

## 富硒益生菌工业化生产培养条件的探索\*

杨家军,黄克和,秦顺义,赵治平

(南京农业大学动物医学院,江苏南京,210095)

**摘 要** 通过单因子试验和正交试验对富硒益生菌的培养条件进行了优化,研究了温度、培养时间、培养基中无机硒浓度、接种量、初始 pH 对益生菌产量和有机硒转化率的影响。确定工业化生产富硒益生菌的优化培养条件:在初始 pH6.2 面粉培养基中,添加 4 种益生菌、总接种量为 5%,培养基中无机硒浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ ,温度为 34℃,培养时间为 36h,在该培养条件下,4 种益生菌均达到  $10^8 \sim 10^9 \text{CFU/mL}$ ,有机硒含量达到 9.41  $\mu\text{g/mL}$ 、转化率为 93.82%。

**关键词** 硒,益生菌,工业化生产,培养条件

益生菌(probiotics)是指含有活菌或死菌,包括菌体成分及代谢产物的生物制品。服用后可改善机体微生物与酶的平衡,通过动物消化道生物的竞争排斥作用,帮助动物建立有利于宿主的胃肠道微生物区系,具有刺激机体特异性与非特异性免疫,预防腹泻,促进生长,提高饲料利用率等优点<sup>[1]</sup>。

硒(selenium, Se)是机体必须的微量元素,缺乏可能导致癌症、心肌坏死等多种疾病的发生,通过膳食摄取足够的硒可起到预防有关疾病的作用<sup>[2~4]</sup>。目前,补硒受到广泛关注,且多使用无机硒。相比无机硒,有机硒具有毒性小、易吸收等优点。用益生菌将无机硒转化成有机硒是一条较好的途径,富硒益生菌具备了有机硒和益生菌的双重功效<sup>[5]</sup>。将富硒益生菌按一定的标准均匀拌入动物的饲料中,让动物采食即可以发挥有机硒作用,又起到了补充益生菌的作用。但由于其生产成本低,导致了有机硒的价格大大高于无机硒,成为临床推广应用的障碍。目前,国内外多使用一种益生菌将无机硒转化成有机硒,其菌种较为单一。本试验用 4 种益生菌将无机硒转化成有机硒,并使用廉价培养基以降低生产成本,重点探讨了各培养条件对有机硒转化率和益生菌产量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

产阮假丝酵母(*Candida utilis*, C. u)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, Lb. a)、嗜热链球菌

(*Streptococcus thermophilus*, S. t)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG),由南京农业大学动物医学院营养代谢病研究组分离保存。

#### 1.1.2 培养基

YEPD:酵母粉 1%、蛋白胨 1%、葡萄糖 2%;改良 M17<sup>[6]</sup>;营养琼脂+甘露醇<sup>[7]</sup>;MRS<sup>[8]</sup>;固体培养基添加 1.5%琼脂粉;面粉培养基:含 5%面粉的液体培养基。

#### 1.1.3 仪 器

SW2CJ2IF 超净工作台(苏州净化设备厂)、AFS—230a 型双道原子荧光光度计(北京万拓仪器有限公司)、410×50BS-Ⅱ恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)、YXQSG1.280 高压锅((上海医用核子仪器厂)、LGR16-10 离心机(北京医用离心机厂)、DJ300 分析天平(常熟恒器工业公司)。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 菌种活化

将 4 种益生菌按 2%的比例分别加入 YEPD 液体培养基中,37℃培养 24 h,备用。

### 1.2.2 单因子试验

采用单因子试验初步探索温度、培养时间、培养基中无机硒浓度、接种量对益生菌生长的影响情况,从而确定各条件的大致范围。

### 1.2.3 正交实验设计

根据单因子实验结果,结合初始 pH,采用  $L_9(3^4)$  正交实验表,进一步明确培养条件。

### 1.2.4 优化实验

综合各种益生菌的数量和有机硒的转化率对培养条件进行调整,用调整后的条件进行发酵培养,计数益生菌数量、计算有机硒转化率。

### 1.2.5 细菌计数

第一作者:硕士研究生(黄克和为通讯作者)。

\* 国家自然科学基金项目(No. 30671547),广东省教育部产学研科技合作项目(No. 2006d90204008)

