比较,结果表明,12 株乳酸菌菌株均能在亚硒酸钠质量浓度为 0~80 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上生长,其中 8 株乳酸菌菌株在亚硒酸钠质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上还能生长。乳酸菌 YQRS 菌株和酵母菌 FJYJM3 菌株均能在亚硒酸钠质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上生长,且在不同的硒质量浓度条件,菌落颜色相对于其它菌株菌落颜色要浅。见表 1 和表 2。

本实验所用 12 株乳酸菌和 7 株酵母菌均已经过培养条件的优化,以菌株生物量达到最大值时的培养条件作为富硒能力筛选的培养条件。每株菌株的生物量为最大时,菌株的硒含量越大;总硒含量越高,富硒能力越好。对以上乳酸菌的富硒效果分析表明,每克干菌体中硒的质量为 393.25~862.63 μg ,总硒质量浓度在 829.75~2 303.22 $\mu\text{g/L}$,以菌株 YQRS 为最高。酵母菌菌株每克干菌体中硒的质量为 691.67~1 156.89 μg ,总硒质量浓度在 5 622.49~2 538.43 $\mu\text{g/L}$,以菌株 FJYJM3 为最高,故选择菌株 YQRS 和菌株 FJYJM3 作为富硒条件筛选的试验菌株。

表 1 不同乳酸菌耐硒能力比较

Table 1 Comparison of se-resistant ability on different *Lactobacillus*

Na_2Se_3 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	CR2	CR3	CR5	DR	FR3	HR	HP12	YQRS	JR12	YR2	YR3	YR6
0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
20	++	++	+	++	+	+	+	+-	+	+	++	+
40	+++	++	++	+++	++	++	++	+	++	++	++	++
60	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	++
80	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
100	++++		++++			++++		+++	+++	++++	++++	++++

注:--表示颜色正常,+表示颜色红色程度,未标记表示未生长。

表 2 不同酵母菌耐硒能力比较

Table 2 Comparison of se-resistant ability on different yeast

Na_2SeO_3 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	FJYJM3	HLJ1	HLJ2	HLJ3	YJ2	YJ3	发酵剂
0	--	--	--	--	--	--	--
20	+-	++	+	+	+	++	+
40	+	++	++	++	++	++	++
60	++	+++	++	+++	+++	+++	++
80	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++
100	+++	++++	+++	++++	++++		++++

注:--表示颜色正常,+表示颜色红色程度,未标记表示未生长。

2.3 硒添加量对富硒效果的影响

将菌株 YQRS 和 FJYJM3 分别接种到不同硒质量浓度的液体培养基中进行发酵培养,测定两株菌干菌体的生物量及总硒质量浓度,结果如表 3 所示。菌株 YQRS 在 15 $\mu\text{g/mL}$ 之后生物量减少的幅度增大,而菌株 FJYJM3 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 之后减少的幅度增大,可见这两个质量浓度之后的硒对菌株的抑制比较明显。提高发酵液中亚硒酸钠质量浓度,有

利于增加干菌体中硒含量。在菌株 YQRS 发酵液中亚硒酸钠质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,干菌体中硒质量分数可达 1 102.72 $\mu\text{g/g}$ 。在菌株 FJYJM3 发酵液中亚硒酸钠质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,干菌体中硒质量分数可达 1 301.36 $\mu\text{g/g}$ 。但是,干菌体硒含量随着发酵液中硒质量浓度的增大不是一直增大,而是达到一定值后,硒含量增幅逐渐减少,使得硒含量基本维持在一定的水平。

表 3 不同加硒量对 YQRS 和 FJYJM3 富硒的影响

Table 3 Effects of different selenium concentration on Se-enriched of FJYJM3 and YQRS

