具有硒吸附能力乳酸菌的筛选及安全性评价

于雷雷¹, 许惠婷¹, 翟齐啸¹, 郭仁妹², 崔树茂¹, 陈卫^{1*}

1. 江南大学食品学院, 无锡 214122;

2. 苏州硒泰克生物科技有限公司, 苏州 215100

* 联系人, E-mail: weichen66@jiangnan.edu.cn

2018-09-06 收稿, 2018-10-20 修回, 2018-10-22 接受, 2018-11-28 网络版发表

江苏省青年基金(BK20180603)、江苏省博士后基金(2018K016A)、国家自然科学基金重点项目(31530056)和江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A052)资助

摘要 乳酸菌具有将无机硒转化为有机硒的潜在能力和多种益生特性, 故将其作为安全高效的硒载体进行补硒已日益成为研究热点. 本研究通过测定来源于8个种水平的43株乳杆菌的硒吸附能力, 最终筛选出一株具有硒吸附能力较高的乳杆菌菌株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)RS7-1, 其对硒的吸附率可达40.79%. 同时, 通过测定不同初始pH、初始菌体浓度、初始硒浓度和不同吸附时间研究该菌株的吸附特性. 此外, 测定该菌株的耐酸和耐胆盐特性以研究其在胃肠道中是否仍可保持较高活性, 并通过体外抗生素耐受性实验以及体内急性毒性实验和30 d喂养实验对其安全性进行评价. 结果表明, 植物乳杆菌RS7-1硒吸附的最适pH为5.0, 最适初始菌体浓度为2 g/L, 在初始硒浓度为20 mg/L时达到最大吸附量, 在吸附时间为60 min即达到平衡. 同时, 该菌株具有较强的耐酸和耐胆盐能力, 不存在非种属特有的抗生素耐受性. 动物实验结果表明, 饲喂植物乳杆菌RS7-1菌悬液的实验组小鼠的摄食量、体重、血常规指标和血生化指标与空白组无显著差异, 且组织器官无病变. 因此, 综合评价植物乳杆菌RS7-1是一株硒吸附能力强、耐酸和耐胆盐、安全性好的乳酸菌, 具有良好的应用价值.

关键词 乳酸菌, 硒, 吸附, 安全性

硒是人类和动物必需的微量元素之一, 通常以硒蛋白的形式存在, 并参与哺乳动物体内的各种生化和生理功能, 例如提高免疫力和抗氧化性^[1]. 根据美国国家科学院的报告, 成人每日应摄入的硒量为55 μg ^[2]. 硒摄入不足可能导致心脏、肌肉、骨骼和免疫功能紊乱^[3,4]. 在中国及亚洲一些地区, 硒含量较低, 故大骨节病和克山病发病率较高^[5]. 因此, 应加大对补硒的重视, 由于有机硒相对无机硒活性高^[6], 有机硒补充剂的研究受到广泛关注.

乳酸菌具有多种益生功能和较高的食用价值, 是被世界公认为“generally recognized as safe (GRAS)”的微生物, 它能够合成维生素B, 刺激免疫反应, 降低

胆固醇和增强抗氧化能力, 并预防溃疡, 减轻肠道炎症^[7,8]. 由于乳酸菌的安全性和益生特性, 其被广泛应用于发酵食品和饮料的生产中. 研究发现, 许多乳酸菌能够吸附无机硒, 并可将其生物转化成有机硒, 如硒代半胱氨酸、硒代甲硫氨酸和甲基化的硒化合物^[9]. 因此乳酸菌可作为有机硒的重要来源为人体补充营养, 另一方面, 定植于肠道的乳酸菌可从饮食中积累硒, 进而影响人体的硒摄入量, 从而改变后者硒蛋白的表达. 研究发现, 富硒乳酸菌可以通过增强和维持关键抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性来防止实验性诱导的小鼠肝损伤^[10]. 富硒益生菌可强烈抑制昆明小鼠肠道中致病性大肠

引用格式: 于雷雷, 许惠婷, 翟齐啸, 等. 具有硒吸附能力乳酸菌的筛选及安全性评价. 科学通报, 2019, 64: 327–336

Yu L L, Xu H T, Zhai Q X, et al. Screening and safety evaluation of lactic acid bacteria with selenium adsorption capacity (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 327–336, doi: 10.1360/N972018-00580

杆菌^[11], 并且还可降低犬粪便中大肠杆菌、葡萄球菌和肠球菌的数量^[12]. 因此富硒益生菌产品具有广阔的应用前景, 日益成为研究热点.

因此, 本研究对43株不同种乳杆菌的硒吸附能力进行体外筛选, 旨在得到一株具有良好硒吸附能力的乳酸菌, 并研究其吸附特性. 此外, 测定其耐酸耐胆盐特性, 评价其体内和体外的安全性, 以期为富硒益生菌产品的开发应用提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂

8个种水平的43株乳杆菌来源于江南大学食品生物技术中心菌种保藏中心. 具体编号如下: 发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentium*)XHT5-8, XHT76, NT2-1, XHT15-1, XHT4-2, XHT10-2; 鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)XHT4-1, XHT3-1, XHT15-L1, XHT28-1, XHT2-1, PAL1; 唾液乳杆菌(*L. salivarius*)XHT24-3, XHT9-6, XHT14-7, XHT18-2, XHT7-4, XHT25-1; 植物乳杆菌(*L. plantarum*)RS7-1(GDMCC 60391), XHT713, XHT601, XHT567, XHT233, RS6-3; 干酪乳杆菌(*L. casei*)XHT3-3, RS42-2, RS8-5, RS29-1, NT52-4, PS5-4; 格氏乳杆菌(*L. grisoides*)XHT1-1, XHT12-9, XHT74, XHT6-1, XHT5-10, XHTD2-1; 保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)菌XHT2-49, XHT169, XHT4, XHT168; 短乳杆菌(*L. brevis*)RS6-12, DL1-11, HY2-1.

蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、无水葡萄糖、无水乙酸钠、七水合硫酸镁、一水合硫酸锰、柠檬酸氢二铵、三水合磷酸氢二钾、吐温80、硝酸和过氧化氢等均购自于国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆汁盐购自于美国Sigma公司; 庆大霉素、卡那霉素等13种抗生素均购自于生工生物工程(上海)股份有限公司; 谷草转氨酶(AST)测定试剂盒, 谷丙转氨酶(ALT)测定试剂盒, 甘油三酯(TG)测定试剂盒, 肌酐(CRE)测定试剂盒, 总胆固醇(TCHO)测定试剂盒, 白蛋白(ALB)测定试剂盒, 血液尿素氮(BUN)测定试剂盒, 总蛋白(TP)测定试剂盒均购自于南京建成生物工程研究所.

1.2 乳酸菌的活化与培养

从-80℃冰箱中取出保菌管, MRS固体平板划线, 37℃培养18 h, 挑取单菌落接种于MRS液体培养基, 37℃培养18 h, 之后以2%的接种量接种于MRS液体

培养基中, 37℃培养18 h, 连续活化三代后以2%的接种量接种于1 L的MRS液体培养基中扩大培养, 37℃培养18 h. 8000×g离心10 min, 用超纯水洗涤菌体沉淀3次后用于后续实验.

1.3 乳酸菌的硒吸附率测定

在参照前人研究方法^[13]的基础上稍作修改. 将1.2方法中得到的菌泥置于锥形瓶中, 加入100 mL初始硒浓度为50 mg/L的亚硒酸钠溶液, 使干菌体浓度达到1 g/L, 置于37℃摇床中振荡培养1 h. 8000 g, 10 min离心得到菌泥, 超纯水反复洗涤3次. 将菌泥置于60℃烘箱中烘干过夜得到干菌体, 并称重. 按照国标GB5009.268-2016^[14]中的方法, 对干菌体进行消解, 用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定硒浓度, 计算硒吸附率, 每个菌株做3个平行.

1.4 目标菌株硒吸附特性的研究

将1.2方法制备的菌泥置于锥形瓶中, 加入100 mL初始硒浓度为50 mg/L的亚硒酸钠溶液, 使干菌体浓度达到1 g/L, 分别调节pH至2, 3, 4, 5, 6和7, 37℃摇床培养1 h. 按上述方法测定硒浓度, 计算硒吸附量, 每个pH做3个平行, 分析得到吸附的最优pH.

将菌泥置于锥形瓶中, 并加入100 mL初始硒浓度为50 mg/L的亚硒酸钠溶液, 使干菌体浓度分别为1, 2, 2.5, 5, 10 g/L, 调节pH至5, 在37℃摇床中振荡培养1 h. 按上述方法测定硒浓度, 计算硒吸附量, 每个接种量做3个平行, 分析得到吸附的最优接种量.

将菌泥重悬于初始硒浓度为0.05, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L的亚硒酸钠溶液中, 干菌体浓度为1 g/L, 在37℃摇床培养1 h. 按上述方法测定硒浓度, 计算硒吸附量, 每个浓度梯度做3个平行, 分析得到吸附的最适初始硒浓度.

将菌泥置于锥形瓶中, 并加入100 mL初始硒浓度为50 mg/L的亚硒酸钠溶液, 使干菌体浓度达到1 g/L, 置于37℃摇床中振荡培养2.5, 5, 7.5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min. 用ICP-MS测定硒浓度, 计算硒吸附量, 每个时间梯度做3个平行, 分析得到吸附的最适反应时间.

1.5 目标菌株耐酸耐胆盐特性的测定

按Ranadheera等人^[15]所述方法, 将胃蛋白酶重悬于经灭菌的0.5%(W/V)生理盐水中使其浓度达到

3 g/L, 将pH调至2.0得到模拟胃液. 将胰酶重悬于经灭菌的0.5%(W/V)生理盐水中使其浓度达到1 g/L, 加入0.3%胆盐并将pH调至8.0得到模拟肠液.

取3份1 mL菌液, 离心洗涤, 分别重悬于1 mL 0.5%(W/V)无菌盐水、1 mL模拟胃液和1 mL模拟肠液混匀, 置于37℃恒温培养箱中培养. 1 mL模拟胃液, 分别在1, 3 h时取出100 μL菌液进行活菌计数, 计算存活率, 确定耐酸特性. 1 mL模拟肠液, 分别在2, 4 h时取出100 μL菌液进行活菌计数, 计算存活率, 确定耐胆盐特性.

