



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103805537 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201310744251. 6

*C12R 1/23* (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 30

*C12R 1/01* (2006. 01)

(71) 申请人 青岛碧水蓝天生物技术有限公司

地址 266000 山东省青岛市市南区观海一路  
29 号 112 室

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所 (普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006. 01)

*A61K 35/74* (2006. 01)

*A61P 1/16* (2006. 01)

*A23L 1/29* (2006. 01)

*C12R 1/225* (2006. 01)

*C12R 1/46* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种富含有机硒的乳酸菌的生产方法

(57) 摘要

本发明涉及生物领域,具体地说,公开了一种富含有机硒的乳酸菌的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:a. 将乳酸菌按常规接种于培养基,培养扩增 24—36 小时,b. 向步骤 a 的发酵液中加入质量百分浓度 5—8% 的亚硒酸钠溶液,使发酵液的硒含量为 30—90mg/L,继续恒温培养 24—36 小时,c. 将步骤 b 得到的菌液离心、无菌生理盐水洗涤 5 次后,离心、去上清,即得富含有机硒的乳酸菌制剂。本生产方法能够提高正常机体抗氧化能力、免疫功能;干预肝纤维化组织细胞脂质过氧化反应,特别是明显改善抗氧化酶活性系统等优点。

1. 一种富含有机硒的乳酸菌的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - a. 将乳酸菌按常规接种于培养基,培养扩增 24—36 小时,
  - b. 向步骤 a 的发酵液中加入质量百分浓度 5-8%的亚硒酸钠溶液,使发酵液的硒含量为 30-90mg/L,继续恒温培养 24—36 小时,
  - c. 将步骤 b 得到的菌液离心、无菌生理盐水洗涤 5 次后,离心、去上清,即得富含有机硒的乳酸菌制剂。
2. 如权利要求 1 所述的富含有机硒的乳酸菌的制备方法,其特征在于,步骤 a 中所说的培养基是 MRS 液体培养基。

## 一种富含有机硒的乳酸菌的生产方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品领域,具体地说,涉及一种富硒乳酸菌制剂生产方法。

### 背景技术

[0002] 硒元素是人体必需的微量矿物质营养素,人体本身的硒总含量为 6-20mg。硒遍布各组织器官和体液,肾中浓度最高,对提高免疫力和预防癌症非常重要。研究表明,硒是机体赖以清除脂质过氧化物和自由基的谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, gSH-Px) 的必需组成成分,硒发挥作用的重要机制之一就是通过 GSH-Px 抗氧化活性实现的。硒能够通过提高肝细胞、Ito 细胞 GSH-Px 活性,阻止脂质过氧化损伤而发挥防止肝病作用。肝纤维化是肝脏对各种原因刺激的慢性肝损伤反应,是肝脏疾病共同可逆病理过程,进一步可发展为不可逆肝硬化。目前,由于工艺和药价等原因,用于防病治病的硒主要还是以无机硒为主,如硒酸钠和亚硒酸钠,但研究证明,人体对无机硒化物的吸收效果差,利用率低,又会对人体产生程度不同的毒副作用;而有机硒化物利用率高、无任何毒副作用。

[0003] 一些发达国家通过酵母富硒获得的功能性富硒食品基料已进入工业。化大规模生产和用于食品之中。但富硒酵母含硒量通常为 0.3mg/g,最高达 1mg/g(微生物学报,1990,30(1):36-40;山西食品工业,1999,(2):28-29),对无机硒的转化利用仍不够理想。乳酸菌是食品加工和保藏的著名菌种,能分泌各种各样的酶类、提供丰富的氨基酸和维生素,具有抗菌、降低胆固醇、维持微生态环境、抗肿瘤、增强免疫力等生物功能,但不具备硒的生物学功能。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种富硒乳酸菌制剂生产方法及其富硒乳酸菌制剂,本发明还涉及了该富硒乳酸菌制剂的应用。

