

红发夫酵母有机硒最佳转化条件的研究

徐洲, 朱文优, 魏琴, 黎维, 张超*

(宜宾学院生命科学与食品工程学院, 固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000)

摘要 [目的]优化红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)有机硒转化条件。[方法]通过正交试验研究硒添加量、培养时间和装液量对红发夫酵母富硒的影响。[结果]红发夫酵母富硒的最适培养基为PDA培养基, 亚硒酸钠的添加方式为分2次添加, 在硒添加量20 mg/L、培养时间30 h、装液量80 mL/500 mL的条件下, 红发夫酵母的生物量达10.62 g/L, 有机硒转化率达63.2%。[结论]研究结果为红发夫酵母富硒的进一步研究提供了参考。

关键词 红发夫酵母; 有机硒; 转化添加; 生物量

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)27-0017-03

Optimum Transformation Conditions of Organic Selenium by *Phaffia rhodozyma*

XU Zhou, ZHU Wen-you, WEI Qin, ZHANG Chao* et al (College of Life Science and Food Engineering, Key Lab of Fermentation Resource and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the transformation conditions of organic selenium by *Phaffia rhodozyma*. [Method] The effect of selenium addition, culture time and liquid loading on selenium accumulation in *Phaffia rhodozyma* was studied by orthogonal experiment. [Result] The optimum medium for selenium enrichment was PDA medium, and the adding method was added in two times. Under the condition of selenium content at 20 mg/L and the liquid loading at 80 mL/500 mL incubating for 30 h, the biomass and transformation rate of organic selenium could reach 10.62 g/L and 63.2%, respectively. [Conclusion] The results can be regarded as the reference for further research on selenium enrichment in *Phaffia rhodozyma*.

Key words *Phaffia rhodozyma*; Organic selenium; Conversion conditions; Biomass

硒(Se)是人体必需的微量元素之一,能促进人体生长发育,增强抗病能力,具有抗衰老等诸多生理作用^[1-2]。硒在自然界以无机硒和有机硒2种方式存在,无机硒一般是指硒酸钠和亚硒酸钠,而有机硒主要是硒通过生物转化与氨基酸结合而成。人体对于硒的补充主要来源是饮食,无机硒具有生理毒性且生物活性较低不能被直接摄入;有机硒通常与其他物质结合成络合态或者以还原态形式存在并可以与某些氨基酸结合,常见基本形式为硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸等^[3]。有机硒无生理毒性,且具有易于被动物吸收、体内利用性高等特点而成为人们关注的焦点^[4-5]。

无机硒可以通过动物、植物和酵母菌等微生物转化成有机硒。植物、动物对无机硒转化存在周期长、受自然条件的变化影响大等缺点,因此,研究者更多地关注微生物对无机硒的转化利用方面。研究表明,酵母菌中的红发夫酵母自身含有丰富的蛋白质、维生素、肝糖和抗氧化能力较强的虾青素等物质^[6-7]。如果能够利用红发夫酵母将无机硒复集转化成有机硒,便可以将富硒的红发夫酵母作为一种安全、营养成分更为丰富的有机硒补充剂。要利用红发夫酵母用于有机硒的转化,就需要研究红发夫酵母的最适培养和发酵条件。鉴于此,笔者首先通过单因素试验,研究了不同培养基、无机硒添加方式、硒添加量、培养时间和装液量对红发夫酵母有机硒转化的影响,同时以有机硒转化率为指标,进行了正交试验优化,以确定红发夫富硒酵母富硒的最优条件参

数,为红发夫酵母富硒的进一步研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料 红发夫酵母由固态发酵资源利用四川省重点实验室提供。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L;酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(YPD):酵母膏10 g/kg,蛋白胨20 g/kg,葡萄糖20 g/kg,琼脂粉20 g/kg;市售硫酸铵培养基;市售尿素培养基。主要试剂:葡萄糖、硫酸铵、酵母膏、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、亚硒酸钠、盐酸、亚硒酸、盐酸苯肼、氯化钾、变色酸等,均为分析纯。

主要仪器:LRH-250型生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、HZQ-QX型摇床(黑龙江哈尔滨东联电子技术有限公司)、T6新世纪紫外分光光度计(北京普析通用有限责任公司)、TGL-16GB型台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司)、DHG-9620A型干燥烘箱(上海恒科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化。取红酵母菌种,按无菌要求制备PDA斜面,挑取一定量红发夫酵母菌种分别转接到斜面上,放入28℃的生化培养箱中,培养观察2~3 d,待菌种变红色菌落后置于4℃备用。