其中存活率($\%$)= $P_1/P_0 \times 100$, P_1 为胁迫处理后活菌数, P_0 为胁迫处理前活菌数.

1.6 目标菌株的安全性评价

(i) 抗生素耐受性实验. 参照国际标准ISO10932^[16]中的方法. 具体如下, 选取质控菌株ATCC14017作为参照, 配制13种常见抗生素母液: 2倍梯度稀释后取100 μL加入96孔板, 用LSM培养基对菌悬液进行稀释, 取100 μL加入96孔板, 厌氧培养24 h后用酶标仪测定菌株的 A_{625} 值, 得到13种抗生素对该菌株的最小抑菌浓度, 即MIC值. 其中, 抗生素的浓度范围如表1.

(ii) 实验动物及适用性喂养. 选取体重相似的4周龄SPF级成年C57BL/6品系小鼠雌、雄性各40只, 饲养于江南大学实验动物中心中(许可证号JN.No 20171115c1200101[77]), 遵循白天、黑夜12 h交替一次的循环标准, 并严格控温控湿. 小鼠适应7 d后开始实验.

表1 抗生素浓度范围

Table 1 The concentrations range of antibiotic

抗生素名称	稀释浓度范围($\mu\text{g/mL}$)
庆大霉素	0.5~256
卡那霉素	2~1024
链霉素	0.5~256
新霉素	0.5~256
四环素	0.125~64
红霉素	0.016~8
克林霉素	0.032~16
氯霉素	0.125~64
氨苄青霉素	0.032~16
万古霉素	0.25~128
利奈唑胺	0.032~16
环丙沙星	0.25~128
利福平	0.125~64

(iii) 急性毒性动物实验. 参考GB15193.3-2014《食品安全国家标准急性经口毒性实验》^[17]要求开展实验, 适应期结束后随机选取雌雄小鼠, 分成2组, 分别为空白组和配方组, 每组雌雄各10只. 其中空白组灌胃脱脂乳, 配方组灌胃目的菌株菌悬液, 其中灌胃菌量达到 10^9 cfu/只. 一次性灌胃, 剂量0.2 mL/只. 灌胃后, 观察记录小鼠的行为特征以及死亡和中毒情况. 在实验前, 3, 7和14 d称重记录体重和摄食量. 实验结束后大体解剖小鼠, 若器官有体积、颜色等变化, 应对该器官进行病理学检查.

(iv) 30 d喂养试验. 参考GB 15193.13-2015《食品安全国家标准30天和90天喂养试验》^[18]和GB 15193.22-2014《食品安全国家标准28天进口毒性试验》^[19]要求开展实验, 适应期结束后随机选取雌雄小鼠, 分成2组, 分别为空白组和配方组, 每组雌雄各10只. 其中空白组灌胃脱脂乳, 配方组灌胃目的菌株菌悬液, 其中灌胃菌量达到 10^9 cfu/只. 连续每日灌胃, 观察记录小鼠的行为特征以及死亡和中毒情况. 在实验前, 3, 7, 14, 21, 28 d称重记录体重和摄食量.

实验结束后解剖小鼠, 对肝、肾组织称重, 计算脏器系数; 通过试剂盒测定血常规指标和血液生化指标. 将取出的肝、肾组织在多聚甲醛溶液中固定10 h, 经石蜡包埋、切片、染色后通过光学显微镜进行病理学检查^[20].

1.7 数据分析

实验数据均以平均值 $\pm$ 均值标准误差(mean $\pm$ SEM)表示. 数据统计采用One-Way ANOVA分析, 以及Tukey's多重检验. P 值小于0.05被认为数据差异显著.

2 结果与讨论

2.1 具有硒吸附优势的乳酸菌筛选

比较8个不同种水平43株乳酸菌在相同吸附条件下对硒的吸附率, 分析乳酸菌种间及种内硒吸附能力的差异, 筛选得到一株具有较强硒吸附能力的植物乳杆菌RS7-1, 结果如图1所示. 在初始硒浓度为50 mg/L时, 不同种属菌株的硒吸附率具有显著差异. 之前研究发现, 多种乳杆菌对硒均具有较好的生物转化能力, 如植物乳杆菌^[21]、保加利亚乳杆菌^[22]、布氏乳杆菌^[23]、罗伊氏乳杆菌^[24]、鼠李糖乳杆菌^[25]、短乳杆菌^[26]、干酪乳杆菌^[27]、发酵乳杆菌^[28]等. 由

图1 不同乳酸菌对硒离子的吸附能力

Figure 1 The selenium adsorption capability among different strains of lactic acid bacteria

于乳杆菌对硒的生物吸附是一个复杂的多途径相结合的过程,其中包括细胞壁与硒离子的相互作用,细胞表面硒元素的结合位点包括羧基、羟基、磷酸酯基团、多糖和蛋白等^[29],不同种属的菌株可能由于其结合位点的分布、数量、种类存在差异,故具有不同的硒吸附能力。相较于其他种属,植物乳杆菌对硒的吸附具有明显优势。而在6株植物乳杆菌中,RS7-1的吸

