

保加利亚乳杆菌富集锌的条件研究*

刘文群 邓泽元 徐尔尼 李 曼

(南昌大学食品科学教育部重点实验室,南昌,330047)

摘 要 研究了保加利亚乳杆菌将无机态微量元素锌富集转化为细胞内的有机态微量元素锌的条件。正交实验结果表明,培养基中 ZnSO_4 浓度为主要影响因素,培养温度、培养时间和接种量为次要影响因素,其中又以培养温度的影响较主要。最佳富集条件为, ZnSO_4 浓度 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 、培养温度 37°C 、培养时间 36 h 、接种量 5% 。在优化条件下,细胞富集的锌含量有明显升高,为 $249.8\mu\text{g/g}$,有机态锌占总量的 80% 以上。

关键词 保加利亚乳杆菌,微量元素锌,富集条件

微量元素是人和动物必需的营养素,它对提高人体免疫机能、预防某些疾病的发生有着重要的作用。大量实验表明,有机态微量元素较之无机态微量元素生物利用率和生物活性高、毒性低^[1,2]。有机态微量元素的获得目前主要有 2 个途径:一是人工合成有机态微量元素;二是借助生物生长吸收无机微量元素,转化为富含有机微量元素的食物。近十几年来,用微生物作为载体富集人及动物所必需的微量元素,制备有机形态、成本低廉的微量元素添加剂,在国内外已形成研究热点。用可食用的、对人体有益的微生物吸收转化无机微量元素是一条极有价值的途径。国外自 1970 年代以来相继研制出硒酵母^[3]、铬酵母^[4~6]等。在美国、法国、芬兰、德国等国均有硒酵母作为食品添加剂及补充药物出售。我国这方面的研究也很活跃,上海酵母厂和上海生物工程试验基地首先研制成功了高铁酵母、高锌酵母。

锌是人体必需的微量元素,被誉为“生命之花”,缺锌时可导致器官和组织的生理功能异常,生长发育迟缓,免疫能力低下,性功能减退等症状。用微生物富集锌已有不少研究报道^[7~10]。李洪军等^[9]研究酵母对锌的富集,发现法国酵母和梅山酵母在 Zn^{2+} (ZnSO_4) 浓度越高时细胞中锌含量也越高,但当 Zn^{2+} 浓度大于或等于 10^{-1} mol/L 时,酵母生长繁殖受到极大抑制,故选择 Zn^{2+} 浓度在 $10^{-2}\sim 10^{-3}\text{ mol/L}$ 之间较为适宜。

目前国内外富集微量元素所用菌种主要为酵母菌,很少用细菌。乳酸菌是一类益生菌,有助于人

体肠道健康^[11]。乳酸菌代谢过程中产生的具有特殊功能的乳酸菌素对很多腐败菌、致病菌具有抑制作用^[12],是美国 FDA 公认的安全食品。通过乳酸菌富集人体必需的微量元素,可以集微量元素、乳酸菌、乳酸菌素的功能于一身。文中研究了保加利亚乳杆菌富集微量元素锌的影响因素(培养基中添加锌的浓度、培养温度、培养时间、接种量),首先通过单因素梯度试验得出各因素水平范围,再用正交试验法找到最佳富集条件,以提高保加利亚乳杆菌富集锌的水平。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*):南昌大学中德联合研究院提供。

1.1.2 培养基

MRS 培养基^[13]:蛋白胨 10 g ,牛肉膏 10 g ,酵母膏 5 g , K_2HPO_4 2 g ,柠檬酸三铵 2 g ,乙酸钠 5 g ,葡萄糖 20 g ,吐温 80 1 mL , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g , $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g , H_2O 1 000 mL , $\text{pH}6.2\sim 6.4$, 121°C 灭菌 15 min