1.2.2 富硒酵母初筛。分别制备PDA培养基、YPD培养基、硫酸铵培养基和尿素培养基,在各种培养基平板中加入较高浓度亚硒酸钠溶液,自然冷却,向平板中加入0.1 mL活化的菌悬液,涂抹均匀,置于28℃培养箱内培养,通过比较,挑选菌落数较多的培养基平板菌种备用。

1.2.3 富硒工艺优化。

1.2.3.1 不同培养时间的影响。装液量为100 mL/500 mL

基金项目 四川省重点实验室项目(NJ2014-10, 2015GTY009, 04JY029-102);四川省教育厅/实验室项目(09ZC051, 2009KFJ001);四川省高校科研创新团队建设资助项目(14TD0031)。

作者简介 徐洲(1984-),男,四川大竹人,讲师,在读博士,从事发酵工程研究。*通讯作者,教授,博士,从事发酵工程研究。

收稿日期 2017-08-28

三角瓶,培养基初始 pH 5.0,后置于 28 ℃、150 r/min 摇床上培养,培养过程中分别在 8、16、24、32、40、48 h 时采用紫外分光光度计法,定时取样测 OD 值,并制出其标准曲线。

1.2.3.2 不同装液量的影响。500 mL 三角瓶中分别装入 60、80、100、120、150 mL 优化后发酵培养基,接种量为 10%,硒添加量为 25 mg/L,pH 中性,在 28 ℃ 下培养 30 h 后测定有机硒的转化率。

1.2.3.3 不同硒浓度的影响。装液量为 100 mL/500 mL,在三角瓶中添加亚硒酸钠溶液使其浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 mg/L,接种量为 10%,转速为 150 r/min,在 28 ℃ 摇床中进行发酵培养,定期测定红酵母生物量及细胞内硒含量。

1.2.3.4 不同硒添加方式的研究。接种量为 10%,转速为 150 r/min,分别采用一次性添加亚硒酸钠溶液到相应的浓度;2 次添加亚硒酸钠溶液到相应浓度,即第 1 次添加 50% 硒溶液,24 h 后再添加 50% 硒溶液,在 28 ℃ 摇床中进行发酵培养,定期测定红酵母的生物量及细胞内硒含量。

1.2.3.5 正交试验优化。通过前期单因素试验,选取 3 种影响作用更大的影响因子,以红发夫酵母有机硒转化率的高低作为响应值,进行正交试验设计优化,确定其最佳富硒工艺条件,正交试验因素与水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 The factor and level of orthogonal experimental scheme

| 水平 Level | 硒添加量(A) Selenium content mg/L | 培养时间(B) Culture time h | 装液量(C) Liquid loading mL/500 mL |
|-------------|--|---------------------------------|--|
| 1 | 15 | 25 | 80 |
| 2 | 20 | 30 | 100 |
| 3 | 25 | 35 | 120 |

1.2.4 检测方法。

1.2.4.1 生物量的测定。将发酵液富硒酵母 4 000 r/min 离心 15 min,将菌体用蒸馏水洗涤 3 次,50 ℃ 烘干至恒重后称重。计算方法参考文献^[1]的方法。

1.2.4.2 总硒含量的测定。

$$\text{总硒含量}(\mu\text{g/L}) = \text{生物量} \times \text{硒含量}$$

1.2.4.3 硒转化率的测定。

$$\text{有机硒转化率} = \text{总硒含量} / \text{添加硒的浓度} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 红发夫酵母富硒培养基的筛选 由图 1 可知,红发夫酵母在不同培养基上生长呈现一定的差异,红发夫酵母在 YPD 培养基上生长的菌落总数最多,而在尿素培养基上生长的菌落总数最少,这是 4 种培养基的主要营养物质氮源和碳氮比(C/N)不尽相同,而氮是构成微生物蛋白质和促进酵母生长的重要成分,氮源的利用速度将直接影响酵母生长与代谢状况。YPD 和 PDA 培养基属于天然培养基,氮源等营养成分充足、C/N 比例适当,可以更加有效地促进红发夫酵母的生长^[8],而硫酸铵培养基和尿素培养基的 C/N 比例不够协调,所以含有的营养物质促红发夫酵母的生长能力偏弱。YPD 和 PDA 培养基菌落总数相差不大,综合考虑选用 PDA