附率可达 $40.79\% \pm 1.27\%$,显著高于其他5株菌,故可初步确定植物乳杆菌RS7-1为硒吸附能力较强的优势菌株进行进一步实验。

2.2 目标菌株硒吸附特性的分析

2.2.1 pH对硒吸附能力的影响

在37℃,初始硒浓度为50 mg/L,振荡时间为1 h

图2 植物乳杆菌RS7-1的吸附特性。(a) 初始pH对植物乳杆菌RS7-1 硒吸附能力的影响;(b) 初始菌体浓度对植物乳杆菌RS7-1 硒吸附能力的影响;(c) 吸附时间对植物乳杆菌RS7-1 硒吸附能力的影响;(d) 初始硒溶液浓度对植物乳杆菌RS7-1 硒吸附能力的影响

Figure 2 Adsorption characteristics of *Lactobacillus plantarum* RS7-1. (a) Effect of initial pH change on selenium adsorption capacity of *L. plantarum* RS7-1; (b) effect of initial cell concentration on selenium adsorption capacity of *L. plantarum* RS7-1; (c) effect of contact time on selenium adsorption capacity of *L. plantarum* RS7-1; (d) effect of initial selenium solution on selenium adsorption capacity of *L. plantarum* RS7-1

的条件下, 初始pH改变对植物乳杆菌RS7-1的硒吸附量的影响结果如图2(a)所示. 结果可知, 当初始pH从2增加到5时, 菌株的硒吸附量不断增加; 而随着pH的进一步上升, 硒吸附量开始下降, 在pH从6增加至7时, 硒吸附量基本不变, 因此植物乳杆菌RS7-1对硒吸附的最适pH是5.

根据文献[30,31]报道, 溶液pH会影响细胞表面的结合位点以及金属离子在水溶液中的化学性质. 在pH较低时, 溶液中存在大量的 H^+ , 同硒离子竞争细胞表面的结合位点, 从而阻碍硒离子到达结合位点, 因此造成菌株对硒的低吸附量^[32]. 同时, 当溶液中含有大量 H^+ 时, SeO_3^- 会和 H^+ 反应生成 H_2SeO_3 , 其不能与菌体表面发生静电相互作用^[33], 这也导致了硒的低吸附量. 随着pH的增加, H^+ 不断减少, 细胞表面暴露出来的结合位点增加, 因此菌株对硒的吸附量增加. 而当pH过高时, 高浓度的 OH^- 会与硒离子结合, 从而导致吸附量的下降.

2.2.2 初始菌体浓度对硒吸附能力的影响

初始硒浓度为50 mg/L, 吸附时间为1 h的条件下, 菌体浓度改变对植物乳杆菌RS7-1的硒吸附量的影响结果如图2(b)所示. 当菌体浓度由1 g/L增加至2 g/L时, 菌株对硒的吸附量增加; 而在菌体浓度继续增加至10 g/L时, 菌株对硒的吸附量呈下降趋势. 故可确定植物乳杆菌RS7-1在吸附硒时的最适菌体浓度为2 g/L.

当菌体浓度较低时, 菌体表面的结合位点对硒的吸附达到饱和, 而溶液中残留的硒离子浓度较高. 当菌体浓度增加时, 菌体表面的结合位点随之增加, 故菌株对硒的吸附量增加. 而当菌体浓度过高时, 菌体表面的带电基团易导致细菌细胞间相互碰撞和菌体自凝集等现象, 从而造成硒离子的解吸附和减少吸附位点的暴露, 因此导致硒吸附量的下降^[34].

2.2.3 吸附时间对硒吸附能力的影响

在37℃, 初始硒浓度为50 mg/L, 菌体浓度为1 g/L的条件下, 吸附时间改变对植物乳杆菌RS7-1的硒吸附量的影响结果如图2(c)所示. 可以看出, 植物乳杆菌RS7-1对硒的吸附可分为两个阶段: (1) 快速吸附阶段, 在吸附的前60 min里, 吸附量迅速增加; (2) 吸附平衡阶段, 在60~120 min的时间段内, 吸附量变化不大, 基本达到吸附平衡状态. 这与文献中报道的基本一致, 即细菌的生物吸附是一个短暂并且迅速的过程^[35], 在30~60 min中完成初始吸附阶段,

并在2~3 h逐渐达到吸附平衡^[36], 而传质阻力的存在会导致吸附平衡的迟滞^[37]. 另有研究认为, 后期吸附量的少量增加可能是由于细菌的生物吸附存在两种机制, 即不仅包括离子与细胞表面官能团的结合, 还包括细胞内部富集^[38].

2.2.4 初始硒溶液浓度对硒吸附能力的影响

在37℃, 吸附时间为1 h, 菌体浓度为1 g/L的条件下, 初始硒浓度改变对植物乳杆菌RS7-1的硒吸附量的影响结果如图2(d)所示. 随着硒溶液浓度的改变, 植物乳杆菌RS7-1对硒的吸附量改变明显, 在硒溶液浓度较低时, 硒吸附量缓慢增加; 当硒溶液浓度从1 mg/L增加到20 mg/L时, 吸附量增加迅速, 之后吸附逐渐达到平衡, 可能是由于在溶液浓度为20 mg/L时, 菌体表面硒的吸附位点基本达到饱和状态, 故继续增加溶液浓度对吸附量的影响不大. 因此我们可以认为, 植物乳杆菌RS7-1在进行硒吸附实验时最适硒溶液浓度为20 mg/L.

