

抑菌功能微生物的筛选及其抑菌物质

李铃铃¹, 余冰艳¹, 周 垒¹, 兰箫松¹, 陈子敬¹, 唐建立^{1,2}, 刘 君^{1,2}, 蒋雪薇^{1,2*}

(¹长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

²湖南省调味品发酵工程技术研究中心 长沙 410600)

摘要 为获得应用于食品防腐的生物防腐剂,筛选出抑菌功能微生物并研究其抑菌物质。采用牛津杯法,以抑菌圈面积为指标,筛选抑菌功能微生物,研究其抑菌谱;以抑菌效价变化为指标,研究抑菌发酵液的 pH 值、温度及紫外照射稳定性;排酸试验及高效液相色谱研究并分析抑菌物质。结果发现,筛选自酱腌和泡菜的 16 株具有抑菌能力的产酸细菌中,腐生葡萄球菌 JL03 和植物乳杆菌 L04-1 的抑菌效果突出且具有广谱抑菌特性;两株菌的抑菌发酵液在 pH 3.0 时,抑菌效价分别由 5 730.69 IU/mL 和 5 772.35 IU/mL 下降到 5 190.12 IU/mL 和 5 122.20 IU/mL,均保持原有活性 85% 以上,说明 pH 稳定性好;100 °C 处理两菌抑菌发酵液 20 min, JL03 抑菌效价由 5 730.69 IU/mL 下降至 4 588.52 IU/mL, 保持原有活性 80% 以上,而 L04-1 的抑菌活性则下降了 44.11%, 说明 JL03 抑菌液的热稳定性优于 L04-1;紫外照射 3 h 后,两株菌的抑菌效价分别由 5 730.69 IU/mL 和 5 772.35 IU/mL 下降到 4 697.29 IU/mL 和 4 437.52 IU/mL,均保持原有活性的 70% 以上,说明均具有良好的抗氧化性;排酸试验发现两株菌以酸性物质抑菌为主,其酸性物质抑菌能力分别占总抑菌能力的 58.03% 和 64.32%;高效液相色谱分析两株菌发酵 72 h 的抑菌液,发现酸性物质主要为草酸、L-苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸共 7 种有机酸,其总含量分别为 9.64 g/L 和 13.46 g/L,相关性分析显示 L-苹果酸(0.43 g/L)、乳酸(6.76 g/L)与 JL03 抑菌液的抑菌效价呈显著正相关($P < 0.05$),乳酸(5.75 g/L)、琥珀酸(1.32 g/L)和富马酸(0.32 g/L)与 L04-1 抑菌液的抑菌效价呈显著正相关($P < 0.05$)。抑菌功能微生物的筛选及其关键抑菌物质的解析,为抑菌功能微生物抑菌性能的提升及其在食品防腐领域的应用奠定了基础。

关键词 抑菌功能微生物; 抑菌效价; 植物乳杆菌; 腐生葡萄球菌; 有机酸

文章编号 1009-7848(2024)10-0071-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.007

微生物污染是导致食品腐败和致病的主要原因,食源性腐败菌不仅会降低食品的营养价值,还会产生有害化合物,如亚硝酸盐和亚硝胺^[1]、苯酚^[2]、硫化氢^[3]等,对人体肝、肾和中枢神经系统造成损害并诱发癌症^[4-6]。此外,一些食源性致病菌,例如志贺氏菌^[7]和沙门氏菌^[8]可引起呕吐、腹泻,中毒甚至死亡^[9-10],严重危害人类健康和经济发展。据世界卫生组织(WHO)统计,全球每年有 6 亿人因食品污染而患病,由食品腐败造成的经济损失多达几百亿美元^[11-12]。防控食品微生物污染是确保食品安全的重要措施,而食品防腐剂的应用是常见的手段。目前的食品防腐剂一般分为化学防腐

剂和天然生物防腐剂两大类。天然生物防腐剂具有高效、安全、环境友好等诸多化学防腐剂无法比拟的优势,是当前防腐剂行业的发展重点。天然的生物防腐剂按来源可分为植物、动物和微生物源三大类^[13]。其中微生物源的防腐剂因微生物种类丰富,繁殖周期短,生长条件要求低,成为天然生物防腐剂的重要来源以及新型天然防腐剂的重要发展方向^[14]。

微生物源防腐剂主要来源于具有抑菌防腐功效的微生物本身或其产物,具有安全无毒、天然高效的特点,可通过微生物大规模培养进行工业化生产^[15]。微生物源防腐剂中的微生物主要是一些食品发酵菌,其在食品发酵过程中,不仅能赋予食品特殊的风味以及益生功能^[16-18],还通过产生乳酸^[19-20]、乙酸^[21]、苯乳酸^[22]、细菌素^[23]等代谢物及多肽抑制食源性腐败菌的生长及繁殖,实现对食品的抑菌防腐,这些既能促进发酵又能实现抑菌防腐的微生物被称为抑菌功能微生物,主要是发酵食品中的乳酸菌等产酸细菌。Divyashree 等^[24]筛选

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 湖南省重点研发项目(2023NK2035);湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30700);湖南省教育厅优秀青年项目(23B0306);湖南省大学生创新训练计划项目(S202210536119)

第一作者: 李铃铃,女,硕士生

通信作者: 蒋雪薇 E-mail: jxw_72@sina.com

具有益生功能的干酪乳杆菌(MYSRD 108)和植物乳杆菌(MYSRD 71),这两株菌的无细胞上清液均能抑制副伤寒沙门氏菌,使副伤寒沙门氏菌生物膜减少75%以上。张欢等^[25]研究了植物乳杆菌等5株乳酸菌和1株木糖葡萄球菌的发酵液对产气荚膜梭菌的抑制作用,发现植物乳杆菌因具备产酸和细菌素的能力,故能有效抑制产气荚膜梭菌的芽胞萌发和生长。姚佳明^[26]诱变获得解淀粉芽胞杆菌B815-1能产生Surfactin、六肽等多种抑菌成分,随着纯化过程中单一成分纯度的提高,抑菌活性反而降低,进一步试验发现Surfactin、六肽和乳酸存在抑菌的协同增效作用。可以看出,乳酸菌以及具有发酵作用的葡萄球菌等产酸细菌能发酵产生多种抑菌物质,其粗发酵液具有抑菌功能,直接使用不仅成本低廉,还具有多种物质协同抑菌的优势,成为抑菌功能微生物应用的发展方向。本文以分离自发酵食品中的产酸细菌为研究对象,筛选抑菌功能微生物,研究其发酵液抑菌的影响因素以及抑菌物质组成,为其抑菌性能提升及在食品防腐方面的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种 菌株:植物乳杆菌(*Lactobacterium plantarum*)L04-1,腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)JL03、JL03-1,香料葡萄球菌(*Staphylococcus condimenti*)JL04、JL20,鱼发酵葡萄球菌(*Staphylococcus piscifermentans*)JL15,肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)JL06、JL07、JL10、JL11、JL12、JL13、JL14、JL16、JL17、JL19,分离自高盐稀态酱醪和泡菜样品,保藏于湖南省调味品发酵工程技术研究中心。指示菌株:地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)分离自变质酱油,保藏于湖南省调味品发酵工程技术研究中心;变形杆菌(*Proteus species*) (CCTCC AB 91103)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) (CCTCC AB 94010)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) (CCTCC AB 93154)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (CCTCC AB 91093),中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 培养基与试剂 MRS液体培养基:蛋白胨