培养基作为红发夫酵母进一步培养的培养基。

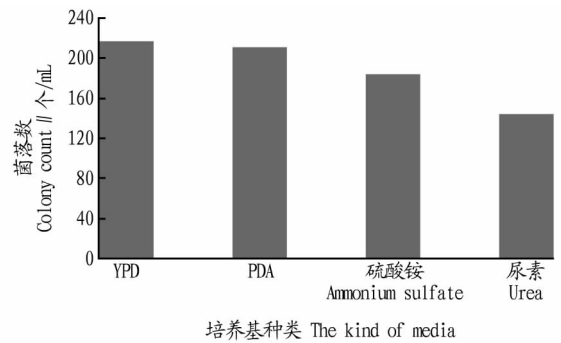


图 1 红发夫酵母在不同培养基上的生长情况

Fig.1 The growth of *Phaffia rhodozyma* on different media

2.2 不同培养时间对酵母的影响 由图 2 可知,红发夫酵母培养从 8 h 开始生长计时,随着培养时间的延长,菌体的吸光度也开始逐渐增加^[9-10]。经筛选的红发夫酵母延迟期约 10 h,从 15 h 左右开始进入对数生长期,而在 35 h 附近红发夫酵母的菌体总量达最大值,随后菌体增殖缓慢进而生长下降,因此,将红发夫酵母富硒的培养时间初步确定为 35 h。

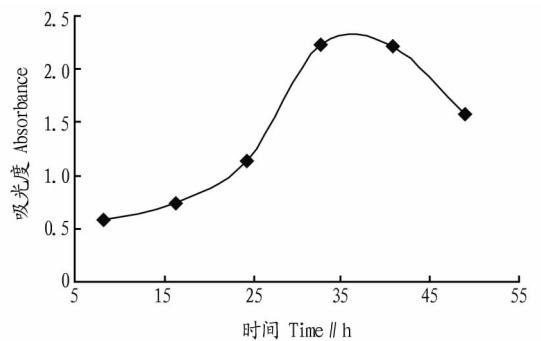


图 2 发酵时间对红发夫酵母富硒的影响

Fig.2 The effect of fermentation time on enriching selenium of *Phaffia rhodozyma*

2.3 装液量对酵母富硒的影响 装液量主要影响菌体培养液的体积溶氧系数(KLA),装液量越大,溶氧系数越小,反之亦然。由图 3 可知,装液量越小,菌体培养液的溶氧量越高,红发夫酵母的生物量越大,然而较大的装液量能显著提高红发夫酵母对无机硒的转化,当装液量达 100 mL/500 mL 时有机硒转化增加率变化微小,所以将其初选为红发夫酵母的装液量。

2.4 硒浓度对酵母富硒的影响 由图 4 可知,随着硒浓度增加,红发夫酵母的生物量和有机硒的转化率均呈现先增加后减少的趋势。当硒浓度 ≤ 20 mg/L 时,红发夫酵母生物量逐渐增多,表明硒浓度在该范围内对红发夫酵母的生长有促进作用,所以红发夫酵母对有机硒的转化率逐渐上升;而当硒浓度 ≥ 20 mg/L 时,随着硒浓度逐渐增加,红发夫酵母生物量降低速率加快,表明过量硒对红发夫酵母的生长有抑制作用,且硒浓度越大,对红发夫酵母生长的抑制作用越明显,同时导致红发夫酵母对有机硒的转化率降低明显,因此,选择 20 mg/L 作为硒添加浓度。