1.1.3 仪 器

150A 生化培养箱、LXJ-Ⅱ离心沉淀机、FA1604 电子天平、KL-UP-Ⅲ-10 实验室专用超纯水机、SpeetrAA-10 原子吸收分光光度计等。

所用硝酸为优级纯,其余试剂均为分析纯

1.2 方 法

1.2.1 富集培养

将 ZnSO_4 配成一定浓度的溶液,灭菌备用。在无菌室将 ZnSO_4 溶液按不同的比例加入 150 mL 已灭菌的 MRS 液体培养基中,摇匀,按一定比例接入

第一作者:硕士,副教授。

*南昌大学基础理论基金资助项目;江西省教育厅资助项目(No. 赣教技字[2005]53)

收稿日期:2006-03-29,改回日期:2006-05-29

保加利亚乳杆菌,每个处理设2个重复。一定温度下培养一定时间,收集培养物待用。

1.2.2 培养物洗涤处理

培养物→离心(4 000 r/min)0.5 h,倾去上清液→加入300 mL双重蒸馏水,搅拌均匀→离心(4 000 r/min)0.5 h,倾去上清液。如此反复洗涤5次,将附着于细胞表面的 Zn^{2+} 洗去。最后于4 000 r/min离心0.5 h获得最终培养物。

1.2.3 干法消化和测定方法

将培养物分别转入坩锅中,在电热鼓风干燥箱进行干燥。干燥后加入适量硝酸,浸泡2 h后置电炉上蒸干,炭化完全后转入550℃高温炉中灰化一定时间,至样品全部变成灰白色。取出冷却,用2%的硝酸溶解样品后,移入50 mL容量瓶中,定容,用原子吸收分光光度计测定锌含量^[14]。同时作空白对照及标准曲线。

1.2.4 有机态和无机态的分离和测定

采用静置浸出离心分离法测定保加利亚乳杆菌富集的锌的有机态和无机态^[15]。将0.2~0.3 g离心洗涤干燥后的乳酸菌细胞加入10 mL双蒸水,每隔

一段时间彻底搅拌,浸取12 h,然后离心获得菌体沉淀(无机态存在于上清液中)。将菌体沉淀干燥、消化、定容,便可测得有机态锌的含量。采用差减法计算得到的无机态锌含量。

1.2.5 数据分析处理

采用SPSS数据处理软件对正交实验结果进行方差分析,得出正确的结论。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

在保加利亚乳杆菌的富集培养过程中,分别对培养基中 $ZnSO_4$ 浓度、接种量、培养时间3个因素进行单因素实验,得出适宜的单因素水平范围。

2.1.1 $ZnSO_4$ 添加量对保加利亚乳杆菌富集锌的影响

对保加利亚乳杆菌进行MRS液体培养基中 $ZnSO_4$ 添加量的单因素实验。向MRS液体培养基中加入不同量的 $ZnSO_4$,使培养基中 $ZnSO_4$ 浓度成为一定梯度,按3%接种量接入保加利亚乳杆菌,在37℃培养48 h,测定细胞中锌元素含量。结果见表1。

表1 $ZnSO_4$ 添加量对保加利亚乳杆菌生长及富集锌量的影响

$ZnSO_4$ 添加量/ $\mu g, mL^{-1}$	0	30	60	90	120	150	200	400	800
细胞干重/ $g, (300 mL)^{-1}$	0.279	0.307	0.308	0.307	0.309	0.308	0.307	0.319	0.310
细胞锌含量/ $\mu g, g^{-1}$	20.42	71.24	146.1	160.4	152.1	126.7	133.3	204.6	177.1

由表1可知,随着MRS培养液中 $ZnSO_4$ 的添加量逐渐增加,保加利亚乳杆菌细胞干重有明显的增加,在添加量为400 $\mu g/mL$ 时,细胞干重达到最大。对锌的富集量也大幅度提高,在 $ZnSO_4$ 添加量为90 $\mu g/mL$ 时,细胞中锌的富集量达到第1个高峰,为160.4 $\mu g/g$;以后随着 $ZnSO_4$ 浓度的增加,保加利亚乳杆菌对锌的富集先降低后又增加,在添加量为400 $\mu g/mL$ 时,细胞中锌的富集量达到第2个高峰,为