10 g、牛肉膏10 g、酵母膏3 g、柠檬酸氢二铵2 g、葡萄糖40 g、氯化钠5 g、乙酸钠5 g、磷酸氢二钾2 g、硫酸镁0.58 g、硫酸锰0.25 g、吐温-80 1 mL、蒸馏水1 000 mL,pH 6.5。牛肉膏蛋白胨培养基^[27],不添加琼脂粉为液体培养基,添加质量分数1%的琼脂粉为半固体培养基。

乳酸链球菌素A(Nisin A, BR, 900 IU/mg),广州佳途科技股份有限公司;乳酸(HPLC),美国斯坦福化学试剂有限公司;草酸(AR)、L-苹果酸(98%)、柠檬酸(AR)、琥珀酸(AR)、甲酸(AR)、硫酸锌(AR)、亚铁氰化钾(AR),国药集团化学试剂有限公司;乙酸(AR)、富马酸(AR)、甲醇(HPLC)、磷酸(AR),上海麦克林生化科技有限公司;其它试剂均为分析纯级,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

FE28 pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Eppendorf 5424R高速台式冷冻离心机,德国Eppendorf公司;ZWY-2102C恒温振荡培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;岛津LC-20A高效液相色谱仪,日本岛津公司;Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,美国Agilent公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种培养

1.3.1.1 试验菌株的培养及抑菌液的制备 将保存在甘油冻管中的试验菌株活化后转接至MRS液体培养基中,37℃,180 r/min摇瓶培养24 h制备种子液,调整种子液菌悬浓度至10⁸ CFU/mL,以体积分数1%的接种量转接至MRS液体培养基中,37℃,180 r/min摇瓶发酵48 h,4 000 r/min冷冻离心10 min,取上清用0.22 μm滤膜过滤所得的无细胞滤液即抑菌液,4℃冰箱冷藏备用。

1.3.1.2 指示菌活化 将指示菌活化后接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃,180 r/min摇瓶培养24 h,调整菌悬浓度为10⁷ CFU/mL。

1.3.2 抑菌效价(Antibacterial potency, AP)测定

1.3.2.1 抑菌圈试验(牛津杯法) 参照翟佳琳等^[28]的研究方法,改进如下:在Φ15 cm平皿中倒入50 mL牛肉膏蛋白胨固体培养基,凝固后均匀置于牛津杯中,将200 μL指示菌悬液与50 mL牛

肉膏蛋白胨半固体培养基混匀倒入平皿上层,冷却后拔出牛津杯,每孔加入 100 μL 抑菌液,加样后将平皿置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏扩散 4 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 8 h。按式(1)计算抑菌圈面积 $S(\text{mm}^2)$ 。

$$S = \pi \left(\frac{\bar{D}^2 - \bar{d}^2}{4} \right) \quad (1)$$

式中: \bar{D} 为抑菌圈直径的平均值,mm; \bar{d} 为牛津杯孔直径的平均值,mm。

1.3.2.2 抑菌液效价 参照 Delgado 等^[29]的方法,以不同浓度 Nisin A 标准品对应的抑菌效价(AP_0)的对数值为横坐标,抑菌面积(S)为纵坐标,绘制 Nisin A 对巨大芽胞杆菌的抑制活性标准曲线,该曲线的拟合方程为: $S = 172.52 \lg \text{AP}_0 - 333.58$ ($R^2 = 0.9950$)。以 Nisin A 为基准,按式(2)计算待测抑菌液的抑菌效价 $\text{AP}_1(\text{IU}/\text{mL})$ 。

$$\text{AP}_1 = 10^{\frac{S - 333.58}{172.52}} \quad (2)$$

式中: S 为抑菌液进行抑菌圈试验的抑菌面积, mm^2 。

1.3.3 抑菌液稳定性研究

1.3.3.1 抑菌液的酸碱稳定性 调节抑菌液的 pH 值分别为 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 保持 3 h 后调回其初始 pH 值,以未处理的抑菌液为对照,测定抑菌效价的变化情况。

1.3.3.2 抑菌液的热稳定性 分别采用 20, 40, 60, 80, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理抑菌液 20 min,以未处理的抑菌液为对照,测定抑菌效价变化情况。

1.3.3.3 抑菌液的紫外照射稳定性 使用 30 W 的紫外灯分别照射抑菌液 1, 2, 3, 4, 5 h, 距离 25 cm,以未照射的抑菌液为对照,测定抑菌效价变化情况。

1.3.4 抑菌液中的抑菌物质研究

1.3.4.1 抑菌液的排酸试验 分别调节抑菌液的 pH 值为 4.0 与 6.5, 空白 MRS 液体培养基的 pH 值为 4.0,按照图 1 进行排酸试验并测量抑菌圈直径 d_1 、 d_2 、 d_3 , 横向排布 3 孔为平行试验。 d_1 表示酸性物质及非酸物质的抑菌能力, d_1-d_2 表示酸性物质抑菌能力, d_1-d_3 表示非酸物质抑菌能力。

1.3.4.2 抑菌液中酸性抑菌物质分析 有机酸标准曲线:称取草酸 0.20 g、L-苹果酸 0.075 g、乙酸 0.20 g、柠檬酸 0.10 g、琥珀酸 0.05 g、富马酸 0.05 g、

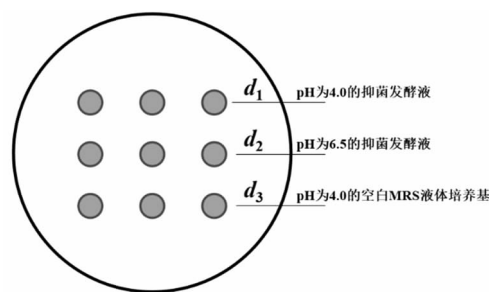


图 1 抑菌物质类型判别试验原理示意图

Fig.1 Principle diagram of antibacterial substance type discrimination test

甲酸 0.20 g、乳酸 0.20 g, 定容 100 mL, 配制混标液。将混标液稀释成浓度梯度液,以各有机酸的出峰时间为横坐标,响应值为纵坐标,绘制有机酸分离色谱图(图 2)。以各有机酸的浓度为横坐标,出峰面积为纵坐标,得到 8 种有机酸标准曲线的回归方程,见表 1。

