

碳源与罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵上清液 抑菌效果的关系

吴惠贞¹, 夏枫耿², 陈中¹, 黄魁英², 林伟锋¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要: 本研究考察了碳源对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵特性和发酵上清液抑菌效果的影响, 以此探讨碳源与 LYS-1 代谢产生抑菌物质的关系。LYS-1 接种于不同碳源配方的培养基中, 测定发酵过程中酸度、活菌数的变化以及发酵上清液的抑菌效果。结果显示, LYS-1 以蔗糖、麦芽糖和葡萄糖为碳源时抑菌圈直径依次为 9.84 mm、8.55 mm 和 7.65 mm, 以果糖、乳糖和甘油为碳源时则无抑菌圈。活菌数 $\geq 1.00 \times 10^9$ CFU/mL 时抑菌圈才会出现, 且活菌数的增加有利于抑菌圈直径的增大。葡萄糖和蔗糖复配具有较优的抑菌效果, 且蔗糖添加量在 5%~10% 范围内增加可以提高抑菌效果。以葡萄糖和果糖等当量替换蔗糖具有同等的抑菌效果, 碳源为 1.00% 葡萄糖+10.00% 蔗糖或 6.26% 葡萄糖+5.26% 果糖时发酵上清液的抑菌效果最强。碳源影响 LYS-1 代谢产生抑菌物质, 葡萄糖和果糖是影响发酵上清液抑菌效果的关键性因素。

关键词: 罗伊氏乳杆菌; 发酵上清液; 碳源; 抑菌效果

文章编号: 1673-9078(2020)04-119-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.016

The Relation between Carbon Source and the Antimicrobial Effect of *Lactobacillus Reuteri* Fermentation Supernatant

WU Hui-zhen¹, XIA Feng-geng², CHEN Zhong¹, HUANG Kui-ying², LIN Wei-feng¹

(1. School of Food Sciences and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Microbiology Research Institute, Guangzhou 510663, China)

Abstract: This study investigated the influence of carbon source on the fermentation properties of *Lactobacillus reuteri* (LYS-1) and its antimicrobial effect of derived fermentation supernatant, as well as the relationship between the carbon source and the antimicrobial substance produced via LYS-1 metabolism. LYS-1 was inoculated in the media formulated with different carbon sources, and then the changes in the acidity, viable cell count and the antimicrobial effect of fermentation supernatant were examined during the fermentation process. The results showed that the diameter of the inhibition zone of LYS-1 was 9.84 mm, 8.55 mm and 7.65 mm, respectively, when glucose, sucrose or maltose was used as the carbon source, with no inhibition zone detected for fructose, lactose and glycerol. The inhibition zone appeared only when the viable cell count was not lower than 10^9 CFU/mL, and the increase in the viable cell count facilitated the increase of the diameter of inhibition zone. The combination of glucose and sucrose led to a greater antimicrobial effect, and an increase of sucrose in the range of 5%~10% could improve significantly the antimicrobial effect. Replacing sucrose with glucose and fructose in equivalent amounts resulted in the same antimicrobial effect. The antimicrobial effect was the greatest when the carbon source was 1.00% glucose + 10.00% sucrose or 6.26% glucose + 5.26% fructose. Carbon source affected the metabolism of LYS-1 to produce antimicrobial substances, with glucose and fructose being the key factors affecting the antimicrobial effect of fermentation supernatant.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; fermentation supernatant; carbon source; antimicrobial effect

引文格式:

吴惠贞, 夏枫耿, 陈中, 等. 碳源对罗伊氏乳杆菌发酵上清液抑菌效果的影响[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 119-125

WU Hui-zhen, XIA Feng-geng, CHEN Zhong, et al. The influence of carbon source on the antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* fermentation supernatant [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 119-125

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 广州市产学研协同创新联盟专题 (201604046011)

作者简介: 吴惠贞 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 林伟锋 (1970-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 是人类肠道的固有细菌, 最适生长温度是 35 °C~40 °C, 最适 pH 是 5.5~6.5, 兼性厌氧型。1989 年被美国食品和药品管理协会列为安全的微生物菌种, 2003 年、2010 年和 2014 年我国先后批准了罗伊氏乳杆菌可用于保健食品、食品和婴幼儿食品^[1]。研究发现, 罗伊氏乳杆菌发酵液和发酵无菌上清液均有抑菌性能^[2], 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌等均有抑制效果^[3-8]。在肉制品、奶制品等的加工保藏过程中添加罗伊氏乳杆菌, 可以有效抑制单增李斯特菌、大肠杆菌等食源性病原菌和腐败菌的生长从而延长货架期^[9-12], 有望成为一种新型的生物防腐剂。