Na ₂ SeO ₃ 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	生物量/(g/L)		硒质量分数/($\mu\text{g/g}$)		总硒质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	
	YQRS	FJYJM3	YQRS	FJYJM3	YQRS	FJYJM3
5	2.89	5.02	312.51	392.3	903.15	1 969.35
10	2.82	4.89	523.12	626.17	1 475.19	3 550.97
15	2.76	4.72	891.8	912.61	2 461.37	4 307.51
20	2.53	4.69	935.13	1 199.25	2 365.87	5 155.491
30	2.35	4.0	1 038.66	1 232.78	2 449.85	4 931.12
40	2.02	3.83	1 102.72	1 301.36	2 227.49	4 985.21

已知总硒含量与生物量和干菌体中硒含量相关,因此可用总硒含量评定一株菌株的富硒能力。在亚硒酸钠质量浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时,发酵获得的 YQRS 菌株菌体总硒质量浓度最高,达 2 461.37 $\mu\text{g/L}$ 。而在亚硒酸钠质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,FJYJM3 总硒质量浓度最高,可达 5 155.491 $\mu\text{g/L}$ 。综上,对于亚硒酸钠,YQRS 的最佳富硒质量浓度是 15 $\mu\text{g/mL}$,FJYJM3 的最佳富硒质量浓度是 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 不同加硒时间对乳酸菌和酵母菌的影响

根据测定的 YQRS 和 FJYJM3 生长曲线,选择在生长初期,对数生长前期、中后期加入亚硒酸钠,即 YQRS 和 FJYJM3 在 0,2,4,6,8 h 加亚硒酸钠。由表 4 可见,YQRS 菌株在 2 h 加硒,干菌体硒质量分数达 864.77 $\mu\text{g/g}$,总硒质量浓度为 2 300.29 $\mu\text{g/L}$;而 FJYJM3 在 4 h 加硒,干菌体硒质量分数达 1 203.95 $\mu\text{g/g}$,总硒质量浓度为 5 851.20 $\mu\text{g/L}$ 。

表 4 不同加硒时间对 YQRS 和 FJYJM3 富硒效果的影响

Table 4 Effects of different adding selenium time on Se-enriched of FJYJM3 and YQRS

加硒时刻/h	生物量/(g/L)		硒质量分数/($\mu\text{g/g}$)		总硒质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	
	YQRS	FJYJM3	YQRS	FJYJM3	YQRS	FJYJM3
0	2.58	4.52	533.99	856.1	1 377.69	3 869.57
2	2.66	4.72	864.77	1 184.97	2 300.29	5 593.06
4	2.73	4.86	742.23	1 203.95	2 026.28	5 851.20
6	2.69	4.79	635.34	1 029.81	709.06	4 918.42
8	2.79	4.69	465.82	833.19	1 299.63	3 907.66

3 讨论

在对富硒酵母菌和乳酸菌的研究中发现,富硒菌株在含硒量不同的培养基中菌落形态差异明显。在含硒量较低的培养基中,菌株菌落形态是白色,菌落相对较大;而在含硒量较高的培养基中,菌落形态则可能是微红色、淡红色、红色、深红色,甚至是无法生长,而且菌落逐渐变小。菌落变红表明菌

株对硒有富集转化的作用,能将培养基中的无机硒转化为有机硒和红色的单质硒,这是细胞的一种解毒反应。已知随着发酵液硒质量浓度的增大,干菌体硒含量并没有一直增大,而是达到一定值后,增幅逐渐减少,基本维持在某一水平。吴竞^[12]、李爱芬^[13]等分别研究了硒浓度对啤酒酵母富硒效果的影响,也表明无机硒对菌株的生长具有不同程度的抑制,因此培养基中添加无机硒时应该有一定的限制。

4 结 语

对 YQRS 和 FJYJM3 菌株分别在对数期前期添加质量浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的亚硒酸钠,总硒质量浓度分别达到 2 300.29 $\mu\text{g/L}$ 和 5 851.20 $\mu\text{g/L}$,

对其富硒效果提升明显。可见在富硒益生菌的培养过程中要综合考虑加硒时刻、培养基中硒质量浓度的影响。本实验通过对富硒益生菌的研究,为以后富硒益生菌在动物饲养中的使用提供了基础依据,给绿色养殖提供了新的途径。

参考文献:

