DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260313002
引用格式: 安宇豪, 陈国超, 解源琳, 等. 添加噬菌体控制发酵啤酒中植物乳杆菌的污染[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(17): 255–262.
An Yuhao, Chen Guochao, Xie Yuanlin, et al. Control of *Lactiplantibacillus plantarum* contamination in fermented beer through bacteriophage addition [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(17): 255–262. (in Chinese with English abstract).

添加噬菌体控制发酵啤酒中植物乳杆菌的污染

安宇豪[1,2], 陈国超[2,3], 解源琳[2,3], 刘 欢[2], 李 灏[1,2*]

[1. 山东医药大学公共卫生学院, 烟台 264003; 2. 济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272067; 3. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)公共卫生与健康管理学院, 济南 250117]

摘 要: 目的 探究添加噬菌体在控制发酵啤酒中植物乳杆菌污染的效果, 并优化防控效果。**方法** 从腐烂苹果和鸭粪便样品中分离到 1 株靶向植物乳杆菌的噬菌体, 命名为 LBP-LH, 并对其特性进行了表征; 通过模拟发酵啤酒中的细菌污染, 将植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在酵母浸出粉蛋白胨葡萄糖液体培养基中进行共培养。在共培养体系中添加噬菌体 LBP-LH, 通过测定共培养体系中酿酒酵母和植物乳杆菌的细胞数量以及乙醇浓度, 以评估噬菌体防止植物乳杆菌污染的效果。**结果** 与污染组相比, 噬菌体处理组植物乳杆菌数量自 9 h 起极显著降低(P<0.01), 酿酒酵母数量与乙醇产量均恢复至对照组水平(P>0.05); 噬菌体单独添加对酿酒酵母生长及乙醇发酵无显著影响(P>0.05)。**结论** 噬菌体 LBP-LH 可特异性清除植物乳杆菌, 不影响酿酒酵母生长与乙醇发酵, 安全性良好, 可作为绿色生物抗菌剂用于发酵啤酒过程中植物乳杆菌污染的精准防控, 在食品发酵工业具有实际应用潜力。

关键词: 噬菌体; 发酵啤酒; 酿酒酵母; 植物乳杆菌; 细菌污染
中图分类号: TS201.3 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)17–0255–08

Control of *Lactiplantibacillus plantarum* contamination in fermented beer through bacteriophage addition

AN Yu-Hao[1,2], CHEN Guo-Chao[2,3], XIE Yuan-Lin[2,3], LIU Huan[2], LI Hao[1,2*]

(1. *School of Public Health*, *Shandong Medical and Pharmaceutical University*, *Yantai* 264003, *China*; 2. *School of Public Health*, *Jining Medical University*, *Jining* 272067, *China*; 3. *School of Public Health and Health Management*, *Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences*, *Ji'nan* 250117, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of adding bacteriophage in controlling the contamination of *Lactiplantibacillus plantarum* during fermented beer, and optimize the prevention and control effect. **Methods** A bacteriophage targeting *Lactiplantibacillus plantarum*, named LBP-LH, was isolated from rotten apple and duck feces samples, and its characteristics were characterized. By simulating bacterial contamination in fermented beer, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* were co-cultured in yeast extract peptone dextrose broth. Then, bacteriophage LBP-LH was added to the co-culture system, and the effects of bacteriophage on preventing

收稿日期: 2026-03-13
第一作者: 安宇豪(2001—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为公共卫生。E-mail: 1784008461@qq.com
***通信作者:** 李灏(1978—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物学。E-mail: lihaoh@163.com

Lactiplantibacillus plantarum contamination was evaluated by measuring the ethanol concentration and cell numbers of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactiplantibacillus plantarum* in the co-culture system. **Results** Compared with the polluted group, the number of *Lactiplantibacillus plantarum* in the bacteriophage treatment group decreased significantly from 9 h (P<0.01), while the number of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production returned to the control group level (P>0.05); the addition of bacteriophages alone had no significant effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol fermentation (P>0.05). **Conclusion** The bacteriophage LBP-LH has been verified to specifically eliminate *Lactiplantibacillus plantarum* without affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol fermentation. It is safe and can be used as a green biological antibacterial agent for precise prevention and control of lactic acid bacteria contamination during fermented beer. It has practical application potential in the food fermentation industry.

KEY WORDS: bacteriophage; fermented beer; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactiplantibacillus plantarum*; bacterial contamination

0 引 言

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种与人类关系密切的酵母，主要应用于面包和馒头等食品及酿酒行业。啤酒是一种低酒精度饮品，因富含二氧化碳常被比喻为“液体面包”，发酵啤酒是一个高度依赖酿酒酵母完成糖化产物转化为乙醇和芳香化合物的关键工业过程[1]。尽管啤酒发酵罐通常设计为密闭系统，但在生产实践中，细菌污染仍是不可忽视的难题，这些细菌不仅消耗酿造原料中的糖分，还会产生酸性代谢产物，破坏啤酒的风味轮廓[2]。

在工业级啤酒发酵半连续/连续生产过程中，无法实现完全无菌环境，细菌污染频发，严重降低了发酵效率与产品品质[3]。在众多细菌污染源中，植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是最具威胁性的污染菌种类之一。它通过糖酵解途径将糖分转化为乳酸，导致发酵液pH下降[4]。这种pH的下降不仅抑制了酿酒酵母的生长，还会导致酵母细胞壁通透性的改变，从而进一步加剧细胞死亡和发酵停止。更为严重的是，植物乳杆菌的存在会导致啤酒出现“酸败”味，严重影响产品质量[5]。

