

广西巴马地区植物源富硒乳酸菌的筛选及体外活性比较

朱虎¹, 余炼^{1*}, 李菲^{2*}, 苏芯莹², 秦莹¹, 刘小玲¹, 王成华¹

(1. 广西大学轻工业与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(2. 广西科学院广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要: 从广西巴马地区的植物及泡菜中分离得到 89 株乳酸菌, 通过细胞密度、生物量及富硒量等指标筛选富硒性能优良的 5 株菌株, 分别为肠膜明串珠菌亚种 GXB032、发酵粘液乳杆菌 GXB083、乳明串珠菌 GXB059、食蜜魏斯氏菌 GXB053、短乳杆菌 GXB065。当亚硒酸钠质量浓度为 10 μg/mL, 加硒时间 3 h 时, 5 株菌株的总硒和有机硒含量均超过 375 μg/g 干菌体, 有机硒转化率均超过 95%。比较富硒处理前后菌株抗氧化性能、黏附活性、耐酸耐胆盐性及胃肠道耐受性等益生活性, 结果显示, 5 株富硒乳酸菌的抗氧化活性相较于未富硒的对照组均呈现显著升高趋势, 其中菌株 GXB083 的 DPPH、超氧阴离子和 ABTS⁺ 自由基清除率效果最好, 其清除率分别为 43.64%、19.24% 和 21.51%; 5 株富硒乳酸菌在 pH 值 3.0 时存活率均大于 79.55%; 模拟胃液中存活率均大于 96%; 模拟肠液中均大于 82%, 耐胆盐性在 42.76% 与 69.77% 之间; 菌株 GXB053 自聚集性及表面疏水性最好, 分别为 45.17% 和 49.66%。该研究表明, 5 株富硒能力强的乳酸菌均具有良好益生特性, 为开发潜在的食品源富硒乳酸菌提供参考和依据。

关键词: 巴马; 乳酸菌; 富硒; 抗氧化; 益生活性

文章编号: 1673-9078(2025)04-172-184

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0300

Screening and *in Vitro* Activity Comparison of Selenium-enriched Lactic Acid Bacteria Isolated from Plants in the Bama Region of Guangxi

ZHU Hu¹, YU Lian^{1*}, LI Fei^{2*}, SU Xinying², QIN Ying¹, LIU Xiaoling¹, WANG Chenghua¹

(1.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China) (2. Guangxi Academy of Sciences, Guangxi Key Laboratory of Offshore Marine Environmental Science, Nanning 530007, China)

Abstract: Eighty-nine strains of lactic acid bacteria were isolated from plants and fermented pickles in the Bama region of Guangxi. Five strains with excellent selenium-enrichment properties, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* GXB032, *Lactobacillus fermentum* GXB083, *Leuconostoc lactis* GXB059, *Weissella cibaria* GXB053, and *Lactobacillus brevis* GXB065, were screened based on indicators such as cell density, biomass, and selenium-enrichment capacity. At a

引文格式:

朱虎,余炼,李菲,等.广西巴马地区植物源富硒乳酸菌的筛选及体外活性比较[J].现代食品科技,2025,41(4):172-184.

ZHU Hu, YU Lian, LI Fei, et al. Screening and *in Vitro* activity comparison of selenium-enriched lactic acid bacteria isolated from plants in the bama region of Guangxi [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 172-184.

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 巴马人才科技项目 (巴人科 20210044); 巴马人才科技项目 (巴人科 20210047)

作者简介: 朱虎 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 乳酸菌资源挖掘及应用研究, E-mail: langzhuhu@qq.com

通讯作者: 余炼 (1971-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 微生物资源的开发应用, E-mail: lianyu@gxu.edu.cn; 共同通讯作者: 李菲 (1988-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 微生物种质资源挖掘及应用, E-mail: finylee@yeah.net

sodium selenite concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ and treatment time of 3 h, the total selenium and organic selenium contents of all five strains exceeded 375 $\mu\text{g/g}$ dry cell weight, with the conversion of organic selenium exceeding 95%. Comparisons of the activities of the probiotic strains, such as antioxidant performance, adhesion activity, acid and bile salt resistance, and gastrointestinal survival, before and after selenium enrichment treatment, revealed that the antioxidant activities of all five selenium-enriched strains showed a trend of significant increase compared with those of the non-selenium-enriched control group. Among the assessed strains, GXB083 was characterized by the the highest DPPH, superoxide anion, and ABTS free radical scavenging activities of 43.64%, 19.24%, and 21.51%, respectively. The five selenium-enriched strains showed survivals exceeding 79.55%, 96%, and 82% at pH 3.0, in simulated gastric fluid, and in simulated intestinal fluid, respectively, with bile salt tolerances ranging from 42.76% to 69.77%. In addition, strain GXB053 was found to show the best self-aggregation ability (45.17%) and surface hydrophobicity (49.66%). The findings of this study indicate that the five assessed lactic acid bacteria with strong selenium-enriching capacities have excellent probiotic characteristics, providing a reference and basis for the development of potential food source selenium-enriched lactic acid bacteria.

Key words: Bama; lactic acid bacteria; selenium enrichment; oxidation resistance; probiotic activity

硒(Se)是人体中重要的微量元素之一,具有抗氧化、增强人体免疫和骨骼健康等功能^[1],目前,全世界大约 10 亿人受到硒营养缺乏的影响,这与地理位置密切相关。硒的摄入量取决于土壤中硒的含量、蔬菜积累硒的能力、硒的形态和土壤 pH 等^[2]。长寿地区的“长寿谱”可能与 Mn、Mo、Se、Fe、Sr、Zn、Ca、Mg 等元素有关。邱洪晟等^[3]在研究新疆和田地区百岁老人时发现,老人的头发中富含 Mn、Se,其中生境中 Se 含量比其他地区的高出 2~3 倍。同样地,南美洲厄瓜多尔长寿地区的河水中 Se 含量很高^[4]。广西巴马素有“世界长寿之乡的圣地”之称。巴马长寿地区硒含量较高,其中土壤中 Se 含量较中国土壤中硒含量平均值高 1.66 倍,饮用水中 Se 含量是中国饮用水中硒含量平均值的 2.09 倍^[5]。

乳酸菌(LAB)广泛存在于动植物、生境及食品中,如果蔬、土壤、发酵制品、胃肠道及口腔中^[2],具有抗氧化、抗菌、降低胆固醇及调节胃肠道菌群等功能^[1]。硒以有机硒和无机硒两种形式存在。无机硒毒性高,不易被人体吸收利用^[6]。与无机硒相比,有机硒的生物利用率高、毒性小、吸收好、安全性高^[7]。通过乳酸菌代谢可将无机硒转化为有机硒,是提高硒生物利用率的一种方法^[7]。乳酸菌体内,硒与氨基酸结合实现无机硒与有机硒的生物转化^[1],如硒蛋氨酸、硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和纳米颗粒硒(SeNPs)^[7]。

近年来,关于乳酸菌将无机硒转化成有机硒的研究受到广泛重视和认可^[8],例如 Zhou 等^[1]将乳酸菌、亚硒酸钠和富硒乳酸菌分别添加至高脂饲料中

对小鼠进行喂养,添加富硒乳酸菌的高脂饲料能显著改善小鼠的健康指标。Chen 等^[9]研究发现,动物服用富硒乳酸杆菌后提高了机体的抗氧化酶活性。而 Ren 等^[10]发现,动物摄入了富硒益生菌后,显著提高了体内这类酶的活性以及总体抗氧化能力。目前,植物乳杆菌、双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌、短乳杆菌、保加利亚乳杆菌等^[6]已被证明能够耐受和富集硒。因此,利用富硒乳酸菌开发富硒食品,可为缺硒个体提供高效安全的补硒手段。富硒乳酸菌是新兴硒产业中最具前景的技术之一。

巴马土壤中硒资源丰富,还存在未被探索的有较强富硒潜力的乳酸菌,本文以巴马当地新鲜瓜果蔬菜和发酵制品为样品,采用溴甲酚紫 MRS 培养基从样品中初步筛选出乳酸菌,通过检测 OD 值、生物量及富硒量等指标进一步筛选富硒能力强的菌株,测定富硒乳酸菌的生长曲线,确定富硒乳酸菌的适宜硒培养质量浓度,并评估富硒菌株的体外益生活性,为富硒发酵食品的开发提供一定的技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2022 年 6 月从广西百色市巴马县采摘当地种植的瓜果蔬菜以及农户自制的发酵泡菜,样品装于密封袋,4℃低温保藏备用。