为提高罗伊氏乳杆菌发酵液的抑菌效果, 研究人员主要从培养基类型、碳源、氮源、金属离子、生长因子、培养起始 pH、培养温度、培养时间、接种量等方面去优化发酵培养基和培养条件^[13-15]。培养基中的碳源是用于构成菌体细胞和代谢产物的碳元素来源, 并为微生物的生长繁殖和代谢活动提供能源^[16]。微生物自身的酶系统不同, 能利用的碳源也不同。资料显示, 罗伊氏乳杆菌能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖、阿拉伯糖、棉籽糖、蜜二糖等^[17]。张雪梅^[18]实验中罗伊氏乳杆菌利用麦芽糖、蔗糖和水苏糖的能力最强, 而陈夷平^[19]实验所用菌株则利用蔗糖、葡萄糖和乳糖的能力较强, 大多数实验菌株也是较能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖或乳糖^[1,20], 但关于葡萄糖和果糖复配对抑菌效果影响的研究很少。另外, 许多研究通过单因素实验、正交设计或响应面模型等进行碳源筛选及培养基配方优化^[21-23], 因菌株和方法不同, 利用的碳源不同, 使得最优培养基配方有所差异, 而且观察指标主要是发酵液的菌体密度, 以抑菌效果为判定指标的相关研究则很少。

本文探讨碳源对罗伊氏乳杆菌发酵过程及其特性与抑菌效果关系的影响, 通过琼脂扩散法测定碳源对发酵上清液的抑菌效果, 以此研究碳源与罗伊氏乳杆菌抑菌物质代谢机制之间的关系, 同时获取最优碳源组合, 为提高罗伊氏乳杆菌发酵上清液的抑菌效果提供培养基配方参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

罗伊氏乳杆菌 LYS-1 (*Lactobacillus reuteri*, GW-1-1201-1805-01)、大肠杆菌 K₁₂D₃₁, 广东省微生物种质资源库保藏菌种。

D-无水葡萄糖 (分析纯)、蔗糖 (分析纯)、D-果

糖 (分析纯)、甘油 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 麦芽糖 (分析纯), 上海伯奥生物科技有限公司; α -乳糖 (分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 细菌学蛋白胨、酵母提取物, 广东环凯微生物科技有限公司; 琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 培养基

1.2.1 改良 MRS 培养基

葡萄糖 1.00%, 蔗糖 5.00%, 酵母提取物 2.00%, 无水乙酸钠 0.50%, 柠檬酸铵 0.20%, 吐温-80 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.058%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, pH 6.20~6.40, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 检测培养基^[24]

NaCl 1.00%, 细菌学蛋白胨 1.00%, 酵母提取物 0.50%, 葡萄糖 0.50%, 琼脂粉 2.00%, pH 7.00, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 仪器与设备

pHS-25 数显 pH 计, 上海精密仪器有限公司; 高压灭菌锅, 合肥华泰医疗设备有限公司; SW-CJ-ECU 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; DGX-9243B-2 恒温培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; TGL-16gR 高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; HH-2 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; SF2000 电子数显卡尺, 广陆数字测控股份有限公司。

1.4 方法

1.4.1 罗伊氏乳杆菌活化与培养

罗伊氏乳杆菌接入改良 MRS 培养基中, 使含菌量为 3.50×10^6 CFU/mL, 37 °C 培养 24 h 活化; 培养时, 活化液按 1% 接种量接入各发酵培养基中, 37 °C 培养。

1.4.2 罗伊氏乳杆菌发酵上清液的制备

罗伊氏乳杆菌发酵液混匀至无沉淀, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 70 °C 水浴锅中保温 30 min 后, 4 °C 保存待作抑菌效果测定。

1.4.3 抑菌效果测定-琼脂扩散法

将检测培养基融化后待其冷却至 48 °C~50 °C, 加入大肠杆菌菌液, 使检测培养基含菌量为 1.00×10^6 CFU/mL, 吸取含菌检测培养基 10 mL, 使在 90 mm 培养皿中均匀摊布, 放置在水平台面上待其凝固, 4 °C 保存 30 min 以上; 用打孔器 ($d=2.7$ mm) 在含菌检测平板上打孔并轻轻挑去琼脂块; 测定时每孔中滴加样液 6 μL , 每个样品滴加 2 个孔, 每组作 3 个平行; 37 °C 培养 16 h~18 h, 用游标卡尺测定抑菌圈直径, 取平均