工业发酵中针对杂菌污染的常用控制策略主要包括抗生素添加、有机酸抑菌、物理灭菌及应用生物抑菌剂等。为了控制或消除植物乳杆菌等细菌导致的污染，人们已经采用了各种方法。例如，工业生产中常在发酵启动初期或污染早期，添加低剂量青霉素 G 等抗生素，因此法操作简便、抑菌快速、成本低廉，得以在大规模生产中得到普遍应用。然而，长期滥用抗生素可导致耐药菌株不断增加，反而导致细菌防治效果适得其反[6]，同时，过度使用抗生素而导致发酵残渣中残留的药物，可能会随饲料被喂养到牲畜中，进一步通过食物链威胁食品供应的安全[7]；添加外源乳酸也可防治细菌污染，有效抑制植物乳杆菌生长[8]，但采用该发酵策略，需使用耐乳酸型酵母菌株完成发酵生产[9]，否则乳酸会极大地降低酿酒酵母生长和发酵能力[10]。此外，采用高温发酵等物理法也可有助于降低杂菌污染风险，但常规工业酿酒酵母无法耐受超过 37 ℃以上温度；超过37 ℃即属于高温发酵，可显著抑制酵母细胞活性，这使得高温发酵需依赖耐热酿酒酵母菌株，同时高温发酵可能也会破坏目标产品风味[11]。另外，尼生素也被用于发酵中的杂菌污染防控，但尼生素成本高且目前常规市售尼生素活性成分含量较低，这限制了其在实际工业中的应用[12]。从产业实际需求来看，当前发酵行业对杂菌防控的要求不断提高，既要保证产品安全性，又要兼顾生产效率和成本控制，传统防控手段已难以适配规模化、高品质的生产需求，因此寻找新的替代抗菌干预方法，用以防治发酵啤酒中的细菌污染是十分必要的。

噬菌体是一类可感染细菌的病毒，具有易分离、成本低、对人体无害等特点。研究表明，尽管噬菌体具有潜力用于治疗细菌感染或消除污染，但受限于当时对其生物学特性的了解不足，以及随后广泛的抗生素使用的冲击，噬菌体的实际应用曾一度受到限制[13]。近年来，噬菌体在微生物领域的应用研究显著增加，在消灭目标宿主细胞上具有宿主特异性，可能是控制细菌污染的理想替代方法[14–16]。人们预期噬菌体可用于治疗细菌感染[17]，并已广泛应用于多种致病菌所致的疾病[18–20]。相较于传统的化学抗生素，噬菌体作为一种高度特异性的生物抗菌剂展现出许多优势，能精准靶向特定细菌而不伤害酵母菌、本身无抗生素残留、对环境友好[15]。并且相比传统的化学抗生素，噬菌体治疗相较于抗生素能在感染部位进行自我繁殖，效果更好[21]。因此，噬菌体疗法被认为是控制啤酒酿造发酵过程中植物乳杆菌等细菌污染的极具前景的绿色替代方案。

本研究以腐烂苹果和鸭粪为材料，以植物乳杆菌为靶标菌进行噬菌体的分离。测定了该噬菌体的特性及其在生物乙醇生产中对植物乳杆菌污染的影响，并评估了分离的噬菌体对发酵的副作用。旨在探讨在啤酒发酵过程中，利用噬菌体添加来控制植物乳杆菌污染的可行性及其机制。通过验证该

方法的有效性, 不仅为啤酒工业提供一种新型的生物防控手段, 也为生物乙醇产业在面对类似细菌胁迫时提供借鉴。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

本研究所用酿酒酵母菌株为实验室自行分离, 经鉴定为 CEC B9S-15; 该菌株的 Gen Bank 登录号为 GU585883.1 (http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU585883.1)。使用的植物乳杆菌菌株购自中国科学院微生物研究所, 其 ATCC 编号为 8014 (http: //www.atcc.org/Products/ All/8014.aspx)

蛋白胨、牛肉膏、酵母膏(北京奥博星生物技术有限责任公司); 柠檬酸氢二铵(纯度≥98.0%)、吐温 80、明胶、盐酸(HCl)(化学纯)、磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、氯化钠、氢氧化钠(NaOH)(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 葡萄糖(纯度≥98.0%)、乙酸钠(纯度≥99.5%)、硫酸锰(纯度≥99.99%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); Tris-HCl(无核糖核酸酶, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

SPX-150B-Z 生化培养箱、YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); TDL-5-A 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); XSP-3C 生物显微镜(上海精密仪器仪表有限公司); HZQ-QX 卧式空气恒温振荡器(北京东联哈尔仪器制造有限公司); 752S 紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司); QP-2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司); METTLER-TOLEDO FE20-FiveEasy™ pH 仪(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.3　实验方法

(1)菌种、培养基和培养条件

本研究采用本实验室自行分离的酿酒酵母菌株, 培养于酵母浸出粉蛋白胨葡萄糖液体培养基(yeast extract peptone dextrose broth, YPD broth) (2%葡萄糖、1%酵母提取物、2%蛋白胨)中, 并以 170 r/min 转速于 30 ℃恒温振荡培养。植物乳杆菌培养于 MRS 培养基[1%蛋白胨、1%牛肉膏、1%酵母提取物、2%葡萄糖、0.5%乙酸钠、0.2%柠檬酸氢二铵、0.2%磷酸氢二钾、0.058%七水合硫酸镁、0.025%硫酸锰、0.1% (*V*:*V*)]于吐温 80, pH 为 6.8 中, 30 ℃培养。