- [1] 张培恩. 蛋鸡日粮中添加富硒酵母对鸡蛋中硒含量及分布的影响[J]. 云南畜牧兽医, 2013(1):17-19.
ZHANG Peien. Effect of se-enriched yeast in hen diets on the selenium content and distribution in eggs [J]. **Yunnan Animal Science and Veterinary Medicine**, 2013(1):17-19. (in Chinese)
- [2] Mc Dowell L R. Minerals in animal and human nutrition[M]. New York:Academic Press, 2003:294-330.
- [3] 董卫星, 王冬梅, 李征, 等. 纳米硒和维生素 E 对热应激奶牛抗氧化性能的影响[J]. 中国奶牛, 2009(9):22-24.
DONG Weixing, WANG Dongmei, LI Zheng, et al. Effects of Nano-Se and Vitamin E on Anti-Oxidative capability of dairy cows in heat stress[J]. **China Dairy Cattle**, 2009(9):22-24. (in Chinese)
- [4] Burke N C, Scaglia G, Boland H T, et al. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves[J]. **Vet Immunol Immunopathol**, 2009, 127(3-4):365-370.
- [5] Alimohamady R, Aliarabi H, Bahari A, et al. Influence of different amounts and sources of selenium supplementation on performance, some blood parameters, and nutrient digestibility in lambs [J]. **Biological Trace Element Research**, 2013, 154(1):45-54.
- [6] 柴丽红, 余飞. 啤酒酵母的富硒条件和效果研究[J]. 食品研究与开发, 2006(6):1.
CHAI Lihong, YU Fei. Studies on cultivation conditions and se content of saccharemyces cerevisiae [J]. **Food Research and Developent**, 2006(6):1. (in Chinese)
- [7] 王凤琴. 富硒酵母的研制[J]. 酿酒科技, 2004(3):34-35.
WANG Fengqin. Development of yeast containing abundant se [J]. **Liquor-making Science and Technology**, 2004(3):34-35. (in Chinese)
- [8] 宋照军. 乳酸菌富硒技术初步研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9):137-140.
SONG Zhaojun. Technology study on enriching selenium in Lactobacillus strains [J]. **Food Science and Technology**, 2004, 25(9):137-140. (in Chinese)
- [9] 宋照军, 潘润淑, 王树宁, 等. 富硒乳酸菌筛选及其富硒工艺初探[J]. 食品工业科技, 2004(7):62-64.
SONG Zhaojun, PAN Runshu, WANG Shuning, et al. Screening of se-enriched Lactobacillus strains and its preliminary study of selenium enriched process[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2004(7):62-64. (in Chinese)
- [10] 黄晶, 林伯全. 富硒酵母的营养生理作用及其在鸡生产中的应用[J]. 广东饲料, 2013, 22(8):32-34.
HUANG Jing, LIN Baiquan. Nutrition physiology effect of se-enriched yeast and its application in chicken production [J]. **Guangdong Feed**, 2013, 22(8):32-34. (in Chinese)
- [11] 侯少范, 王五一. 微量硒的测定方法简介[J]. 分析化学, 1980(2):183.
HOU Shaofan, WANG Wuyi. Introduction of the determination methods for microelement selenium [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 1980(2):183. (in Chinese)
- [12] 李爱芬, 刘振乾, 徐宁, 等. 微量元素硒载体酵母发酵的研究[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2004, 25(5):626-631.
LI Aifen, LIU Zhenqian, XU Ning, et al. Study on fermentation of microelement selenium carrier yeast [J]. **Journal of Jinan University:Natural Science Edition**, 2004, 25(5):626-631. (in Chinese)
- [13] 吴竞, 王阳光, 刘永杰, 等. 不同酵母菌种富硒能力比较与发酵条件优化[J]. 畜牧与兽医, 2012(1):1.
WU Jing, WANG Yangguang, LIU Yongjie. et al. Comparison on selenium-enriched ability of different strains of yeast and optimization of fermentation conditions[J]. **Animal Science and Veterinary Medicine**, 2012(1):1. (in Chinese)