

蒙氏肠球菌 A9-1A 的安全性评价及其产细菌素发酵条件的优化

闻丞渤^{1,2}, 蒙晓莹^{1,2}, 程健恒², 黄兰艳², 张颖², 张德显¹, 陈谋通^{2*}

(1. 佛山大学动物科技学院, 广东佛山 528225) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 国家市场监管重点实验室(食品微生物安全大数据技术), 广东省微生物分析检测中心, 食品药品实验室, 广东广州 510070)

摘要: 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是重要食源性致病菌, 开发安全高效的天然抑菌剂具有重要意义。为了评价产细菌素蒙氏肠球菌 (*Enterococcus mundtii*) A9-1A 的安全性并优化其发酵条件提高细菌素产量, 本研究采用体外试验与动物试验进行安全性评估, 结果表明该菌株不具有溶血性和耐药性, 在体重、脏器指数、血清肝功能指标及细胞因子和器官组织等方面对正常小鼠健康无明显负面影响, 且无细菌易位情况。通过单因素试验、均匀设计试验及正交试验优化, 确定培养基成分为: 酵母提取粉 20.00 g L⁻¹、葡萄糖 20.00 g L⁻¹、吐温 80 2.74 mL L⁻¹、K₂HPO₄ 3H₂O 4.41 g L⁻¹、CH₃COONa 3H₂O 3.24 g L⁻¹、柠檬酸铵 9.91 g L⁻¹、MgSO₄ 7H₂O 0.60 g L⁻¹ 和 MnSO₄ 4H₂O 1.00 g L⁻¹。优化后抑菌圈直径达 42.82 mm, 同初始培养基 (38.67 mm) 相比提升 10.73%。确定发酵条件为: 培养时间 24 h, 培养温度 30 ℃, 初始 pH 值 7.0, 接种比例 3.0% (φ)。经成分和条件优化后, 抑菌圈直径达 45.09 mm, 比初始培养基提高了 16.60%, 同时细菌素产量由 6 826.67 AU mL⁻¹ 提升至 10 240.00 AU mL⁻¹, 增幅达 50.00%。本研究结果为 *E.mundtii* 细菌素产量提高及其作为生物菌剂应用奠定了良好的理论基础。

关键词: 蒙氏肠球菌; 细菌素; 单核细胞增生李斯特菌; 安全性评价; 发酵工艺优化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0602

Safety Evaluation of *Enterococcus mundtii* A9-1A and Optimization of Fermentation Conditions for Its Bacteriocin Production

WEN Chengbo^{1,2}, MENG Xiaoying^{1,2}, CHENG Jianheng², HUANG Lanyan², ZHANG Ying², ZHANG Dexian¹, CHEN Moutong^{2*}

(1.School of Animal Science and Technology, Foshan University, Foshan 528225, China)

(2.Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences; State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health; National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food; State Administration for Market Regulation (Key Laboratory of Big Data Technologies for Food Microbiological Safety); Guangdong Detection Center of Microbiology, Food and Drug Laboratory, Guangzhou 510070, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* is an important foodborne pathogen, and the development of safe and efficient natural antibacterial agents is of great significance. The objective of this study was to evaluate the safety of the bacteriocin-producing *Enterococcus mundtii* A9-1A strain targeting *L.monocytogenes* and to optimize its fermentation conditions for enhanced bacteriocin yield. The *in vitro* and *in vivo* animal experiments were conducted in this study. The results showed that no hemolytic activity or antibiotics resistance was observed. It had no significant adverse effects on the health of normal mice in terms of body weight, organ indices, serum liver function indicators, cytokines, and organ tissues, with no bacterial translocation observed. Through single-factor tests and uniform design, the optimal medium composition was determined as follows: yeast extract 20.00 g L⁻¹, glucose 20.00 g L⁻¹, Tween 80 2.74 mL L⁻¹, K₂HPO₄ 3H₂O 4.41 g L⁻¹, CH₃COONa 3H₂O 3.24 g L⁻¹, ammonium citrate 9.91 g L⁻¹, MgSO₄ 7H₂O 0.60 g L⁻¹, and MnSO₄ 4H₂O 1.00 g L⁻¹. After medium optimization, the diameter of the

收稿日期: 2026-04-17; 修回日期: 2026-05-30; 接受日期: 2026-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32222068); 广东省重点领域研发计划项目 (2025B0202130001); 广州市科技计划项目 (2024A04J6592)

作者简介: 闻丞渤 (2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌高效控制, E-mail: bwcheng0023@163.com

通讯作者: 陈谋通 (1984-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: cmtoon@163.com

inhibition zone reached 42.82 mm, representing an increase of 10.73% compared with the initial medium (38.67 mm). The optimal fermentation conditions were determined by using orthogonal experiments, which were listed as follows: culture time 24 h, temperature 30 °C, initial pH 7.0, and inoculation ratio 3.0% (φ). Following the combined optimized medium composition and culture conditions, the inhibition zone diameter increased to 45.09 mm, which was 16.60% higher than that of the initial medium. Meanwhile, the bacteriocin titer increased from 6 826.67 AU mL⁻¹ to 10 240.00 AU mL⁻¹, with an increase rate of 50.00%. These results provide a solid rationale for improving the bacteriocin production of *E.mundtii* and its application as a biological agent.

Key words: *Enterococcus mundtii*; bacteriocin; *Listeria monocytogenes*; safe assessment; fermentation process optimization

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种重要的食源性致病菌, 具有耐低温、生物膜形成能力强、环境适应性广等特点, 严重威胁食品安全^[1]。该菌可引起李斯特菌病, 临床表现包括败血症、脑膜炎、流产等, 感染孕妇、新生儿、老年人及免疫力低下者等易感人群死亡率为 20%~30%^[2]。美国疾病控制与预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 报告了 1998~2023 年间共有 129 例李斯特菌暴发事件, 造成 217 例死亡^[3]。因此, 如何有效控制食品中 *L.monocytogenes* 的污染与生长, 一直是食品微生物安全领域的研究热点。随着消费者对食品安全需求的不断提高, 以及部分化学防腐剂潜在安全风险和耐受性问题的出现, 天然抑菌剂的开发与应用受到广泛关注^[4]。来源于乳酸菌的细菌素因其安全性高、抑菌谱明确、热稳定性好以及易被蛋白酶降解等优点, 被认为是极具应用前景的天然生物抗菌剂^[5]。

肠球菌属是乳酸菌的重要成员之一, 广泛存在于发酵食品和动物肠道中, 其中部分菌株可产生具有显著抑菌活性的细菌素, 尤其对革兰氏阳性致病菌表现出较强抑制作用, 如 Enterocin DD14 对李斯特菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌等具有抑制作用^[6]。已有研究表明, 肠球菌产生的细菌素在抑制 *L.monocytogenes* 方面具有突出优势, 在肉制品、乳制品、即食食品、食用菌等食品中具有潜在应用价值^[7]。然而, 细菌素的产量和抑菌活性受菌株遗传特性及培养条件的双重影响, 不同培养基成分和发酵条件往往会显著改变其合成水平和生物活性^[8,9]。同时, 肠球菌因其抗生素耐药性、携带毒力因子等问题, 其安全性评价亦备受重视。