值。

1.4.4 罗伊氏乳杆菌发酵特性的测定

将罗伊氏乳杆菌活化液接入发酵培养基中, 37 °C 培养 72 h, 分别取 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、15 h、18 h、21 h、24 h、36 h、48 h、72 h 的发酵液进行酸度、活菌数和抑菌效果测定。酸度测定参考 GB 5009.239-2016, 活菌数测定参考 GB 4789.35-2016。

1.4.5 数据处理

用 Origin 9.0 软件对数据进行处理和图表绘制, 并用 SPSS 19.0 的单因素方差分析来统计分析显著性差异 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 碳源种类对抑菌效果的影响

以改良 MRS 培养基为空白, 用添加量为 6.00% 的葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油作为碳源替代葡萄糖和蔗糖。测定罗伊氏乳杆菌 LYS-1 培养 24 h 后发酵液的活菌数及发酵上清液的抑菌效果, 结果如表 1。

表 1 碳源种类对抑菌效果的影响

Table 1 Influence of carbon source types on the antimicrobial effect

碳源	活菌数/(CFU/mL)	抑菌圈直径/mm
空白	4.15×10^9	10.43
葡萄糖	1.05×10^9	7.65
蔗糖	3.51×10^9	9.84
果糖	5.23×10^8	0.00
乳糖	7.10×10^8	0.00
麦芽糖	2.42×10^9	8.55
甘油	1.73×10^6	0.00

由表 1 可知, 只有碳源为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖时能产生抑菌圈, 且以这三种糖为碳源时发酵液的活菌数较高, 活菌数和抑菌圈直径排序为蔗糖>麦芽糖>葡萄糖。与陈夷平^[19]、王超^[1]、刘金玲^[25]实验中罗伊氏乳杆菌利用蔗糖的能力最强, 利用麦芽糖和葡萄糖的能力也较强的结果相一致。该实验菌株利用果糖和乳糖的能力较弱, 不能以甘油为主要碳源而生长。实验结果还反映了碳源对抑菌效果和细胞生长的影响有一定的联系, 碳源为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖时, 活菌数均在 10^9 CFU/mL 以上, 且活菌数越高抑菌圈直径越大, 而碳源为果糖、乳糖和甘油时活菌数则相对较低。另一方面, 尽管蔗糖作为碳源时抑菌圈直径和活菌数较优, 但比空白组 (1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖) 低, 表明复合碳源比单一碳源可能更促进罗伊氏乳杆

菌的生长和增强发酵上清液的抑菌效果。

2.2 碳源对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵特性和发酵上清液抑菌效果的影响

由上述结果可知, 罗伊氏乳杆菌 LYS-1 利用不同碳源对活菌数和抑菌效果有着不同的影响, 乳酸菌常被应用于牛奶中水解乳糖制备发酵酸乳, 但结果显示本实验菌株利用乳糖的能力较弱, 故以 6.00%乳糖为碳源进行罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵特性及发酵上清液抑菌效果的研究, 碳源 1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖作为对比分析。结果如图 1、图 2 所示。

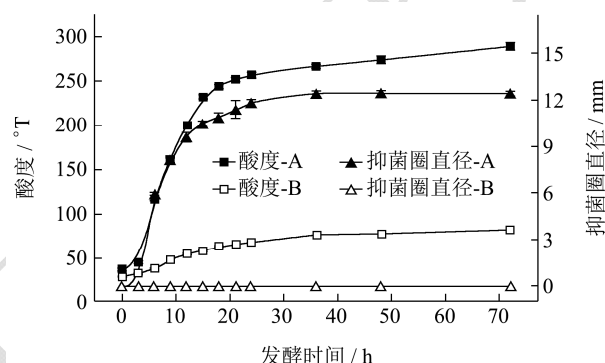


图 1 碳源对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵液酸度及其上清液抑菌效果的影响

Fig.1 Influence of carbon source on the acidity of *Lactobacillus reuteri* (LYS-1) fermentation liquid and its antimicrobial effect of supernatant