(2)噬菌体的分离、繁殖和储存

将腐烂的苹果或鸭的粪便样品加入 MRS 肉汤中, 与 1%体积的植物乳杆菌指数生长期在 30 ℃下培养。过夜振荡后, 以 10000×*g* 离心 10 min, 去除剩余的细菌细胞或细胞碎片, 取上清, 采用经典的双层琼脂平板法[22]进行反复分离与纯化, 直至筛选得到斑形一致且尺寸稳定的噬菌斑, 其中每一个噬菌斑都代表一个单独的克隆。用移液枪吸取 30 个单噬菌斑, 用小体积标准镁(standard magnesium, SM)缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、0.1 mol/L 氯化钠、8 mmol/L 七水合硫酸镁、0.01%明胶、pH 为 7.5)洗脱。在植物乳杆菌上增殖单个噬菌体悬液, 并通过双层琼脂分层法测定噬菌体滴度[22]。将噬菌体裂解液悬浮在 SM 缓冲液中, 于 4 ℃保存。

(3)噬菌体的 pH 稳定性

为了评估噬菌体在不同酸碱度环境中的稳定性, 本研究采用 1%胰蛋白胨的培养基进行实验。首先, 取 4.5 mL 经 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 调节至不同 pH 的胰蛋白胨溶液分装于各试管中, 置于 25 ℃水浴箱中平衡至温度稳定。随后向每个试管中加入 0.5 mL 噬菌体裂解液, 在 25 ℃孵育 1 h 后测定其滴度。为量化 pH 对噬菌体活性的影响, 将各 pH 条件下的噬菌体滴度与 pH 为 8.0 时的滴度进行比较, 计算相对滴度。该实验重复进行 3 次以确保结果的可靠性。

鉴于乙醇发酵过程通常在 pH 为 4.0~6.0 范围内进行, 进一步研究了噬菌体 LBP-LH 在该 pH 范围内的残留活性变化, 进行了相应实验。具体操作为: 将 0.5 mL 噬菌体裂解液分别加入含有不同 pH 为 4.0、5.0、6.0 的管中, 置于 25 ℃孵育 1 h, 期间每隔 10 min 取样一次, 并立即将样本置于冰浴中冷却, 以防止进一步的活性变化。随后测定其滴度, 并计算相对于 0 min 时滴度的相对滴度值。实验同样进行 3 次重复。

(4)噬菌体的热稳定性

本研究首先在 MRS 肉汤培养基中活化噬菌体, 并接种 1%体积的植物乳杆菌指数生长期培养物于 30 ℃孵育。活化后的菌液以 10000×*g* 离心 10 min, 以除去残余的细菌细胞或细胞碎片。随后, 将上清液(即噬菌体裂解液)分别置于 30、40、50、60、70 和 80 ℃的水浴箱中孵育 1 h。在此期间, 每隔 10 min 取样一次, 并立即置于冰浴中冷却, 以防止进一步的活性变化。随后测定其滴度, 并计算相对于 0 min 时滴度的相对滴度值。该实验同样进行 3 次重复以确保结果的可靠性。

(5)抑制植物乳杆菌污染的噬菌体处理方法

为验证噬菌体对植物乳杆菌污染的抑制效果, 本研究在 YPD 肉汤培养基中模拟了发酵啤酒过程中的细菌污染。实验设置了 3 个独立的组别: 对照组(仅接种酿酒酵母)、污染组(酿酒酵母与植物乳杆菌共培养)以及噬菌体处理组(酿酒酵母、植物乳杆菌及噬菌体 LBP-LH 共培养)。接种比例分别为酿酒酵母 4×10^5 细胞/mL, 植物乳杆菌 $1.6\sim2.3\times10^6$ 细胞/mL; 噬菌体加入量为 3.6×10^3 噬菌斑形成单位 PFU/mL。所有组别均在 30 ℃、170 r/min 条件下培养。为监测发酵过程和微生物动态变化, 使用血球计数板计数酵母细胞, 通过梯度稀释平板计数法统计植物乳杆菌数量, 并采用气相色谱法(gas chromatography, GC)测定发酵液中的乙醇含量。色谱条件: 色谱柱, DB-8 毛细管柱; 柱温, 120 ℃; 检测器温度: 250 ℃; 进样口温度: 250 ℃; 载气: N_2; 尾吹气流量: 5.9 mL/min; 氢气流量: 40 mL/min; 空气流量: 400 mL/min; 分流比为 0。在下面的实验中都采用同

样的色谱条件测定乙醇。乙醇产量的相对含量通过与对照组比较得出。此外，使用 METTLER-TOLEDO FE20-FiveEasy™ pH 仪实时监测发酵过程中的 pH 变化。为确保结果的可靠性，该实验均进行 3 次重复。