1.2 主要试剂

MRS 肉汤培养基,购自海博生物公司;Mix 酶和螯合树脂 Chelex-100,购自楚杰生物公司;27F 和 1492R 通用引物,购自生工生物工程(上海)股

份有限公司; DPPH 试剂盒、ABTS 试剂盒、超氧阴离子试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所有限公司; 亚硒酸钠标准溶液, 购自中国计量科学研究院; 浓盐酸、硝酸、甲醇、亚硒酸钠、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、溴甲酚紫、丙三醇等, 购自天津大茂化学试剂厂, 均为分析纯。

1.3 主要仪器与设备

SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; DW-HL780 超低温冰箱, 中科美菱科技有限公司; ETHOS UP 微波消解系统, 莱伯泰科仪器股份有限公司; Ni-U 光学显微镜, 日本尼康株式会社; Agilent 7800 电感耦合等离子体质谱仪, 安捷伦科技有限公司; TL-18M 台式高速冷冻离心机, 上海市离心机械研究所有限公司; Mastercycler nexus gradient PCR 仪, 艾本德中国有限公司; Infinite 200 PRO 全波长酶标仪, 帝肯贸易有限公司; Biosafe150-96 超声波细胞破碎仪, 南京赛飞生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 筛选培养基制备

MRS 琼脂培养基: 66.2 g MRS 肉汤培养基, 15 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水。

溴甲酚紫鉴定培养基: 1 000 mL MRS 琼脂培养基, 0.4 g 溴甲酚紫。

1.4.2 乳酸菌的分离纯化

新鲜样品洗净后, 剪碎成小块, 用电动组织研磨器破碎后, 加入无菌生理盐水梯度稀释, 在溴甲酚紫-MRS 固体培养基上均匀涂布, 37 °C 培养 48 h。挑选形态、大小、颜色不同的有变色圈的单菌落形态, 在 MRS 琼脂培养基中不断纯化至单菌落。将纯化后的菌株进行革兰氏染色, 调节双目显微镜于 100× 油镜下观察该菌株的形态。纯化好的菌株置于 20% 甘油的冻存管中, -80 °C 冰箱保藏。

1.4.3 16S rRNA 分子鉴定

采用 Chelex-100 快速提取菌株 DNA, 作为 PCR 扩增模板, 采用引物为 27 F 和 1492 R, 程序如下: 94 °C 预变性 8 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次后, 72 °C 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳法检测 PCR 产物, 送至广州擎科生物技术有限公司进行测序, 将测序结果提交至 EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进

行 BLAST 同源性比对, 选取同源性较高的模式菌株 16S rDNA 序列, 采用 MEGA7.0 构建 Neighbor joining 系统发育树。

1.4.4 菌种的活化

将冻存管中乳酸菌菌株在 MRS 固体培养基中连续活化 2 代, 接种到 MRS 肉汤培养基中, 37 °C 培养 24 h 调节菌悬液的吸光值 OD₆₀₀ 为 0.60, 即得到乳酸菌种子液。

1.4.5 富硒乳酸菌菌株筛选

将分离纯化所得的 89 株乳酸菌种子液以 2% 的接种量 (V/V) 分别接种到含 10 μg/mL 无机硒 (以亚硒酸钠含量计) 的 MRS 培养基中, 37 °C 培养至 18 h, 测定菌液的 OD₆₀₀, 每个试验重复三次。根据菌液的 OD₆₀₀ 大小, 初步筛选出具有耐硒能力的乳酸菌菌株。

配制亚硒酸钠质量浓度为 40 μg/mL 的 MRS 培养基, 以 2% 接种量 (V/V) 分别接种初筛得到的耐硒乳酸菌菌株。于 37 °C 培养 18 h, 加硒组和未加硒组均设置三个平行, 通过测定菌体的生物量复筛得到耐硒能力较强的乳酸菌菌株。

复筛得到的具有较强耐硒能力的乳酸菌在 40 μg/mL 亚硒酸钠浓度下培养后, 再通过硒含量的测定去进一步筛选出富硒能力强的乳酸菌菌株。

1.4.6 菌体生物量测定

将初步筛选得到的具有耐硒能力的乳酸菌菌株接种于含 40 μg/mL 亚硒酸钠的培养基中, 37 °C 培养 18 h 后, 离心 10 min (4 000 r/min), 去上清液, 加入无菌水洗涤三次, 收集菌体, 烘干至恒重 (65 °C), 计算每 120 mL 培养基中菌体干重, 每个试验重复三次。

1.4.7 硒含量测定

总硒含量: 参照《国标 GB 5009.268-2016 食品安全国家标准食品中多元素的测定》方法, 将上述复筛所得耐硒能力强的菌株接种于亚硒酸钠质量浓度为 10 μg/mL 的 MRS 培养基中, 培养 18 h 后, 离心收集菌体, 烘干至恒重, 得到烘干菌体。称取 0.1 g 烘干菌体于微波消解仪进行消解, 测定其总硒含量。

无机硒含量: 参考孙显^[1]测定无机硒的方法, 取上述 0.1 g 烘干菌体, 加入 10 mL 盐酸 (φ=15%) 提取无机硒, 在电热板上加热煮沸, 并及时补充加入直到混合液澄清, 静置冷却后, 离心去沉淀至溶液澄清, 上清液用盐酸 (15%) 定容至 10 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

通过电感耦合等离子体质谱仪测定总硒含量和

残留无机硒含量。并根据以下公式计算细胞内有机硒含量:

$$X = A - A_1 \quad (1)$$

式中:

X ——细胞内有机硒含量, $\mu\text{g/g}$;

A ——细胞内总硒含量, $\mu\text{g/g}$;

A_1 ——细胞内无机硒含量, $\mu\text{g/g}$ 。

1.4.8 富硒乳酸菌生长曲线的测定

将 1.4.5 筛选到的富硒能力强的乳酸菌分别接种到 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 连续培养 24 h, 每隔 2 h 取样测定菌液的 OD_{600} , 每个试验重复三次。以培养时间为横坐标, 菌液的 OD_{600} 为纵坐标, 绘制生长曲线, 以用于确定适宜的加硒时间和培养时间。

1.4.9 富硒乳酸菌适宜硒质量浓度的确定

用亚硒酸钠配制 7 组硒质量浓度的 MRS 液体培养基: 0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$, 从 0~6 依次编号。将筛选出的 5 株乳酸菌种子液以 2% 的接种量 (V/V) 接种于上述含硒的培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养至生长稳定期, 观察菌体颜色变化, 并测定菌体的总硒含量及生物量, 以确定最适加硒质量浓度^[12]。

1.4.10 无细胞上清 (CFS), 完整细胞 (IC) 和无细胞提取物 (CFE) 的制备

参照 Ragul 等^[13]的方法, 略作修改。将筛选出的 5 株富硒乳酸菌分别在 1.4.9 所确定的最适加硒质量浓度的 MRS 液体培养基中进行富硒培养 18 h, 4 000 r/min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心, 收集上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 得到无细胞上清液 (CFS), 收集的细胞用无菌 PBS 缓冲液洗涤后重悬, 调整 OD_{600} 值统一为 0.8, 获得完整细胞 (IC)。破碎细胞, 菌悬液冰浴中以 5 s 超声开启 / 3 s 超声关闭, 10 min。离心 (10 000 r/min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) 收集上清液并通过 0.22 μm 滤膜, 即为富硒乳酸菌的无细胞提取液 (CFE), 用于后续抗氧化活性研究。

1.4.11 富硒乳酸菌抗氧化活性研究

1.4.11.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除活性的测定参考 Jung 等^[14]的方法, 稍作修改。将 500 μL 富硒乳酸菌的无细胞提取液与 500 μL 0.2 mmol/L DPPH 溶液 (溶解在无水乙醇中) 混合, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 的黑暗条件下进行反应。30 min 后, 将混合物在 8 000 r/min 离心 10 min, 在 517 nm 处测定上清的吸光度。对照组用无水乙醇代替样品, 空白对照组用等量的无水乙醇代替 DPPH。用等量的蒸馏水和无水乙醇的混合物调零。以上每组做三次平行。清除率计算公式如下:

$$X = \left(1 - \frac{A - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X ——DPPH 自由基清除率, %;