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培养基作为乳酸菌常用培养基, 富含多种氮源、碳源、缓冲盐及生长因子, 能够满足乳酸菌生长和代谢的基本需求, 但标准 MRS 培养基并非针对特定细菌素高效合成而设计, 其成分比例往往偏向菌体生长而非次级代谢产物的最大化合成^[10]。因此, 在细菌素研究中, 通过优化 MRS 培养基中碳源、氮源及无机盐等关键组分的种类和含量来提高细菌素产量和抑菌活性, 已成为提升其应用潜力的重要研究方向。除培养基组成外, 发酵条件同样是影响细菌素合成的重要因素。培养温度、培养时间、初始 pH 值、接种比例等均可能通过影响菌体生理状态和代谢通路, 进而调控细菌素的合成与分泌^[11]。例如, 某些乳酸菌的最佳生长温度为 37 °C, 但细菌素合成的最适温度为 30 °C^[12], 所以合理的发酵条件则有助于诱导细菌素合成相关基因的表达, 提高其抑菌活性, 因此系统优化发酵条件对于提升细菌素应用价值具有重要意义。

本研究以一株具有拈抗 *L.monocytogenes* 活性的产细菌素蒙氏肠球菌 (*Enterococcus mundtii*, *E.mundtii*) A9-1A 为研究对象, 通过体外与动物试验评价其安全性, 并利用单因素试验、均匀设计试验、正交试验等对 MRS 培养基配方及发酵条件进行系统优化, 旨在评价 A9-1A 菌株安全性, 提高发酵上清液的抑菌活性, 可为开发高效、天然的食品生物防腐剂提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

E.mundtii A9-1A, *L.monocytogenes* ATCC 19115, 均保藏于广东省科学院微生物研究所微生物安全与健康研究发展中心。

1.1.2 试剂与培养基

半乳糖、乳糖、木糖, 中科腾宇科技技术有限公司; 阿拉伯糖, 北京伊喀森生物科技有限公司; 麦芽糖、果糖、甘露糖、山梨醇, 上海麦克林生化科技有限公司; 葡萄糖、吐温 80、K₂HPO₄ 3H₂O、CH₃COONa 3H₂O、柠檬酸铵、MgSO₄ 7H₂O, 广东环凯实验室科技有限公司; MnSO₄ 4H₂O, 广州市文翰科学仪器有限公司; 4%多聚

甲醛, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 无水乙醇、二甲苯, 广东广试试剂科技有限公司; 苏木素染液、返蓝液、分色液、伊红染液、中性树胶, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 肠球菌鉴定药敏板, 珠海迪尔生物工程股份有限公司; 小鼠 AST、ALT、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒, 江苏酶免实业有限公司; 酵母提取粉、蛋白胨、牛肉浸粉、BHI 培养基、TSA 培养基、TSB 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.3 仪器与设备

BSA224S-CW 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; BSC-1360 II A2 生物安全柜, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; SHP-250 生化培养箱, 广东环凯生物科技有限公司; 3K15 台式高速冷冻离心机, 曦玛离心机(扬州)有限公司; HM-340E 切片机、CTM-6 包埋机、Gemini-AS 染色机、Excelsior-AS 脱水机, 赛默飞世尔科技公司。

1.1.4 试验动物

试验选用 SPF 级 C57BL/6 健康小鼠雌雄各 12 只, 6~8 周龄, 体重范围在 16~24 g。小鼠及饲料购自广东省医学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(粤)2022-0002。饲养于广东省科学院微生物研究所实验动物中心 SPF 级动物房负压环境, 无病原体, 自由饮水和进食, 1 周更换 2 次垫料。实验伦理批准单位: 广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心), 伦理批件号: GT-IACUC202509221。

1.2 试验方法

1.2.1 安全性评价

1.2.1.1 体外安全性评价

抗生素敏感性试验: 参考 Genis 等^[13]的方法, 按照药敏试剂说明书对 *E.mundtii* A9-1A 进行最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)分析, 评估标准参照 EUCAST 2026 年版临床折点表(见表 1), 将测试结果分类为敏感(Susceptible, S)和耐药(Resistant, R)。

表 1 肠球菌属抗生素敏感性判断标准

Table 1 Criteria for antimicrobial susceptibility test of <i>Enterococcus</i> spp			
药物名称	试验质量浓度/($\mu\text{g mL}^{-1}$)	最小抑制质量浓度/($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		敏感 (S)	耐药 (R)
氨苄西林	0.25、0.50、2.00、4.00、8.00	≤ 4	> 4
阿莫西林	0.12、1.00、2.00、4.00	≤ 4	> 4
万古霉素	0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00	≤ 4	> 4
左氧氟沙星	2.00、4.00	≤ 4	> 4
替考拉宁	1.00、8.00、16.00	≤ 2	> 2
替加环素	0.12、0.25、0.50、1.00	≤ 0.5	> 0.5
利奈唑胺	2.00、4.00、8.00、16.00	≤ 4	> 4

溶血性试验: 参考 Hsu 等^[14]的方法, 吸取 10 μL A9-1A 菌株活化菌液点接于含 5.0% (ϕ) 羊血的 BHI 平板表面, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱观察是否溶血现象, 设置具有 β 溶血活性的金黄色葡萄球菌作为对照。若菌落周围出现明显透明溶血环, 判定为 β 溶血; 若菌落周围出现绿色区域, 判定为 α 溶血; 若未观察到上述两种现象, 则判定为 γ 溶血。

1.2.1.2 体内安全性评价

参考 Nataraj 等^[15]的方法, 24 只小鼠随机分为对照组和实验组, 每组 12 只。小鼠经适应性饲养 1 周后, 对照组灌胃 PBS 溶液, 实验组灌胃 PBS 重悬的 A9-1A 菌液, 菌液浓度为 1×10^{10} CFU/mL。两组均按 20 mL kg^{-1} 体重的剂量进行灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 7 d, 整个实验周期为 28 d。实验期间每 6 d 记录一次小鼠体重。实验周期结束后处死全部小鼠, 收集血清利用 ELISA 试剂盒测定 AST、ALT、IL-6、IL-10, 分离心、肝、脾、肾器官组织进行称重, 评估脏器指数, 并分别剪取 0.05~0.1 g 器官组织经低温研磨后进行菌落计数, 最后将肝脏和脾脏组织放入 4% 甲醛溶液固定 24 h, 经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色等步骤制作病理切片观察病变情况。

1.2.2 培养基优化

1.2.2.1 A9-1A 菌株发酵上清获取及活性检测

按照蛋白胨 10.00 g L⁻¹, 牛肉浸粉 10.00 g L⁻¹, 酵母提取粉 5.00 g L⁻¹, 葡萄糖 20.00 g L⁻¹, 吐温 80 1.00 mL L⁻¹, K₂HPO₄ 3H₂O 1.52 g L⁻¹, CH₃COONa 3H₂O 5.00 g L⁻¹, 柠檬酸铵 2.00 g L⁻¹, MgSO₄ 7H₂O 0.10 g L⁻¹, MnSO₄ 4H₂O 0.05 g L⁻¹ 配制初始 MRS 培养基。

接种 A9-1A 菌株甘油冻存菌液于 MRS 肉汤培养基中, 37 °C 静置培养 12 h, 连续培养 2 次获得种子液, 将种子液按 1.0% (φ) 接种至 MRS 培养基, 37 °C 培养 24 h。菌液在 4 °C, 10 000×g 条件下离心 5 min 后收集上清, 调节 pH 值为 6.0 并经 0.22 μm 针头式过滤器过滤后备用。培养 *L.monocytogenes* ATCC 19115 作为指示菌液, 均匀涂布于 TSA 平板, 放置牛津杯加入 200 μL 上清转移至 4 °C 冰箱进行扩散, 最后转移至 37 °C 培养箱培养 24 h, 观察结果并用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.2.2 碳源优化