注: A-碳源为 1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖; B-碳源为 6.00%乳糖。

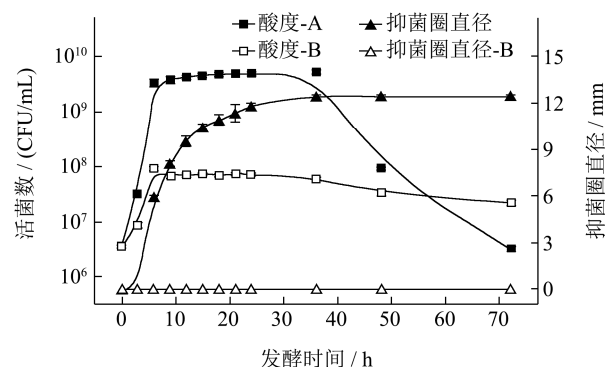


图 2 碳源对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 增殖与发酵上清液抑菌效果的影响

Fig.2 Influence of carbon source on the *Lactobacillus reuteri* (LYS-1) growth and its antimicrobial effect of fermentation supernatant

注: A-碳源为 1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖, B-碳源为 6.00%乳糖。

由图 1、图 2 可知, 两种碳源对罗伊氏乳杆菌

LYS-1 发酵过程中酸度、活菌数和抑菌效果的影响均不同,且酸度、活菌数与抑菌效果之间又有一定的关联。以乳糖为碳源时,发酵过程中 LYS-1 增殖较少,活菌数最高为 7.35×10^7 CFU/mL,只增加了一个对数级;产酸较弱,酸度变化幅度不大,72 h 酸度最高只有 81.87°T ,0 h~72 h 的发酵上清液均无抑菌圈产生。这与万心怡^[13]和张烽^[26]的研究中乳糖为碳源时最有利于抑菌物质产生的结论不同,原因可能在于该实验菌株产半乳糖苷酶的能力较弱导致乳糖利用能力较弱。以蔗糖为主要碳源时,LYS-1 增殖较明显,6 h 活菌数达 3.35×10^9 CFU/mL,酸度达 115.93°T 并开始出现抑菌圈;6 h~36 h 活菌数缓慢增加,酸度持续增加,基本是碳源为乳糖时的 3~4 倍,抑菌圈直径逐渐增大;36 h 活菌数和抑菌圈直径达到最大值,分别为 4.90×10^9 CFU/mL 和 12.52 mm,随后活菌数快速下降,酸度缓慢增加,但抑菌圈直径基本保持稳定,说明抑菌物质作为代谢产物分泌于发酵液中,其含量不随菌细胞的衰败破裂而降低或增加。研究显示,乳酸菌的抑菌能力与细胞生长有密切的关系^[27,28],徐海燕^[29]和王志新^[30]的罗伊氏乳杆菌抑菌动力学曲线表明,抑菌物质在对数期初期开始产生,进入稳定期后产量持续增长,稳定期中期或后期达到最高水平并基本维持稳定,与本实验 LYS-1 的发酵特性相似。综上可以表明,抑菌物质的代谢与活菌数密切相关,碳源影响 LYS-1 的生长代谢,从而影响抑菌物质的产生和发酵上清液的抑菌效果。

2.3 葡萄糖、蔗糖和麦芽糖复配对抑菌效果的影响

表 2 葡萄糖、蔗糖和麦芽糖复配配方

Table 2 Combination formula of glucose, sucrose and maltose

分组	葡萄糖/%	蔗糖/%	麦芽糖/%
空白	1.00	5.00	0.00
1	1.00	2.50	2.50
2	1.00	3.40	1.60
3	1.00	3.75	1.25
4	2.00	2.00	2.00
5	0.00	3.00	3.00

鉴于罗伊氏乳杆菌 LYS-1 较能利用蔗糖、麦芽糖和葡萄糖这 3 种碳源且发现复配碳源的抑菌效果比单一碳源时要强,本实验对蔗糖、麦芽糖和葡萄糖进行不同添加量的组合,以观察抑菌效果的变化。以改良 MRS 培养基为空白,在此基础上变换碳源配方(见表 2),然后测定 LYS-1 培养 24 h 后发酵上清液的抑菌效

果。抑菌结果如图 3 所示,空白组与 1、4、5 组无显著差异 ($p \geq 0.05$),与 2、3 组有明显差异 ($p < 0.05$)且空白组的抑菌圈直径较大。三种碳源复配(组 1~4)比两种碳源复配(空白组、组 5)时的抑菌圈直径要小,且随着蔗糖添加量的增加,抑菌效果反而减弱,可能是因为水解两种双糖会消耗较大的能量从而影响抑菌物质的合成。大多数研究中的最优碳源配方也是一至两种碳源的组合,只有张雪梅^[18]和陈夷平^[19]的研究结果中最优碳源为三种碳源复配,但他们的总碳源含量与本实验的不同,所以实验结果有所差异。两种碳源复配时,蔗糖和麦芽糖复配的抑菌效果有优于葡萄糖和蔗糖复配的趋势但不明显 ($p \geq 0.05$)。鉴于培养基配方简易与降低成本的考虑,加之对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 生长而言,生长初期会优先利用单糖,故碳源复配的较优选择还是空白组,即 1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖。