A ——样品组 (DPPH+ 样品) 吸光度;

A_1 ——空白对照组 (样品 + 无水乙醇) 吸光度;

A_0 ——对照组 (DPPH+ 无水乙醇) 吸光度。

1.4.11.2 超氧阴离子自由基清除能力

参考 Liu 等^[15]的方法评估富硒乳酸菌的超氧阴离子清除能力, 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液 (150 mmol/L, pH 值 8.0) 加入 0.5 mL 无细胞提取液混合均匀, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 20 min, 再加入 0.4 mL 的邻苯三酚 (25 mmol/L), $25\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 5 min, 立即滴入 2 滴的 HCl (8 mol/L) 终止反应, 蒸馏水调零, 测定 325 nm 处的吸光度 A 。空白对照组用 0.5 mL 蒸馏水代替样品, 每组实验做三个平行。超氧阴离子自由基清除率计算如下:

$$X = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

X ——超氧阴离子自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度;

A ——样品组吸光度。

1.4.11.3 ABTS⁺自由基清除能力

ABTS⁺ 自由基清除活性的测定参照 Re 等^[16]的方法, 稍作修改。ABTS 溶于蒸馏水中配制为 7 mmol/L 的原液, ABTS 原液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾 (1:1, V/V) 混合生成自由基阳离子, 室温下避光保存 24 h, 孵育后再用蒸馏水稀释至 734 nm 吸光度为 0.7。富硒乳酸菌在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ MRS 培养液中培养 18 h, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 值 7.0) 洗涤 2 次。调 OD_{600} 为 1.0, 与 ABTS 试剂按 1:2 (V/V) 比例混合。然后将溶液置于室温暗处静置 10 min, 离心。对照反应是在 ABTS 溶液中加入 PBS。在 734 nm 处测定混合物的吸光度。每组实验做三个平行。ABTS⁺ 自由基清除率计算公式如下:

$$X = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

X ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_0 ——对照组吸光度;

A ——样品组吸光度。

1.4.12 富硒乳酸菌的黏附活性

通过检测细胞的自聚集性、细胞表面疏水性来

评价细胞的黏附活性。根据 Vasicek 等^[17]的方法对富硒乳酸菌的自聚集性进行评估,并进行了修改。将富硒乳酸菌培养物 4 000 r/min, 4 ℃离心 10 min, 收集细胞,用 PBS (pH 值 7.4) 洗涤 2 次,用 PBS 重悬至 OD₆₀₀=0.5。涡旋 30 s,在 37 ℃下孵育 2 h,测量悬液 600 nm 处的吸光度,每组实验做三个平行。用以下公式计算自聚集性:

$$X = (A_0 - \frac{A}{A_0}) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

X——自聚集性, %;

A₀——细胞悬液初始 OD₆₀₀=0.5;

A——细胞悬液 2 h 处的 OD₆₀₀。

富硒乳酸菌的细胞表面疏水性根据 Mohanty 等^[18]的方法进行评价。富硒乳酸菌的细胞在 PBS 中重悬调整 OD₆₀₀=0.50。将 3 mL 细胞悬液与 1 mL 二甲苯混合,涡旋 3 min,在 37 ℃下孵育 60 min,分离两相。仔细收集水相,测量 OD₆₀₀,每组实验做三个平行。用以下公式计算疏水性:

$$X = (1 - \frac{A}{A_0}) \times 100\% \quad (6)$$

式中:

X——表面疏水性, %;

A₀——细胞悬液初始 OD₆₀₀=0.5;

A——加入二甲苯后的水相 OD₆₀₀。

1.4.13 富硒乳酸菌耐酸耐胆盐性

根据 Li 等^[19]描述的方法,略作修改。采用 MRS 肉汤 (pH 值 3.0) 测定富硒乳酸菌的耐酸性,采用添加 0.3% (m/V) 牛胆汁盐的 MRS 肉汤测定富硒乳酸菌的胆汁耐受性。然后将每种溶液 270 mL 与每种菌株过夜培养物 30 mL 混合,各取 5 mL,在 37 ℃下孵育 4 h。用移液管回收混合物,测量 OD₆₀₀,每组实验做三个平行。富硒乳酸菌存活率的计算方法如下:

$$X = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

X——乳酸菌存活率, %;

A——4 h 处的 OD₆₀₀;

A₀——0 h 处的 OD₆₀₀。

1.4.14 富硒乳酸菌胃肠道耐受性

人工模拟胃肠液需新鲜配制,参考 Son 等^[20]的方法。125 mmol/L NaCl、7 mmol/L KCl、45 mmol/L

NaHCO₃ 和 3 g/L 胃蛋白酶 (500 U/mg),用盐酸调节 pH 值 2.5,经 0.22 μm 滤膜过滤后制备成模拟胃液;45 mmol/L NaCl、1 g/L 胰蛋白酶 (75 U/mg)、3 g/L 牛胆盐,用 1 mol/L NaOH 调至 pH 值 8.0,经 0.22 μm 滤膜过滤后制备成模拟肠液。

菌株在 37 ℃厌氧培养箱中培养过夜,离心 (8 000 r/min, 4 ℃) 5 min,收集菌体,重悬于 MRS 液体培养基中调整 OD₆₀₀ 为 0.8,加入等体积人工胃液 (3 g/L 胃蛋白酶) 或人工肠液 (1 g/L 胰蛋白酶、3 g/L 牛胆盐),置于 37 ℃培养 4 h,活菌计数法计算存活率,每组实验做三个平行。计算公式如下:

$$X = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (8)$$

式中:

X——乳酸菌存活率, %;

A——模拟肠液或胃液处理 4 h 时的活菌数的对数值, lg CFU/mL;

A₀——0 h 处的活菌数的对数值, lg CFU/mL。

1.4.15 数据分析

采用 Excel 2019 进行图表制作,数据处理;采用 SPSS 22.0 软件对数据进行显著性分析,结果均以平均值 ±SD 表示;采用 Origin Pro 2024 制作柱状图、曲线图等。

2 结果与讨论

2.1 菌株形态学和分子生物学鉴定

用加入了溴甲酚紫的 MRS 平板筛选产酸菌株。挑取其中有较大的黄色圈的菌株,经过多次划线纯化以及革兰氏染色,共有 89 株菌为革兰氏阳性,其中大多数菌落呈圆形,中间是半透明的,边缘规则,少量菌落表面暗淡粗糙,边缘不规则,初步确定这 89 株菌为乳酸菌。提取疑似乳酸菌 DNA 后,进行 16S rRNA 分子鉴定。

2.2 菌株的 16S 鉴定结果

89 株菌的测序结果在 EZbiocloud 上核酸序列数据库中通过 BLAST 比对同源性,98% 以上的同源性为有效结果。鉴定结果见表 1,共 89 株乳酸菌,分别属于短乳杆菌属、乳植物杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属和明串珠菌属 8 个属,共计 13 种菌。在每种菌中选取一株序列同源性高于 99% 的菌株,共选取 12 株用于构建系统发育树,见图 1。

表 1 菌株16S rDNA系统发育分析
Table 1 Phylogenetic analysis of 16S rDNA of strains

乳酸菌属	乳酸菌种类	菌株编号
短乳杆菌属	短乳杆菌 (<i>Levilactobacillus brevis</i>)	GXB013、GXB036、GXB037、GXB038、GXB041、 GXB044、GXB046、GXB048、GXB049、GXB065、GXB067
	戊糖乳植物杆菌 (<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>)	GXB005、GXB007、GXB008、GXB010、GXB012、GXB039、 GXB040、GXB042、GXB043、GXB045、GXB047、GXB050、 GXB063、GXB064、GXB066、GXB068、GXB069、GXB070
乳植物杆菌属	类植物乳植物杆菌 (<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>)	GXB035
	植物乳植杆菌 (<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>)	GXB011、GXB025
乳酪杆菌属	类干酪乳酪杆菌坚韧亚种 (<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>)	GXB078
粘液乳杆菌属	发酵粘液乳杆菌 (<i>Limosilactobacillus fermentum</i>)	GXB079、GXB080、GXB082、GXB083、GXB084、 GXB086、GXB087、GXB088、GXB009
乳杆菌属	瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i>)	GXB077、GXB081、GXB085
乳球菌属	乳酸乳球菌乳亚种 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	GXB002、GXB003、GXB004、GXB006、GXB014、 GXB015、GXB016、GXB017、GXB018、GXB020、 GXB022、GXB027、GXB028、GXB029、GXB030、 GXB051、GXB052、GXB060、GXB075
	格氏乳球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>)	GXB019、GXB023、GXB026、GXB074
魏斯氏菌属	融合魏斯氏菌 (<i>Weissella confusa</i>)	GXB024、GXB034、GXB054、GXB055、GXB057、 GXB062、GXB072、GXB073、GXB076
	食窦魏斯氏菌 (<i>Weissella cibaria</i>)	GXB001、GXB021、GXB031、GXB033、GXB053
明串珠菌属	肠膜明串珠菌亚种 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i>)	GXB032
	乳明串珠菌 (<i>Leuconostoc lactis</i>)	GXB056、GXB058、GXB059、GXB061、GXB071

