

富硒乳酸菌的筛选及其富硒能力的初步研究

朱何东,常 峰,罗俊成,胡 承,王忠彦*

(四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

摘 要:从黄水中筛选到一株富硒乳酸菌,经鉴定为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)。通过亚硒酸钠抗性筛选和 MRS 液体培养基发酵培养,初步确定其富硒条件为:接种量 10 %(v/v),亚硒酸钠添加量 46 $\mu\text{g/mL}$,pH6.2,37 $^{\circ}\text{C}$,培养 36 h,富硒能力为 56.52 %。

关键词: 微生物; 布氏乳杆菌; 筛选; 富硒能力

中图分类号:TS261.1;TS261.4;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)08-0029-03

Screening of An Abundant-Se-Containing *Lactobacillus* Strain and Its Abundant-Se-containing Capability

ZHU He-dong, CHANG Feng and LUO Jun-cheng et al.

(Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: An abundant-Se-containing *lactobacillus* strain was screened from yellow water and identified as *lactobacillus buchneri*. Through sodium selenite resistance screening and fermenting culture by MRS liquid culture medium, the abundant-Se-containing conditions were concluded as follows: 10 % (v/v) inoculation quantity, addition level of sodium selenite as 46 $\mu\text{g/mL}$, pH value as 6.2, temperature at 37 $^{\circ}\text{C}$, culture time 36 h, and Se-containing capability as 56.52 %. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe, *lactobacillus buchneri*, screening, abundant-Se-containing capability

硒是人体必需的微量元素之一。适量的硒能清除体内过多的活性氧自由基,从而延缓人体衰老,预防肿瘤、心血管疾病、中枢神经系统疾病等,以及能刺激人体免疫球蛋白及抗体的产生,增强机体对疾病的抵抗力^[1]。缺硒是克山病和大骨节病的主要原因,同时,缺硒还可导致白内障、男性不育等疾病,艾滋病的发生和发展也可能与其相关^[2]。

生物体内的硒大多来源于蔬菜、水果、肉类等,但天然食物中硒含量较低,无法满足人体硒的日需量,另外我国地区性水土缺硒的情况也普遍存在,因此人体适量的补硒是非常必要的。通过食品途径强化硒元素,已成为目前功能性食品的研究热点之一。由于亚硒酸钠等无机硒毒性高,吸收率低,不适于直接添加到食品中,所以通过生物学的方法将无机硒转化为有机硒,是生产富硒食品及其添加剂的最好方法。目前有机硒的获得主要有微生物转化法、植物天然转化法、种子发芽转化法、动物转化法等^[3]。微生物转化法中较多的是培养富硒酵母,所

用菌种一般是啤酒酵母,富硒酵母在国外已实现工业化生产。

国内外学者对于富硒酵母已进行了大量的研究,而其他富硒微生物却极少报道,仅见宋照军等^[4,5]对嗜酸乳杆菌等 3 类常见乳酸菌富硒能力进行了初步研究。

乳酸菌是食品发酵工业中应用最广泛的微生物之一,乳酸菌发酵食品风味独特、营养丰富,具有众多的医疗保健作用,是公认的营养保健食品^[6]。黄水是浓香型白酒酿造过程中的副产物,含有丰富的醇、醛、酸、酯等呈香呈味物质和经长期驯化的有益微生物等^[7]。笔者从黄水中筛选到一株乳酸菌,初步鉴定为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*),对其富硒条件、能力进行了初步研究,以期对进一步研究开发富硒的活性乳酸菌功能食品有所助益。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2005-03-11

作者简介:朱何东(1981-),男,硕士研究生,研究方向:工业及食品微生物。

*王忠彦为本文通讯作者。

1.1.1 样品来源

四川某浓香型白酒酿造企业窖池中黄水。

1.1.2 培养基

筛选培养基:改进 MRS 培养基^[8]。蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 10.0 g,酵母提取物 5.0 g,葡萄糖 20.0 g, K_2HPO_4 2.0 g,吐温 80 为 1 mL,柠檬酸三铵 2.0 g,乙酸钠 5.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL, pH6.2~6.4。

发酵培养基:筛选培养基不加琼脂。

1.1.3 试剂

0.5% 3,3'-二氨基联苯胺溶液,5% EDTA-2Na 溶液,1:1 盐酸溶液,甲苯,5% NaOH 溶液,10% HNO_3 溶液,1000 mg/L 亚硒酸钠储备液(准确称取 0.100 g 亚硒酸钠于 50 mL 烧杯中,加入 1:1 盐酸 10 mL,加热溶解,冷却后移至 100 mL 容量瓶中,用 10% HNO_3 溶液洗烧杯若干次,合并洗液于容量瓶中,再用 10% HNO_3 溶液稀释至刻度,即为 1000 mg/L 亚硒酸钠储备液。临用时用蒸馏水稀释成浓度 1 $\mu g/mL$ 的亚硒酸钠标准溶液。