样品准备与色谱条件:取 2 mL 抑菌液与 5 mL 硫酸锌溶液、5 mL 亚铁氰化钾溶液混合定容 100 mL, 静置 30 min 除去蛋白杂质后取上清,用 0.22 μm 滤膜过滤。以 $V(0.1\% \text{磷酸}):V(\text{甲醇})=95:5$ 为流动相,流速 0.6 mL/min 进行等度洗脱,进样量 10 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,扫描时间 15 min,紫外检测波长 210 nm。

1.3.5 抑菌液与有机酸混合液效价比较 按照 1.3.1.1 节处理,分别获得菌株 JL03 和 L04-1 的抑菌液。按菌株 JL03 抑菌液中各有机酸质量浓度(草酸 0.35 g/L, L-苹果酸 0.38 g/L, 乳酸 4.64 g/L, 乙酸 2.66 g/L, 柠檬酸 0.23 g/L, 琥珀酸 0.30 g/L, 富马酸 0.25 g/L)配制有机酸混合液 A_1 ,以巨大芽胞杆菌为指示菌对比测定 JL03 抑菌液与有机酸混合液 A_1 的抑菌效价。按菌株 L04-1 抑菌液中各有机酸质量浓度(草酸 1.10 g/L, L-苹果酸 1.17 g/L, 乳酸 4.55 g/L, 乙酸 3.44 g/L, 柠檬酸 0.61 g/L, 琥珀酸 1.51 g/L, 富马酸 0.53 g/L)配制有机酸混合液 A_2 ,以巨大芽胞杆菌为指示菌对比测定 L04-1 抑菌液与有机酸混合液 A_2 的抑菌效价。

1.3.6 数据分析 采用 Excel 2021 进行数据平均值及标准差计算,采用 Origin 2021 进行数据可视化分析,采用 SPSS 软件进行差异显著性检验和多重比较。

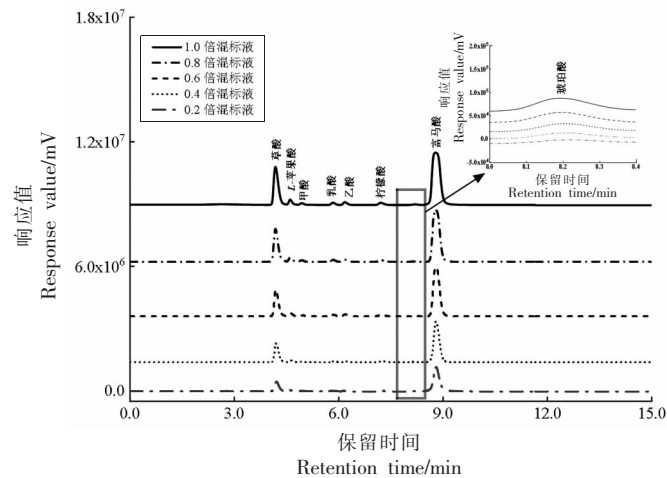


图2 标准有机酸分离液相色谱图

Fig.2 Standard organic acid separation liquid chromatogram

表1 有机酸标准曲线

Table 1 Organic acid standard curve

序号	有机酸	标准曲线	R^2
1	草酸	$y = 1.22 \times 10^7 x - 0.11$	0.9980
2	L-苹果酸	$y = 1.10 \times 10^6 x - 246.76$	0.9954
3	甲酸	$y = 1.15 \times 10^6 x - 573.46$	0.9998
4	乳酸	$y = 2.30 \times 10^6 x + 143.65$	0.9992
5	乙酸	$y = 1.81 \times 10^6 x - 3906.28$	0.9986
6	柠檬酸	$y = 9.33 \times 10^7 x + 7.88 \times 10^4$	0.9999
7	琥珀酸	$y = 1.70 \times 10^6 x - 0.0046$	0.9984
8	富马酸	$y = 1.50 \times 10^8 x - 0.12$	0.9855

2 结果与分析

2.1 抑菌功能微生物筛选结果

为了得到具有优良抑菌性能的功能菌株,以革兰氏阳性(G^+)的地衣芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、巨大芽胞杆菌以及革兰氏阴性(G^-)的大肠杆菌、变形杆菌、伤寒杆菌为指示菌,对16株试验菌株进行抑菌能力比较,结果见表2。16株菌的抑菌液对 G^+ 和 G^- 菌均具有不同的抑制效果,其中对 G^- 菌,如大肠杆菌、变形杆菌有很强的抑制活性,对3种 G^+ 菌的抑制作用不如 G^- 菌,表明试验菌株的抑菌液对 G^- 菌的抑制效果强于 G^+ 菌,推测原因是革兰氏阳性菌对抑菌物质耐受性更强,这与翟佳琳等^[28]的研究结果一致。综合比较后菌株L04-1对地衣芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌的抑制效果最好,对其它4种指示菌也有很好的抑制效果。菌株JL03对金黄色葡萄球菌的抑制效果显著优于其它

菌株($P < 0.05$),对其它5种指示菌的抑制效果也很突出,表明这两菌株具有优良的抑菌特性和广泛的抑菌谱,可作为抑菌功能菌进行后续研究。

2.2 抑菌功能微生物抑菌液抑菌性能的影响因素

研究表明微生物代谢产生的抑菌物质主要是一些有机酸、多肽或者前体肽。其中,有机酸是弱酸,通常以游离态存在,熔点、沸点较低,容易挥发或分解。多肽或前体肽在某些物理或化学因素的影响下,其特定的空间构象易被破坏,导致理化性质改变、功能活性丧失,进而影响抑菌性能。pH值、温度及活性氧等是主要因素。本研究分别考察pH值、温度以及紫外照射条件下菌株JL03和L04-1抑菌液抑菌效价的变化情况。