204.6 $\mu g/g$ 。因此,保加利亚乳杆菌富集锌元素采用 $ZnSO_4$ 添加量为400 $\mu g/mL$ 较为合适。

2.1.2 接种量对保加利亚乳杆菌富集锌的影响

在培养保加利亚乳杆菌的MRS液体培养基中加入 $ZnSO_4$ 使其浓度为400 $\mu g/mL$,以不同的接种量接入保加利亚乳杆菌,37℃培养48 h,测定细胞中锌元素含量。结果见表2。

表2 接种量对保加利亚乳杆菌生长及富集锌量的影响

接种量/%	1	2	3	4	5	6	7	8
细胞干重/ $g, (300 mL)^{-1}$	0.311	0.313	0.319	0.322	0.326	0.328	0.328	0.331
细胞锌含量/ $\mu g, g^{-1}$	136.4	154.8	185.2	194.5	201.6	180.3	180.1	176.7

由表2可知,随着接种量的增加,保加利亚乳杆菌的细胞干重和细胞中锌含量逐渐增加,在接种量为5%时细胞中锌含量达到最高,为201.6 $\mu g/g$ 。所以保加利亚乳杆菌富集锌元素采用接种量为5%较为合适。

2.1.3 培养时间对保加利亚乳杆菌富集锌的影响

在培养保加利亚乳杆菌的MRS液体培养基中加入 $ZnSO_4$ 使其浓度为400 $\mu g/mL$,以5%的接种量接入保加利亚乳杆菌,37℃培养不同时间,测定细胞中锌元素含量。结果见表3。

由表3可看出,随着培养时间的增加,保加利亚乳杆菌的细胞干重只有很小幅度的变化;细胞中锌富

集量开始时增加,以后逐渐下降,说明培养时间较长对保加利亚乳杆菌富集锌元素较为不利。在培养时间为 36 h 时细胞中锌富集量达到最大,为 231.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。因此,保加利亚乳杆菌富集锌元素采用培养时间为 36 h 较为适宜。

表 3 培养时间对保加利亚乳杆菌生长及富集锌量的影响

培养时间/h	24	36	48	60	72	84
细胞干重/ $\text{g} \cdot (300 \text{ mL})^{-1}$	0.314	0.316	0.319	0.311	0.301	0.296
细胞锌含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	183.1	231.6	205.2	195.7	155.4	149.7

2.2 保加利亚乳杆菌富集锌的正交实验

根据单因素实验结果,选择正交实验因素水平范围如下:培养温度(A)分别为 33 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、41 $^{\circ}\text{C}$;培养时间(B)分别为 36 h、48 h、60 h;接种量(C)分别为 3%、4%、5%; ZnSO_4 浓度(D)分别为 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验结果见表 4。

表 4 保加利亚乳杆菌富集锌的正交实验

	A 温度	B 时间	C 接种量	D 元素浓度	细胞锌含量 $/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	180.6
2	1	2	2	2	223.3
3	1	3	3	3	205.8
4	2	1	2	3	219.5
5	2	2	3	1	200.3
6	2	3	1	2	235.9
7	3	1	3	2	228.0
8	3	2	1	3	212.4
9	3	3	2	1	188.9
K_1	203.2 \pm 21.47 ^a	209.4 \pm 25.27 ^a	209.6 \pm 27.75 ^a	189.9 \pm 9.891 ^a	
K_2	218.6 \pm 17.82 ^a	212.0 \pm 11.51 ^a	210.6 \pm 18.86 ^a	229.1 \pm 6.367 ^c	
K_3	209.8 \pm 19.68 ^a	210.2 \pm 23.81 ^a	211.4 \pm 14.67 ^a	212.6 \pm 6.852 ^b	
R	15.4	2.6	1.8	39.2	