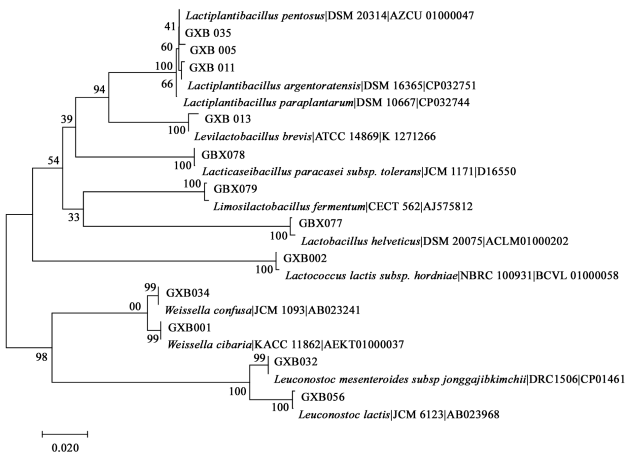


图 1 部分菌株 16S rDNA 系统发育树
Fig.1 16S rDNA phylogenetic tree of some strains

2.3 富硒乳酸菌筛选结果

图 2 为上述菌株形态学、分子生物学鉴定和 16S 鉴定所得的 89 株乳酸菌经过含亚硒酸钠（10 μg/mL）的 MRS 液体培养 18 h 后的菌体 OD₆₀₀。由图 2 可知，与未加硒组相比，部分菌株加硒组 OD 值明显下降，少部分菌株甚至出现滞长的状况，说明亚硒酸钠胁迫

迫培养明显抑制了这部分菌株的生长。但有部分菌株的 OD 值基本无变化，如 GXB011、GXB025、GXB032、GXB077、GXB083 等；另外部分菌株的 OD 值略微有所下降，但变化不明显，如 GXB005、GXB006、GXB019、GXB023、GXB035、GXB051、GXB052、GXB053、GXB055、GXB057、GXB059、GXB061、GXB064、GXB065、GXB074、GXB081 和 GXB086。与他人研究相比，Zhang 等^[21]发现，Na₂SeO₃ 质量浓度超过 10 μg/mL 时，显著抑制动物双歧杆菌的生长。韦梦婷等^[22]的研究表明，在亚硒酸钠质量浓度为 20 μg/mL 时，15 株乳酸菌有 9 株的 OD₆₀₀ 无明显变化。本研究在添加低质量浓度的亚硒酸钠后筛选的这 22 株乳酸菌的生长没有受到明显的影响，具有一定的硒耐受性，故后续试验选择这 22 株乳酸菌 OD 值无明显变化的乳酸菌菌株继续进行富硒菌株的筛选。

为了获得富硒能力强的乳酸菌，本研究将亚硒酸钠的质量浓度提高至 40 μg/mL。从上述 89 株乳酸菌中挑选耐硒能力强的 22 株菌，经过 40 μg/mL 的亚硒酸钠 MRS 液体培养 18 h 后，测定其生物量（mg/120 mL）的变化，从而筛选出耐硒能力

较强的菌株。各菌株的生物量测定结果如表 2 所示，不同菌株之间加硒组与空白组差值存在显著性差异 ($P<0.05$)。比较加硒组与空白未加硒组乳酸菌生物量的变化发现，菌株 GXB006、GXB019、GXB052、GXB079、GXB074、GXB081 的生物量均有不同程度的降低，说明高浓度亚硒酸钠抑制了这六株菌株的生长。而菌株 GXB005、GXB011、

GXB023、GXB025、GXB032、GXB035、GXB051、GXB053、GXB055、GXB057、GXB059、GXB064、GXB065、GXB077、GXB083、GXB086 的生物量略微增加，而乳酸杆菌 BB 12 和干酪乳杆菌 431 均能耐受 60 $\mu\text{g/mL}$ 的无机硒^[23]。说明本研究筛选出的 16 株菌具有较强耐硒能力，可以进一步测定它们的富硒量，从中挑选富硒优势菌。

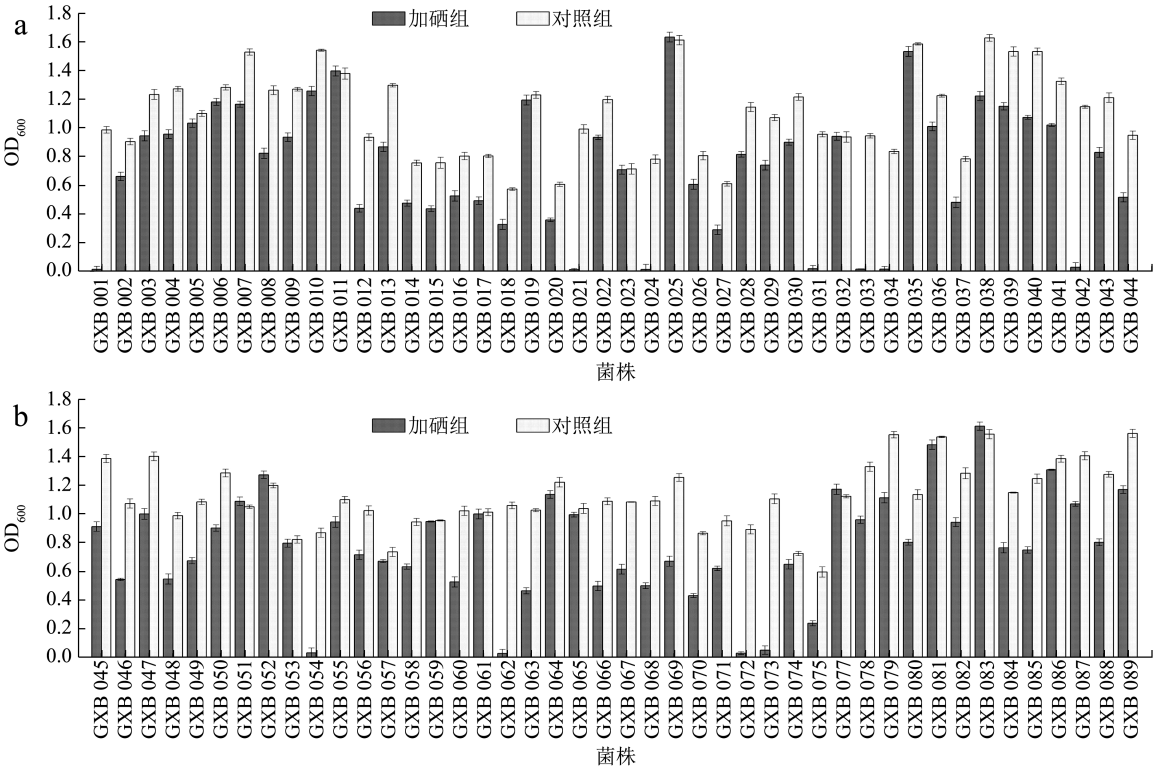


图 2 耐硒乳酸菌的筛选

Fig.2 Screening of selenium-resistant lactic acid bacteria

注：图 a 为菌株 GXB001 至 GXB044 的 OD₆₀₀，图 b 为菌株 GXB044 至 GXB089 的 OD₆₀₀。

表 2 耐硒菌株在40 $\mu\text{g/mL}$ 亚硒酸钠浓度下培养后的生物量

Table 2 Biomass of selenium-tolerant strains cultured at 40 $\mu\text{g/mL}$ sodium selenite concentration