(6)噬菌体对发酵的副作用评价

评估噬菌体对发酵过程可能产生的副作用，本研究将酿酒酵母接种于 YPD 培养基中，设置有无噬菌体 LBP-LH 的两种培养条件。具体设计包括：对照组(仅接种酿酒酵母于 YPD 培养基中)和副作用评估组(酿酒酵母与噬菌体 LBP-LH 共培养于 YPD 培养基中)。所有培养均在 30 ℃、170 r/min 条件下进行。期间使用血球计数板统计酿酒酵母细胞数量，并通过 GC 测定发酵液中的乙醇含量，该实验同样设置 3 次重复。

1.4 数据处理

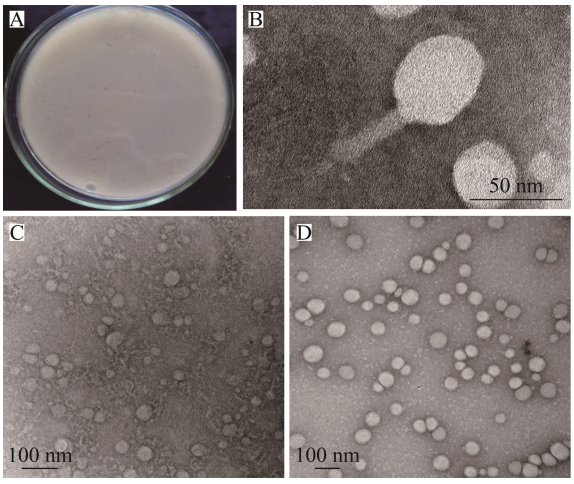
采用 SPSS 13.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验数据分析。$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 噬菌体分离及形态特征

在课题组前期研究中[23]，植物乳杆菌在测试的 3 种乳酸菌(干酪乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌)中对酿酒酵母生长以及最终乙醇产量的抑制效果最为显著。因此，本研究选择了植物乳杆菌作为污染菌株，以评估噬菌体处理的效率。

从腐烂苹果和鸭粪便样品中分离出的噬菌体经双层琼脂平板法反复分离纯化获得的噬菌体命名为 LBP-LH。噬菌体 LBP-LH 形成的噬斑清晰，但较小，直径约为 1 mm(图 1A)。对噬菌体 LBP-LH 进行电镜观察，LBP-LH 具有复杂的对称性，具有一个长的尾部和一个等长的头部(图 1B~D)。LBP-LH 头部直径约为 30~40 nm，尾部直径约为 50~70 nm(图 1B)。根据前期工作的一步生长曲线计算出增殖噬菌体 LBP-LH 的参数[24]，其裂解量为 32 PFU。



注：A. 噬菌斑图像；B~D. 透射电镜图像。

图 1 噬菌体 LBP-LH 形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of bacteriophage LBP-LH

2.2 不同 pH 下噬菌体 LBP-LH 的存活情况

在酿酒酵母进行生物乙醇发酵的过程中，pH 会随发酵时间的推移而发生变化。若噬菌体处理能够有效控制植物乳杆菌的污染，纯化的噬菌体裂解液可以制备成液体制剂、粉末制剂或其他形式用于实际应用。在噬菌体制剂的工业化生产过程中，可能会涉及酸、碱或高温处理，这些工艺条件将直接影响噬菌体的活性。因此，必须评估噬菌体在不同 pH 和温度下的存活能力。

实验结果显示(图 2A)，噬菌体 LBP-LH 对中性及碱性环境表现出较高的耐受性，而在酸性环境下活性显著降低。具体而言，pH 1~4 条件下噬菌体活性受到极显著抑制($P<0.01$)，pH 为 5 以及 pH 为 12 时噬菌体活性亦存在显著抑制作用($P<0.05$)。相反，在 pH 为 6~11 的范围内，尤其是 pH 为 8~9 之间，噬菌体仍能保持相对较高的活性。

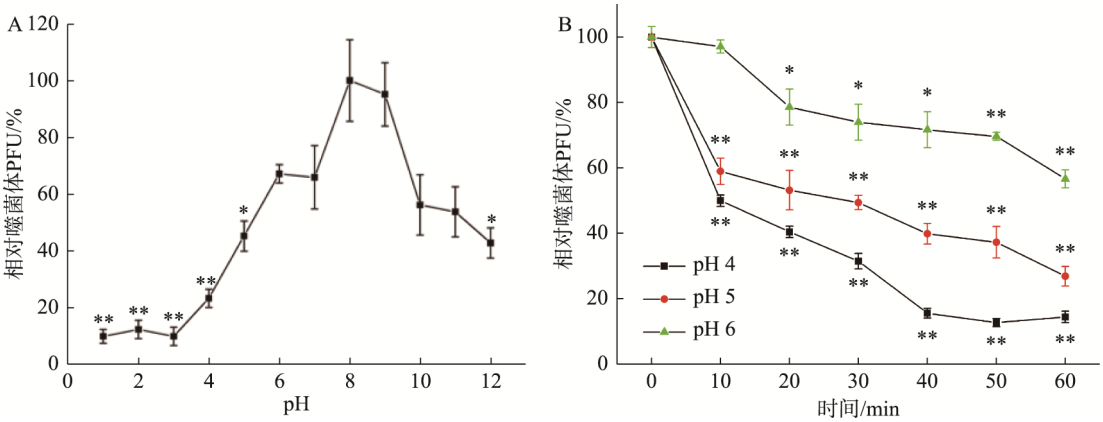
此外，研究还进一步测定了噬菌体 LBP-LH 在 pH 为 4~6 范围内的残余活性变化(图 2B)。结果表明，当噬菌体在 1%胰蛋白胨(pH 6)中浸泡 60 min 后，仍能保持较高的活性，其剩余滴度约为 57%。然而，噬菌体对 pH 为 4 和 5 更为敏感，在 pH 4 和 5 条件下经过 60 min 孵育后，其剩余滴度分别约为 15%和 27%(与 0 min 时的滴度相比差异显著，$P<0.01$)。