收稿日期:2007-07-10,改回日期:2007-08-29

用无菌生理盐水对样品进行倍比稀释,然后取100 $\mu$ L加入到各培养基上,涂布均匀。YEPD固体培养基用于计数产假丝酵母,32 $^{\circ}$ C培养;MRS固体培养基-嗜酸乳杆菌(厌氧培养);改良M17琼脂-嗜热链球菌<sup>[6]</sup>,营养琼脂+甘露醇-鼠李糖乳杆菌<sup>[7,8]</sup>;37 $^{\circ}$ C培养24~48h,后计菌落数,再乘以稀释倍数,即为活菌数,单位为cfu/mL。

1.2.6 硒含量测定

参照文献[9]。将发酵液3000 $\times$ g离心5~8min,取上清液测定无机硒含量。

有机硒含量/%=加硒总量-无机硒量

有机硒转化率/%= $\frac{\text{有机硒含量}}{\text{总硒}} \times 100$

2 结果与讨论

2.1 单因子实验

2.1.1 温度对益生菌生长的影响

培养基为面粉培养基,无机硒浓度为0,培养时间为36h,装液量100mL/500mL,接种量为10%,初始pH为6.2,结果见表1。富硒益生菌以2个指标来衡量:有机硒含量和活菌数。*Lb.a*、*LGG*、*S.t*随着温度的升高其数量逐渐升高,但*C.u*却相反。*C.u*在4种菌中富硒能力最强,但温度过低会减少其他菌的数量。综合菌数量和有机硒转化率这2方面的因素,应将温度控制在30~34 $^{\circ}$ C较为合适。

表1 温度对益生菌生长的影响

温度/ $^{\circ}$ C	<i>Lb.a</i>	<i>LGG</i>	<i>S.t</i>	<i>C.u</i>
31	9.01 $\pm$ 0.05	8.96 $\pm$ 0.09	7.58 $\pm$ 0.13	8.52 $\pm$ 0.04
32	9.55 $\pm$ 0.07	9.31 $\pm$ 0.07	7.82 $\pm$ 0.07	8.32 $\pm$ 0.05
33	9.71 $\pm$ 0.06	9.51 $\pm$ 0.08	7.96 $\pm$ 0.03	8.22 $\pm$ 0.10
34	10.07 $\pm$ 0.04	9.75 $\pm$ 0.03	8.28 $\pm$ 0.07	8.06 $\pm$ 0.06
35	10.32 $\pm$ 0.08	9.80 $\pm$ 0.04	8.42 $\pm$ 0.05	7.86 $\pm$ 0.11
36	10.46 $\pm$ 0.12	10.01 $\pm$ 0.06	8.62 $\pm$ 0.06	7.41 $\pm$ 0.07

注:数值为细菌数量的对数,用平均数 $\pm$ 标准差表示。

2.1.2 培养时间对益生菌生长的影响

培养基、无机硒浓度、装液量、接种量、初始pH同2.1.1,培养温度为32 $^{\circ}$ C,结果见表2。

表2 培养时间对益生菌生长的影响

时间/h	<i>Lb.a</i>	<i>LGG</i>	<i>S.t</i>	<i>C.u</i>
24	8.29 $\pm$ 0.07	8.28 $\pm$ 0.06	7.91 $\pm$ 0.03	7.51 $\pm$ 0.05
28	8.95 $\pm$ 0.05	9.28 $\pm$ 0.06	8.46 $\pm$ 0.05	8.11 $\pm$ 0.08
32	9.43 $\pm$ 0.10	9.48 $\pm$ 0.03	8.35 $\pm$ 0.04	8.42 $\pm$ 0.03
36	9.39 $\pm$ 0.09	9.18 $\pm$ 0.07	8.18 $\pm$ 0.07	8.45 $\pm$ 0.04
40	9.21 $\pm$ 0.08	9.12 $\pm$ 0.05	8.13 $\pm$ 0.06	8.11 $\pm$ 0.09

培养28h,*S.t*的数量达到最大,随着培养时间

的加长,该菌处于衰退期;培养32h,*Lb.a*和*LGG*的数量达到最大,之后处于衰退期,酵母培养32~36h较为合适。但随着培养时间的加长,其加大了工业化生产的成本。综合4种益生菌数量和培养成本,培养时间确定在28~36h较为合适。