菌株序号	生物量/(mg/120 mL)		加硒组与空白组差值	菌株序号	生物量/(mg/120 mL)		加硒组与空白组差值
	加硒组	空白组			加硒组	空白组	
GXB005	205.70 ± 0.33	201.00 ± 0.40	4.70 ± 0.30 ⁱ	GXB055	176.90 ± 0.35	170.00 ± 0.25	6.90 ± 0.64 ^{gh}
GXB006	173.30 ± 0.34	174.20 ± 0.24	-0.90 ± 0.33 ^{kl}	GXB057	141.90 ± 0.34	137.00 ± 0.50	4.90 ± 0.34 ⁱ
GXB011	207.70 ± 0.40	199.00 ± 0.28	8.70 ± 0.40 ^f	GXB059	115.00 ± 0.55	89.50 ± 0.41	25.50 ± 0.33 ^b
GXB019	152.00 ± 0.28	152.30 ± 0.21	-0.30 ± 0.37 ^k	GXB061	64.00 ± 0.37	69.00 ± 0.35	-5.00 ± 0.41 ^o
GXB023	128.00 ± 0.51	117.00 ± 0.49	11.00 ± 0.29 ^c	GXB064	222.30 ± 0.58	219.30 ± 0.38	2.90 ± 0.28 ^j
GXB025	167.60 ± 0.27	162.30 ± 0.20	5.20 ± 0.64 ⁱ	GXB065	86.20 ± 0.25	75.00 ± 0.22	11.20 ± 0.37 ^c
GXB032	111.30 ± 0.25	91.00 ± 0.51	20.30 ± 0.09 ^c	GXB074	134.50 ± 0.34	137.00 ± 0.57	-2.50 ± 0.16 ^{mn}
GXB035	148.60 ± 0.20	146.70 ± 0.08	1.90 ± 0.25 ^j	GXB077	102.30 ± 0.20	91.30 ± 0.01	11.00 ± 0.27 ^c
GXB051	193.80 ± 0.22	188.00 ± 0.01	5.80 ± 0.32 ^{hi}	GXB081	165.00 ± 0.45	168.70 ± 0.20	-3.70 ± 0.13 ^{no}
GXB052	168.00 ± 0.25	170.00 ± 0.58	-2.00 ± 0.12 ^{lm}	GXB083	272.40 ± 0.21	225.00 ± 0.14	47.40 ± 0.56 ^a
GXB053	103.60 ± 0.08	88.00 ± 0.34	15.60 ± 0.20 ^d	GXB086	171.30 ± 0.18	164.00 ± 0.30	7.30 ± 0.33 ^g

注：不同小写字母表示不同菌株加硒组与空白组差值存在显著性差异 ($P<0.05$)。

表 3 耐受硒能力强的菌株在10 μg/mL亚硒酸钠浓度下培养后的硒含量

Table 3 Selenium content of the isolates with strong tolerance to selenium after cultivation at 10 μg/mL sodium selenite

菌株	总硒量/(μg/g)	有机硒量/(μg/g)	无机硒/(μg/g)	有机硒转化率/%
GXB005	137.95 ± 0.47 ^k	135.75 ± 0.47	2.20 ± 0.94	98.41 ± 0.68 ^{ab}
GXB011	253.85 ± 0.81 ^g	252.19 ± 0.46	1.65 ± 0.47	99.35 ± 0.18 ^a
GXB023	320.65 ± 0.17 ^f	317.83 ± 0.17	2.82 ± 0.01	99.12 ± 0.02 ^a
GXB025	152.68 ± 0.18 ^j	151.81 ± 1.42	0.87 ± 1.41	99.43 ± 0.93 ^a
GXB032	581.17 ± 0.44 ^c	574.50 ± 2.80	6.67 ± 2.36	98.85 ± 0.41 ^a
GXB035	56.09 ± 0.43 ⁿ	54.57 ± 1.23	1.52 ± 0.94	97.29 ± 1.70 ^{abc}
GXB051	111.89 ± 0.04 ^l	110.05 ± 0.44	1.83 ± 0.47	98.36 ± 0.42 ^{ab}
GXB053	455.62 ± 1.55 ^d	448.37 ± 0.16	7.25 ± 1.63	98.41 ± 0.35 ^{ab}
GXB055	206.03 ± 4.22 ⁱ	198.90 ± 0.04	7.13 ± 4.20	96.58 ± 1.95 ^{abc}
GXB057	150.16 ± 2.24 ^j	141.52 ± 0.78	8.65 ± 2.83	94.27 ± 1.78 ^c
GXB059	736.45 ± 0.56 ^b	733.59 ± 0.57	2.86 ± 0.02	99.61 ± 0.01 ^a
GXB064	83.94 ± 2.96 ^m	81.46 ± 2.30	2.48 ± 0.66	97.06 ± 0.68 ^{abc}
GXB065	386.53 ± 2.08 ^e	375.82 ± 4.72	10.71 ± 5.89	97.23 ± 1.51 ^{abc}
GXB077	216.63 ± 5.23 ^h	212.61 ± 4.75	4.02 ± 0.47	98.15 ± 0.18 ^{ab}
GXB083	1 377.47 ± 4.72 ^a	1367.34 ± 4.73	10.13 ± 0.01	99.26 ± 0.04 ^a
GXB086	221.16 ± 1.47 ^h	210.14 ± 0.38	11.02 ± 1.41	95.02 ± 0.60 ^{bc}

注：不同小写字母表示不同菌株的总硒量或有机硒转化率存在显著性差异（ $P<0.05$ ）。

上述具有较强耐硒能力的 16 株菌在 10 μg/mL 亚硒酸钠浓度下培养后，各菌株的总硒、细胞内有机硒及残留无机硒的含量如表 3 所示。这 16 株菌的总硒量存在显著性差异（ $P<0.05$ ），有机硒转化率均超过了 95%，其中，发酵粘液乳杆菌 GXB083 的总硒达到 1 377.47 μg/g 干菌体，有机硒含量达到 1 367.34 μg/g 干菌体，均为最高，它的富硒能力最强；另外，菌株 GXB032、GXB053、GXB059、GXB065 的总硒和有机硒含量均超过 375 μg/g 干菌体，也明显优于其他菌株。韦梦婷等^[22]的研究表明富硒乳酸菌富硒率最高可达 81.80%。本研究测定的是乳酸菌菌体内的硒含量，乳酸菌可将亚硒酸钠这类无机硒转化为硒蛋白及硒多糖等有机硒，说明富硒乳酸菌可利用低剂量的硒在体内进行转化和积累。最后通过总硒含量确定肠膜明串珠菌亚种 GXB032、食窦魏斯氏菌 GXB053、乳明串珠菌 GXB059、短乳杆菌 GXB065、发酵粘液乳杆菌 GXB083 为富硒优势菌株，进行后续实验。

2.4 生长曲线和加硒时间的确定

筛选出的 5 株富硒优势菌株 GXB032、GXB053、GXB059、GXB065、GXB083 的生长曲线如图 3，

各菌株的繁殖速度有些许差异，但基本都在 3 h 培养后进入对数生长期；GXB083、GXB065 的对数生长期持续到 12 h，随后进入稳定期；GXB032、GXB059、GXB053 的对数生长期持续到 10 h，随后进入稳定期。过早的加入硒，对乳酸菌的毒性较强，易导致菌株生长受到抑制，不利于菌株富集硒。而乳酸菌在对数期代谢旺盛，生长迅速，此时加入硒能获得较大的转化率。Suhajda 等^[24]研究发现，在酵母细胞达到对数生长期后加入亚硒酸钠，可以得到最高的富硒量，在接近稳定期时富硒能力逐渐减弱。故本研究选择在第 3 小时即对数生长前期加入亚硒酸钠，以获得最大富硒量。