2.3 噬菌体 LBP-LH 的热稳定性

噬菌体 LBP-LH 表现出对中低温(即 30、40 和 50 ℃)的耐受性(图 3)。在 30、40 和 50 ℃下孵育 60 min 后，噬菌体 LBP-LH 仍保持较高活性，其剩余效价分别约为 75%、55%和 50%。然而，噬菌体 LBP-LH 对高温(即 60、70 和 80 ℃)更敏感，其在 60 ℃和 70 ℃孵育 60 min 后的剩余滴度分别仅为(与 0 min 噬菌体 LBP-LH 滴度比较，$P<0.05$)的 35%和 20%左右。此外，噬菌体 LBP-LH 在 80 ℃孵育后立即失去活性，并且在 80 ℃孵育时没有检测到噬菌体颗粒。

2.4 噬菌体 LBP-LH 处理对酿酒酵母发酵过程中植物乳杆菌污染的影响

为了在实验室规模上模拟细菌污染，将植物乳杆菌与酿酒酵母在 YPD 培养基中共同培养，并添加噬菌体 LBP-LH 以评估噬菌体处理的效果。由图 4A 可知，在污染组(酿酒酵母和植物乳杆菌混合共培养)中，从共培养 6 h 开始，植物乳杆菌的存在抑制了酵母细胞的生长($P<0.05$)。然而，噬菌体 LBP-LH 的加入逆转了植物乳杆菌对酿酒酵母生长的抑制作用。与污染组相比，噬菌体处理组(酿酒酵母、植物乳杆菌和噬菌体 LBP-LH 共培养)的酵母细胞数量从共培养后 8 h 开始显著增加($P<0.05$)。此外，与仅用 YPD 培养酿酒酵母的对照组相比，噬菌体处理组的酵母细胞数量并未减少($P>0.05$)。



注: A. 不同 pH 孵育 1 h。*表示与 pH=8 相比具有显著性差异, $P<0.05$; **表示具有极显著性差异, $P<0.01$; B. 不同 pH 随时间变化。*表示不同 pH 不同时间与 0 min 相比具有显著性差异, $P<0.05$; **表示具有极显著性差异, $P<0.01$。

图 2　噬菌体 LBP-LH 在不同 pH 和时间下的残余活性变化图

Fig.2　Changes diagram in residual activity of bacteriophage LBP-LH at different pH and time

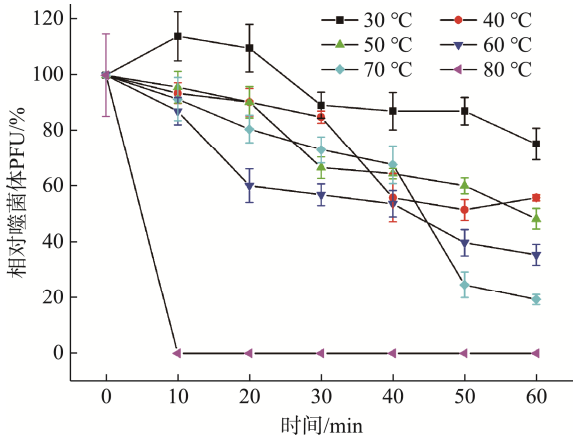


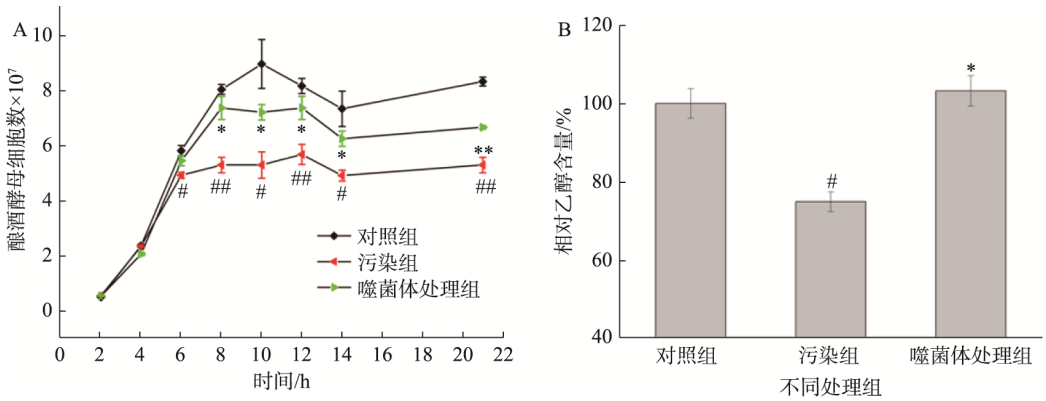
图 3　噬菌体 LBP-LH 在 MRS 肉汤培养基中的耐热性

Fig.3　Heat resistance of bacteriophage LBP-LH in MRS broth medium

由图 4B 可知，植物乳杆菌的存在也显著降低了乙醇的产量($P<0.05$)。然而，噬菌体 LBP-LH 的加入逆转了植物乳杆菌对乙醇产量的抑制作用($P<0.05$)。此外，与仅用 YPD 培养基培养酿酒酵母的对照组相比，噬菌体处理组的最终乙醇产量并没有降低。