参考 Oliveira 等^[16]的方法, 分别配制含等比例 2.0 wt.% 的蔗糖、葡萄糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖、山梨醇、甘露糖、阿拉伯糖、木糖的 MRS 培养基, A9-1A 菌株种子液接种后置于 37 °C 培养箱培养 24 h, 离心获取无细胞发酵上清利用牛津杯法评估抑菌活性, 测量抑菌圈直径确定最佳碳源。确定最佳碳源后, 配制含 0.5 wt.%、1.0 wt.%、1.5 wt.%、2.0 wt.%、2.5 wt.%、3.0 wt.% 不同比例碳源的 MRS 培养基, 根据结果确定碳源适宜比例。

1.2.2.3 氮源优化

参考 Zheng 等^[17]的方法, 配制含等比例 2.5 wt.% 不同氮源组成 (蛋白胨 100%、牛肉浸粉 100%、酵母提取粉 100%、蛋白胨 50%+牛肉浸粉 50%、蛋白胨 50%+酵母提取粉 50%、牛肉浸粉 50%+酵母提取粉 50%、蛋白胨 33.33%+牛肉浸粉 33.33%+酵母提取粉 33.33%, wt.%) 的 MRS 培养基, 利用牛津杯法测定活性后确定最佳氮源。确定最佳氮源后, 配制含 1.0 wt.%、1.5 wt.%、2.0 wt.%、2.5 wt.%、3.0 wt.%、3.5 wt.%、4.0 wt.% 不同比例氮源的 MRS 培养基, 根据抑菌活性确定氮源适宜比例。

1.2.2.4 均匀设计试验及结果验证

参考苏楚亮等^[18]的方法, 单因素优化试验确定碳源及氮源后, 利用均匀设计试验优化 MRS 其余成分比例。吐温 80、K₂HPO₄ 3H₂O、CH₃COONa 3H₂O、柠檬酸铵、MgSO₄ 7H₂O、MnSO₄ 4H₂O 共 6 个成分作为均匀设计的参试因素, 以初始 MRS 培养基配方含量为基准, 在各组分含量上下浮动一定范围的基础上确定均匀设计试验的因素水平, 每个因素设置 7 个水平, 利用 DPS v9.01 做均匀设计, 参试因素水平见表 2, 均匀设计表见表 3, 具体优化试验方案见表 4。根据单因素试验结果及表 4 中培养基其余各成分含量进行培养基配制, 利用牛津杯法测定抑菌活性。A9-1A 菌株活化种子液分别接种于初始 MRS 培养基和优化后的 MRS 培养基, 37 °C 培养 24 h 后收集上清测定抑菌圈直径, 评估优化效果。

表 2 参试因素水平表

Table 2 Levels table of test factors

水平 编号	因素					
	吐温 80 /(mL L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	CH ₃ COONa 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	柠檬酸铵 /(g L ⁻¹)	MgSO ₄ 7H ₂ O /(g L ⁻¹)	MnSO ₄ 4H ₂ O /(g L ⁻¹)
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.50	0.38	2.50	1.00	0.10	0.05
3	1.00	0.76	5.00	2.00	0.20	0.10
4	1.50	1.52	7.50	3.00	0.30	0.25
5	2.00	2.28	10.00	5.00	0.40	0.30
6	2.50	3.04	12.50	7.50	0.50	0.50
7	3.00	4.56	15.00	10.00	0.60	1.00

表 3 U₇(7⁶) 均匀设计表

Table 3 Uniform design table of U₇(7⁶)

试验 编号	因素					
	吐温 80 /(mL L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	CH ₃ COONa 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	柠檬酸铵 /(g L ⁻¹)	MgSO ₄ 7H ₂ O /(g L ⁻¹)	MnSO ₄ 4H ₂ O /(g L ⁻¹)
1	6 (2.50)	2 (0.38)	2 (2.50)	2 (1.00)	2 (0.10)	2 (0.05)

2	1 (0.00)	6 (3.04)	3 (5.00)	5 (5.00)	1 (0.00)	4 (0.25)
3	5 (2.00)	7 (4.56)	6 (12.50)	4 (3.00)	5 (0.40)	1 (0.00)
4	4 (1.50)	5 (2.28)	1 (0.00)	3 (2.00)	7 (0.60)	6 (0.50)
5	3 (1.00)	1 (0.00)	4 (7.50)	7 (10.00)	6 (0.50)	3 (0.10)
6	7 (3.00)	4 (1.52)	5 (10.00)	6 (7.50)	3 (0.20)	7 (1.00)
7	2 (0.50)	3 (0.76)	7 (15.00)	1 (0.00)	4 (0.30)	5 (0.30)

表 4 MRS 培养基优化试验方案

Table 4 Optimization scheme of MRS medium

试验 编号	因素					
	吐温 80 /(mL L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	CH ₃ COONa 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	柠檬酸铵 /(g L ⁻¹)	MgSO ₄ 7H ₂ O /(g L ⁻¹)	MnSO ₄ 4H ₂ O /(g L ⁻¹)
1	2.50	0.38	2.50	1.00	0.10	0.05
2	0.00	3.04	5.00	5.00	0.00	0.25
3	2.00	4.56	12.50	3.00	0.40	0.00
4	1.50	2.28	0.00	2.00	0.60	0.50
5	1.00	0.00	7.50	10.00	0.50	0.10
6	3.00	1.52	10.00	7.50	0.20	1.00
7	0.50	0.76	15.00	0.00	0.30	0.30

1.2.2.5 发酵条件优化与结果验证

参考张炎等^[19]的方法, 培养时间对抑菌活性的影响: A9-1A 菌株种子液接种于 MRS 培养基 37 ℃培养 36 h, 每隔 2 h 测定一次抑菌圈直径; 初始 pH 值对抑菌活性的影响: 配制不同初始 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的 MRS 培养基, A9-1A 菌株接种 MRS 培养基后置于 37 ℃培养箱培养 24 h, 测定抑菌圈直径; 培养温度对抑菌活性的影响: A9-1A 菌株种子液接种于 MRS 培养基后, 置于不同温度 (20、28、30、33、37、40、43 ℃) 的培养箱内培养 24 h, 收集上清液测定抑菌圈直径; 接种比例对抑菌活性的影响: A9-1A 菌株活化种子液按照 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% (φ) 不同比例接种于 MRS 肉汤培养基后培养 24 h, 收集上清液测定抑菌圈直径; 发酵条件正交试验优化: 根据单因素试验结果, 对培养时间、初始 pH 值、培养温度、接种比例共 4 个因素设定 3 个水平进行正交试验优化, 具体试验方案如表 5 所示, 以抑菌圈直径作为评估指标。

参考 Madi-Moussa 等^[20]的方法, 对发酵条件优化结果进行验证: 将 A9-1A 菌株活化种子液分别接种于初始 MRS 培养基、成分和发酵条件均优化后的 MRS 培养基, 培养结束后收集上清液测定抑菌圈直径, 并将发酵上清做二倍梯度稀释至无抑菌表现, 将 1 AU 定义为仍能在指示菌上形成清晰抑菌圈的最高稀释度倒数, 作为优化前后细菌素产量的评估标注, 计算方法见公式:

$$T = \frac{2^n}{v} \quad (1)$$

式中:

T ——为细菌素效价, AU mL⁻¹;

n ——为临界稀释级数;

v ——为加样体积 mL。

表 5 正交实验表

Table 5 Table of orthogonal experiments

试验编号	培养时间/h	培养温度/℃	初始 pH 值	接种比例/%
1	12	20	5.0	2.0
2	12	30	6.0	3.0
3	12	40	7.0	4.0
4	18	20	6.0	4.0