2.3 目标菌株耐酸耐胆盐特性分析

经模拟胃液处理后1和3 h后, 植物乳杆菌RS7-1的存活率分别为98.43%和95.28%; 而经过模拟肠液处理后4 h, 植物乳杆菌RS7-1仍具有29.72%的存活率, 对胃肠道的环境耐受性较好. 人体胃液的pH在2.5~3.5之间, 且食物在胃中停留的时间一般为2~4 h, 之后进入肠道, 肠道富含胰蛋白酶、胆汁盐, pH在8左右^[39]. 只有当益生菌以一定的存活率穿过胃肠道屏障环境, 能够耐受胃酸、胆汁及消化酶, 进而定植于肠道, 才能发挥它的许多益生作用. 因此益生菌的耐酸和耐胆盐特性是维持益生菌功效的重要因素. 植物乳杆菌RS7-1具有良好的耐酸和耐胆盐特性, 可在被人体食用后保持高活性的抵达结肠环境发挥其益生特性.

2.4 目标菌株安全性评价

2.4.1 耐抗生素特性分析

植物乳杆菌RS7-1对不同种类的抗生素耐受性不同(表2). 其中, 该菌株对万古霉素的耐受性最强, 在任何浓度下均耐受; 对庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素、四环素、环丙沙星的耐受性次之, MIC值在16~128之间; 对红霉素和克林霉素极度敏感, 其MIC值小于等于1; 对氯霉素、氨苄青霉素、利奈唑胺、利福平的敏感性次之, MIC值在2~8之间. 这与文献报

表2 植物乳杆菌RS7-1 耐抗生素特性结果

Table 2 Antibiotic resistance of *L. plantarum* RS7-1

抗生素名称	MIC($\mu\text{g/mL}$)	
	质控菌株ATCC14917	RS7-1
庆大霉素	— ^{a)}	16
卡那霉素	— ^{a)}	128
链霉素	— ^{a)}	16
新霉素	— ^{a)}	32
四环素	8~32	32
红霉素	0.25~2	0.25
克林霉素	0.5~4	1
氯霉素	4~16	8
氨苄青霉素	0.25~2	2
万古霉素	— ^{a)}	Δ ^{b)}
环丙沙星	16~64	32
利奈唑胺	2~8	4
利福平	1~4	4

a) —, 不适用; b) Δ , 任何浓度下均耐受

道基本一致, 由于植物乳杆菌细胞壁上五肽末端的D-丙氨酸残基被D-乳酸或D-丝氨酸取代, 阻止万古霉素的结合, 因此植物乳杆菌存在对万古霉素的天然抗性基因^[40]. 由于具有抗生素抗性基因的益生菌被人体食用后存在向致病菌转移其抗性基因的可能性, 从而导致对人体健康的潜在风险, 故有必要对益生菌的抗生素耐受性进行评价^[41]. 通过参考质控菌株ATCC14917的MIC测定范围, 说明对植物乳杆菌RS7-1的测定具有一定的可信度, 故植物乳杆菌RS7-1不存在非种属特有的抗生素耐受性, 是一株安全性较好的可食用菌株.

2.4.2 急性毒性动物实验指标情况

一次性给予目的菌株后14 d的观察期内, 各组雌雄小鼠均正常活动, 精神良好, 饮水正常, 小鼠未出现中毒和死亡的情况. 小鼠解剖后未发现小鼠脏器出现体积、颜色等病理变化. 各实验组老鼠的体重以及摄食量变化情况如图3(a)和(b)所示. 由图3(a)和(b)

图3 小鼠体重和摄食量变化. (a) 急性毒性实验小鼠体重变化; (b) 急性毒性实验小鼠摄食量变化; (c) 30 d喂养实验小鼠体重变化; (d) 30 d喂养实验小鼠摄食量变化

Figure 3 The changes of body weight and food consumption of mice. (a) The changes of body weight in mice of acute toxicity experiment; (b) the changes of food consumption in mice of acute toxicity experiment; (c) the changes of body weight in mice of 30 d feeding experiment; (d) the changes of food consumption in mice of 30 d feeding experiment

可知,在急性毒性实验中,各组小鼠的体重、摄食量无明显异常($P>0.05$),各组小鼠都正常摄食生长,表明目的菌株对小鼠的体重和摄食量没有影响。

2.4.3 30 d喂养实验

小鼠体重和摄食量指标情况.连续给予目的菌株后28 d的观察期内,各组雌雄小鼠均正常活动,精神良好,饮水正常,小鼠未出现中毒和死亡的情况.数据采用One-Way ANOVA分析,在30 d喂养观察期内,各组小鼠正常生长,从图3(c)和(d)可以发现小鼠体重和摄食量在各组之间并没有显著性差异($P>0.05$),所以喂食目的菌株对小鼠体重、摄食量没有影响。

小鼠血常规、脏器系数、血生化指标情况.血常规是作为诊断疾病的一种常见辅助手段.检测项目主要有血红蛋白、红细胞、白细胞等,由表3可知30 d喂养试验各组小鼠在血红蛋白含量、红细胞计数、白细胞计数上没有显著差异,说明喂食目的菌株对小鼠血常规指标没有影响.实验结束,小鼠解剖取小鼠肝脏、肾脏用生理盐水清洗,称重,计算脏器系数,数据采用One-Way ANOVA分析,结果如表3,发现空白鼠与配方组小鼠脏器系数并没有显著差异($P>0.05$).