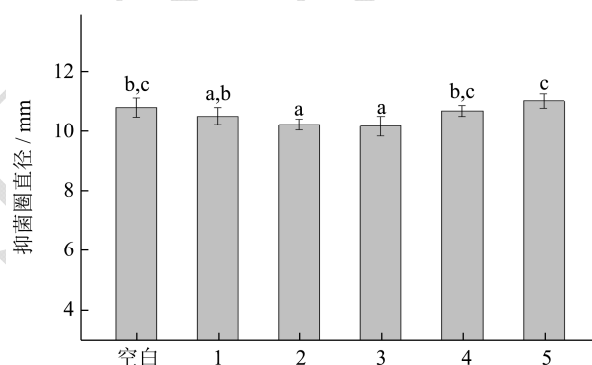


图 3 葡萄糖、蔗糖和麦芽糖复配对抑菌效果的影响

Fig.3 Influence of glucose, sucrose and maltose combination on the antimicrobial effect

注:空白-1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖;1-1.00%葡萄糖+2.50%蔗糖+2.50%麦芽糖;2-1.00%葡萄糖+3.40%蔗糖+1.60%麦芽糖;3-1.00%葡萄糖+3.75%蔗糖+1.25%麦芽糖;4-2.00%葡萄糖+2.00%蔗糖+2.00%麦芽糖;5-3.00%蔗糖+3.00%麦芽糖;不同字母 a~c 表示显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.4 蔗糖添加量对抑菌效果的影响

前述 2.1 的研究结果显示,罗伊氏乳杆菌 LYS-1 虽然不能单以果糖为碳源而使发酵上清液具备抑菌效果,但利用蔗糖时发酵上清液的抑菌效果比利用葡萄糖时强,葡萄糖和蔗糖搭配时抑菌效果更强,故本实验以改良 MRS 培养基为空白,在此基础上提高蔗糖的添加量依次为 6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%,测定罗伊氏乳杆菌培养 24 h 后发酵上清液的抑菌效果,以研究蔗糖添加量对抑菌效果的影响,结果如图 4 所示。

从图 4 可知,一定范围内蔗糖添加量的增加有利

于增大抑菌圈直径,添加量从 5.00%增加至 10.00%,抑菌效果增强,在 10.00%时抑菌圈直径达到最大值 12.56 mm,而添加量从 10.00%增加至 30.00%的过程中,抑菌效果开始减弱,添加量为 25.00%和 30.00%时甚至比空白组的抑菌效果还弱。这是因为随着蔗糖添加量的进一步升高,增加了发酵体系的渗透压,使得发酵体系中罗伊氏乳杆菌 LYS-1 受到高渗透压胁迫,细胞繁殖变得缓慢,从而导致抑菌物质产生量减少,发酵上清液抑菌效果下降。由抑菌圈直径可知,本实验中最优碳源配方为 1.00%葡萄糖+10.00%蔗糖。而刘金玲^[25]研究结果中,最优碳源配方为 2.10%葡萄糖+3.00%蔗糖,黄沧海^[23]得出的最优配方为 1.00%葡萄糖+6.00%蔗糖,可见本实验菌株耐受高渗透压的能力更强。

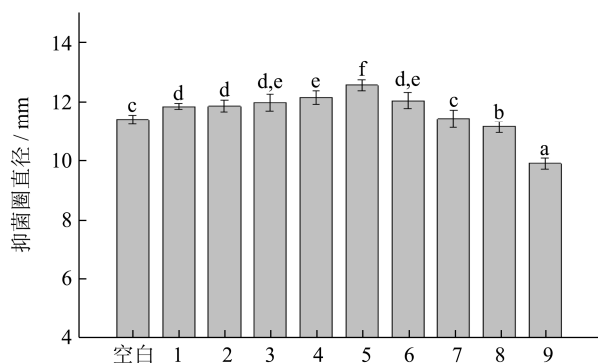


图4 蔗糖添加量对抑菌效果的影响

Fig.4 Influence of sucrose addition amount on the antimicrobial effect

注: 空白-1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖; 1-1.00%葡萄糖+6.00%蔗糖; 2-1.00%葡萄糖+7.00%蔗糖; 3-1.00%葡萄糖+8.00%蔗糖; 4-1.00%葡萄糖+9.00%蔗糖; 5-1.00%葡萄糖+10.00%蔗糖; 6-1.00%葡萄糖+15.00%蔗糖; 7-1.00%葡萄糖+20.00%蔗糖; 8-1.00%葡萄糖+25.00%蔗糖; 9-1.00%葡萄糖+30.00%蔗糖; 不同字母 a~f 表示显著性差异 ($p<0.05$)。