2.2.1 抑菌液的pH值稳定性

pH值影响抑菌液中某些抑菌成分的表面电荷性质、电离度或者溶解度等性质,从而对抑菌液的理化性质和抑菌活

表 2 抑菌活性的测定结果

Table 2 Determination results of antibacterial activity

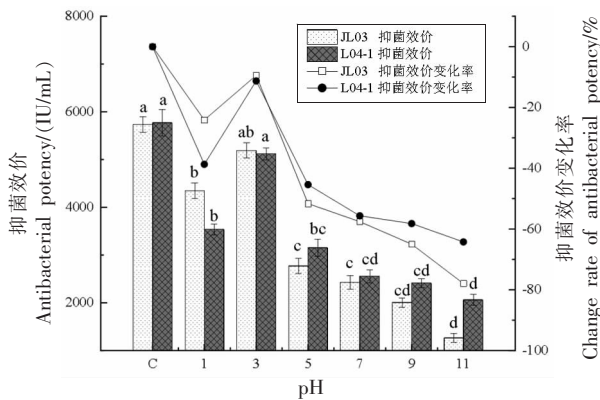
菌株编号	抑菌圈面积/mm ²					
	地衣芽胞杆菌 (G ⁺)	巨大芽胞杆菌 (G ⁺)	金黄色葡萄球菌 (G ⁺)	大肠杆菌(G ⁻)	伤寒杆菌(G ⁻)	变形杆菌(G ⁻)
JL03	++	++	+++	++++	++++	+++
JL03-1	+++	++	++	++++	++++	+++
JL04	++	++	+	++++	++	+++
JL06	++	++	++	++++	+++	++++
JL07	++	++	++	+++++	++	+++
JL10	++	++	+++	+++++	++	++
JL11	++	++	++	+++	++	+++
JL12	++	++	++	+++	+++	+++
JL13	++	++	++	++++	++	+++
JL14	++	++	++	++++	++	+++
JL15	++	+++	++	++++	++	++++
JL16	++	++	++	++++	++	+++
JL17	++	++	+	++++	++	+++
JL19	++	++	+	++++	++	++++
JL20	++	++	++	+++++	++	++++
L04-1	+++	+++	++	++++	++++	++

注:+. 抑菌面积 0~150 mm²;++. 抑菌面积 150~300 mm²;+++。 抑菌面积 300~450 mm²;++++。 抑菌面积 450~600 mm²;+++++。 抑菌面积 600~750 mm²。

性产生影响^[30]。菌株 JL03、L04-1 未经处理的抑菌液的 pH 值分别为 3.89 和 3.82, 具有较好的抑菌活性, 对它们的抑菌液进行不同 pH 处理, 抑菌效价变化见图 3。与对照组相比, 经不同 pH 处理的两株菌抑菌液的抑菌活性有变化且趋势较为一致, 均呈先升后降的趋势。两株菌的抑菌液在 pH 1.0~3.0 条件下均保持较高的抑菌活性, pH 3.0 时抑菌活性变化最小, 两株菌抑菌液效价分别由 5 730.69 IU/mL 和 5 772.35 IU/mL 下降到 5 190.12 IU/mL 和 5 122.20 IU/mL, 均保持原有活性的 85% 以上, 表明抑菌液在酸性环境中更为稳定。抑菌活性随 pH 值(5.0~11.0)的升高而显著降低($P < 0.05$), 推测原因是抑菌液中的酸性物质被逐步中和消耗所致。研究发现, 大多数蛋白质类抑菌物质(如抗菌肽)在酸性条件下能保持抑菌活性稳定, 而在中性或碱性处理后抑菌活性降低甚至丧失, 可能的原因是抑菌液中的抗菌肽分子在碱性条件下发生碱裂解^[31]。推测两株菌的抑菌液中, 除酸性物质外还存在抗菌肽类物质。此外, 由抑菌效价变化率可以看出, 在 pH 1.0~3.0 范围, 菌株 JL03 抑菌活性的变化小于菌株 L04-1, 说明菌株 JL03 的代谢产

物对低 pH 值的耐受性较好。在 pH 5.0~11.0 范围, 菌株 JL03 抑菌活性变化大于菌株 L04-1, 说明菌株 L04-1 的代谢产物在碱性条件下保持更好的抑菌活性。

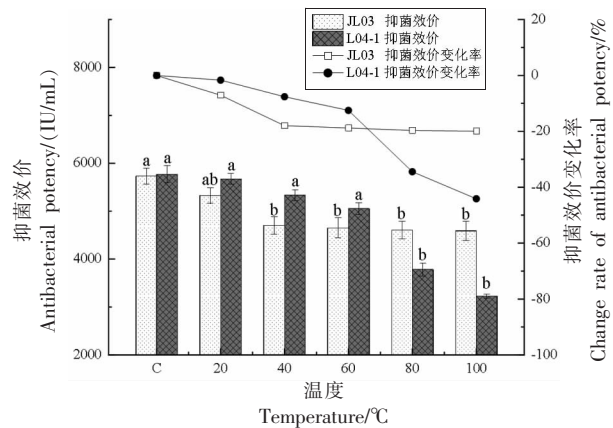
2.2.2 抑菌液的热稳定性 温度的变化影响抑菌液中多肽及蛋白质类抑菌物质的活性变化^[32], 以及有机酸的电离程度和挥发性有机酸浓度^[33], 从而影响抑菌液的效价。采用不同温度处理抑菌液, 研究其热稳定性, 结果见图 4。菌株 JL03 抑菌液的抑菌效价随温度的升高而降低, 其抑菌效价的最大变化率为 19.93%, 且在 40~100 °C 处理条件下不存在显著性差异, 说明菌株 JL03 抑菌液中抑菌物质比较稳定, 未大量失活。该菌株在 100 °C 处理条件下, 抑菌效价由 5 730.69 IU/mL 下降至 4 588.52 IU/mL, 仍保持 80% 以上的抑菌活性, 说明菌株 JL03 抑菌液中抑菌物质的热稳定性较好。菌株 L04-1 的抑菌效价在 20~60 °C 条件下没有显著性变化, 而随着温度升至 80~100 °C 时, 抑菌活性显著降低($P < 0.05$), 最大变化率达到 44.11%, 其抑菌物质热稳定性不如菌株 JL03。



注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

图3 不同pH处理的抑菌液抑菌效价的变化

Fig.3 The changes in the antibacterial potency of antibacterial fermentation broth under different pH treatments



注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

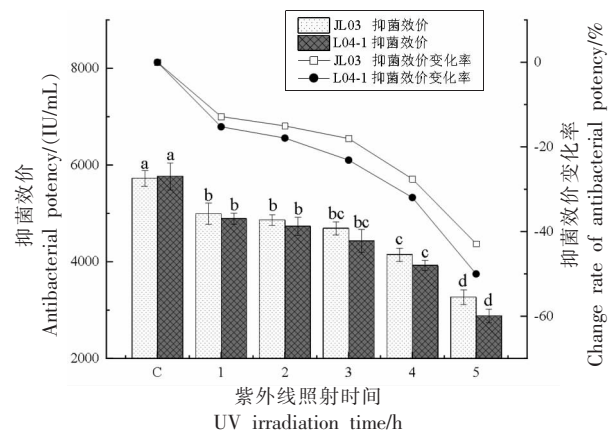
图4 不同温度处理的抑菌液抑菌效价的变化

Fig.4 The changes of antibacterial potency of antibacterial fermentation broth under different temperature treatments