血生化是诊断身体主要指标的一种常见手段,一般包括血糖、血脂、肝功、肾功等,为判断疾病提供了重要依据,按试剂盒说明书的要求测定血生化

指标.由表4可知30 d喂养试验各组小鼠在血生化指标上没有显著差异($P>0.05$),说明喂食目的菌株对小鼠血生化没有影响。

对经30 d喂养试验的小鼠进行肝、肾的病理学检查,结果如图4所示.空白组小鼠、配方组小鼠肝脏外形正常,未见水肿、炎症、坏死等病变情况.肾脏外形正常,未见肾小球萎缩、坏死等病变情况.各组各个器官均未出现病变,说明2种膳食补充剂未造成小鼠组织、器官病变损伤。

3 结论

本实验通过测定8个种水平43株乳杆菌对硒的吸附能力,筛选得到一株植物乳杆菌RS7-1为硒吸附能力较强的目的菌株.通过研究其吸附特性,得到该菌株对硒吸附的最适初始pH为5.0,最适初始菌体浓度为2 g/L,且该菌株在初始硒溶液浓度为20 mg/L时即可达到最大吸附量,在吸附时间为60 min吸附平衡,同时研究发现该菌株对硒的吸附可分为2个阶段,即前期快速吸附阶段和后期吸附平衡阶段.体外实验发现其耐酸和耐胆盐特性良好.同时对该菌株进行了体外和体内的安全性评价,体外实验结果说明不存在非种属特有的抗生素耐受性,故不存在向致病菌转移抗性基因的潜在风险;体内实验结果发现喂食植物乳杆菌RS7-1对小鼠的各项生理指标没有影

表3 30 d喂养试验小鼠血液常规指标和脏器系数指标^{a)}

Table 3 The hematological indexes of blood and organ coefficient index of mice in 30 d feeding experiment

组别	血红蛋白 (g/L)	红细胞 ($10^{12}/L$)	白细胞			脏器系数	
			总数 ($10^9/L$)	淋巴细胞 ($10^9/L$)	中性粒细胞 ($10^9/L$)	肝脏(%)	肾脏(%)
空白组(雄)	161±7.17	10.98±0.45	4.64±0.12	4.75±0.08	1.33±0.60	4.18±0.29	1.22±0.13
配方组(雄)	162±6.08	10.89±0.59	3.35±0.58	2.80±0.42	0.50±0.20	4.24±0.40	1.21±0.07
空白组(雌)	155±10.21	10.44±0.90	2.86±0.23	2.37±0.23	0.40±0.44	4.27±0.17	1.18±0.16
配方组(雌)	163±4.00	10.89±0.59	3.35±0.68	2.67±0.40	0.75±0.55	4.39±0.45	1.24±0.06

a) 各组没有显著性差异($P>0.05$)

表4 30 d喂养试验小鼠血液生化指标^{a)}

Table 4 The blood biochemical index of mice in 30 d feeding experiment

组别	ALB(g/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN(mmol/L)	CRE(μ mol/L)	TCHO(mmol/L)	TG(mmol/L)	TP(g/L)
空白组(雄)	22.35±0.17	40.76±2.12	53.83±17.53	20.23±0.97	35.43±3.91	1.67±0.08	1.52±0.08	34.29±3.73
配方组(雄)	22.47±0.17	35.53±2.70	58.52±12.00	21.86±1.49	35.58±2.69	1.34±0.04	1.41±0.04	36.21±2.95
空白组(雌)	22.07±0.16	43.89±3.40	61.19±14.04	21.47±1.67	34.90±3.70	1.49±0.08	1.33±0.02	33.26±2.49
配方组(雌)	22.49±0.13	39.01±5.25	58.52±16.55	22.81±1.12	35.75±4.13	1.43±0.08	1.20±0.06	29.27±1.09

a) 各组没有显著性差异($P>0.05$)

图4 (网络版彩色)小鼠肝脏和肾脏病理切片。(a), (c)分别为空白组雄性小鼠和雌性小鼠肝脏病理切片; (b), (d)分别为配方组雄性小鼠和雌性小鼠肝脏病理切片; (e), (g)分别为空白组雄性小鼠和雌性小鼠肾脏病理切片; (f), (h)分别为配方组雄性小鼠和雌性小鼠肾脏病理切片

Figure 4 (Color online) Liver and kidney pathological section of mice. (a) and (c) were liver pathological sections of male and female mice in control group, respectively; (b) and (d) were liver pathological sections of male and female mice in the formula group, respectively; (e) and (g) were respectively kidney pathological sections of male and female mice in control group, respectively; (f) and (h) were respectively kidney pathological sections of male and female mice in the formula group, respectively