2.1.3 培养基中无机硒浓度对益生菌生长的影响

培养基、装液量、初始pH同2.1.1,34 $^{\circ}$ C、培养32h,结果见表3。无机硒浓度直接影响到富硒益生菌中有机硒的含量,在0~5 $\mu$ g/mL时,益生菌数量变化较小,虽然有机硒转化率高,但总硒含量少;加硒量超过15 $\mu$ g/mL,对益生菌生长产生明显的抑制,那么必然降低了有机硒转化率,导致评价富硒益生菌的2项指标下降。加硒量至20 $\mu$ g/mL时,面粉培养基呈现黄色或微红色,证明培养基中所添加的无机硒被还原成单质硒,所以加硒量应控制在15 $\mu$ g/mL以下。

表3 加硒量对益生菌生长的影响

硒浓度/ $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	<i>Lb.a</i>	<i>LGG</i>	<i>S.t</i>	<i>C.u</i>
0	10.17 $\pm$ 0.11	9.93 $\pm$ 0.03	9.14 $\pm$ 0.13	8.63 $\pm$ 0.07
5	9.70 $\pm$ 0.08	9.71 $\pm$ 0.06	8.87 $\pm$ 0.05	8.40 $\pm$ 0.10
10	9.35 $\pm$ 0.06	9.22 $\pm$ 0.05	8.48 $\pm$ 0.11	7.82 $\pm$ 0.05
15	7.90 $\pm$ 0.04	7.81 $\pm$ 0.07	8.18 $\pm$ 0.10	6.14 $\pm$ 0.04
20	6.62 $\pm$ 0.06	6.61 $\pm$ 0.05	7.51 $\pm$ 0.09	4.02 $\pm$ 0.12

2.1.4 接种量对益生菌生长的影响

培养基、装液量、初始pH同2.1.1,无机硒浓度为10 $\mu$ g/mL、32 $^{\circ}$ C培养32h,结果见表4。接种量对益生菌的影响不大,但过少的接种量也会减少益生菌的数量,当接种量超过4%时,益生菌数量没有多大变化,综合考虑以5%的接种量最为合适。

表4 接种量对益生菌生长的影响

接种量/%	<i>Lb.a</i>	<i>LGG</i>	<i>S.t</i>	<i>C.u</i>
2	9.57 $\pm$ 0.02	9.26 $\pm$ 0.10	9.09 $\pm$ 0.07	8.19 $\pm$ 0.06
4	9.70 $\pm$ 0.04	9.57 $\pm$ 0.06	9.12 $\pm$ 0.08	8.36 $\pm$ 0.05
6	9.73 $\pm$ 0.04	9.52 $\pm$ 0.06	9.11 $\pm$ 0.08	8.32 $\pm$ 0.04
8	9.74 $\pm$ 0.02	9.81 $\pm$ 0.03	9.13 $\pm$ 0.05	8.29 $\pm$ 0.04
10	9.75 $\pm$ 0.02	9.77 $\pm$ 0.04	9.15 $\pm$ 0.03	8.25 $\pm$ 0.05

2.2 正交试验

以上表明,培养基中的无机硒浓度、培养温度和培养时间对各菌株的生物量有较显著影响,但尚不能明确各条件。所以选取了3个因素的3个不同水平,同时考虑了培养基的初始pH,设置了益生菌适宜生长的3个不同水平,利用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验进一步优化各条件。

表 5 正交实验  $L_9(3^4)$  因素设计

水平	因 素			
	A(加硒量) /mg · L <sup>-1</sup>	B(温度) /℃	C(培养时间) /h	D (初始 pH)
1	7.5	30	28	5.0
2	10	32	32	5.6
3	12.5	34	36	6.2

各因素对各种益生菌生长的影响情况不尽相同，但最优组合皆为  $A_1B_3C_3D_3$ ，当无机硒浓度达 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，各益生菌的数量没有多大的差异。硒转化率的最优组合为  $A_2B_3C_1D_2$ ，但最佳搭配为加硒量 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，34℃，培养 36h，初始 pH 为 6.2，如表 7 所示。综合益生菌生物量、有机硒转化率和总硒含量，