2.5 不同添加方式对酵母富硒的影响 由图 5 可知,当培

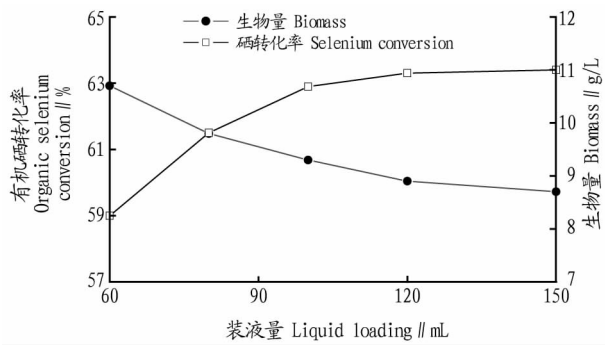


图3 装液量对生物量和有机硒转化率的影响

Fig. 3 Effect of liquid loading on biomass and organic selenium conversion

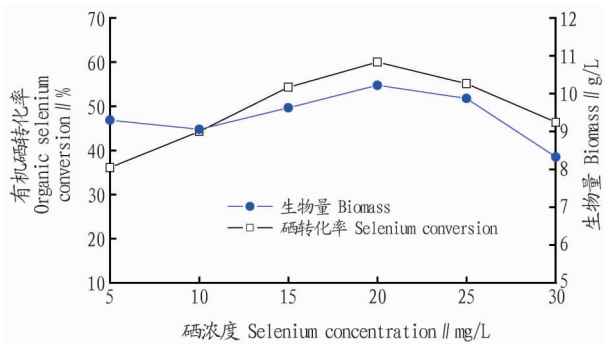


图4 不同硒浓度对有机硒转化率的影响

Fig. 4 Effect of different selenium concentration on the transformation rate of organic selenium

培养基中硒浓度 ≥ 15 mg/L 时,2 次添加方式对有机硒的转化率明显高于 1 次添加的方式。1 次添加方式红发夫酵母对有机硒的转化率低,是由于 1 次加入硒使起始环境的硒浓度偏高,对红发夫酵母的抑制作用相对较强,不利于红发夫酵母出芽,影响红酵母对有机硒的转化;分 2 次添加的方式使得硒浓度在红发夫酵母生长初期较低,对红发夫酵母群体生长的抑制作用较弱,随着红发夫酵母生长速度加快,红发夫酵母的数量逐渐增加,富硒能力也逐渐增强^[11-12],因此,选用 2 次添加 Na_2SeO_3 的方式。

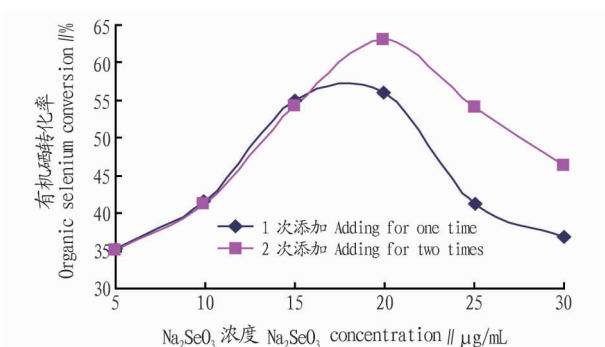


图5 不同添加方式对有机硒转化率的影响

Fig. 5 Effect of different adding methods on the conversion rate of organic selenium

2.6 正交试验优化 前期单因素试验结果表明,硒添加量、培养时间和装液量对红发夫酵母的有机硒转化率影响较大,所以正交试验选取硒添加量、培养时间、装液量为因素,以有

机硒转化率为考察指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以确定对红发夫富硒酵母富硒的最优条件参数。

由表 2 可知,对红发夫酵母有机硒转化的影响由主到次依次是硒添加量(A)、培养时间(B)、装液量(C),硒添加量是最主要的影响因素。从级差分析的 R 值可以看出,红发夫酵母的最佳富硒条件是 $A_2B_2C_1$,此时有机硒的转化率达 63.2%,即最适硒添加量为 20 mg/L,最佳培养时间为 30 h,最适装液量为 80 mL/500 mL,在该条件下通过验证试验得出红发夫酵母的生物量和有机硒转化率最优,分别达 10.62 g/L 和 63.2%。

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 The design and results of orthogonal experiments

| 试验号 Test No. | 因素 Factors | | | 有机硒转化率 Organic selenium conversion / % |
|-----------------|------------|--------|--------|---|
| | A | B | C | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 62.2 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 61.8 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 61.4 |
| 4 | 2 | 2 | 1 | 63.2 |
| 5 | 2 | 3 | 2 | 62.6 |
| 6 | 2 | 1 | 3 | 62.3 |
| 7 | 3 | 3 | 1 | 61.6 |
| 8 | 3 | 1 | 2 | 62.2 |
| 9 | 3 | 2 | 3 | 61.9 |
| k_1 | 61.800 | 62.333 | 62.233 | |
| k_2 | 62.700 | 62.200 | 62.300 | |
| k_3 | 61.900 | 61.867 | 61.867 | |
| R | 0.900 | 0.466 | 0.433 | |