2.5 葡萄糖和果糖复配对抑菌效果的影响

前述 2.4 的研究结果显示,一定范围内提高蔗糖添加量能提高发酵上清液的抑菌效果。蔗糖是双糖,由葡萄糖和果糖通过 α -1,2 糖苷键构成,葡萄糖和果糖是单糖,在细胞利用效率上比双糖有优势,故本实验用葡萄糖和果糖来等当量替代蔗糖作为碳源,研究其不同添加量对抑菌效果的影响。以改良 MRS 培养基为空白,用葡萄糖和果糖等当量替代添加量分别为 5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%的蔗糖,测定发酵上清液的抑菌效果并进行比较,结果如图 5 所示。

对比图 4 与图 5 可知,碳源为蔗糖或是与之等当

量的葡萄糖和果糖复配时,添加量同等条件下后者的抑菌圈直径略大一点,但无明显差异 ($p\geq 0.05$),而且随着葡萄糖和果糖添加量的增加,抑菌圈直径呈现先增大后减小的变化趋势,与蔗糖添加量对抑菌效果的影响趋势相一致。碳源为 6.26%葡萄糖+5.26%果糖时抑菌圈直径达到最大值 12.86 mm,对应于 1.00%葡萄糖+10.00%蔗糖,继续增大葡萄糖和果糖的添加量则会因为高渗透压胁迫而降低抑菌效果。由此说明葡萄糖和蔗糖复配的本质是葡萄糖和果糖的协同作用,葡萄糖作为碳源和能量来源,经异型乳酸发酵途径代谢产生乳酸、乙醇、 CO_2 、ATP 等产物,促进罗伊氏乳杆菌 LYS-1 增殖和抑菌物质代谢,而直接添加的果糖及蔗糖经水解酶形成的果糖的作用如同 Emma^[31]所说,仅作为电子受体,提高糖酵解过程中的 ATP 水平从而大大促进细胞生长和抑菌物质代谢,进一步增强发酵上清液的抑菌效果。由抑菌圈直径可知,本实验中最优碳源配方为 6.26%葡萄糖+5.26%果糖。

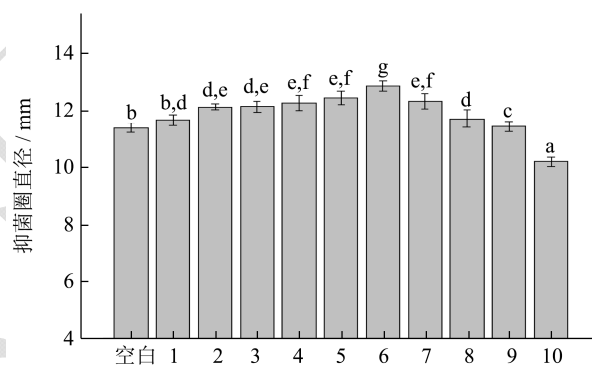


图5 葡萄糖和果糖复配对抑菌效果的影响

Fig.5 Influence of glucose and fructose combination on the antimicrobial effect

注: 空白-1.00%葡萄糖+5.00%蔗糖; 1-3.63%葡萄糖+2.63%果糖; 2-4.16%葡萄糖+3.16%果糖; 3-4.68%葡萄糖+3.68%果糖; 4-5.21%葡萄糖+4.21%果糖; 5-5.74%葡萄糖+4.74%果糖; 6-6.26%葡萄糖+5.26%果糖; 7-6.79%葡萄糖+5.79%果糖; 8-7.32%葡萄糖+6.32%果糖; 9-7.85%葡萄糖+6.85%果糖; 10-8.38%葡萄糖+7.38%果糖; 不同字母 a~g 表示显著性差异 ($p<0.05$)。

3 结论

本文研究了碳源对罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵特性及其与抑菌效果关系的影响。LYS-1 利用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖能力较强,细胞增殖明显,发酵上清液具有良好抑菌效果;利用果糖、乳糖和甘油能力较弱,细胞增殖较少,发酵上清液不具备抑菌效果。当活菌数达到 10^9 CFU/mL 时抑菌圈才会出现,且活菌数的增多有利于抑菌圈直径的增大,碳源影响 LYS-1 发酵