此外，还测定了污染组和噬菌体处理组中植物乳杆菌的细胞数量，以评估噬菌体 LBP-LH 对植物乳杆菌污染的抑制作用。由图 4C 可知，与污染组相比，噬菌体处理组的植物乳杆菌细胞数量从共培养后 9 h 开始极显著下降($P<0.01$)。这些关于细胞数量和乙醇产量的结果表明，噬菌体 LBP-LH 可以有效地抑制酿酒酵母发酵过程中的植物乳杆菌污染。

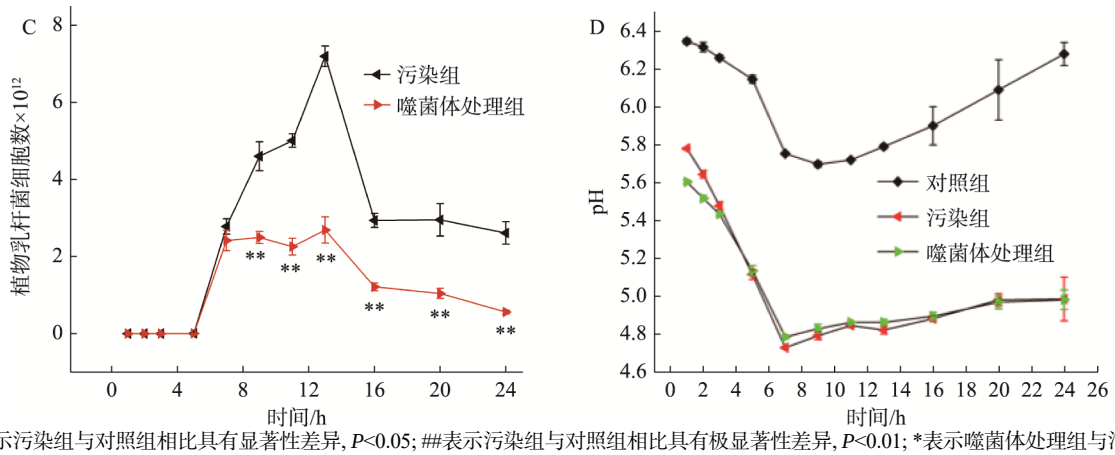
由图 4D 可知，与对照组相比，污染组的 pH 降低。污染组 pH 的降低可能主要是由植物乳杆菌释放的乳酸积累造成的。噬菌体 LBP-LH 处理与污染组相比并未有明显升高；可能由于噬菌体可高效裂解宿主菌，但无法快速降解体系中已存在的有机酸。与此同时，酵母在糖代谢过程中也会持续产生少量弱酸类物质，共同导致发酵体系 pH 维持在较低水平。



注: #表示污染组与对照组相比具有显著性差异, $P<0.05$; ##表示污染组与对照组相比具有极显著性差异, $P<0.01$; *表示噬菌体处理组与污染组相比具有显著性差异, $P<0.05$; **表示噬菌体处理组与污染组相比具有极显著性差异, $P<0.01$。

图 4　噬菌体 LBP-LH 处理对酿酒酵母培养过程中植物乳杆菌污染的影响

Fig.4　Effects of bacteriophage LBP-LH treatment on *Lactiplantibacillus plantarum* contamination during the culture of *Saccharomyces cerevisiae*



注: #表示污染组与对照组相比具有显著性差异, $P<0.05$; ##表示污染组与对照组相比具有极显著性差异, $P<0.01$; *表示噬菌体处理组与污染组相比具有显著性差异, $P<0.05$; **表示噬菌体处理组与污染组相比具有极显著性差异, $P<0.01$。

图 4(续) 噬菌体 LBP-LH 处理对酿酒酵母培养过程中植物乳杆菌污染的影响

Fig.4 Effects of bacteriophage LBP-LH treatment on *Lactiplantibacillus plantarum* contamination during the culture of *Saccharomyces cerevisiae*

2.5 噬菌体 LBP-LH 对发酵的副作用评价

在不接种植物乳杆菌的情况下, 评价噬菌体 LBP-LH 对酿酒酵母发酵的副作用。添加噬菌体 LBP-LH 在各时间点均未降低酿酒酵母的生长(图 5A)。最终的乙醇产量也不受噬菌体 LBP-LH 的抑制(图 5B)。这些结果表明, 在含有酿酒酵母的发酵液中添加噬菌体 LBP-LH 对生物乙醇发酵是无害的。