3 结论

通过红发夫酵母的富硒条件研究,得出了适于红酵母生长和富硒的培养条件,结果表明,在 PDA 培养基中红发夫酵母生长旺盛,分 2 次添加硒溶液将更利于有机硒的转化,最佳培养条件为:装液量 80 mL/500 mL,硒添加浓度 20 mg/L,培养时间 30 h。在上述条件下,培养有机硒转化率达 63.2%。尽管硒添加量是对酵母富硒性能影响最大的因素,然而硒含量的提高主要来自于生物量的提高,因此在实际生产过程中,要提高有机硒的转化率,还应综合考虑总生物量提高的影响。目前,红发夫酵母主要应用于胡萝卜素的生产和生产单细胞蛋白等方面,将红发夫酵母应用于富硒研究并得到附加值更高的富硒酵母产品,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 张超,徐洲,魏琴,等.红发夫酵母富硒特性研究[J].食品工业科技,2011(4):177-179.
- [2] 刘杰,徐林,吴根福.富硒酵母的研究进展[J].饲料工业,2009,30(22):44-48.
- [3] 蒋守群.有机硒在动物营养上的研究与应用[J].饲料工业,2005,26(20):43-45.
- [4] 张志焱,程秀芳,刘虹,等.高生物量富硒酵母的选育及发酵条件的优化[J].饲料博览(技术版),2008(8):22-25.
- [5] 贾洪峰,贺雅非,刘丽娜.富硒酵母的研究进展[J].四川食品与发酵,2005,41(3):8-12.
- [6] 王菊芳,梁世中.红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)生产虾青素进展[J].生物工程进展,2000,20(5):48-50.
- [7] 朱晓立,梁世中,邓毛程,等.不同培养方式对红发夫酵母产虾青素的影响[J].食品科技,2011(1):13-17.

时愈合,后期生长缓慢,大部分最终不易成活,效率很低。而用萌发 7 d 后的幼苗嫁接成活率能达到 96% 以上,而且很少出现侧生根,嫁接不成功的为 4%,主要原因是嫁接时虽然对接成功,但嫁接完封皿后,接穗的叶子由萎蔫到恢复自然状态时导致接穗与砧木错位,只要不错位,能达到 100% 的成功率。

表 3 Fe²⁺ 含量对嫁接苗的影响

Table 3 Effect of Fe²⁺ concentration of the medium on grafting success

| Fe ²⁺ 浓度 Fe ²⁺ concentration//mmol/L | 植株生长状况 Growth condition of plant |
|---|-------------------------------------|
| 0.05 | 植株瘦小,叶片小且失绿严重 |
| 0.10 | 植株瘦弱,叶片较小且有失绿现象 |
| 0.15 | 植株生长正常,叶片大小颜色均正常 |
| 0.20 | 植株生长基本正常,叶片较绿 |
| 0.30 | 植株生长略受抑制,叶片较绿但较小 |

在柑橘的微嫁接过程中^[17]发现培养基中蔗糖浓度对微嫁接的成活起非常关键的作用,培养基中的蔗糖浓度为 7.5% 时,微嫁接成活率最高为 90%;而蔗糖浓度为 2.5% 时,成活率仅为 55%。该研究发现蔗糖含量的多少也会影响嫁接的效率,当蔗糖浓度为 1.0% 时效果较好,因为是无菌嫁接,而且操作过程时间较长,易污染,蔗糖浓度太高,污染程度增大,反而降低了嫁接苗的成活率。

该研究还发现普通的 1/2MS 培养基中盐芥幼苗的叶子发黄,当适当增加 Fe²⁺ 的浓度后,幼苗叶子会变正常,并且 0.15 mmol/L 铁盐更有利于盐芥幼苗及嫁接苗的正常生长。

综上所述,在几个影响因素中,起决定作用的是盐芥无菌苗的苗龄,若选择太小的幼苗做接穗和砧木,因为盐芥自身发育的特点,该时期植株生长缓慢,导致嫁接苗生长缓慢,侧根多而不易成活,即使成活,后期长势也弱。而太大的苗子不易切割,分生组织没有幼苗活跃,嫁接效率下降。萌发后 7~10 d 的无菌苗是最佳嫁接苗,易切割,易成活,嫁接效率最高。

盐芥作为一种极度耐盐、干旱、低温、高热等非生物胁迫的盐生植物的模式植物^[22-23],在过去的十多年间被广泛应用于非生物胁迫的生理生化及分子生物学方面的研究,其嫁接体系的成功构建将为研究植物体中水平基因转移、信号转导、非生物胁迫等生理生化特别是植物耐盐分子机理方面提供参考。

参考文献

[1] JONARD R, HUGARD J, CACHEIX J J, et al. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science[J]. *Sci Hortic*, 1983, 20(2): 147-159.
 [2] ESTRADA-LUNA A A, LÓEZ-PERALTA C, CÁDENAS-SORIANO E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.) [J]. *Sci Hortic*, 2002, 92(3/

4): 317-327.