过程中活菌数的变化,从而影响酸度的变化和抑菌效果的强弱。葡萄糖和蔗糖复配的抑菌效果较优,5%~10%范围内随着蔗糖添加量的增加,抑菌效果增强。以葡萄糖和果糖等当量替换蔗糖作为碳源时发酵上清液能产生同等的抑菌效果,最优碳源配方为1.00%葡萄糖+10.00%蔗糖或6.26%葡萄糖+5.26%果糖,葡萄糖和果糖是影响罗伊氏乳杆菌 LYS-1 发酵上清液抑菌效果的关键性因素。

参考文献

- [1] 王超.富硒罗伊氏乳杆菌高密度培养及其微胶囊化的研究[D].厦门:华侨大学,2017
WANG Chao. Study on high-density culture and microencapsulation of selenium-enriched *Lactobacillus reuteri* CG001 [D]. Xiamen: Huaqiao University, 2017
- [2] 熊涛,邓耀军,廖良坤,等.罗伊氏乳杆菌 NCU801 的鉴定及抑菌性能研究[J].食品与发酵工业,2015,41(2):24-29
XIONG Tao, DENG Yao-jun, LIAO Liang-kun, et al. Identification and antibacterial experiments of *Lactobacillus reuteri* NCU801 [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(2): 24-29
- [3] Vimont A, Fernandez B, Ahmed G, et al. Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 289: 182-188
- [4] Mishra S K, Malik R K, Panwar H, et al. Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* [J]. Biotech, 2018, 8(1): 23
- [5] 朱振军,黄国宏,梁晓琳,等.罗伊氏乳杆菌的益生特性及安全性分析[J].现代食品科技,2016,32(6):315-320
ZHU Zhen-jun, HUANG Guo-hong, LIANG Xiao-lin, et al. Analysis of probiotic properties and safety of *Lactobacillus reuteri* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 315-320
- [6] 刘春娟,边鑫,赵士举.具有抑制腐败菌能力的罗伊氏乳杆菌筛选及在酸乳生产中的应用[J].食品科学,2016,37(7):157-162
LIU Chun-juan, BIAN Xin, ZHAO Shi-ju. Screening of *Lactobacillus reuteri* inhibiting spoilage organisms and its application to yoghurt production [J]. Food Science, 2016, 37(7): 157-162
- [7] 张学燕,聂召龙,王通,等.牦牛源乳酸菌的筛选鉴定与体外益生特性评价[J].西北农业学报,2019,28(4):522-529
ZHANG Xue-yan, NIE Zhao-long, WANG Tong, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria and probiotic characteristics *in vitro* on yak calves [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(4): 522-529
- [8] 白凤翎,励建荣.抗真菌性乳酸菌生物保护剂的研究进展[J].现代食品科技,2014,30(5):311-319
BAI Feng-ling, LI Jian-rong. Advanced research on antifungal lactic acid bacteria of food bio-protective agent [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 311-319
- [9] Marta A, Natalia G T, Marta H, et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium species* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172(7): 70-75
- [10] Angiolillo L, Conte A, Zambrini A V, et al. Biopreservation of fior di latte cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(9): 5345-5355
- [11] Ortiz-Rivera Y, Sánchez-Vega R, Gutiérrez-Méndez N, et al. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(6): 4258
- [12] Angiolillo L, Conte A, Nobile M a D. Microencapsulated *Lactobacillus reuteri* combined with modified atmosphere as a way to improve tuna burger shelf life [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(7): 1576-1584
- [13] 万心怡.罗伊氏乳杆菌产罗伊氏细菌素的工艺优化[D].无锡:江南大学,2017
WAN Xin-yi. Process optimization of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [14] 王巧丽.猪源罗伊氏乳杆菌的筛选、特性研究及应用[D].兰州:甘肃农业大学,2013
WANG Qiao-li. Screening, characteristics and application of *Lactobacillus reuteri* from pigs [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013
- [15] 陈国,肖雅琴,陈宏文.罗伊氏乳杆菌培养基优化及其生长代谢研究[J].食品科学,2010,31(13):174-179
CHEN Guo, XIAO Ya-qin, CHEN Hong-wen. Optimal medium and growth metabolism of *Lactobacillus Reuteri* [J]. Food Science, 2010, 31(13): 174-179
- [16] 何建勇.生物制药工艺学[M].北京:人民卫生出版社,2007
HE Jian-yong. Biopharmaceutical Technology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007
- [17] 张刚.乳酸细菌-基础.技术和应用[M].北京:化学工业出版社