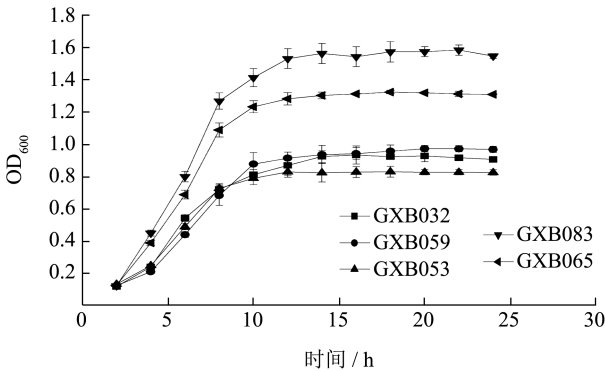


图 3 5 株富硒乳酸菌的生长曲线

Fig.3 Growth curves of five Se-enriched lactic acid bacteria

2.5 适宜亚硒酸钠质量浓度的确定

通过离心洗去培养基再加入同体积的生理盐水，观察不同质量浓度的亚硒酸钠培养的 5 株富硒优势菌株 GXB032、GXB053、GXB059、GXB065、GXB083 的生长情况，见表 4。培养基中的亚硒酸钠的质量浓度在大于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时，肠膜明串珠菌亚种 GXB032、乳明串珠菌 GXB059 和发酵粘液乳杆菌 GXB083 均有不同程度的变红，且变红的程度随着亚硒酸钠的质量浓度增加而加深。食窦魏斯氏菌 GXB053、短乳杆菌 GXB065 则在亚硒酸钠质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时变红。Xia 等^[25]的研究表明，乳酸菌可以将亚硒酸钠等无机硒转化为有机硒，当硒含量过高时，亚硒酸钠被还原为零价态的红色的单质硒。培养基中的菌体变红是无机硒转化为单质硒，且红色越深单质硒含量越高，同时说明亚硒酸钠对乳酸菌菌的生长产生了毒性，乳酸菌出现病理性伤害，导致其生物量及有机硒转化率下降。因此选择培养基里的菌体显示颜色由正常向微红色转变，刚出现了红色单质硒时为最适质量浓度，此时单质硒转化量少，对菌体伤害小。实验显示肠膜明串珠菌亚种 GXB032、乳明串珠菌 GXB059 和发酵粘液乳杆菌 GXB083 的适宜亚硒酸钠质量浓度定为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，食窦魏斯氏菌 GXB053、短乳杆菌 GXB065 的适宜亚硒酸钠质量浓度则定为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

菌株编号	亚硒酸钠的质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)						
	0	5	10	20	40	80	160
GXB032	-	-	+	++	+++	+++	+++
GXB053	-	-	-	+	+	++	+++
GXB059	-	-	+	+	++	++	+++
GXB065	-	-	-	+	++	+++	+++
GXB083	-	-	+	++	++	+++	+++

注：-，正常；+，微红；++，红；+++，深红。

上述 5 株富硒乳酸菌在各自适宜的亚硒酸钠浓度下培养所得的菌体总硒含量及生物量见图 4，总硒含量和生物量增加量最高的为发酵粘液乳杆菌 GXB083，分别为 1 377.85 $\mu\text{g/g}$ 和 47.04 $\text{mg}/120\text{ mL}$ 。食窦魏斯氏菌 GXB053、短乳杆菌 GXB065 由于培养基中的亚硒酸钠质量浓度提高至 20 $\mu\text{g/mL}$ ，其总硒含量分别为 262.91 $\mu\text{g/g}$ 和 486.90 $\mu\text{g/g}$ ；其生物量增加量分别为 22.61 $\text{mg}/120\text{ mL}$ 和 19.96 $\text{mg}/120\text{ mL}$ 。

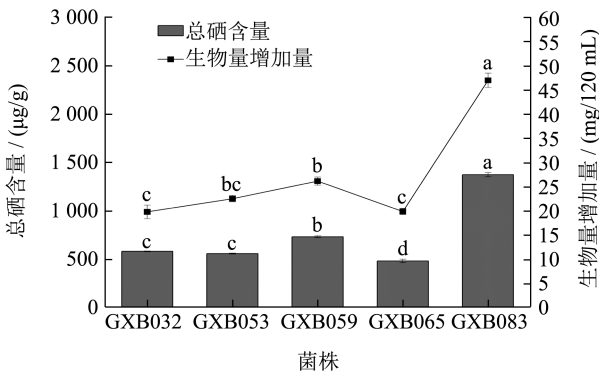


图 4 富硒菌株在最适亚硒酸钠浓度下的总硒含量及生物量增加量

Fig.4 Total selenium content and biomass increase of Se-enriched strains at the optimal sodium selenite concentration

注：不同字母代表不同菌株的总硒含量及生物量之间有显著差异， $P<0.05$ 。

2.6 富硒乳酸菌的抗氧化活性

富硒乳酸菌的无细胞提取物的抗氧化活性结果如图 5 所示，可知富硒培养后的乳酸菌，总体上其无细胞提取物对 DPPH、超氧阴离子和 ABTS^+ 自由基清除率相较于未富硒有显著提高 ($P<0.05$)。其中发酵粘液乳杆菌菌株 GXB083 富硒组的 DPPH 清除率最高，为 43.64%，相比未富硒提高了 7.86%；超氧阴离子自由基清除率最高，为 19.24%，相比未富硒提高了 1.61%； ABTS^+ 自由基清除率最高，为 21.51%，相比未富硒提高了 5.05%。其他 4 株的富硒组相比未富硒也均有提高。肠膜明串珠菌亚种 GXB032 的超氧阴离子自由基和 ABTS^+ 自由基清除率相比未富硒增量最大，分别达 5.04% 和 5.13%。实验结果表明富硒之后的乳酸菌相比未富硒的抗氧化活性均有一定程度的增加。杨靖鹏等^[26]的研究中，富硒后的嗜热链球菌 WY12，其上清液 DPPH 自由基清除率到达 65.99%，相比于未富硒 52.98%，提高了 13.01%，富硒组有显著提高。Kim 等^[27]报道了 8 种，15 株乳酸菌的 DPPH 以及 ABTS^+ 自由基清除率，其中 DPPH 自由基清除率在 2.55%~6.88% 之间， ABTS^+ 自由基清除活性为 19.69%~86.26%。说明乳酸菌富硒之后的总抗氧化能力得到明显的提升。Wang 等^[28]的研究发现，肠膜系乳酸菌对 DPPH 自由基清除能力优于其他菌株，其无细胞提取物 (CFE) 的 DPPH 自由基清除率有 26.37%。乳酸菌能将无机硒转化为有机硒，在细胞内生成硒蛋白和硒多糖^[29]，本研究筛选的富硒优势乳酸菌菌株的有机硒转化率较高，因此具有较好的抗氧化能力。

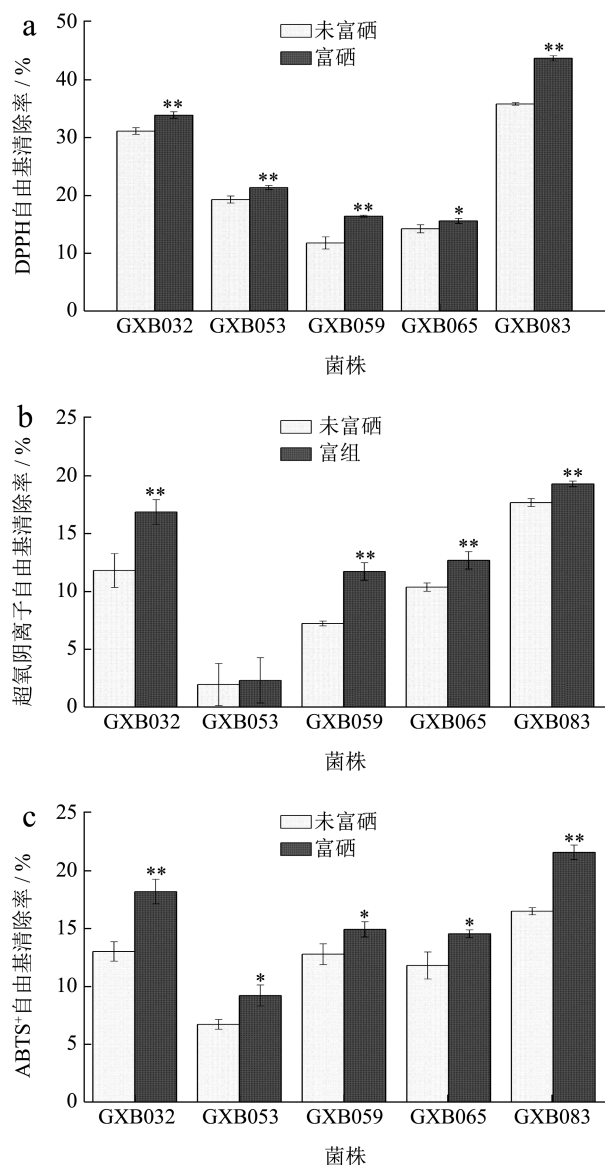


图5 富硒乳酸菌无细胞提取物的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of cell-free extracts of Se-enriched lactic acid bacteria