2.2.3 抑菌液紫外线照射稳定性 紫外照射能激发一些化学物质进入激发态,这些化学物质能够与氧分子结合并形成活性氧。活性氧是一类高度反应性的氧化剂,可与许多分子中的双键或硫醚键等反应,造成氧化损伤,从而影响物质的结构和功能^[34],进而引起抑菌活性的改变甚至丧失。采取紫外照射对抑菌液,以照射时间控制强度,结果见图5。随着照射时间的延长,菌株 JL03、L04-1 抑菌液的抑菌效价逐渐降低。当照射 1 h 时抑菌活性均显著降低,而照射时间 3 h 时,菌株 JL03 和 L04-1 的抑菌效价分别由 5 730.69 IU/mL 和 5 772.35 IU/mL 下降到 4 697.29 IU/mL 和 4 437.52 IU/mL,抑菌活性均保持在原有活性的 70%以上,说明这两株菌的抑菌物质对短时间的紫外线照射不敏感,1~3 h 内没有显著差异,具有良好的抗氧化性。此外,在 1~5 h 照射过程中,菌株 L04-1 的抑菌活性变化均大于菌株 JL03,说明菌株 JL03 的代谢产物对紫外线的耐受性比菌株 L04-1 强,这表明不同菌株抑菌物质的稳定性和抗紫外线能力存在差异。

2.3 抑菌液中抑菌物质鉴别及影响抑菌效价的有机酸

2.3.1 排酸试验鉴别抑菌物质类型 由抑菌性能影响试验结果可知,菌株 JL03 和 L04-1 兼具酸性物质抑菌能力和抗菌肽类等非酸物质抑菌能力。为进一步验证两株菌抑菌液的抑菌作用类型,设



注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

图5 不同紫外线照射时间下抑菌液抑菌效价的变化

Fig.5 The changes of antibacterial potency of antibacterial fermentation broth under ultraviolet irradiation at different time

计图1排酸试验,测定两株菌酸性物质及非酸性物质抑菌能力的占比,初步判断其抑菌物质类型。排酸试验是将抑菌液的pH值中和至空白MRS液体培养基的初始pH值6.5(测量抑菌圈直径 d_2),以pH=4.0(菌株JL03、L04-1发酵结束时未经处理抑菌液的pH值分别为3.89和3.82,统一调整为4.0)的抑菌液为对照(测量抑菌圈直径 d_1),其中 d_1 表示总抑菌能力, d_1-d_2 表示酸性物质抑菌能力。模拟未处理抑菌液的pH值,调节空白MRS液体培养基的pH=4.0(测量抑菌圈直径 d_3),以pH4.0的抑菌液为对照, d_1-d_3 表示非酸物质抑菌能

力,结果见表 3。由表 3 可知,菌株 JL03 和 L04-1 的 d_1-d_2 分别为 10.30 mm 和 13.43 mm, d_1-d_3 分别为 4.49 mm 和 3.72 mm, 均大于 0, 表明两株菌抑菌液的抑菌作用类型均为酸性物质抑菌和非酸物质抑菌共同作用, 其酸性物质抑菌能力分别占总抑菌能力的 58.03% 和 64.32%, 非酸物质抑菌能力占比分别为 25.30% 和 17.82%, 两株菌以酸性物质抑菌为主。菌株 JL03 和 L04-1 的酸性物质抑菌能

力占比与非酸物质抑菌能力占比之和分别为 83.33% 和 82.14%, 并未达到 100%, 分析原因, 可能是为减少抑菌液样品 pH 值的差异, 将菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液由 pH 3.89 和 pH 3.82 统一调整至 4.0 时, 中和了部分酸性抑菌物质, 同时 pH 值的调整也导致了一些非酸抑菌物质抑菌能力受到影响, 因此, 进一步定量研究抑菌物质更为重要。

表 3 抑菌物质类型判别及其酸性物质和非酸物质抑菌能力占比

Table 3 Identification of antibacterial substance types and the proportion of acidic and non acidic substance antibacterial abilities

菌株	抑菌圈直径/mm			酸性物质抑 菌能力/mm	酸性物质抑 菌能力占比/ %	非酸性物质 抑菌能力/ mm	非酸性物质 抑菌能力占 比/%
	d_1	d_2	d_3	$d_1 - d_2$	$d_1 - d_2/d_1$	$d_1 - d_3$	$d_1 - d_3/d_1$
JL03	17.75 ± 0.79	7.45 ± 0.04	13.26 ± 0.68	10.30	58.03	4.49	25.30
L04-1	20.88 ± 0.91	7.45 ± 0.11	17.16 ± 0.57	13.43	64.32	3.72	17.82

2.3.2 抑菌液中有有机酸组成及含量变化 排酸试验表明: 菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液的抑菌作用类型均为酸性物质抑菌和非酸物质抑菌两种类型共同作用, 并以酸性物质抑菌为主。利用 HPLC 测定菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液中的有机酸种类及含量, 结果见图 6。在菌株 JL03 和 L04-1 发酵 72 h 的抑菌液中均可检测到草酸、L-苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸 7 种有机酸, 总含量分别为 9.64 g/L 和 13.46 g/L。由图 6a 可知, 菌株 JL03 发酵 72 h 代谢生成的有机酸以乳酸为主, 其含量达到最大, 为 6.76 g/L, 占 7 种有机酸总含量的 70.12%, 说明菌株 JL03 具有较好的产乳酸性能, 并随发酵时间的延长, 乳酸含量呈不断增长的趋势。相比之下, 草酸、乙酸、柠檬酸、富马酸以及琥珀酸的占比较少, 随发酵时间呈先升后降的趋势, 且总含量变化不大, 表明这些有机酸无法像乳酸一样大量积累。

由图 6b 可知, 菌株 L04-1 发酵 72 h 代谢生成的主要有机酸为乳酸、乙酸和琥珀酸, 其含量分别为 5.75, 3.01, 1.32 g/L, 占 7 种有机酸总含量的 74.89% 以上。其变化动态情况与总有机酸相似, 说明乳酸、乙酸和琥珀酸是菌株 L04-1 发酵过程中有机酸的重要组成部分。其中, 主要有机酸为乳

酸, 其含量随发酵时间的延长呈增长的趋势, 在 36 h 增速开始放缓, 在 60 h 达到最大值 5.75 g/L, 随后保持该含量至 72 h, 这可能是由于菌株 L04-1 在发酵过程中同型或异型乳酸发酵占比较大, 大部分葡萄糖转化为乳酸的结果。草酸、L-苹果酸、乙酸、柠檬酸的含量呈先升后降的趋势, 说明它们在发酵初期积累, 而随发酵时间的延长含量下降。分析原因可能是发酵后期一些有机酸成分转化为其它成分或者被菌株代谢消耗。