- 社,2007
- ZHANG Gang. Latic acid bacteria-foundation, technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007
- [18] 张雪梅.*Lactobacillus reuteri* IMAU10240 培养基及培养条件优化[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2016
- ZHANG Xue-mei. The optimization about medium and cultivating condition of *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 [D]. Huhehaote: Inner Mongolia Agricultural University, 2016
- [19] 陈夷平.罗伊氏乳杆菌 IMAU10281 生长培养基的优化[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2015
- CHEN Yi-ping. Study on fermentation medium optimization of *Lactobacillus reuteri* IMAU10281 [D]. Huhehaote: Inner Mongolia Agricultural University, 2015
- [20] 刘栋.罗伊氏乳杆菌 LT018 高密度培养及其冻干技术的研究[D].南宁:广西大学,2017
- LIU Dong. Studies on high-density cultivation and freeze-drying and technology of *Lactobacillus Reuteri* LT018 [D]. Nanning: Guangxi University, 2017
- [21] 朱战波,刘宇,贾永全,等.二次正交旋转组合设计优化罗伊乳杆菌发酵培养基[J].中国生物制品学杂志,2008,21(6): 527-530
- ZHU Zhan-bo, LIU Yu, JIA Yong-quan, et al. Optimization of fermentation medium for *Lactobacillus reuteri* by quadratic orthogonal rotation combination design [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2008, 21(6): 527-530
- [22] 秦鹏,谢鹏,刘广宇,等.响应曲面法优化罗伊氏乳杆菌发酵培养基[J].安徽农业科学,2016,6:91-93
- QIN Peng, XIE Peng, LIU Guang-yu, et al. Optimization of fermentation medium of *Lactobacillus reuteri* by response surface methodology [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2016, 6: 91-93
- [23] 黄沧海,譙仕彦,李德发.仔猪源罗伊氏乳酸杆菌生物学特性的研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然 科 学),2004,19(6):722-726
- HUANG Cang-hai, QIAO Shi-yan, LI De-fa. Study of biological characteristics of *Lactobacillus reuteri* originated from piglet [J]. Journal of Yunnan Agriculture University (Natural Science), 2004, 19(6): 722-726
- [24] 曹丁,明飞平,夏枫耿,等.抗菌肽产生菌的推理选育及抑菌特性分析[J].广东农业科学,2015,42(18):122-126
- CAO Ding, MING Fei-ping, XIA Feng-geng, et al. Rational selection and antibacterial properties analysis of antimicrobial peptides producing bacteria [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(18): 122-126
- [25] 刘金玲,李嘉文,张含雪,等.罗伊乳杆菌增殖培养基中碳源氮源的优化[J].中国微生态学杂志,2016,28(5):533-537
- LIU Jin-ling, LI Jia-wen, ZHANG Han-xue, et al. Optimization of carbon and nitrogen sources of enrichment culture medium for *Lactobacillus reuteri* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(5): 533-537
- [26] 张烽.微生物甘油脱水酶生物催化生产 3-羟基丙醛的研究 [D].杭州:浙江工业大学,2009
- ZHANG Feng. Biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde by microbial glycerol dehydratase [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009
- [27] 张艾青.产广谱细菌素植物乳杆菌的初步研究及其在泡菜中的应用[D].四川农业大学,2007
- ZHANG Ai-qing. The preliminary study of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* and it's apply on pickled vegetable [D]. Sichuan Agricultural University, 2007
- [28] 张君超,谢远红,金君华,等.产乳酸菌素菌株的筛选鉴定及其特性分析[J].食品工业科技,2016,37(9):169-174
- ZHANG Jun-chao, XIE Yuan-hong, JIN Jun-hua, et al. Identification and antimicrobial characters of a strain produc in lactobacillin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(9): 169-174
- [29] 徐海燕,曹银生,张志焱,等.罗伊氏乳杆菌所产细菌素的研究[J].饲料与畜牧,2011, 9:27-30
- XU Hai-yan, CAO Yin-sheng, ZHANG Zhi-yan, et al. Study on bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* [J]. Feed and Animal Husbandry, 2011, 9: 27-30
- [30] 王志新,韩烁培,王雨,等.植物乳杆菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J].食品工业科技,2019,40(9):133-139,146
- WANG Zhi-xin, HAN Shuo-pe, WANG Yu, et al. Screening and identification of *Lactobacillus plantarum* and studies of its antimicrobial substances [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 133-139, 146
- [31] Emma A, Elke L V, Rong C, et al. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(1): 206