分析表 4 数据可知,影响保加利亚乳杆菌富集量的主次因素为:D(ZnSO_4 浓度)>A(培温度)>B(培养时间)>C(接种量)。 ZnSO_4 浓度(D)为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时极显著地高于 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的锌富集量,显著地高于浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的锌富集量,故选择 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D_2)为 ZnSO_4 浓度;因素 A、B、C 的 3 个水平之间无显著性差异,可选择最优水平,也可选择其他水平,故培养温度(A)选择 37 $^{\circ}\text{C}$ (A_2),培养时间(B)选择 36 h(B_1),接种量(C)选择 5%(C_3)。因此,本实验确定最佳富集条件为 $A_2B_1C_3D_2$ 。

2.3 保加利亚乳杆菌富集锌的有机态分析

在最佳条件进行富集实验,即 ZnSO_4 添加量 400

$\mu\text{g}/\text{mL}$,培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$,接种量 5%,培养时间 36 h。测定细胞中锌元素总量,按 1.2.4 方法分析有机态和无机态含量。结果见表 5。

表 5 保加利亚乳杆菌富集锌元素的有机形态

锌元素形态	有机态	无机态	总富集量
细胞锌含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	207.3	42.5	249.8

由表 5 可知,在优化条件下,细胞富集的锌含量有明显升高,为 249.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。保加利亚乳杆菌富集的微量元素锌中,有机态占总量的 80% 以上,这种有机态元素的含量是比较高的,对人体应具有较高的营养价值。

3 小 结

(1)保加利亚乳杆菌富集锌元素采用培养时间为 36 h 较为适宜,培养时间较长对保加利亚杆菌的生长和锌元素富集都较为不利。

(2)从正交实验分析可知,影响保加利亚乳杆菌富集锌元素的因素中,培养基中 ZnSO_4 浓度为主要影响因素,培养温度、培养时间和接种量为次要影响因素。在 3 个次要因素中,培养温度的影响是较主要的。

(3)在优化条件下,细胞富集的锌含量有明显升高,有机态含量较高(占总富集量的 80% 以上),对人体应具有较高的营养价值。

参 考 文 献

- 1 Scolago H, Pereziglesias J, Femadzesolis J M, et al. The effect of the chromium yeast for human[J]. Analytic Chemistry, 1997, 357(5): 464~466
- 2 杨月欣. 四种锌化物的生物利用率的比较[J]. 营养学报, 1998, 20(2): 157
- 3 Demirci A, Pometto A. L. Production of organically bound Selenium yeast by continuous fermentation[J]. Agricultural Food Chemistry, 1999, 47: 2 491~2 495
- 4 Anderson R A. Factors affecting the retention and extraction of yeast chromium[J]. Agricultural Food Chemistry, 1978, 26(4): 358~359
- 5 Toepfer E W. Preparation of chromium - containing material of glucose tolerance factor activity from brewer, yeast extracts and by synthesis[J]. Agricultural Food Chemistry, 1977, 25(1): 152~153
- 6 Scolago H, Pereziglesias J, Femadzesolis J M, et al. The effect of the chromium - rich yeast for human[J]. Analytic Chemistry, 1997, 357: 464~466

- 7 林稚兰,李爱芬,邓昌亮,等.谷氨酸发酵废液培育高锌酵母[J].微生物学通报,1992,19(4):207~211
- 8 胡振英,宋中枢,邓卫斌,等.富锌酵母的实验研制[J].中兽医医药杂志,1997(6):14~16
- 9 李洪军,何 炬,贺雅非,等.酵母对无机锌的富集及其影响因素研究[J].食品与发酵工业,1998,24(4):22~27
- 10 孙 会,王伟利,钱爱东,等.酵母富集微量元素锌的研究[J].饲料工业,2004,25(4):56~58
- 11 郭本恒.有益乳酸菌的研究趋势与动态[J].中国乳业,2001(6):25~27
- 12 李科德,韩木兰,柏建玲.乳酸链球菌素的研究和应用[J].微生物学通报,2002,29(4):102~104
- 13 松 滨,李威娜.酸奶中保加利亚乳杆菌的分离和鉴定[J].中国乳品工业,2003,31(3):16~18
- 14 王盛良,黄杰,黄薇等.富铬酵母的研制[J].食品科学,2001,22(2):32~35
- 15 金 婵,郝素娥,孙丽欣,等.高铬酵母的制备及其有机铬含量的研究[J].营养学报,2002,24(3):282~284