5	18	30	7.0	2.0
6	18	40	5.0	3.0
7	24	20	7.0	3.0
8	24	30	5.0	4.0
9	24	40	6.0	2.0

1.2.3 统计分析

所有实验均进行三次重复，每次重复测定三个平行值，使用 Microsoft Excel 2021、IBM SPSS Statistics 26 和 GraphPad Prism 9 进行统计分析，结果以平均值±标准差表示，多组间比较用单因素方差分析， $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义，采用 GraphPad Prism 9 进行作图。

2 结果与讨论

2.1 安全性评价

2.1.1 体外安全性评价



图 1 A9-1A 菌株的溶血性

Fig.1 Hemolysis of A9-1A strain

由图 1 可知，对照组金黄色葡萄球菌周围形成明显溶血圈，呈现典型的 β 溶血，而 A9-1A 菌株未见溶血现象，表现为 γ 溶血。已有研究表明，部分肠球菌可表现出溶血性，如 Genis 等^[21]报道产细菌素 *E.mundtii* HC166.3 具有溶血活性。Yang 等^[22]在对亚洲象来源 62 株肠球菌的研究也发现，14.5%的菌株具有 α 溶血性。上述结果表明，肠球菌虽广泛分布于人体及自然环境中，但并不意味着所有菌株均具有良好的安全性，因此溶血性应作为其安全性评估的重要指标之一。此外，A9-1A 菌株对所检测抗菌药物均表现为敏感，各药物的 MIC 均处于较低水平。结合课题组前期基因组分析结果，A9-1A 菌株中未检出毒力因子和耐药相关基因，说明 A9-1A 菌株在溶血性和耐药性方面具有较好的安全特征^[23]。

2.1.2 体内安全性评价

2.1.2.1 体重变化

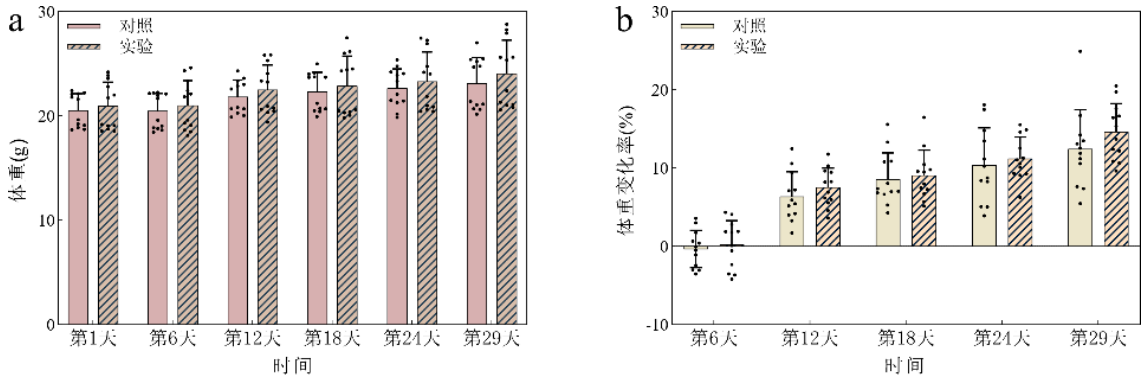


图 2 C57BL/6 小鼠体重变化及体重变化率

Fig.2 Weight change and weight change rate of C57BL/6 mice

注: a 为小鼠体重变化; b 为小鼠体重变化率, 均同第 1 天体重相比较。

如图 2a、b 所示, 在整个试验周期内, 对照组与实验组小鼠体重整体呈逐渐增长趋势且差异不显著, 未观察到明显异常波动或干预后早期体重下降, 提示各组小鼠总体生长状态良好。值得注意的是, 第 1 天至第 6 天两组小鼠体重差异较小, 体重变化率接近 0, 增长幅度不明显, 这可能与灌胃操作所致的短期应激有关, Kärberg 等^[24]的研究亦表明, 灌胃应激可在一定时期内影响小鼠体重变化; 自第 6 天后, 两组体重均持续增加, 且实验组在多数时间点的均值均略高于对照组 ($P>0.05$), 至第 29 天两组均达到观察期内最高水平。表明小鼠经 A9-1A 菌株灌胃后对其正常生长并未产生负面影响。

2.1.2.2 脏器指数及细菌易位情况

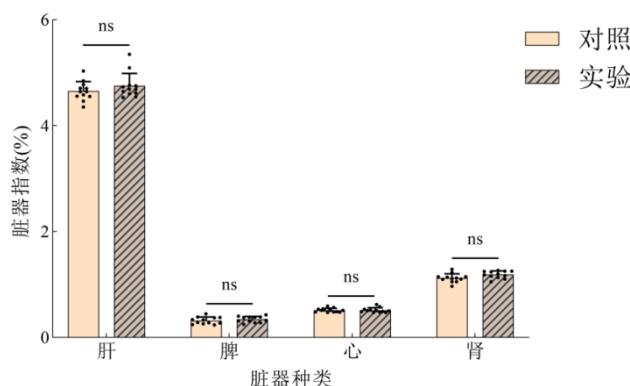


图 3 C57BL/6 小鼠脏器指数

Fig.3 Organ index of C57BL/6 mice

注: ns 表示组间无显著性差异 ($P>0.05$)。下同。

如图 3 所示, 本试验中实验组与对照组小鼠肝脏、脾脏、心脏及肾脏脏器指数均无显著差异 ($P>0.05$), 说明连续灌胃 A9-1A 菌株对小鼠主要脏器的相对重量未产生明显影响。类似地, Lin 等^[25]对嗜乳酸杆菌 L177 的小鼠灌胃试验, 以及 Che 等^[26]对鼠李糖乳杆菌 B16 的小鼠灌胃试验中, 脏器指数同样未见显著变化。此外, 在小鼠的肝脏、脾脏、心脏和肾脏组织中均未检测到 A9-1A 菌株生长, 说明该菌未发生向主要脏器的易位。Piewngam 等^[27]基于小鼠模型的研究指出, 肠球菌跨越肠屏障并进入血流往往依赖宿主免疫抑制与菌体特定毒力调控, 结合试验中未观察到脏器易位的结果, 进一步说明 A9-1A 菌株在体内表现出较低的潜在致病风险, 具有较好的安全性。

2.1.2.3 肝功能指标及细胞因子测定

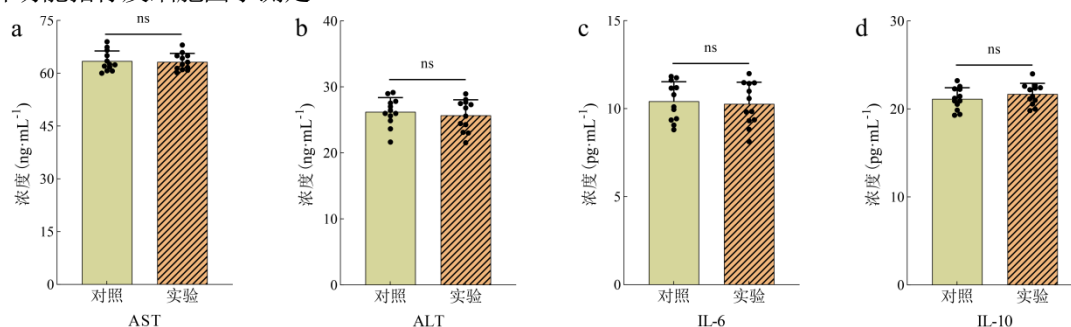


图 4 C57BL/6 小鼠肝功能指标及细胞因子变化

Fig.4 Changes of liver function indexes and cytokines in C57BL/6 mice

注: a 为天门冬氨酸氨基转移酶; b 为丙氨酸氨基转移酶; c 为白细胞介素 6; d 为白细胞介素 10。

AST 和 ALT 是反映肝细胞损伤的经典血清生化指标, 当肝细胞膜完整性受损或肝细胞发生损伤时, 可释放入血并导致其血清水平升高^[28]。如图 4a、b 所示, 与对照组相比, 实验组小鼠血清 AST 和 ALT 水平均无显著变化, 组间差异均无统计学意义, 表明连续灌胃 A9-1A 菌株未引起小鼠肝细胞损伤或肝功能异常。IL-6 和 IL-10 是反映机体炎症与免疫状态变化的重要细胞因子, 其中 IL-6 主要参与促炎反应, 而 IL-10 则具有抗炎和免疫调节作用^[29]。如图 4c、d 所示, 实验组小鼠血清 IL-6 和 IL-10 水平与对照组相比亦无显著差异, 提示 A9-1A 菌株灌胃后未诱导明显的全身炎症反应, 也未造成机体免疫稳态失衡。结果表明, A9-1A 菌株在健康小鼠体内具有较好的生