注: *表示显著, $P < 0.05$, **表示极显著, $P < 0.01$ 。

2.7 富硒乳酸菌的黏附活性

自聚集和细胞表面疏水性直接关系到益生菌的粘附能力,使其能更好地粘附在肠道表面,形成生物膜^[30]。自聚集和细胞表面疏水性的结果如图6所示。GXB053自聚集性最好,富硒组与未加硒组分别为45.17%和45.64%,Vougiouklaki等^[31]研究的乳酸菌自聚集性的范围在4.38%~12.23%,本研究所有菌株的自聚集性都>30%,说明本研究的5株富硒乳酸菌的自聚集性良好,且富硒之后相比未富硒自聚集性变化不显著($P > 0.05$)。图6b显示,

食窦魏斯氏菌 GXB053 的表面疏水性最好,达到了49.66%;表面疏水性最小的菌株为GXB032,为18.03%,Vougiouklaki等^[31]报道的各菌株表面疏水性结果为7.11%~56.63%,说明不同菌株的表面疏水性有较大差异,且本研究各菌株的富硒组与未富硒组变化不大,说明富硒培养对于这5株菌株的黏附活性无明显影响。

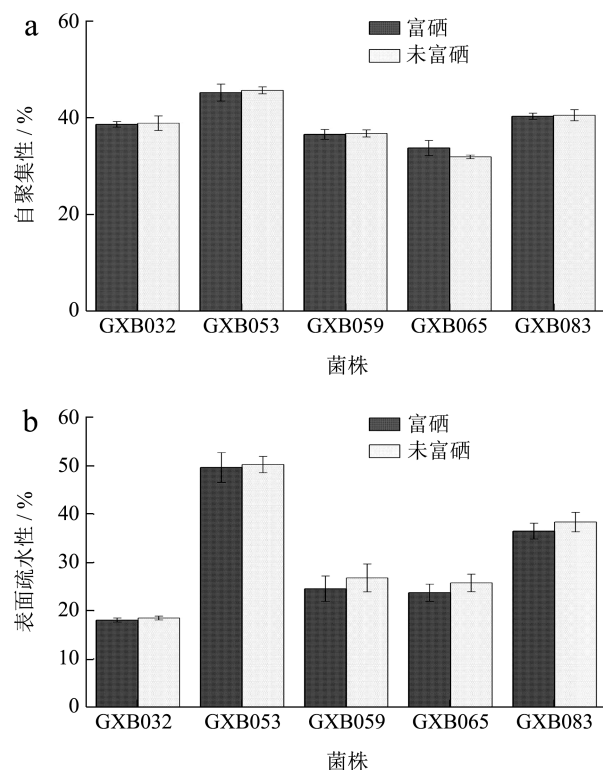


图6 富硒乳酸菌的黏附活性

Fig.6 Adhesive activity of Se-enriched lactic acid bacteria

2.8 富硒乳酸菌的耐酸耐胆盐性

5株富硒乳酸菌的耐酸性和胆汁耐受性结果如图7所示,5株富硒乳酸菌的耐酸性分别为77.95%、80.63%、81.55%、81.02%和83.88%。暴露在胆盐环境4h后,GXB053表现出最高的胆汁耐受性,为69.77%,其次是GXB032(65.81%)、GXB059(55.25%)、GXB083(47.57%)和GXB065(42.1%),Zhang等^[32]的研究发现酸乳杆菌和食窦魏斯氏菌均具有较好的耐酸性(69.96%)以及胆盐耐受性(45.24%),本研究的5株菌株的耐酸耐胆盐性优于Zhang所报道的菌株,说明本研究菌株均具有较强的耐酸耐胆盐性,且所有富硒组与未富硒组均无显著差异($P > 0.05$),证明进行富硒培养之后的富硒乳酸菌的耐酸耐胆盐益生活性并不会发生明显变化。

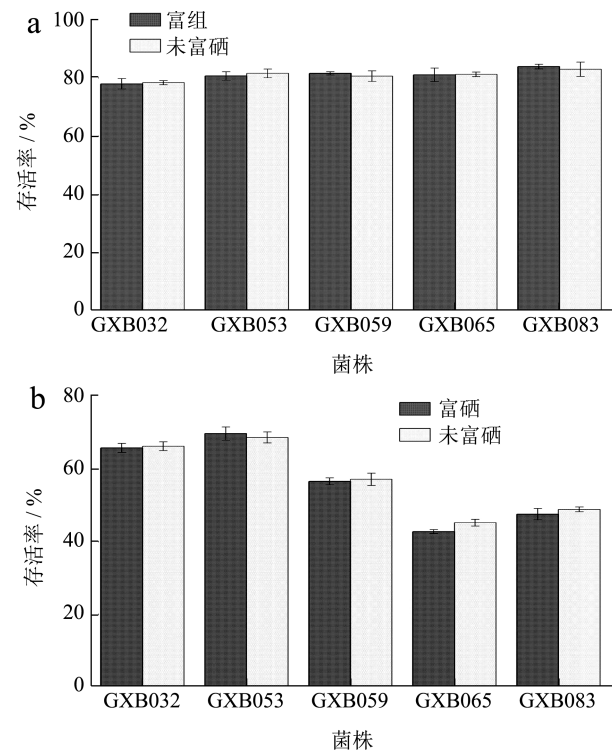


图 7 富硒乳酸菌对酸和胆盐的耐受性

Fig.7 Tolerance of Se-enriched lactic acid bacteria to acid and bile salts

注：图 a 为富硒乳酸菌的耐酸性，图 b 为富硒乳酸菌的胆盐耐受性。

2.9 富硒乳酸菌的胃肠道耐受性

胃的 pH 值在 1.5 到 4.5 之间，消化大约需要 3 h。对于益生菌微生物来说，耐酸能力是一个至关重要的特征。如表 5 和表 6 所示，5 株被试菌株对模拟胃液和模拟肠液中均表现出较高的抗性，除 GXB053 在模拟胃液中富硒组与未富硒组的存活率存在显著差异 ($P<0.05$)，其他 4 株菌株在模拟胃肠液中，富硒与未富硒均无显著差异 ($P>0.05$)；4 h 后所有菌株均仍有活力，菌株 GXB032 和 GXB065 在模拟胃液中各组的存活率均大于 100%，说明菌株在模拟胃液中存活并继续生长，菌株 GXB053、GXB059 和 GXB083 的富硒组在模拟胃液中存活率均达到 98% 以上，在模拟肠液中的存活率均达到 80% 以上。Vougiouklaki 等^[31]的研究发现，产气乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、短乳酸杆菌和植物酸杆菌对模拟胃肠道环境均表现出良好的耐受性（存活率范围在 60.40%~88.81%），本实验的结果优于其他报道，说明本实验的 5 株乳酸菌有较好的胃肠道耐受性，且富硒培养均不会改变其胃肠道耐受性，有作为富硒食品源乳酸菌的潜力。

表 5 富硒乳酸菌在模拟胃液中的存活率						
Table 5 Survival rate of Se-enriched <i>Lactobacillus</i> in simulated gastric juice						
菌株种类	活菌数/(lg CFU/mL)				存活率/%	
	0 h 富硒	4 h 富硒	0 h 未富硒	4 h 未富硒	富硒	未富硒
GXB032	8.70 ± 0.24	9.14 ± 0.18	8.89 ± 0.17	9.34 ± 0.19	105.09 ± 1.19 ^a	105.13 ± 1.01 ^a
GXB053	8.06 ± 0.10	7.92 ± 0.15	8.39 ± 0.16	8.17 ± 0.11	98.17 ± 0.64 ^c	97.45 ± 0.75 ^b
GXB059	8.38 ± 0.11	8.26 ± 0.04	8.65 ± 0.19	8.38 ± 0.09	98.55 ± 1.63 ^{bc}	96.85 ± 2.37 ^b
GXB065	8.48 ± 0.13	8.62 ± 0.17	8.67 ± 0.22	8.81 ± 0.25	101.64 ± 0.65 ^b	101.72 ± 3.02 ^{ab}
GXB083	8.21 ± 0.07	8.15 ± 0.10	8.36 ± 0.13	8.36 ± 0.14	99.23 ± 0.76 ^{bc}	99.99 ± 0.88 ^{ab}