最终确定  $A_2B_3C_3D_3$  为最优组合。

表 6 正交实验结果及分析

序列号	<i>Lb. a</i>	LGG	<i>S. t</i>	<i>C. u</i>	有机硒转化率 /%
$A_1B_1C_1D_1$	9.25	8.99	8.00	8.25	86.39
$A_1B_2C_2D_2$	9.63	9.39	8.14	8.58	85.53
$A_1B_3C_3D_3$	9.67*	9.42*	8.42*	8.74*	92.69
$A_2B_1C_2D_3$	9.57	9.11	8.10	8.48	92.98
$A_2B_2C_3D_1$	9.61	9.29	8.19	8.45	90.63
$A_2B_3C_1D_2$	9.59	9.36	8.26	8.34	93.99*
$A_3B_1C_3D_2$	9.36	9.10	8.02	8.00	88.75
$A_3B_2C_1D_3$	9.30	9.07	8.11	7.84	82.76
$A_3B_3C_2D_1$	9.35	9.16	8.08	8.03	87.87

注：各组最优搭配用 \* 表示。

表 7 极差分析表

益生菌数量极差分析																
	A 硒浓度				B 温度				C 培养时间				D 初始 pH			
	Lb. a	LGG	St	C. u	Lb. a	LGG	St	C. u	Lb. a	LGG	St	C. u	Lb. a	LGG	St	C. u
K <sub>1</sub>	28.55	27.80	24.56	25.57	28.18	27.20	24.12	24.73	28.14	27.42	24.37	24.43	28.21	27.44	24.27	24.73
K <sub>2</sub>	28.77	27.76	24.56	25.27	28.54	27.75	24.44	24.90	28.55	27.66	24.32	25.09	28.58	27.85	24.42	24.92
K <sub>3</sub>	28.11	27.33	24.22	23.87	28.61	27.94	24.76	25.11	28.64	27.81	24.63	25.19	28.54	27.60	24.63	25.06
R	0.66	0.47	0.34	1.70	0.43	0.74	0.64	0.38	0.50	0.39	0.31	0.76	0.37	0.41	0.36	0.33
极差	Lb. a				LGG				S. t				C. u			
比较	R <sub>A</sub> >R <sub>C</sub> >R <sub>B</sub> >R <sub>D</sub>				R <sub>B</sub> >R <sub>A</sub> >R <sub>D</sub> >R <sub>C</sub>				R <sub>B</sub> >R <sub>D</sub> >R <sub>A</sub> >R <sub>C</sub>				R <sub>A</sub> >R <sub>C</sub> >R <sub>B</sub> >R <sub>D</sub>			
有机硒转化率极差分析																
	(A)加硒量				(B)温度				(C)培养时间				(D)初始 pH			
K <sub>1</sub>	264.61%				268.12%				263.14%				264.89%			
K <sub>2</sub>	277.60%				258.92%				266.38%				268.27%			
K <sub>3</sub>	259.38%				274.55%				272.07%				268.43%			
R	18.22%				15.63%				8.93%				3.54%			
极差比较: R <sub>A</sub> >R <sub>B</sub> >R <sub>C</sub> >R <sub>D</sub>																

2.3 优化实验

采用优化后的培养条件：无机硒浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，温度为 34℃，培养时间为 36 h，初始 pH 为 6.2；

在液体面粉培养基中发酵培养成熟后，各指标如表 8 所示。各益生菌数量与最优搭配的数量较为接近，有机硒含量较高，转化率较为理想。

表 8 益生菌数量和有机硒转化率

<i>Lb. a</i>	LGG	<i>S. t</i>	<i>C. u</i>	有机硒含量/mg · L <sup>-1</sup>	有机硒转化率/%
9.68±0.03	9.45±0.02	8.23±0.04	8.75±0.05	9.41±0.04	93.82

当前，在国内外多使用单一菌种完成无机硒转化，同时使用多种菌种完成硒生物转化的报道较为少见。产朊假丝酵母、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌等益生菌具备较高的转化能力<sup>[10,11]</sup>。文中使用 4 种益生菌完成有机硒的转化，扩大了益生菌的范围，增加了产品的优点；目前鉴于生产富硒益生菌的培养基成本高，本文使用了面粉作为培养基，降低了成本价格，益生菌数量仍达到较高水平。为富硒益生菌的推广应用奠定了基础。

3 结 论

在初始 pH6.2 的面粉培养基，接种 4 种益生菌，添加浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的无机硒，34℃，培养 36 h，4 种益生菌皆达到  $10^8 \sim 10^9$  cfu/mL，有机硒含量达到 9.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，有机硒转化率为 93.82%。