物安全性。

2.1.2.4 组织病理切片观察

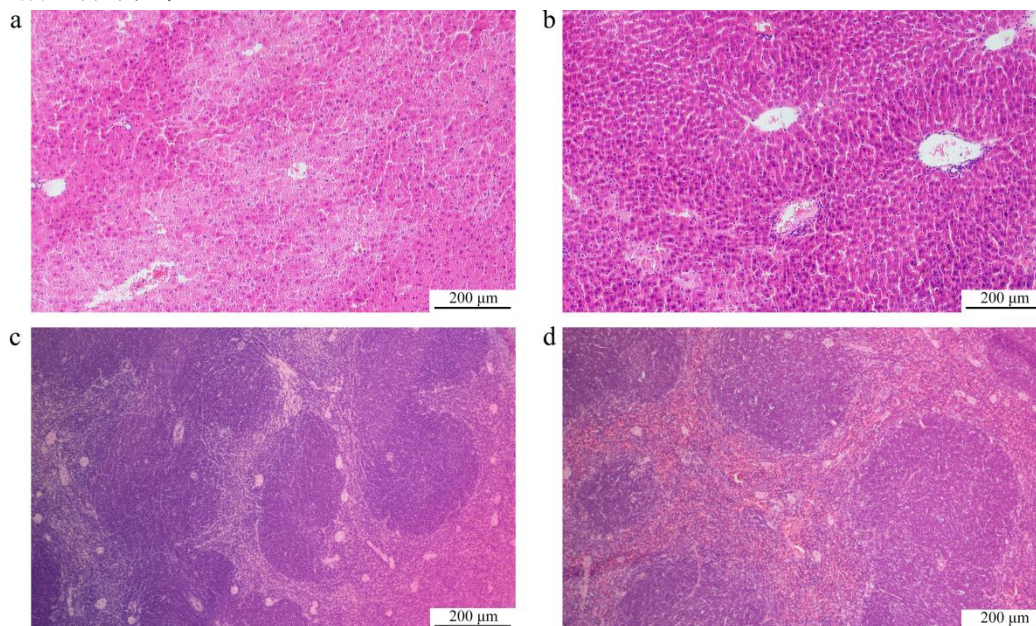


图5 C57BL/6小鼠肝脏和脾脏组织病理变化

Fig.5 Pathological changes of liver and spleen in C57BL/6 mice

注: a 为对照组小鼠肝脏病理切片; b 为实验组小鼠肝脏病理切片; c 为对照组小鼠脾脏病理切片; d 为实验组小鼠脾脏病理切片; 切片均为 HE 染色, 放大倍数均为 200 倍。

如图 5a、b 所示, 对照组与实验组小鼠肝组织均可见完整清晰的肝小叶结构, 中心静脉及门管区分布正常。两组肝细胞形态规则, 胞质均匀嗜酸, 未见明显空泡样变、脂滴沉积、坏死及纤维化等异常改变; 肝窦排列正常, 亦未观察到明显充血、出血及炎性细胞浸润。由图 5c、d 可见, 对照组与实验组小鼠脾组织红髓和白髓分界清晰, 淋巴滤泡及脾小动脉周围淋巴鞘结构完整, 部分滤泡中央可见浅染生发中心, 脾髓区血池形态正常, 未见明显淤血、出血、坏死及异常增生。总体来看, 实验组肝脏和脾脏组织形态均与对照组基本一致, 提示连续灌胃 A9-1A 菌株未引起肝脏和脾脏的明显病理性损伤。

2.2 培养基优化

2.2.1 碳源优化

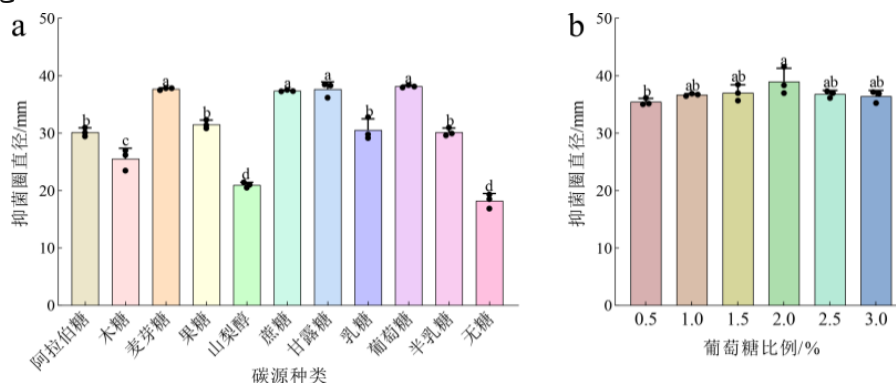


图6 碳源对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of carbon source on the antibacterial activity of A9-1A strain

注: a 为碳源种类对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响; b 为葡萄糖比例对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响。不同小写字母代表组间具有显著性差异 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示无明显差异 ($P > 0.05$)。下同。

碳源为乳酸菌生长提供能量和碳骨架, 其种类及添加水平可显著影响菌体生长和细菌素产量。不同碳源配制的 MRS 培养基对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响如图 6a 所示。与无糖培养基相比, 多数碳源均可不同程度提高 A9-1A

菌株的抑菌活性,而以山梨醇为碳源时,其抑菌活性与无糖组接近,差异不显著 ($P>0.05$),说明山梨醇对细菌素产生无明显促进作用。相比之下,麦芽糖、蔗糖、甘露糖和葡萄糖的促进作用较为明显,其抑菌圈直径分别为 37.72、37.38、37.65 和 38.16 mm,其中以葡萄糖组效果最佳。进一步优化葡萄糖添加量的结果如图 6b 所示,当葡萄糖浓度为 2.0 wt.% 时,抑菌圈直径达到最大值 38.95 mm,表明该浓度最有利于 A9-1A 菌株细菌素的产生。类似地,Maany 等^[30]在粪肠球菌细菌素产量优化研究中也发现,2%碳源水平有利于细菌素获得最佳产量。综合上述结果,最终确定葡萄糖为最优碳源,其最佳添加量 2.0 wt.%。

2.2.2 氮源优化

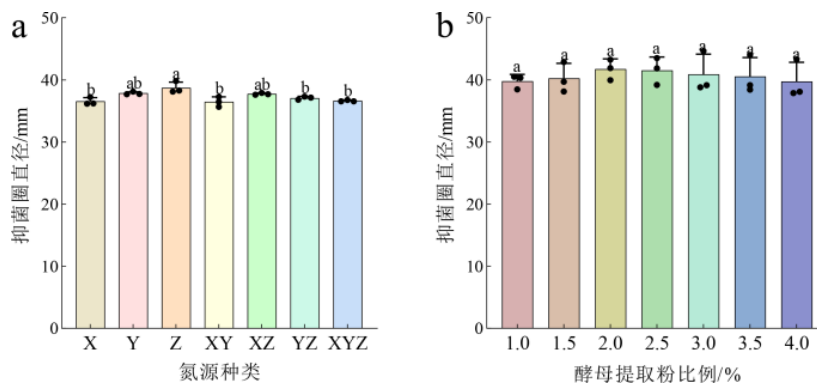


图7 氮源对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.7 Effect of nitrogen source on the antibacterial activity of A9-1A strain