[3] MURASHIGE T, BITTERS W P, RANGAN T S, et al. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clone [J]. *J Hortic Sci*, 1972, 7: 118-119.
 [4] OLLAT N, POIZAT C, LIMA D S A, et al. Quantitative root-stock-scion relationships in grapevine: Investigations by the analysis of reciprocal micrograftings. Book of abstracts of 6th international symposium on grape vine [J]. *Physiology and biotechnology*, 2000, 11(15): 70-71.
 [5] TSUKAYA H, NAITO S, REDEI G P, et al. A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis 1*, affecting the development of both inflorescences and leaves [J]. *Development*, 1993, 118: 751-764.
 [6] RHEE S Y, SOMERVILLE C R. Flat-surface grafting in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant molecular biology reporter*, 1995, 13(2): 118-123.
 [7] TURNBULL C G N, BOOKER J P, LEYSER H M O. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis* [J]. *The plant journal*, 2002, 32(2): 255-262.
 [8] LIN M K, BELANGER H, LEE Y J, et al. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits [J]. *Plant cell*, 2007, 19(5): 1488-1506.
 [9] CORBESIER L, VINCENT C, JANG S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1030-1033.
 [10] AYRE B G, TURGEON R. Graft transmission of a floral stimulant derived from constants [J]. *Plant physiology*, 2004, 135(4): 2271-2278.
 [11] CHEN A, SCHROEDER J I. An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2006, 141(1): 108-120.
 [12] YOO S J, HONG S M, JUNG H S, et al. The cotyledons produce sufficient FT protein to induce flowering: Evidence from cotyledon micrografting in *Arabidopsis* [J]. *Plant & cell physiology*, 2012, 54(1): 119-128.
 [13] BUHITZ A, PIERITZ J, SPRINGER F, et al. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility [J]. *BMC plant biology*, 2010, 10(1): 1-13.
 [14] MOLNAR A, MELNYK C W, BASSETT A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells [J]. *Science*, 2010, 328(5980): 872-875.
 [15] LIANG D C, WHITE R G, WATERHOUSE P M. Gene silencing in *Arabidopsis* spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement [J]. *Plant physiology*, 2012, 159(3): 984-1000.
 [16] BROSNAN C A, MITTER N, CHRISTIE M, et al. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, 2007, 104(37): 14741-14746.
 [17] NAVARRO L, ROISTACHER C N, MURASHIGE T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus [J]. *Jam Soc Hortic Sci*, 1975, 100: 471-479.
 [18] PALMA B, VOGT G F, NEVILLE P. A combined *in vitro/in vivo* method for improved grafting of *Acacia senegal* (L.) Willd [J]. *J Hortic Sci*, 1996, 71(3): 379-381.
 [19] PALMA B, VOGT G F, NEVILLE P. La microgreffe, une solution pour la multiplication *in vitro* de l'*Acacia senegal* (L.) Willd? [J]. *Annales des sciences forestières*, 1997, 54(2): 203-210.
 [20] 宋瑞琳, 吴如健, 柯冲. 茎尖嫁接脱除柑桔主要病原的研究 [J]. *植物病理学报*, 1999, 29(3): 275-279.
 [21] 李耿光, 胡兰娟, 黄群声, 等. 柑桔茎尖培养的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 1978, 4(2): 189-196.
 [22] AMTMANN A, BRESSAN R, BOHNERT H, et al. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants [J]. *Molecular plant*, 2009, 2(1): 3-12.
 [23] WU H J, ZHANG Z H, WANG J Y. Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea* [J]. *PNAS*, 2012, 109(30): 1-6.

(上接第 19 页)

[8] 张超, 尹礼国, 朱文优, 等. 富硒红发夫酵母补料分批培养研究 [J]. *食品工业科技*, 2011(9): 220-222.
 [9] 陈福生, 杨清华. 不同添加时间和添加量组合对酵母富硒效果的影响 [J]. *中国酿造*, 2004, 23(9): 14-16.

[10] 贺立东. 分光光度法测定富硒酵母中有机硒的含量 [J]. *食品工业科技*, 2000, 21(5): 67-68.
 [11] 李爱芬, 刘振乾, 徐宁, 等. 微量元素硒载体酵母发酵的研究 [J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2004, 25(5): 626-631.
 [12] 柴丽红, 苗丹. 安琪活性干酵母的富硒研究 [J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 38-40, 75.