响,具有较高的安全性,故具备投入工业化生产的潜力。本研究为以益生菌为载体的硒补充剂提供了一定的参考依据,但是该菌株的吸附条件还可以进一

步优化,如吸附温度等,同时可通过诱变育种和基因工程手段等方法提高该菌株的吸附能力,从而提高富硒益生菌产品的应用价值。

参考文献

- 1 Malgorzata K, Joanna K, Marek P, et al. Selenium—A fascinating antioxidant of protective properties. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27: 245–255
- 2 Ungvári É, Monori I, Megyeri A, et al. Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64: 298–306
- 3 Agarwal R, Behari J R. Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2007, 79: 306–310
- 4 Broome C S, Mcardle F, Kyle J A, et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80: 154–162
- 5 Ullah H, Liu G, Yousaf B, et al. Developmental selenium exposure and health risk in daily foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 149: 291–306
- 6 Yang J P, Fan Z Y, Fan M T, et al. Research advance of Se-enriched lactic acid bacteria and relevant fermented foods (in Chinese). *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37: 355–361 [杨靖鹏, 范智义, 樊明涛, 等. 富硒乳酸菌及其发酵食品的研究进展. *食品工业科技*, 2016, 37: 355–361]
- 7 Chen Z, Shi J, Yang X, et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by *Tibetan kefir* grains during milk fermentation. *Int Dairy J*, 2015, 43: 15–21
- 8 Clarke G, Cryan J F, Dinan T G, et al. Review article: Probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome-focus on lactic acid bacteria. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35: 403–413
- 9 Pophaly S D, Poonam, Singh P, et al. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: A functional food perspective. *Trends Food Sci Technol*, 2014, 39: 135–145
- 10 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. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 5795–5800
- 11 Yang J, Huang K, Qin S, et al. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Dig Dis Sci*, 2009, 54: 246–254
- 12 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. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 141: 170–183
- 13 Zhai Q X. Effects of lactic acid bacteria against cadmium toxicity and the involved protective mechanisms (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuxi: Jiangnan University, 2015 [翟齐啸. 乳酸菌减除镉危害的作用及机制研究. 博士学位论文. 无锡: 江南大学, 2015]
- 14 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 5009.268-2016. National Food Safety Standard. Determination of Multi-elements in Food (in Chinese). Beijing: China Standards Press, 2016 [中华人民共和国

- 共和国质量监督检验检疫总局. GB 5009.268-2016 食品安全国家标准食品中多元素的测定. 北京: 中国标准出版社, 2016]
- 15 Ranadheera C S, Evans C A, Adams M C, et al. Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro*, gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *J Funct Foods*, 2014, 8: 18–25
- 16 International Dairy Federation. Milk and Milk Products-Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antibiotics Applicable to Bifidobacteria and Non-enterococcal Lactic Acid Bacteria (LAB). Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 2010
- 17 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 15193.3-2014. National Food Safety Standard. The Acute Toxicity Test (in Chinese). Beijing: China Standards Press, 2015 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.3-2014. 食品安全国家标准. 急性毒性试验. 北京: 中国标准出版社, 2015]
- 18 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 15193.13-2015. National Food Safety Standard. Thirty and Ninety Days Feeding Study (in Chinese). Beijing: China Standards Press, 2015 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.13-2015 食品安全国家标准 30 天和 90 天喂养试验. 北京: 中国标准出版社, 2015]
- 19 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 15193.22-2014. National Food Safety Standard. 28 Days Oral Toxicity Test (in Chinese). Beijing: China Standards Press, 2014 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.22-2014 食品安全国家标准 28 天经口毒性试验. 北京: 中国标准出版社, 2014]
- 20 Yu L, Zhai Q, Liu X, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 1891–1900
- 21 Zeng Y T, Guo X L, Zhou K, et al. Screening and identification of Se-enriching lactic acid bacteria (in Chinese). *Food Sci*, 2015, 36: 178–182 [曾议霆, 郭溪浪, 周康, 等. 富硒乳酸菌的筛选及鉴定. *食品科学*, 2015, 36: 178–182]
- 22 Yang H. Research on Se-enriched capability and conditions of *Lactobacillus* (in Chinese). Master Dissertation. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015 [杨鹤. 五种乳酸菌富硒能力及条件的研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015]
- 23 Mogna L, Nicola S, Pane M, et al. Selenium and zinc internalized by *Lactobacillus buchneri* Lb26 (DSM 16341) and *Bifidobacterium lactis* Bb1 (DSM 17850): Improved bioavailability using a new biological approach. *J Clin Gastroenterol*, 2012, 46: 41–45
- 24 Galano E, Mangiapane E, Bianga J, et al. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 2196–2204
- 25 Yang J J. Industrial producing condition of selenium-enriched probiotics and its inhibitory activity against pathogenic *Escherichia Coli* (in Chinese). Master Dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008 [杨家军. 富硒益生菌制剂工业化生产条件及其抑制致病性大肠杆菌的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2008]
- 26 Diowski A, Pęczkowska B, Włodarczyk M, et al. Bacteria/yeast and plant biomass enriched in Se via bioconversion process as a source of Se supplementation in food. *Prog Biotechnol*, 2000, 17: 295–300
- 27 Calomme M R, Van d B K, Vanden Berghe D A. Selenium and *Lactobacillus* species. *J Appl Bacteriol*, 1995, 79: 331–340
- 28 Andreoni V, Moro L M, Cavalca L, et al. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. *Ann Microbiol*, 2000, 50: 77–88
- 29 Kieliszek M, Blazejak S, Piwowarek K, et al. Equilibrium modeling of selenium binding from aqueous solutions by *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts. *3 Biotech*, 2018, 8: 388
- 30 Ghaedi M, Ahmadi F, Tavakoli Z, et al. Three modified activated carbons by different ligands for the solid phase extraction of copper and lead. *J Hazard Mater*, 2008, 152: 1248–1255
- 31 Ghaedi M, Ahmadi F, Soylak M. Simultaneous preconcentration of copper, nickel, cobalt and lead ions prior to their flame atomic absorption spectrometric determination. *Ann Chim*, 2007, 142: 277–285
- 32 Krishnaiah N, Abdulwahab S. Equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies on the biosorption of selenium (IV) ions onto ganoderma lucidum biomass. *Sep Sci Technol*, 2013, 48: 2293–2301
- 33 Tuzen M, Sarı A. Biosorption of selenium from aqueous solution by green algae (*Cladophora hutchinsiae*) biomass: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. *Chem Eng J*, 2010, 158: 200–206
- 34 Khakpour H, Younesi H, Mohammadhosseini M. Two-stage biosorption of selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Environ Chem Eng*, 2014, 2: 532–542
- 35 Volesky B. Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 2001, 59: 203–216
- 36 Vijayaraghavan K, Yun Y S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol Adv*, 2008, 26: 266
- 37 Wu J, Yu H Q. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresour Technol*, 2007, 98: 253–259
- 38 Lu W B, Shi J J, Wang C H, et al. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *J Hazard Mater*, 2006, 134: 80–86
- 39 Ranadheera C S, Evans C A, Adams M C, et al. *In vitro*, analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Res Int*, 2012, 49: 619–625
- 40 Delcour J, Ferain T, Deghorain M, et al. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 76: 159–184
- 41 Liu Y, Zhang Y, Zhang H P. Evaluating methods of probiotic's safety in the world (in Chinese). *J Chin Inst Food Sci Tech*, 2011, 11: 141–151 [刘勇, 张勇, 张和平. 世界益生菌安全性评价方法. *中国食品学报*, 2011, 11: 141–151]