注: a 为氮源种类对 A9-1A 菌株活性的影响,其中 X 表示氮源为 100%蛋白胨、Y 为 100%牛肉浸粉、Z 为 100%酵母提取粉、XY 为 50%蛋白胨+50%牛肉浸粉、XZ 为 50%蛋白胨+50%酵母提取粉、YZ 为 50%牛肉浸粉+50%酵母提取粉、XYZ 为 33.33%蛋白胨+33.33%牛肉浸粉+33.33%酵母提取粉; b 为酵母提取粉比例对 A9-1A 菌株活性的影响。

由图 7a 可见,与复合氮源及其他单一氮源相比,以酵母提取粉为氮源时 A9-1A 菌株抑菌活性最高,抑菌圈直径为 38.73 mm。考虑到单一氮源培养基配方更为简化,有利于后续活性物质的分离纯化,同时在成本控制方面亦具有一定优势,因此确定酵母提取粉为最佳氮源。进一步优化酵母提取粉添加量的结果如图 7b 所示,当其比例为 2.0 wt.% 时,抑菌圈直径达到最大值,为 41.70 mm。尽管其余添加水平下的抑菌圈直径略低,但各比例组间差异均无统计学意义,表明在本试验范围内,酵母提取粉含量对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响相对有限,最终确定酵母提取粉的最适添加量为 2.0 wt.%。

2.2.3 均匀设计试验与验证

各试验组的均匀设计试验结果见表 6。试验编号为 4 的抑菌圈直径最大,说明培养基成分组合对 A9-1A 菌株的产细菌素促进作用最明显。以表 7 中抑菌圈直径为目标函数 (Y),用 DPS v9.01 对数据进行二次多项式逐步回归分析,所得回归方程为:

$$Y=40.224\ 380\ 9+0.001\ 479\ 532\ 164\ 2X_2^2-0.010\ 745\ 308\ 195\ X_3^2+0.003\ 137\ 533\ 461X_2X_4+0.133\ 260\ 105\ 94X_4X_5+3.885\ 620\ 59X_5X_6$$

对回归方程进行检验,得到复相关系数 $R=0.999\ 999$,由此可见,抑菌圈直径与回归方程中试验因素的含量有紧密的相关性,其显著性检验值 F 值=99 999.850 001 594 5,显著水平 P 值=0.002 4<0.01,剩余标准差 $SSE=0.000\ 101\ 7$,调整相关系数 $Ra=0.999\ 994$,回归方程极显著,说明方程的可信度较高。由表 7 可知,方程中由 X_2 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)、 X_3 ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) 2 因素的平方项及 X_2 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 与 X_4 (柠檬酸铵)、 X_4 (柠檬酸铵) 与 X_5 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、 X_5 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 与 X_6 ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 共 3 组的交互作用 P 值均小于 0.01,说明这些因素对发酵上清的抑菌活性影响很大,达到极显著水平。由表 8 可知,经配方试验得到的观测值与拟合值接近,最大拟合误差绝对值为 0.000 1,进一步说明了回归方程的准确性。得出的理论最佳成分组合及该组合下的理论抑菌圈直径如表 9 所示,除葡萄糖不变外,优化后的 MRS 培养基其余成分含量同初始 MRS 培养基相比,具有明显的差异,且得到该最佳成分组合下的理论抑菌圈直径,为 43.40 mm。经验证,初始 MRS 培养基条件下抑菌圈直径为 38.67 mm,优化后增至 42.82 mm,提升幅度为 10.73%,表明培养基成分优化对 A9-1A 菌株细菌素产生具有明显促进作用。此外,优化后实测抑菌圈直径与理论预测值 43.40 mm 较为接近,二者仅相差 1.35%,说明所建立的优化模型具有较好的拟合效果和预测准确性。

表 6 MRS 培养基优化均匀设计试验结果

Table 6 Uniform design test results of MRS medium optimization							
试验编号	1	2	3	4	5	6	7
抑菌圈直径/mm	40.19±0.41	40.02±0.43	38.78±1.60	41.57±0.61	40.48±0.95	40.17±0.81	38.16±0.46

表 7 各回归项的回归系数检验

Table 7 Regression coefficient test of each regression item			
回归项	偏相关	t 值	P 值
$r(y, X_2 \times X_2) =$	1.000 0	166.296 7	0.000 1
$r(y, X_3 \times X_3) =$	-1.000 0	20 599.522 9	0.000 1
$r(y, X_2 \times X_4) =$	1.000 0	324.530 7	0.000 1
$r(y, X_4 \times X_5) =$	1.000 0	5 379.491 4	0.000 1
$r(y, X_5 \times X_6) =$	1.000 0	10 307.618 4	0.000 1

注：P 值代表试验结果显著性，P<0.05 表示结果显著，P<0.01 表示结果极显著。

表 8 配方的观察值、拟合值和拟合误差

Table 8 Observed value, fitted value and fitted error of the samples			
配方编号	观测值	拟合值	拟合误差
1	40.191 3	40.191 4	0.000 0
2	40.017 2	40.017 1	0.000 1
3	38.779 0	38.779 0	0.000 0
4	41.572 0	41.572 0	0.000 0
5	40.480 6	40.480 5	0.000 0
6	40.166 0	40.166 1	-0.000 1
7	38.157 3	38.157 2	0.000 0

表 9 均匀设计试验理论最佳成分组合

Table 9 Optimum composition combination of uniform design test theory								理论抑菌 圈直径 /mm
成分								
葡萄糖 /(g L ⁻¹)	酵母提取 粉/(g L ⁻¹)	吐温 80 /(mL L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	CH ₃ COONa 3H ₂ O /(g L ⁻¹)	柠檬酸铵 /(g L ⁻¹)	MgSO ₄ 7H ₂ O /(g L ⁻¹)	MnSO ₄ 4H ₂ O /(g L ⁻¹)	
20.00	20.00	2.74	4.41	3.24	9.91	0.60	1.00	

2.3 发酵条件优化

2.3.1 培养时间

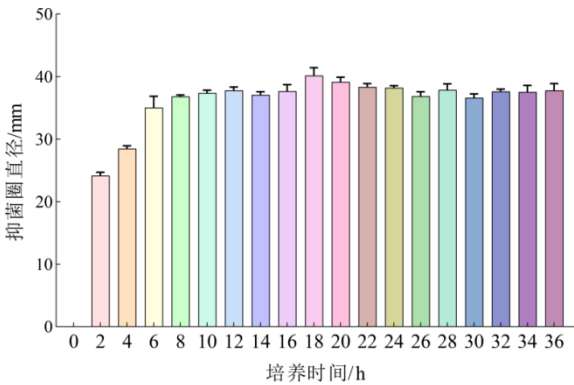


图 8 培养时间对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.8 Effect of culture time on the antibacterial activity of A9-1A strain

细菌素产量与菌体生长通常具有一定的时序关系,其合成多发生于指数生长阶段,并常在指数生长后期至稳定期达到较高水平,而并非在接种初期即大量分泌^[31]。由图 8 可知,随着培养时间的延长,A9-1A 菌株细菌素产量总体呈上升趋势,并在培养 2 h 时即可检测到抑菌活性,说明该菌株细菌素产生时间相对较早。在本试验条件下,细菌素产量于 4~6 h 进入快速增长阶段,并在 18 h 时达到最高,抑菌圈直径为 40.14 mm;此后抑菌活性虽略有下降,但差异不显著 ($P>0.05$)。因此,确定 18 h 为 A9-1A 菌株产细菌素的最适培养时间。