1.1.4 仪器

752 紫外分光光度计、pHS-2C 型酸度计、台式高速离心机等。

1.2 方法

1.2.1 富硒乳酸菌的筛选和耐硒性能测定

样品用无菌水适当稀释,取一定量涂布于固态筛选培养基,37℃倒置培养 72 h,待长出菌落后挑取单菌落,转接,经平板划线法得到纯种。筛选出的菌种接入装有 5 mL 发酵培养基的试管,37℃培养 24 h。筛选培养基灭菌后加入预先灭菌的 Na_2SeO_3 浓溶液,制成含 Na_2SeO_3 10 $\mu g/mL$ 、20 $\mu g/mL$ 、30 $\mu g/mL$ 、40 $\mu g/mL$ 、50 $\mu g/mL$ 、60 $\mu g/mL$ 、70 $\mu g/mL$ 、80 $\mu g/mL$ 、90 $\mu g/mL$ 、100 $\mu g/mL$ 的筛选培养基平板,0.1 mL 试管菌液涂布接种,37℃倒置培养 48 h,观察平板菌落颜色变化,选出 Na_2SeO_3 抗性强的菌株,确定菌株耐硒大致浓度区间,再在浓度区间内划分更细的 Na_2SeO_3 浓度,重复上述筛选过程,确定菌株耐硒浓度。

1.2.2 富硒条件的确定

由菌株耐硒性能确定其液体发酵时 Na_2SeO_3 的大致添加量,配制 Na_2SeO_3 浓度为 40 $\mu g/mL$ 、42 $\mu g/mL$ 、44 $\mu g/mL$ 、46 $\mu g/mL$ 、48 $\mu g/mL$ 、50 $\mu g/mL$ 的发酵培养基,250 mL 三角瓶装液 100 mL,10%接种量,37℃下培养,每隔 2 h 测 pH 值的变化,每隔 12 h 取 10 mL 发酵液以 4000 r/min 离心 20 min,观察菌体颜色变化,并测定发酵液含硒量。

1.2.3 乳酸菌硒含量的测定

3, 3'-二氨基联苯胺比色法^[5,9]。

1.2.3.1 硒含量标准曲线的绘制

取浓度 1 $\mu g/mL$ 的亚硒酸钠标准液 0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL,分别移入 125 mL 分液漏斗,加水至 35 mL,加入 5% 的 EDTA-2Na 溶液 1 mL,摇匀,调节 pH 值 2~3,各加 0.5% 3,3'-二氨基联苯胺溶液 4 mL,摇匀,置于暗处 30 min。调节 pH 值至中性,加入 10 mL 甲苯振荡 2 min,静置分层,弃水层,甲苯层通过棉花栓过滤于比色皿中,置于 420 nm 波长处测定吸光度,绘制标准曲线。

1.2.3.2 残留无机硒含量的测定

发酵液 4000 r/min 离心 20 min,取 2 mL 上清液于 100 mL 容量瓶中,蒸馏水稀释至刻度,取 10 mL 稀释液于分液漏斗,加水至 35 mL,以下同标准曲线。根据样品测得的吸光度,从标准曲线中查得相应的硒含量,乘以相应的倍数,此为残留无机硒含量。

1.2.3.3 有机硒含量的测定

有机硒含量=总硒含量-残留无机硒含量
=培养基加硒量-残留无机硒含量

1.2.3.4 富硒能力(有机硒转化率)的计算

有机硒转化率= $\frac{\text{有机硒含量}}{\text{培养基加硒量}} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

从黄水样品中筛选到 71 株菌株,经复筛后确定一株 Na_2SeO_3 抗性较强菌,编号为 921-11,单菌落呈圆形,较光滑,乳白色,不透明,边缘齐整,无缺刻,直径 0.2~0.8 mm。革兰氏染色呈阳性,菌体短杆状,无芽孢,无运动性。经进一步生理生化试验(见表 1),将此菌初步鉴定为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)^[10,11]。

表 1 菌株的生理生化特征

项目	特征	项目	特征	项目	特征
细胞色素氧化酶	—	酪素水解	—	蔗糖	+
过氧化氢酶	—	蜜二糖	+	乳糖	+
需氧性试验	兼性厌氧	核糖	+	麦芽糖	+
葡萄糖氧化发酵	异型发酵	木糖	+	甘露醇	—
M. R 实验	+	松三糖	+	山梨醇	—
V. P 实验	+	果糖	+	棉籽糖	+
明胶水解试验	—	鼠李糖	—	海藻糖	—
硝酸盐还原试验	—	半乳糖	+	甘露糖	—
淀粉水解	—	阿拉伯糖	+	葡萄糖(酸)	+
产生 H_2S 试验	—	七叶灵	+	葡萄糖(气)	+
石蕊牛奶	紫→红	纤维二糖	—		

2.2 富硒条件的确定(图 1)