参 考 文 献

1 郭本恒主编. 益生菌[M]. 北京：化学工业出版社，2004. 1 ~2

- 2 Marlho S H, Antunes F, Pinto R E. Role of Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides [J]. Free Radical Bio & Med, 1997, 22:871~883
- 3 Finley J W, Davis C D, Feng Y. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer [J]. Brit J Nutr, 2000, 130 (9):2 384~2 389
- 4 Wright G S, Gruidl M E. Early detection and prevention of lung cancer [J]. Curr Opin Oncol, 2000, 12(2):143~148
- 5 Ip C, Birringer M, Block E, et al. Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention [J]. J Agr Food Chem, 2000, 48(6):2062~2070
- 6 曹文海, 任国潜. 嗜热链球菌的检验培养基(M17)的改良[J]. 乳品加工, 2006, 1(1):46~48
- 7 Kedia G, Wang R H, Patel H, et al. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties [J], Process Biochemistry, 2007, 42(1):65~70
- 8 李影林主编. 培养基手册[M]. 吉林: 科学技术出版社, 1991. 298~299
- 9 高建忠, 秦顺义, 黄克和. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定富硒酵母中的有机硒和无机硒[J], 分析科学学报, 2006, 22(2):157~160
- 10 马汉军, 宋照军, 潘润淑, 等. 乳酸菌富硒酸乳的研制[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2):122~124
- 11 邹 宇, 于俊林, 徐 晶, 等. 硒及微生物富硒研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 127(9):171~173

## Research on the Conditions of Selenium-enriched Probiotics for Industrial Production

Yang Jiajun, Huang Kehe, Qin Shunyi, Zhao Zhiping

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**ABSTRACT** Single-factor tests and orthogonal test were done to optimize the cultural conditions on selenium-enriched probiotics to ascertain the conditions for industrial produce. Temperature, culture durations, inorganic-selenium concentration, inoculum sizes, the initial pH were studied. It was concluded that four kinds of probiotic were fermented in flour medium, with 5% inoculum sizes and 10mg/mL inorganic-selenium concentration, which were cultured for 36h at 34℃ with the initial pH of the medium of 6.2. Under the above mentioned conditions, 93.82% inorganic-selenium was converted into organic-selenium and the number of four kinds of probiotic was reached  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL.

**Key words** Selenium, probiotics, industrial produce, cultural conditions

信  
息  
窗

### “仪器厂商售后服务满意度”网上调查正式展开

由仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 主办, 中国分析测试协会、中国仪器仪表学会分析仪器学会协办的“仪器厂商售后服务满意度”网上调查于 2007 年 11 月 29 日全面展开, 将于 2008 年 2 月 20 日结束投票。本次调查是配合“仪器信息网 2007 年度评选活动”而进行的, 旨在全面了解中国仪器市场上仪器厂商售后服务的情况, 以促进更多的仪器厂商提升售后服务水平, 进而带动和引导仪器行业持续、稳定、和谐地发展。

本次调查涉及的近 100 家候选仪器厂商均为业界佼佼者, 是仪器信息网年度评选委员会根据“仪器厂商 2007 年网上受关注程度”(根据留言数、点击量、搜索率等加权计算), 经过层层筛选最终得出的。调查采取网上投票的方式, 将从仪器厂商的服务响应速度、服务态度、服务水平、服务价格及耗材配件的价格等几方面对仪器厂商的售后服务进行评价, 调查结束后, 本网将根据投票结果分别评出售后服务满意度较高的国外厂商和国内厂商, 作为“仪器信息网 2007 年度评选活动”的结果之一, 并将在 2008 年 3 月 11 日的颁奖典礼上颁发相应奖项。

另外, 调查结束时还将从投票人中抽取: 一等奖 1 名, 奖励价值 1000 元奖品; 二等奖 5 名, 奖励价值 500 元奖品; 三等奖 30 名, 奖励价值 100 元奖品; 纪念奖 100 名, 赠送价值 20 元的本网小礼品。仪器信息网注册 VIP 用户的有效投票都将获得 50 积分的奖励。届时将在仪器信息网和相关媒体上公布获奖者名单。

欢迎广大仪器用户积极参与本次调查, 捍卫您的权益, 共同推动仪器行业的健康发展, 同时可能还有一份幸运等着您!

参与调查请访问: <http://serviceDC.instrument.com.cn>。仪器信息网年度评选委员会热线服务电话: 010-51654077

Email: [editor@instrument.com.cn](mailto:editor@instrument.com.cn) (仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 供稿)