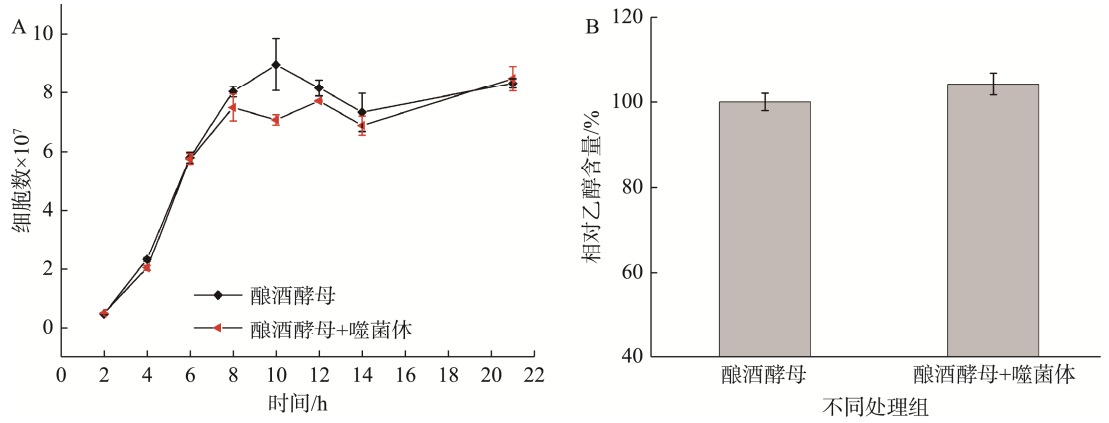


图 5 噬菌体 LBP-LH 对酿酒酵母发酵的副作用

Fig.5 Side effects of bacteriophage LBP-LH on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*

3 讨论与结论

在工业级别发酵过程中, 酿酒酵母细胞经常受到各种环境因素胁迫; 同时, 植物乳杆菌等细菌的污染几乎不可避免[25], 从而抑制了酿酒酵母细胞生长[26–27]。因此, 为提高乙醇发酵产量, 进而降低生产成本, 必须对工业级酿酒酵母发酵中的污染杂菌进行控制。

生物防治制剂作为化学合成物的非危险替代品, 可利用生物过程抑制细菌污染[28]。宿主特异性的噬菌体对非宿主细胞生物无害, 为治疗细菌污染提供了一种相对无毒的替代策略。虽然化学试剂和噬菌体都具有显著的抗菌活性, 但裂解性噬菌体由于具有更高的杀灭效率和特异性而优于化学试剂。比如, 已有研究表明噬菌体可比抗生素更有效地治疗人或动物的病原体感染[29]。本研究中噬菌体 LBP-LH 的添加逆转了植物乳杆菌对酿酒酵母生长和最终生物乙醇产量的抑制作用。这些结果表明噬菌体对酿酒酵母发酵过程中植物乳杆菌污染的控制是有效的。作为环境中的天然居留物, 噬菌体具有生物安全性, 不会造成类似于发酵废液中抗生素残留而导致的二次污染。之前的研究也证明了噬菌体在治疗由肠道致病菌大肠杆菌 3 引起的鸡腹泻中表现出了良好的生物安全性[30]。同时, 噬菌体特异性良好, 其宿主范围较为有限[31]。噬菌体只裂解其宿主菌, 只有表面具有可被噬菌体识别的特异性受体分子的细胞才会被噬菌体识别并杀灭[32]。本课题组前期工作也表明了噬菌体 LBP-LH 的宿主特异性, 这也提示可利用该噬菌体防控植物乳杆菌污染, 将不会对基于酿酒酵母的发

酵过程造成影响[24]。此外, 噬菌体具有自限性, 需要其宿主细胞不断生长[33]; 一旦其宿主微生物不再存在, 噬菌体则不能持续足够长的时间。因此, 一旦发酵体系中植物乳杆菌细胞被清除, 噬菌体 LBP-LH 将无法在发酵体系中继续存活。

在噬菌体防控应用中, 噬菌体在添加后可能很快失活[34]。然而, 只要发酵系统中存在宿主菌, 噬菌体就可不断繁殖并裂解其宿主细胞, 直至宿主细胞被彻底清除。本研究中, 噬菌体 LBP-LH 的添加降低了植物乳杆菌的细胞数量, 这也表明了采用噬菌体控制酿酒酵母发酵过程中植物乳杆菌污染的有效性。

此外, 伴随着发酵过程的进行, 乳酸菌、酿酒酵母等微生物可分泌乳酸、乙酸等分子, 使得发酵体系 pH 发生变化[35]。本研究中, 对照组、污染组和噬菌体处理组的 pH 在发酵过程中维持在 4~6 范围内。植物乳杆菌污染组与噬菌体处理组 pH 均未达到对照水平, 以之前的研究中测得的乳酸和乙酸含量变化来看, 在植物乳杆菌与酿酒酵母共培养后, 乳酸含量较单独培养酿酒酵母时显著升高, 乙酸含量在两种培养条件下均处于极低水平相符合[23]。本研究认为该现象与体系内代谢物积累特征直接相关, 植物乳杆菌在污染前期已大量增殖并分泌乳酸等酸性代谢物, 导致 pH 快速下降[36]; 噬菌体可高效裂解宿主菌, 但无法快速降解体系中已存在的有机酸。与此同时, 酵母在糖代谢过程中也会持续产生少量弱酸类物质, 共同导致发酵体系 pH 维持在较低水平[37]。这一结果提示, 在植物乳杆菌污染发生后, 噬菌体的核心作用是终止污染进程、保护酵母、恢复发酵能力, 而非快速逆转 pH 变化, 该现象符合实际发酵体系的代谢规律。表明即使在 pH 未恢复至正常水平的情况下, 噬菌体仍能高效清除植物乳杆菌, 保障酿酒酵母的正常发酵功能。噬菌体 LBP-LH 对发酵的副作用研究中, 通过测定乙醇产量和酵母细胞数量探究了噬菌体对发酵体系的调控作用, 结果表明其宿主特异性强, 仅针对植物乳杆菌发挥作用, 不会对酿酒酵母的生长及发酵过程产生干扰。