[0005] 本发明的富硒乳酸菌制剂,其主要成分是富含有机硒的乳酸菌,所说的有机硒是通过乳酸菌发酵转化无机硒而富集在菌体内,每克制剂中硒含量为 4-12 毫克。

[0006] a. 将乳酸菌按常规接种于培养基,培养扩增 24—36 小时,

[0007] b. 向步骤 a 的发酵液中加入质量百分浓度 5-8% 的亚硒酸钠溶液,使发酵液的硒含量为 30-90mg/L,继续恒温培养 24—36 小时,

[0008] c. 将步骤 b 得到的菌液离心、无菌生理盐水洗涤 5 次后,离心、去上清,即得富含有机硒的乳酸菌制剂。

[0009] 本发明制备过程中所说的培养基优选 MRS 液体培养基。所述的乳酸菌是保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、动物双歧杆菌、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*) 或乳链球菌 (*S. lactis*)。上述微生物菌种由中科院微生物研究所微生物菌种保藏中心提供。

[0010] 在上述步骤 c 中用水洗涤沉淀物的目的是洗去无机硒,其中所说的水,根据制备产品的不同要求可以是普通水、蒸馏水、无菌水或无菌生理盐水等。

[0011] 发明人在实验中发现,乳酸菌混合培养的富硒效果不如单一菌种,因此,要得到(混合型)富硒乳酸菌制剂,最好是先用单一菌种转化无机硒,得到相应富硒乳酸菌制剂,再将得到的上述制剂混合。

[0012] 本发明所说的富硒乳酸菌制剂在制备防治肝纤维化制品中的应用。本发明的富硒乳酸菌制剂富含有机硒,经动物实验表明:能明显抗肝纤维化,通过干预肝纤维化组织细胞脂质过氧化反应,特别是明显改善抗氧化酶活性系统发挥效应;在干预肝纤维化过程中,还通过改善和提高机体免疫细胞功能活性发挥积极有效的作用。因此,该制剂本身就具有防治肝纤维化的功效,此外,还可将其作为食品或药用基料来生产制备防治肝纤维化的食品或药品。

[0013] 本发明的有益效果是,利用乳酸菌富集转化无机硒为有机硒,既提升了乳酸菌自身的营养及医疗保健功能,又增加了其附加值。本发明的生产工艺简单、操作简便、转化率高于酵母富硒。

[0014] 本发明的富硒乳酸菌制剂能够提高正常机体抗氧化能力、免疫功能;干预肝纤维化组织细胞脂质过氧化反应,特别是明显改善抗氧化酶活性系统等优点。因为本发明是借助乳酸菌利用无机硒转变而成的一种生物制剂,安全可靠,既可作为功能性食品添加剂,又可作为防病治病的功能性调节剂。能用于制备防治肝纤维化食品和药品。本发明的制剂兼具乳酸菌和硒的生物学功能,特别是在防治肝纤维化方面有广阔的应用前景。

### 具体实施方式

[0015] 实施例1:配制乳酸菌MRS液体培养基:按1000ml蒸馏水中加入蛋白胨10.0g,牛肉膏10.0g,酵母浸膏5.0g,葡萄糖20.0g,乙酸钠5.0g,柠檬三胺2.6g,吐温801.0g,  $K_2HPO_4$  2.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.58g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.25g;混合溶解调pH至6.0-6.4,121℃灭菌15min。

[0016] 取活化的保加利亚乳杆菌的菌落于MRS液体培养基中,在42℃下培养扩增后,加入5%亚硒酸钠溶液使培养基的硒含量为64mg/L,继续培养24h,收集菌液、离心(2000r/min,15min)、无菌生理盐水反复洗涤5次,再离心后,沉淀物即为富含有机硒的保加利亚乳杆菌制剂。

[0017] 按以下方法测定硒含量:

[0018] (1) 标准硒工作液准备

[0019] 精密称取分析纯亚硒酸钠,加硝酸溶液制成每毫升含1.0mg硒的标准贮备液;精密量取标准贮备液1mL,用硝酸溶液定容至100mL即为标准硒工作液。

[0020] (2) 样品消化

[0021] 精密称取0.3g富硒保加利亚乳酸菌制剂干粉样品于小烧杯中,加少量水湿样,然后再加入消化液(双氧水:高氯酸:浓硫酸二3:3:1),摇匀。置通风橱内电炉上消化至终点后,加5%EDTA-2Na溶液2mL,摇匀,用40%氢氧化钠于冷水浴中调PH至中性,定容至100mL,同法做对照空白实验。

[0022] (3) 样品测量和标准曲线制定

[0023] 精密量取5mL消化液于分液漏斗中,另取7个分液漏斗,分别加入与消化液等量的空白溶液及标准硒工作液0.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0mL,5%氢氧化钠溶液调PH至中性,