Study on Conditions of Bio-concentrating Trace Element Zinc by *Lactobacillus bulgaricus*

Liu Wenqun Deng Zeyuan Xu Erni Li Man

(The Key Lab. of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT In this paper, *Lactobacillus bulgaricus* (LB) was cultured in the medium with Zinc. The inorganic state trace element Zn was changed into the organic state trace element through bio-transformation. The effect of different conditions on enrichment of trace element Zn by LB was assessed with the orthogonal design of $L_9(3^4)$. The results showed that $ZnSO_4$ concentration in the medium was the main influence factor; the culture temperature, the culture time and the inoculation volume were the secondary influence factors. The optimal enriching conditions of Zn by LB were as follows: $ZnSO_4$ concentration, $400\mu g/mL$; the culture temperature, $37^\circ C$; the culture time, 36h; and the inoculation volume, 5%. In these optimal enrichment conditions the amount of Zinc by LB was raised up to $249.8\mu g/g$. The amount of organic form was above 80%.

Key words *Lactobacillus bulgaricus*, trace element Zn, enriching conditions

会 讯

婴幼儿脑部发育营养素与相关食品标准研讨会在京召开

2006年8月31日,由中国食品科学技术学会儿童食品专业学会主办,美赞臣(广州)有限公司协办的“婴幼儿脑部发育营养素与相关食品标准研讨会”在北京中国大饭店召开。会议围绕我国婴幼儿生长发育现状和趋势分析、我国婴幼儿营养与健康状况、婴幼儿早期脑部发育重要营养元素及相关食品标准、企业如何推动中国婴幼儿脑部营养发展事业等议题进行研讨,随后美赞臣(广州)有限公司将企业的婴幼儿食品研发最新科研成果递交给中国儿童食品专业学会作为今后行业制定相关标准的参考。

众所周知,儿童是对营养需求非常敏感的人群之一,儿童时期的营养直接关系到其一生的健康。因此,多年来,世界各国的营养学家在儿童食品及营养等方面都在进行着不断的探索和研究,以寻求最科学的营养膳食。

儿童营养不良不但影响体格发育,同时也影响儿童的脑发育和智力发育。婴幼儿阶段的营养缺乏对其脑发育的损害,甚至有可能导致其终生的心理行为受到不良影响。儿童是民族和国家的未来和希望所在,更是千万家庭的核心和焦点,吸引着全社会的目光;目前我国儿童食品生产企业的个体水平参差不齐,整个行业良莠并存,包括婴幼儿食品在内的儿童食品也还存在一些亟待解决的问题,消费者缺乏必要的科学指导和正确引导的问题也比较突出。

此次会议也正是在这样的背景下举办的,主办方表示希望通过此次会议能够引起全社会人士对婴幼儿营养和健康的关注,以科学的态度对待孩子的成长,建议进一步加强儿童食品安全信用体系建设,制定婴幼儿食品的相关标准,政府相关部门加强对婴幼儿食品的监管力度,在提倡婴幼儿食品脑部营养的同时,确保婴幼儿食品的安全和卫生。

参加此次研讨会议的还有卫生部等管理部门领导,中国营养学会、中国食品科学技术学会、中国奶业学会、广东奶业协会、中国消费者协会、CDC、发改委宏观院公众营养与发展中心、全国妇联心系新生命工作组等人士及婴幼儿食品方面的专家,以及来自多家新闻媒体的记者。