2.3.2 初始 pH 值

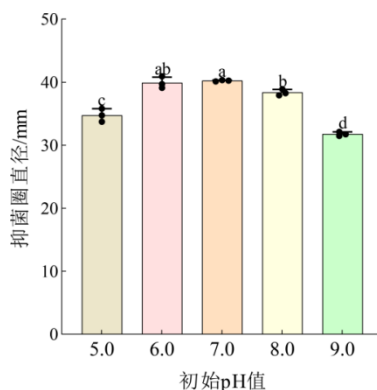


图 9 初始 pH 值对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.9 Effect of initial pH on the antibacterial activity of A9-1A strain

不同菌株对初始 pH 值的适应范围存在较大差异,但总体上,中性或弱酸性环境通常更有利于细菌素产生^[11]。如图 9 所示,A9-1A 菌株在初始 pH 值为 6.0~8.0 范围内均表现出较高的抑菌活性,其中以初始 pH 值为 7.0 时,抑菌活性最佳,抑菌圈直径达 40.23 mm。类似地,Guo 等^[32]在乳酸片球菌 CCFM18 的研究中也发现,初始 pH 值为 7.0 最有利于细菌素的产生。因此最终确定最佳初始 pH 值为 7.0。

2.3.3 培养温度

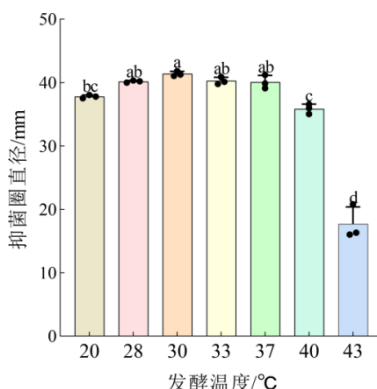


图 10 培养温度对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.10 Effect of culture temperature on the antibacterial activity of A9-1A strain

多数乳酸菌产细菌素的最适温度通常集中在 30~37 °C,与其生长适温相近^[33]。如图 10 所示,随着培养温度升高,A9-1A 菌株发酵上清的抑菌活性呈先升高后降低的变化趋势,并在 30 °C 时达到最大,抑菌圈直径为 41.37 mm。类似地,Todorov 等^[34]在胚芽乳杆菌 ST13BR 的培养条件进行优化时也发现,30 °C 同样为其细菌素产生的最适温度。说明 30 °C 有利于 A9-1A 菌株细菌素的合成与积累,因此最终确定 30 °C 为 A9-1A 菌株产细菌素的最适培养温度。

2.3.4 接种比例

接种比例可通过改变初始细胞密度和群体感应信号的积累速度,进一步影响细菌素产生的启动时机及抑菌活性的维持^[35]。如图 11 所示,随着接种比例的增加,A9-1A 菌株发酵上清的抑菌活性总体呈先升高后降低的趋势,但各处理组间差异不显著 ($P>0.05$)。当接种比例为 0.5% (φ) 时,抑菌圈直径为 39.37 mm;当接种比例增加至 3.0% (φ) 时,抑菌圈直径达到最大值 40.45 mm。接种比例对细菌素产量的影响通常与菌株特性及培养条件密切

相关，结合本试验结果，最终确定 3.0% (φ) 为 A9-1A 菌株产细菌素的最适接种比例。

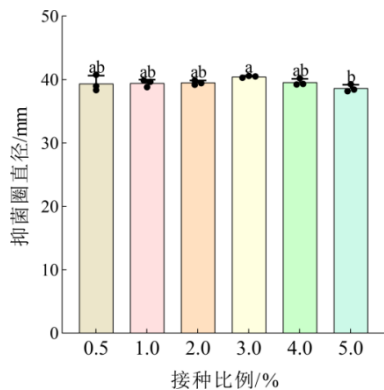


图 11 接种比例对 A9-1A 菌株抑菌活性的影响

Fig.11 Effect of inoculation ratio on the antibacterial activity of A9-1A strain

2.3.5 发酵条件正交试验优化与验证

由表 10 可知，极差分析结果表明，各发酵条件对 A9-1A 菌株产细菌素的影响程度由大到小依次为 C（初始 pH 值）、B（培养温度）、D（接种比例）、A（培养时间），结合各因素水平的极值分析，确定最佳发酵条件组合为 A₃B₂C₃D₂，即培养时间为 24 h，培养温度为 30 ℃，初始 pH 值为 7.0，接种比例为 3.0% (φ)。在此基础上，采用优化后的培养基成分和发酵条件对 A9-1A 菌株进行验证培养，并以抑菌圈直径评价其抑菌活性。结果显示，最终优化后抑菌圈直径达到 45.09 mm，较初始 MRS 培养基提高 16.60%。同时，细菌素产量由初始 MRS 培养基条件下的 6 826.67 AU mL⁻¹ 提高至 10 240.00 AU mL⁻¹，增幅为 50.00%，表明培养基成分与发酵条件的协同优化可显著促进 A9-1A 菌株细菌素的合成。

表 10 发酵条件正交试验结果

Table 10 Orthogonal test results of fermentation conditions					
试验编号	A（培养时间）	B（培养温度）	C（初始 pH 值）	D（接种比例）	抑菌圈直径/mm
1	1	1	1	1	21.76±3.26
2	1	2	2	2	43.90±0.40
3	1	3	3	3	38.77±0.78
4	2	1	2	3	38.27±0.32
5	2	2	3	1	43.33±0.14
6	2	3	1	2	33.24±1.30
7	3	1	3	2	41.13±0.27
8	3	2	1	3	39.65±1.57
9	3	3	2	1	38.24±0.33
K ₁	34.81	33.72	31.55	34.44	
K ₂	38.28	42.29	40.14	39.42	
K ₃	39.67	36.75	41.08	38.90	
R	4.86	8.57	9.53	4.98	
主次顺序	C>B>D>A				
最优组合	A ₃ B ₂ C ₃ D ₂				

3 结论

本研究以一株产细菌素的 *E.mundtii* A9-1A 为研究对象，围绕其安全性评价及培养条件优化开展系统研究。体外试验与动物试验结果表明，A9-1A 菌株未表现出溶血性和耐药性，在体重、脏器指数、肝功能指标 AST、ALT 和细胞因子 IL-6、IL-10 水平及肝脾器官组织结构等方面对正常小鼠健康无明显负面影响，且无细菌易位情况。通过单因素试验、均匀设计试验及正交试验优化，确定优化后 MRS 培养基组成为：酵母提取粉 20.00 g L⁻¹、葡萄

糖 20.00 g L⁻¹、吐温 80 2.74 mL L⁻¹、K₂HPO₄ 3H₂O 4.41 g L⁻¹、CH₃COONa 3H₂O 3.24 g L⁻¹、柠檬酸铵 9.91 g L⁻¹、MgSO₄ 7H₂O 0.60 g L⁻¹、MnSO₄ 4H₂O 1.00 g L⁻¹，经优化后 A9-1A 菌株发酵上清对 *L.monocytogenes* ATCC 19115 的抑菌圈直径达 42.82 mm，较初始 MRS 培养基（38.67 mm）提升了 10.73%；确定优化后发酵条件为：培养时间 24 h、培养温度 30 ℃、初始 pH 值 7.0，接种比例 3.0%（ φ ）。经培养基成分及发酵条件进一步优化后，抑菌圈直径达 45.09 mm，较初始 MRS 培养基提高 16.60%，同时细菌素产量由初始 MRS 培养基条件下的 6 826.67 AU mL⁻¹ 提高至 10 240.00 AU mL⁻¹，增幅为 50.00%。本研究结果为 A9-1A 菌株安全性及乳酸菌细菌素产量提升提供理论支撑。