加 2mol/L 甲酸溶液 3mL, 然后加水至 35mL, 摇匀。各分液漏斗中加入 0.5% 3,3'-二氨基联苯胺溶液 5.0mL, 摇匀后置暗处反应 30min。用 5% 氢氧化钠溶液调 PH6.5-7.0, 精密加入甲苯 10mL, 震荡萃取 1min, 静置分层, 取甲苯层滤液于 1mL 比色皿中, 在波长 420nm 处测光密度 (OD) 值。用标准硒工作液的 OD 值绘制标准曲线, 在曲线上查出与样品消化液对应的硒含量。标准硒在 0.02-0.1me/mL 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为  $y=0.045+0.114x$ , 拟合度超过 0.99。测定消化液的 OD 值后代入回归方程即可得到该富硒乳酸菌制剂的硒含量为 9.00-11.45me/g。

[0024] 实施例 2: 与实施 1 基本相同, 不同之处在于, 取活化的嗜热链球菌的菌落于 1VIRS 液体培养基中, 在 42℃ 下培养扩增 12h 后, 加入 8% 亚硒酸钠溶液使培养基的硒含量为 30me/L, 继续培养 12h, 收集菌液、离心 (2000r/min, 15min)、蒸馏水反复洗涤 3 次, 再离心后, 沉淀物即为富含有机硒的嗜热链球菌制剂, 有机硒含量可达 6-12me/g。

[0025] 实施例 3: 与实施 1 基本相同, 不同之处在于, 将所述的保加利亚乳杆菌用嗜酸乳杆菌替代, 培养扩增 24h 后, 加入 9% 亚硒酸钠溶液使培养基的硒含量为 120me/r, , 继续培养 36h, 收集菌液、离心 (2000r/min, 15min)、生理盐水反复洗涤 3 次, 再离心后, 去上清即制得富含有机硒的嗜酸乳杆菌制剂, 有机硒含量可达 8-15mg/g。

[0026] 实施例 4: 与实施 1 基本相同, 不同之处在于, 将所述的保加利亚乳杆菌用乳链球菌替代, 在 37℃ 下培养 36h, 加入亚硒酸钠溶液使培养基的硒含量为 80me/L, 继续培养 36h, 收集菌液、离心 (2000r/min, 15min)、无菌水反复洗涤 6 次, 再离心后, 沉淀物即为富含有机硒的乳链球菌制剂, 有机硒含量可达 8-12mg/g。

[0027] 实施例 5: 取实施 1、实施 2、实施 3 和实施 4 制得的富硒乳酸菌制剂中的至少两种按比例配合在一起, 混匀后即制成 (混合型) 富硒乳酸菌制剂。实施例 6: 本发明制剂用于防治肝纤维化动物试验将 60 只健康成年 SD 大鼠 (雌雄各半), 经 1 周适应性饲养后, 随机分成对照组、纤维化组、有机硒抗纤维化保护组, 每组 20 只。纤维化组和保护组大鼠腹腔注射用橄榄油稀释的 50% 四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 溶液诱发肝纤维化, 对照组用同样方法注射同等剂量的橄榄油。对照组和纤维化组饲喂普通全价饲料, 保护组饲喂添加含硒 1mg/kg 饲料的富硒乳酸菌制剂全价饲料。大鼠自由采食、饮水, 环境温度 20-25℃。整个试验持续 4 周。观察动物表现, 并在试验的第 2、4 周宰杀大鼠取肝脏组织匀浆测定 MDA 含量和 GSH-Px 活性。

[0028] 试验结果: 注射 CCl<sub>4</sub> 后第 1 天, 纤维化组大鼠即出现明显临床症状: 精神抑郁, 减食, 毛色暗淡、紊乱, 但在第 2 周剖检尚未见明显病理变化, 在 4 周后剖检可见纤维化组大鼠肝脏纤维化, 有粘连, 器官呈苍白感, 腹水严重, 而日粮添加乳酸菌有机硒制剂的保护组大鼠, 在整个实验期里没有明显的临床症状和剖检病理变化, 对照组大鼠无异常表现。整个实验期内, 富硒乳酸菌制剂能显著提高肝损伤组织匀浆 GSH-Px 活性; 纤维化组肝组织匀浆 MDA 含量显著升高, 而保护组与对照组接近。表明富硒乳酸菌制剂能通过抗损伤保护, 干预肝损伤脂质过氧化反应, 改善抗氧化酶活性发挥正常有效的作用。