菌株液体培养基中的耐硒条件实验结果见图 1。

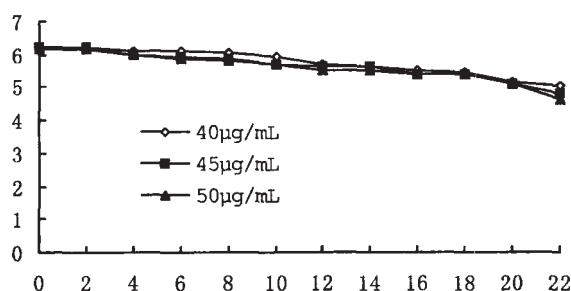


图1 菌株液体培养基中的耐硒性能

由图1可以看出,当发酵培养基中 Na_2SeO_3 浓度为 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $45\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,菌株都可正常生长产酸,而且液体培养24 h后高速离心,不出现红色菌体,即菌株在液体培养基中富硒时, Na_2SeO_3 的有效浓度可以在 $40\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 之间。

2.3 菌株的耐硒性能(表2)

Na_2SeO_3 浓度	菌种	Na_2SeO_3 浓度	菌种	Na_2SeO_3 浓度	菌种
10	—	44	+	60	+
20	—	45	+	70	+
30	—	46	+	80	+
40	—	47	+	90	+
41	—	48	+	100	+
42	—	49	+		
43	—	50	+		

注:“+”代表有红色单质硒出现,“—”代表无红色单质硒出现,下表同。

菌株耐硒性能测定结果表明,当培养基平板加入 Na_2SeO_3 $44\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,菌体出现红色,说明菌体把一部分无机硒还原成单质硒,而不是转化成有机硒,故 Na_2SeO_3 平板上菌种最大的耐硒量为 $43\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 菌种富硒能力的测定

2.4.1 标准曲线绘制(见图2)

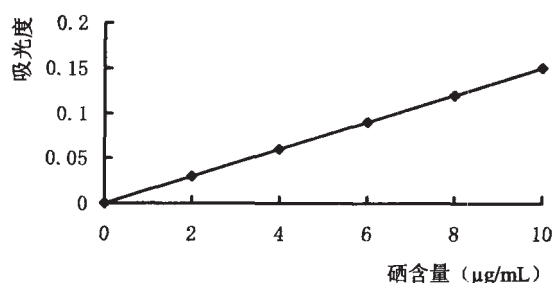


图2 硒标准曲线

2.4.2 菌种富硒能力(见表3)

根据表3可初步得出菌株921-11选用MRS液体培养基富硒时,当条件为:接种量10%, Na_2SeO_3 添加量 $46\text{ }\mu\text{g/mL}$, $\text{pH}6.2$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养36 h,富硒效果较好,残留无机硒含量 $20.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,有机硒含量 $26.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,富硒

能力为56.52%。

表3 不同条件下菌种富硒能力

Na_2SeO_3 ($\mu\text{g/mL}$)	颜色变化				吸光度			
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
0	—	—	—	—	0	0	0	0
40	—	—	—	+	0.109	0.084	0.057	0.059
42	—	—	—	+	0.116	0.082	0.055	0.056
44	—	—	—	+	0.121	0.082	0.058	0.061
46	—	—	—	+	0.125	0.091	0.060	0.062
48	—	—	—	+	0.133	0.098	0.064	0.067
50	—	—	+	+	0.136	0.101	0.070	0.075

3 结论

黄水作为酿酒副产物,富含多种有益微生物,长期以来,对黄水的综合利用程度一直都处于较低水平,甚至不加处理直接排放,造成环境污染。笔者从“变废为宝”的角度出发,有针对性地对黄水中的乳酸菌进行理性筛选,得到了一株耐硒性能和富硒能力都较强的乳酸菌株,经鉴定为布氏乳杆菌,命名为922-11。在MRS固体平板培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ $\text{pH}6.2$,培养48 h条件下,菌株有效富硒所需 Na_2SeO_3 浓度 $\leq 43\text{ }\mu\text{g/mL}$;在MRS液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ $\text{pH}6.2$,培养36 h条件下,有效富硒所需 Na_2SeO_3 浓度为 $46\text{ }\mu\text{g/mL}$,富硒能力达56.52%。

参考文献:

- [1] 苗健,高琦,许思来.微量元素与相关疾病[M].郑州:河南医科大学出版社,1997. 119-122.
- [2] 郑文杰,欧阳政.植物有机硒的化学及其医学应用[M].广州:暨南大学出版社,2001. 7-19.
- [3] 郑建仙.硒的微生物转化及在调味料中的应用[J].中国食品工业,1995(7):24-26.
- [4] 宋照军.乳酸菌富硒技术初步研究[J].食品科学,2004,25(9):137-140.
- [5] 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.
- [6] 杨洁彬,郭兴华,张謇,等.乳酸菌——生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社,1999. 139-142.
- [7] 罗惠波,张宿义,卢中明.浓香型白酒黄水的应用探索[J].酿酒,2004,31(2):71-72.
- [8] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999. 85-86.
- [9] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997. 240-242.
- [10] R.E.布坎南,N.E.吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.814-815.
- [11] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001. 267-294.