注：不同小写字母表示富硒或未富硒的不同菌株的存活率存在显著性差异 ($P<0.05$)，下同。

表 6 富硒乳酸菌在模拟肠液中的存活率						
Table 6 Survival rate of Se-enriched <i>Lactobacillus</i> in simulated intestinal fluid						
菌株种类	活菌数/(lg CFU/mL)				存活率/%	
	0 h 富硒	4 h 富硒	0 h 未富硒	4 h 未富硒	富硒	未富硒
GXB032	8.88 ± 0.11	8.35 ± 0.2	9.13 ± 0.06	8.72 ± 0.18	94.06 ± 1.22 ^a	95.40 ± 1.55 ^a
GXB053	8.17 ± 0.04	6.72 ± 0.10	8.38 ± 0.05	7.02 ± 0.09	82.28 ± 1.10 ^b	83.78 ± 1.07 ^b
GXB059	7.88 ± 0.09	6.68 ± 0.18	8.17 ± 0.07	7.08 ± 0.26	84.83 ± 2.67 ^b	86.65 ± 3.38 ^b
GXB065	8.21 ± 0.03	7.95 ± 0.05	8.32 ± 0.03	8.29 ± 0.09	96.79 ± 0.26 ^a	99.65 ± 1.43 ^a
GXB083	8.31 ± 0.10	7.71 ± 0.17	8.65 ± 0.16	8.08 ± 0.11	92.82 ± 1.96 ^a	93.50 ± 1.20 ^a

3 结论

本研究从广西巴马地区植物中分离纯化出 89 株乳酸菌, 从中筛选得到 5 株富硒性能优良的乳酸菌, 分别是肠膜明串珠菌亚种 GXB032、发酵粘液乳杆菌 GXB083、乳明串珠菌 GXB059、食窦魏斯氏菌 GXB053、短乳杆菌 GXB065。对这 5 株菌株进行富硒培养, 并进行体外活性的比较, 富硒组 DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力相较于未富硒均明显升高, 其中 GXB083 的 DPPH、超氧阴离子和 ABTS⁺ 自由基清除率最高, 分别为 43.64%、19.24% 和 21.51%, GXB032 的超氧阴离子和 ABTS⁺ 自由基清除率相比未富硒增量最多, 分别有 5.04% 和 5.13%。5 株富硒乳酸菌均具有较好的耐酸耐胆盐性以及胃肠道耐受性, 在 pH 值 3.0 的条件下存活率均大于 79.55%, 在 0.3% 质量浓度的胆盐暴露 4 h 后, GXB032 的存活率最高, 达到了 69.77%, 且 5 株存活率均大于 42%。5 株菌株在模拟胃液中存活率均大于 96%, 在模拟肠液中均大于 82%。GXB053 自聚集性最好, 富硒组与未加硒组分别为 45.17% 和 45.64%。GXB053 的表面疏水性最好, 达到了 49.66%。实验证明这 5 株富硒能力强的乳酸菌是良好的硒载体, 可将无机硒转化成有机硒, 且可作为潜在的益生菌用于开发富硒食品。后期将进一步分析富硒乳酸菌中有机硒的形态及其在发酵食品中的应用, 为富硒乳酸菌的研究提供更多的支撑。

参考文献

- [1] ZHOU M, ZHENG X, ZHU H, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* enriched with organic/inorganic selenium on the quality and microbial communities of fermented pickles [J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130495.
- [2] MARTÍNEZ F G, MORENO M G, PESCUA M, et al. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: Formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids. front [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 506.
- [3] 邱洪晟, 谭雪英, 侯继尧, 等. 和田地区百岁老人生活区土壤元素检测分析[J]. 微量元素与健康研究, 2000, 17(3): 52-53.
- [4] KELLER W D. Drinking water: a geochemical factor in human health [J]. GSA Bulletin, 1978, 89(3): 334-336.
- [5] 李维. 广西巴马典型长寿区水、土壤、粮食中微量元素含量及分布规律研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2022.
- [6] YANG J, YANG H. Recent development in Se-enriched yeast, lactic acid bacteria and bifidobacteria [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 63(3): 411-425.
- [7] XU Y, WU S, HE J, et al. Salt-induced osmotic stress stimulates selenium biotransformation in *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 131: 109763.
- [8] 徐颖, 康超, 吕嘉彬, 等. 乳酸菌生物富硒作用研究[J]. 陕西科技大学学报, 2018, 36(3): 52-56, 77.
- [9] CHEN L, PAN D D, ZHOU J, et al. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(37): 5795-5800.
- [10] REN Z, ZHAO Z, WANG Y, et al. Preparation of selenium/zinc-enriched probiotics and their effect on blood selenium and zinc concentrations, antioxidant capacities, and intestinal microflora in Canine [J]. Biological Trace Element Research, 2011, 141(1-3): 170-183.
- [11] 孙显. 富硒褶皱臂尾轮虫生理生化特征及抗衰老机制的初步研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [12] 宋照军, 王树宁, 潘润淑, 等. 富硒乳酸菌的分离、筛选、驯化及富硒研究[J]. 中国酿造, 2004, 11: 4-6.
- [13] RAGUL K, KANDASAMY S, DEVI P B, et al. Evaluation of functional properties of potential probiotic isolates from fermented brine pickle [J]. Food Chemistry, 2020, 311: 126057.
- [14] JUNG J, JANG H J, EOM S J, et al. Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: Ginsenoside conversion and antioxidant effects [J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(1): 20-26.
- [15] LIU W, WANG H Y, PANG X B, et al. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 451-457.
- [16] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26: 1231-1237.
- [17] VASIEE A, FALAH F, BEHBAHANI B A, et al. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130: 471-479.
- [18] MOHANTY D, PANDA S, KUMAR S, et al. *In vitro* evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica* [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 126: 212-217.
- [19] LI M, WANG Y, CUI H Y, et al. Characterization of lactic

- acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a wild boar as potential probiotics. Front [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 49.
- [20] SON S H, JEON H L, JEON E B, et al. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 85: 181-186.
- [21] ZHANG B W, ZHOU K, ZHANG J L. et al. Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium Animalis* 01 [J]. Food Chemistry, 2009, 115 (2): 727-734.
- [22] 韦梦婷,王英,单成俊,等.富硒乳酸菌的筛选和体外活性的研究[J].食品工业科技,2021,42(8):102-108.
- [23] PUSZTAHELYI T, KOVÁCS S, PÓCSI I, et al. Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2015, 30: 96-101.
- [24] SUHAJDA Á, HEGÓCZKI J, JANZSÓ B, et al. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2000, 14(1): 43-47.
- [25] XIA S K, CHEN L, LIANG J Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2413-2417.
- [26] 杨靖鹏,宋云博,李俊娥,等.乳酸菌富硒能力及其体外生物活性评估[J].中国食品学报,2019,19(1):171-182.
- [27] KIM S, LEE J Y, JEONG Y, et al. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria [J]. Fermentation, 2022, 8(1): 29.
- [28] WANG H, LI L. Comprehensive evaluation of probiotic property, hypoglycemic ability and antioxidant activity of lactic acid bacteria [J]. Foods, 2022, 11: 1363.
- [29] MAO G H, FENG W W, XIAO H, et al. Purification, characterization, and antioxidant activities of selenium-containing proteins and polysaccharides in royal sun mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2014, 16(5): 463.
- [30] JARA J, RAMOS A P, SOLAR G D, et al. Role of Lactobacillus biofilms in *Listeria monocytogenes* adhesion to glass surfaces [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 334: 108804.
- [31] VOUGIOUKLAKI D, TSIRONI T, TSANTES A G, et al. Probiotic properties and antioxidant activity *in vitro* of lactic acid bacteria [J]. Microorganisms, 2023, 11(5): 264.
- [32] ZHANG Q L, WANG M, MA X, et al. *In vitro* investigation on lactic acid bacteria isolated from Yak faeces for potential probiotics [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 984537.