Summary for “具有硒吸附能力乳酸菌的筛选及安全性评价”

Screening and safety evaluation of lactic acid bacteria with selenium adsorption capacity

Leilei Yu¹, Huiting Xu¹, Qixiao Zhai¹, Renmei Guo², Shumao Cui¹ & Wei Chen^{1*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

² Suzhou Setek Biotechnology Ltd., Suzhou 215100, China

* Corresponding author, E-mail: weichen66@jiangnan.edu.cn

Selenium, one of the essential trace elements in humans and animals, is involved in various biochemical and physiological functions, such as improving immunity and antioxidant properties. Lactic acid bacteria, recognized as “generally recognized as safe (GRAS)” in the world, have the ability to convert inorganic selenium into organic form and have plenty of outstanding probiotic properties, including regulation of gut microbiota, increase of antioxidant capacity, and decrease of intestinal inflammation and so on. Therefore, using them as a safe and efficient selenium supplementation carrier is increasingly becoming a hotspot in recent research. In order to obtain a strain of lactic acid bacteria with good selenium adsorption capacity, 43 strains of *Lactobacillus* of different species were screened by determining the adsorption rate of selenium *in vitro*. The adsorption conditions were as follows: The initial selenium concentration was 50 mg/L, the initial cell concentration was 1 g/L, and the adsorption time was 1 h. The selenium adsorption rate and selenium adsorption capacity of the strains were determined by measuring the selenium content of the dried bacteria after nitrolysis. The selenium levels were determined by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). At the same time, the adsorption characteristics of the strain were studied by changing the initial pH, initial cell concentration, initial selenium concentration and adsorption time, and acid and bile salt tolerance were determined to confirm whether it can still maintain high activity in the gastrointestinal tract. Then the safety of the strain was evaluated by the acute toxicity test and the 30-d feeding experiment, as well as antibiotic resistance of the strain. The results showed that the *Lactobacillus plantarum* RS7-1 had the most excellent selenium adsorption ability among the 43 strains, and its adsorption rate for selenium was up to 40.79%±1.27%. The optimum pH of the strain was 5.0, and the optimal initial bacterial concentration was 2 g/L. The maximum adsorption capacity was reached when the initial selenium concentration was 20 mg/L. The adsorption of selenium can be divided into two stages, rapid adsorption stage and adsorption equilibrium stage. The equilibrium time was reached when the adsorption time was 60 min. At the same time, the strain has outstanding acid and bile salt tolerance, without species-specific antibiotic tolerance, and after safety evaluation, the mice fed with the strain shows no significant difference in the food consumption, body weight, biochemical index, hematological indexes of blood compared with mice in blank group, and no organ and tissue lesions were detected. In conclusion, *Lactobacillus plantarum* RS7-1 is a strain of lactic acid bacteria with superb selenium adsorption capacity, great acid and bile salt tolerance, without toxicity and side effect. This study provides an idea for the selenium supplement with probiotics as the carrier, and the selenium adsorption capacity can be further improved by optimization of adsorption conditions, mutation breeding and genetic engineering, thereby increasing the application value of selenium-enriched probiotic products in the future.

lactic acid bacteria, selenium, adsorption, safety

doi: 10.1360/N972018-00580