2.3.3 影响抑菌效价的关键有机酸 为深入研究影响菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液抑菌效价的关键有机酸, 将发酵 0~72 h 过程中各有机酸含量的变化与其对巨大芽胞杆菌的抑菌效价变化进行相关性分析, 结果见图 7。相关性结果显示, 菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液的抑菌效价与 7 种有机酸总含量之间呈显著正相关关系(菌株 JL03 的相关系数为 0.81, 菌株 L04-1 的相关系数为 0.88), 说明有机酸含量对这两株菌抑菌液的抑菌效价有较大的影响, 该结论与排酸试验抑菌物质主要为酸性抑菌物质的结果一致。由图 7a 可知, 乳酸与菌株 JL03 抑菌液的抑菌效价存在显著正相关关系($P \leq 0.01$), L-苹果酸与菌株 JL03 抑菌液的抑菌效价存在显著正相关关系($P \leq 0.05$), 说明乳酸和 L-苹果酸

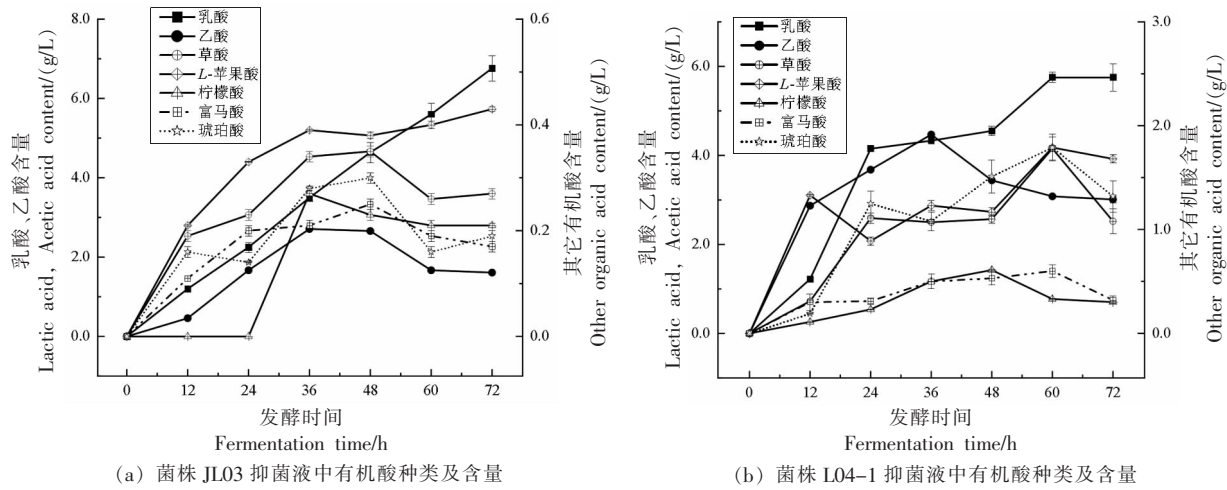
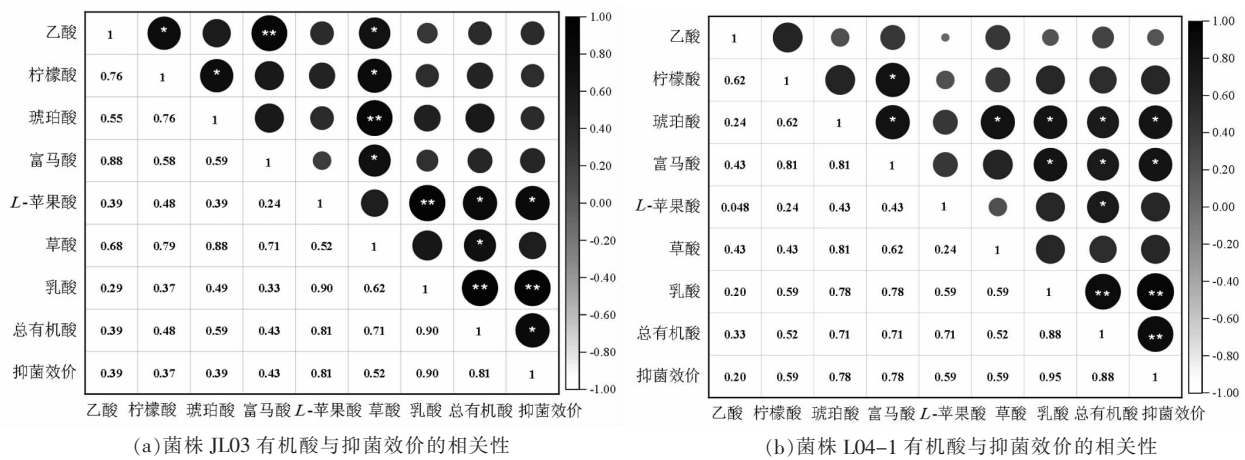


图 6 抑菌液中有有机酸种类及含量的变化

Fig.6 The changes of types and contents of organic acids in antibacterial fermentation broth

(发酵 72 h 含量为 0.43 g/L)是菌株 JL03 抑菌液中关键有机酸,其浓度及占比增大时,抑菌液的抑菌效果会相应增强。由图 7b 相关性结果显示,乳酸与菌株 L04-1 抑菌液的抑菌效价呈显著正相关关系($P \leq 0.01$),琥珀酸和富马酸与 L04-1 菌株的抑菌效价呈显著正相关($P \leq 0.05$),说明这 3 种有机酸是影响菌株 L04-1 抑菌效价的关键有机酸,乳酸、琥珀酸和富马酸(发酵 72 h 含量为 0.32

g/L)的积累对菌株 L04-1 抑菌液的抑菌效价有增进作用。此外,图 7a 结果显示:JL03 抑菌液的关键有机酸——乳酸和 L-苹果酸之间存在显著的正相关关系。图 7b 结果显示:L04-1 抑菌液的关键有机酸——乳酸、琥珀酸和富马酸之间也存在显著的正相关关系,表明抑菌功能菌抑菌液组分中的关键有机酸之间存在增效作用。



注:**表示在 0.01 水平上显著相关;*表示在 0.05 水平上显著相关。

图 7 有机酸与抑菌效价的相关性分析

Fig.7 Correlation analysis of organic acids and antibacterial potency

2.4 抑菌液与有机酸混合液抑菌效果的比较

为比较菌株 JL03 和 L04-1 抑菌液与其对应有机酸混合液的抑菌效果,参照两株菌发酵 48 h

时各自产生的有机酸种类及含量,配制有机酸混合液。以巨大芽胞杆菌为指示菌,比较抑菌液与有机酸混合液之间的抑菌效价差异,结果见图 8。菌

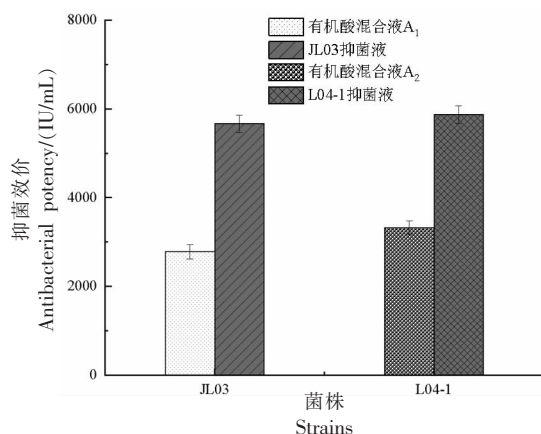


图8 抑菌液与有机酸混合液抑菌效果比较

Fig.8 The comparison of the antibacterial effect of antibacterial fermentation broth and organic acid mixtures