参考文献

- [1] PANG X, WANG Y, FENG Z, et al. Quorum sensing in *Listeria monocytogenes* and control strategies for its inhibition in the food industry [J]. International Journal of Food Microbiology, 2026, 447: 111518.
- [2] OSEK J, LACHTARA B, WIECZOREK K. *Listeria monocytogenes* in foods—from culture identification to whole-genome characteristics [J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(9): 2825-2854.
- [3] SU Y, LIU A, ZHU M J. Mapping the landscape of listeriosis outbreaks (1998-2023): trends, challenges, and regulatory responses in the United States [J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 154: 104750.
- [4] QUINTERO-YANES A, PETIT K, RODRIGUEZ-VILLALOBOS H, et al. Multiplexed bacteriocin synthesis to combat and prevent antimicrobial resistance [J]. Communications Biology, 2025, 8(1): 1246.
- [5] SUGRUE I, ROSS R P, HILL C. Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials [J]. Nature reviews. Microbiology, 2024, 22(9): 556-571.
- [6] LADJOUI Z, DUSSERT E, TEIAR R, et al. A review on enterocin DD14, the leaderless two-peptide bacteriocin with multiple biological functions and unusual transport pathway [J]. Antibiotics, 2023, 12(7): 1188.
- [7] KASIMIN M E, SHAMSUDDIN S, MOLUJIN A M, et al. Enterocin: promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp. [J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 684.
- [8] SØRENSEN H M, ROCHFORD K D, MAYE S, et al. Bioactive ingredients from dairy-based lactic acid bacterial fermentations for functional food production and their health effects [J]. Nutrients, 2023, 15(22): 4754.
- [9] LI Y, MA H, PAN R, et al. Optimisation of cultivation conditions for *Bacillus velezensis* G7 from mangrove plants and exploration of potential bacteriocins [J]. Frontiers in Pharmacology, 2025, 16: 1530043.
- [10] OOI M F, FOO H L, LOH T C, et al. A refined medium to enhance the antimicrobial activity of postbiotic produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RS5 [J]. Scientific Reports, 2021, 11: 7617.
- [11] PUJATO S A, MERCANTI D J, BRIGGILER MARCÓ M, et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: strategies for the bioprotection of dairy foods [J]. Frontiers in Food Science and Technology, 2024, 4: 1439891.
- [12] 尚楠,王洋,任发政,等.产细菌素双歧杆菌的筛选及其分泌条件研究[J].食品科学,2013,34(23):170-175.
- [13] GENİŞ B, TUNCER Y. Technological properties and safety evaluation of bacteriocinogenic *Enterococcus* strains isolated from raw meat and traditional meat products in Türkiye [J]. BMC Microbiology, 2026, 26: 474.
- [14] HSU H Y, LIAO Y C, LIN S H, et al. Safety assessment of *Lactiplantibacillus plantarum* TWK10 based on whole-genome sequencing, phenotypic, and oral toxicity analysis [J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 784.
- [15] NATARAJ B H, JEEVAN K, DANG A K, et al. Pre-clinical safety and toxicity assessment of *Limosilactobacillus fermentum* NCDC 400 in murine model [J]. Microbial Pathogenesis, 2024, 189: 106589.
- [16] OLIVEIRA T F DE, KUNIYOSHI T M, FROTA E G, et al. Anti-listerial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus lactis* LBM BT2 using alternative medium with sugarcane molasses [J]. Antibiotics, 2024, 13(3): 210.
- [17] ZHENG Q, CHIA S L, SAAD N, et al. Different combinations of nitrogen and carbon sources influence the growth and postbiotic metabolite characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods [J]. Foods, 2024, 13(19): 3123.
- [18] 苏楚亮,袁征超,杨昱仪,等.利用均匀设计法优化二孢拟奥德蘑母种培养基[J].中国食用菌,2020,39(9):36-41+45.
- [19] 张炎,房保柱,平文祥,等.副干酪乳杆菌 HD1.7 高密度培养产细菌素 Paracin1.7 条件优化[J].中国农学通报,2020,36(24):116-124.
- [20] MADI-MOUSSA D, COUCHENEY F, DRIDER D. Expression of five class II bacteriocins with activity against *Escherichia coli* in

- Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a heterologous host [J]. Biotechnology Reports, 2021, 30: e00632.
- [21] GENİŞ B, ÖZTÜRK H, ÖZDEN TUNCER B, et al. Safety assessment of enterocin-producing *Enterococcus* strains isolated from sheep and goat colostrum [J]. BMC Microbiology, 2024, 24: 391.
- [22] YANG J, CHEN Y, DONG Z, et al. Distribution and association of antimicrobial resistance and virulence characteristics in *Enterococcus* spp. isolates from captive Asian elephants in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1277221.
- [23] 叶庆磊,张颖,刘子豪,等.一株拮抗单增李斯特菌的蒙氏肠球菌 A9-1A 的筛选及其细菌素抗菌活性分析[J].微生物学通报,2024,51(12):5177-5192.
- [24] KÄRRBERG L, ANDERSSON L, KASTENMAYER R J, et al. Refinement of habituation procedures in diet-induced obese mice [J]. Laboratory Animals, 2016, 50(5): 397-399.
- [25] LIN X, ZHOU X, LU Y, et al. Safety assessment and probiotic potential of a novel species *Lactobacillus xujianguonis* [J]. Nutrients, 2025, 17(21):3474.
- [26] CHE Z, HUANG J, WEN S, et al. *Lactobacillus rhamnosus* B16 regulates lipid metabolism homeostasis by producing acetic acid [J]. Journal of Translational Medicine, 2025, 23: 1122.
- [27] PIEWNGAM P, CHIOU J, LING J, et al. Enterococcal bacteremia in mice is prevented by oral administration of probiotic *Bacillus* spores [J]. Science Translational Medicine, 2021, 13(621): eabf4692.
- [28] KALAS M A, CHAVEZ L, LEON M, et al. Abnormal liver enzymes: a review for clinicians [J]. World Journal of Hepatology, 2021, 13(11): 1688-1698.
- [29] SYED KHAJA A S, BINSALEH N K, BEG M M A, et al. Clinical importance of cytokine (IL-6, IL-8, and IL-10) and vitamin D levels among patients with type-1 diabetes [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 24225.
- [30] MAANY D, EL-WASEIF A, EL-WAHED E A. Optimization of enterocin production from probiotic *Enterococcus faecium* using taguchi experimental design [J]. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2024, 21(3): 192-198.
- [31] GASPAR C, DONDEERS G G, PALMEIRA-DE-OLIVEIRA R, et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400 [J]. AMB Express, 2018, 8(1): 153.
- [32] GUO X, BAI X, ZHENG Z, et al. Optimization of culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* CCFM18 and characterization of its biological properties [J]. Fermentation, 2025, 11(8): 470.
- [33] YANG E, FAN L, YAN J, et al. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria [J]. AMB Express, 2018, 8: 10.
- [34] TODOROV S D, VAN REENEN C A, DICKS L M T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2004, 50(3): 149-157.
- [35] HE Y, DEGRAEVE P, OULAHAL N. Anti-*Listeria* activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells entrapped in alginate beads: effects of inoculum size, alginate bead formulation, and atmosphere composition [J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16:1663475.