株 JL03 抑菌液的抑菌效价是有机酸混合液 A₁ 的 2.04 倍, 菌株 L04-1 抑菌液的抑菌效价是有机酸混合液 A₂ 的 1.77 倍, 抑菌液效价明显高于配制的有机酸混合液。分离自发酵食品中的抑菌功能微生物具有良好的安全性, 其抑菌液获取成本低于用纯化有机酸试剂配制的有机酸混合液, 因此, 在食品防腐的应用方面更具优势。

3 结论

采用牛津杯法, 以地衣芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、巨大芽胞杆菌、变形杆菌、伤寒杆菌以及大肠杆菌为指示菌, 对分离自高盐稀态酱醪和泡菜的 16 株产酸细菌进行抑菌能力比较, 筛选并获得了 6 种指示菌均有良好抑制效果的抑菌功能菌——植物乳杆菌 L04-1 和腐生葡萄球菌 JL03。研究抑菌液抑菌效价的影响因素, 发现两株菌的抑菌液在 pH 3.0 处理下, 抑菌效果保持原有活性的 85% 以上, 紫外照射 3 h 后保持原有活性的 70% 以上, 100 °C 处理 JL03 抑菌液 20 min, 60 °C 处理 L04-1 抑菌液 20 min, 抑菌效果仍保持原有活性的 80% 以上, 具有良好的耐酸、耐热以及耐紫外照射特性。排酸试验发现菌株 JL03 和 L04-1 的抑菌物质以酸性物质为主, 其抑菌能力分别占总抑菌能力的 58.03% 和 64.32%。HPLC 分析, 两株菌抑菌液中的酸性抑菌物质主要为草酸、L-苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸。相关性分析

发现 L-苹果酸、乳酸是菌株 JL03 抑菌液中的关键有机酸, 乳酸、琥珀酸和富马酸是菌株 L04-1 抑菌液中的关键有机酸, 且关键有机酸组分间存在增效作用。比较抑菌效价发现, 两株菌抑菌液的效价明显高于配制的有机酸混合液。抑菌功能微生物的筛选及其抑菌物质研究, 为开发及工业化应用低成本、高效的天然生物防腐剂奠定了基础, 同时为食品的防腐保鲜提供了一个新思路。

参 考 文 献

- [1] SONG P, WU L, GUAN W X. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: A meta-analysis[J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 9872-9895.
- [2] 马瑜璐, 朱斌, 张雷, 等. 顶空固相微萃取-气质联用检测猪肉新鲜度[J]. *食品科学*, 2011, 32(14): 253-256.
MA Y L, ZHU B, ZHANG L, et al. Evaluation of pork freshness by HS-SPME-GC-MS[J]. *Food Science*, 2011, 32(14): 253-256.
- [3] 谭悦, 阚建全, 陈光静, 等. 发酵豆制品潜在风险因子分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 233-243.
TAN Y, KAN J Q, CHEN G, et al. Analysis of potential risk factors of fermented soybean products [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(3): 233-243.
- [4] ANANTHARAM P, WHITLEY E M, MAHAMA B, et al. Characterizing a mouse model for evaluation of countermeasures against hydrogen sulfide-induced neurotoxicity and neurological sequelae[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1400(1): 46-64.
- [5] DE LA POMÉLIE D, SANTÉ-LHOUELLIER V, SAYD T, et al. Oxidation and nitrosation of meat proteins under gastro-intestinal conditions: Consequences in terms of nutritional and health values of meat[J]. *Food Chem*, 2018, 243: 295-304.
- [6] GANKHUYAG N, LEE K H, CHO J Y. The role of nitrosamine (NNK) in breast cancer carcinogenesis[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2017, 22(3): 159-170.
- [7] MATTOCK E, BLOCKER A J. How do the virulence factors of shigella work together to cause

- disease? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 64.
- [8] RAWSON T. A hierarchical Bayesian quantitative microbiological risk assessment model for *Salmonella* in the sheep meat food chain [J]. *Food Microbiol*, 2022, 104: 103975.
- [9] GUT A M, VASILJEVIC T, YEAGER T, et al. *Salmonella* infection—prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review [J]. *Microbiology (Reading)*, 2018, 164(11): 1327–1344.
- [10] FIGUEIREDO R, HENRIQUES A, SERENO R, et al. Antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: An update [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2015, 12(2): 110–117.
- [11] TORGERSON P R, DE SILVA N R, FÈVRE E M, et al. The global burden of foodborne parasitic diseases: An update [J]. *Trends Parasitol*, 2014, 30(1): 20–26.
- [12] 王振杰, 孙晔, 顾欣哲, 等. 计算机视觉技术对食品腐败检测的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(8): 2969–2975.
- WANG Z J, SUN Y, GU X Z, et al. Research progress on computer vision for detection of food putrefaction [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2015, 6(8): 2969–2975.
- [13] LEE N K, PAIK H D. Status, antimicrobial mechanism, and regulation of natural preservatives in livestock food systems [J]. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 2016, 36(4): 547–557.
- [14] VAN MOLL L, DE SMET J, COS P, et al. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: A review [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2021, 47(5): 562–579.
- [15] 刘洋, 黄晨, 王万骞, 等. 浅析食品防腐剂的安全应用 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(18): 127–130.
- LIU Y, HUANG C, WANG W Q, et al. Food preservatives for security applications [J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(18): 127–130.
- [16] 蔡静静, 张亚川, 李谔, 等. 新疆伊犁地区乳制品中乳酸菌发酵和益生特性及其复合发酵方案优化 [J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 172–179.
- CAI J J, ZHANG Y C, LI X, et al. Fermentation and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Yili, Xinjiang and optimization of their mixtures for mixed-culture fermentation [J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 172–179.
- [17] PRADHAN P, TAMANG J P. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally prepared dry starters of the Eastern Himalayas [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(1): 7.
- [18] SONGRÉ-OUATTARA L T, MOUQUET-RIVIER C, ICARD-VERNIÈRE C, et al. Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 130(3): 258–264.
- [19] DE SIMONE N, CAPOZZI V, DE CHIARA M, et al. Screening of lactic acid bacteria for the bio-control of *Botrytis cinerea* and the potential of *Lactiplantibacillus plantarum* for eco-friendly preservation of fresh-cut kiwifruit [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 773.
- [20] GONG Y H, LI T Y, LI S Y, et al. Achieving high yield of lactic acid for antimicrobial characterization in cephalosporin-resistant *Lactobacillus* by the co-expression of the phosphofructokinase and glucokinase [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(6): 1148–1161.
- [21] 袁先铃, 周莺茹, 郑连强, 等. 酸菜中乳酸菌生长曲线、产酸性能及抑菌性能探究 [J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(14): 199–203.
- YUAN X L, ZHOU Y R, ZHENG L Q, et al. Investigation into the growth curve, acid-production ability, and bacterial inhibition of lactic acid bacteria in sauerkraut [J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(14): 199–203.
- [22] 刘晨, 张丽萍. 亚硝基肌-紫外复合诱变筛选高产苯乳酸菌株 [J]. *中国食品学报*, 2015, 15(9): 41–46.
- LIU C, ZHANG L P. Breeding of a high phenyllactic acid strain by composite mutation with UV and NTG [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(9): 41–46.
- [23] ZANGENEH M, KHORRAMI S, KHALEGI M. Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(11): 6023–6030.
- [24] DIVYASHREE S, ANJALI P, SOMASHEKARAIHA R, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD

- 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi* [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2021, 32: e00672.
- [25] 张欢, 李沛军, 田兴垒, 等. 乳酸菌和木糖葡萄糖球菌对产气荚膜梭菌抑制能力分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 86–92.
- ZHANG H, LI P J, TIAN X L, et al. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosus* against *Clostridium perfringens* [J]. *Food Science*, 2020, 41(6): 86–92.
- [26] 姚佳明. 解淀粉芽孢杆菌抑菌活性成分鉴定及机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- YAO J M. Studies on identification and mechanism of bacteriostatic substances in *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [27] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241.
- SHEN P, CHEN X D. *Microbiology experiments*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241.
- [28] 翟佳琳, 赵景娜, 王丹丹, 等. 具有抑菌活性植物乳杆菌的筛选及抑菌物质特性的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 84–90.
- ZHAI J L, ZHAO J N, WANG D D, et al. Screening of *Lactiplantibacillus plantarum* with bacteriostatic activity and study on properties of bacteriostatic substances[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(13): 84–90.
- [29] DELGADO A, BRITO D, FEVEREIRO P, et al. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 62(1): 121–124.
- [30] ZHU X Y, JAŃCZEWSKI D, GUO S F, et al. Polyion multilayers with precise surface charge control for antifouling[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(1): 852–861.
- [31] DEY B C, RAI N, DAS S, et al. Partial purification, characterization and mode of action of bacteriocins produced by three strains of *Pediococcus* sp[J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 56(5): 2594–2604.
- [32] 路妍, 杨鑫, 吴文庆, 等. 枯草芽孢杆菌 S-16 产抗菌蛋白发酵条件优化及蛋白分离纯化[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(2): 63–70.
- LU Y, YANG X, WU W Q, et al. Optimization of fermentation conditions and purification of antagonistic proteins produced by *Bacillus subtilis* strain S-16 [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(2): 63–70.
- [33] 黄静, 吴晓玉, 翟志军, 等. 离子排斥色谱法快速测定益生菌发酵液中 7 种有机酸含量[J]. *江西农业大学学报*, 2016, 38(3): 533–541.
- HUANG J, WU X Y, ZHAI Z J, et al. Rapid determination of seven organic acids in fermentation broth of probiotics by Ion-exclusion chromatography [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2016, 38(3): 533–541.
- [34] BULTEAU A L, MOREAU M, SAUNOIS A, et al. Algae extract-mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(1/2): 136–143.

Screening of Antibacterial Functional Microorganisms and Their Antibacterial Substances

Li Lingling¹, Yu Bingyan¹, Zhou Lei¹, Lan Jingsong¹, Chen Zijing¹, Tang Jianli^{1,2}, Liu Jun^{1,2}, Jiang Xuewei^{1,2*}
(¹School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114
²Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Condiment Fermentation, Changsha 410600)

Abstract In order to obtain biological preservatives for application in food preservation, antibacterial functional microorganisms were screened and their antibacterial substances were studied. The Oxford cup method was used to screen the antibacterial functional microorganisms, and to study their inhibitory spectrum using the area of the inhibition circle as an indicator. The pH, temperature and UV irradiation stability of the antibacterial fermentation broth was investigated using the change in antibacterial potency as an indicator. The acid exclusion test and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to study and analyse the antibacterial substances. It was found that among the 16 strains of acid-producing bacteria with antibacterial ability screened from sauce mash and kimchi, *Staphylococcus saprophyticus* JL03 and *Lactobacterium plantarum* L04-1 showed excellent antibacterial effect and broad-spectrum antibacterial proper-

ties. The antibacterial fermentation broth of the two strains decreased from 5 730.69 IU/mL and 5 772.35 IU/mL to 5 190.12 IU/mL and 5 122.20 IU/mL at pH 3.0, respectively. All retained more than 85% of their initial antibacterial activity, indicating good pH stability. When the two bacterial antibacterial fermentation broths were treated at 100 °C for 20 min, the antibacterial potency of JL03 decreased from 5 730.69 IU/mL to 4 588.52 IU/mL, retaining more than 80% of the initial antibacterial activity. In contrast, the antibacterial activity of L04-1 decreased by 44.11%, indicating that the thermal stability of JL03 antibacterial fermentation broth was better than that of L04-1. After 3 h of UV irradiation, the antibacterial potency of the two bacteria decreased from 5 730.69 IU/mL and 5 772.35 IU/mL to 4 697.29 IU/mL and 4 437.52 IU/mL, respectively. All of them retained more than 70% of their initial antibacterial activity, indicating that they have good antioxidant properties. The acid exclusion test revealed that the antibacterial substances of the two strains were mainly acids, and the inhibitory capacity of acidic substances accounted for 58.03% and 64.32% of the total inhibitory capacity, respectively. HPLC analysis of the antibacterial fermentation broth of the two bacterial strains fermented for 72 h showed that the main acids were oxalic acid, *L*-malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid and fumaric acid, with a total content of 9.64 g/L and 13.46 g/L, respectively. Correlation analysis showed that *L*-malic acid (0.43 g/L) and lactic acid (6.76 g/L) were significantly and positively correlated with the antibacterial potency of JL03 antibacterial fermentation broth ($P < 0.05$). Lactic acid (5.75 g/L), succinic acid (1.32 g/L) and fumaric acid (0.32 g/L) were significantly and positively correlated ($P < 0.05$) with the antibacterial potency of L04-1 antibacterial fermentation broth. Screening of antibacterial microorganisms and the analysis of key antibacterial substances have laid the foundation for improving the antibacterial performance of antibacterial microorganisms and their application in the field of food preservation.

Keywords antibacterial functional microorganisms; antibacterial potency; *Lactobacterium plantarum*; *Staphylococcus saprophyticus*; organic acid