本研究结果表明, 噬菌体处理可以有效地抑制植物乳杆菌在酿酒酵母发酵中的污染, 并且噬菌体 LBP-LH 处理对酿酒酵母的生长和生物乙醇的产生没有影响。这一发现突出了噬菌体作为一种新型生物防治剂在工业生物发酵(包括啤酒酿造)中控制细菌污染的潜在应用价值。展望未来, 纯化的噬菌体制剂可生产成液体制剂或粉末状制剂或其他形式应用。然而, 在生物乙醇发酵过程中仍然存在其他污染微生物, 噬菌体对这些微生物的裂解作用可能会使噬菌体处理更有效。此外, 尽管植物乳杆菌在本研究中没有表现出对噬菌体 LBP-LH 的抗性, 但这种抗性可能是在长时间培养后自发产生的。如何应对噬菌体抗性也将是后续研究的重点。

参考文献

[1] Sicard D, Legras J L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces* sensu stricto complex [J]. Comptes Rendus Biologies, 2011, 334(3): 229–236.

[2] Adhya S, Merril C R, Biswas B. Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2014, 4(1): a012518.

[3] Deasy T, Mahony J, Neve H, et al. Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(12): 2157–2161.

[4] Popova-Krumova P, Danova S, Atanasova N, et al. Lactic acid production by *Lactiplantibacillus plantarum* AC 11S-kinetics and modeling [J]. Microorganisms, 2024, 12(4): 739.

[5] Ciont C, Epuran A, Kerezsi A D, et al. Beer safety: new challenges and future trends within craft and large-scale production [J]. Foods, 2022, 11(17): 2693.

[6] Feyereisen M, Mahony J, Lugli G A, et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages [J]. Viruses, 2019, 11(5): 393.

[7] Van-Boeckel T P, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(18): 5649–5654.

[8] Bayrock D P, Ingledew W M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, 31(8): 362–368.

[9] Marinova-Yordanova V Y, Kizheva Y K, Rasheva I K, et al. Traditional Bulgarian fermented foods as a source of beneficial lactic acid bacteria [J]. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 2024, 16(1): 7.

[10] Narendranath N V, Thomas K C, Ingledew W M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 26(3): 171–177.

[11] Sengupta P, Mohan R, Wheeldon I, et al. Prospects of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* for high solids ethanol fermentation of lignocellulosic biomass [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 134.

[12] Weixler D, Berghoff M, Ovchinnikov K V, et al. Correction to: recombinant production of the lantibiotic nisin using *Corynebacterium* glutamicum in a two-step process [J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 24.

[13] Weber-Dąbrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience [M]. Górski A, Krotkiewski H, Zimecki M. Inflammation. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001: 201–209.

[14] Bertozzi-Silva J, Sauvageau D. Bacteriophages as antimicrobial agents against bacterial contaminants in yeast fermentation processes [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 123.

[15] Bai J, Kim Y T, Ryu S, et al. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 474.

[16] Ramos-Vivas J, Elexpuru-Zabaleta M, Samano M L, et al. Phages and enzybiotics in food biopreservation [J]. Molecules, 2021, 26(17): 5138.

[17] Ceccato-Antonini S R. Conventional and nonconventional strategies for

controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(6): 80.

[18] García-Contreras R, Martínez-Vázquez M, González-Pedrajo B, et al. Editorial: alternatives to combat bacterial infections [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 909866.

[19] Mahler M, Costa A R, van Beljouw S P B, et al. Approaches for bacteriophage genome engineering [J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(5): 669–685.

[20] Mardiana M, Teh S H, Tsai Y C, et al. Characterization of a novel and active temperate phage vB_AbaM_ABMM1 with antibacterial activity against *Acinetobacter* baumannii infection [J]. Scientific Reports, 2023, 13: 11347.

[21] Strathdee S A, Hatfull G F, Mutalik V K, et al. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions [J]. Cell, 2023, 186(1): 17–31.

[22] Niu Yuanyuan, Yang Xiaobo, Wang Shang, et al. Isolation and characterization of two homolog phages infecting *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 946251.

[23] Ding Yujing, Niu Yuanpu, Chen Ze, et al. Discovery of novel *Lactobacillus* plantarum co-existence-associated influencing factor(s) on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation performance [J]. LWT, 2021, 135: 110268.

[24] Cui Fengxia, Zhang Ruimin, Liu Huaqing, et al. Metabolic responses to *Lactobacillus* plantarum contamination or bacteriophage treatment in *Saccharomyces cerevisiae* using a GC–MS-based metabolomics approach [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(12): 2003–2013.

[25] Elsztein C, de Menezes J A S, de Morais M A. Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(9): 967–973.

[26] Zhao X Q, Bai F W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production [J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(1): 23–30.

[27] Cousin F J, Le-Guellec R, Chuat V, et al. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria Genera in cider and other fermented foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 291: 17–24.

[28] Bayrock D P, Thomas K C, Ingledew W M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(5): 498–502.

[29] Santos A, Navascués E, Bravo E, et al. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 147–154.

[30] Li Hao, Ma Manli, Xie Huijun, et al. Biosafety evaluation of bacteriophages for treatment of diarrhea due to intestinal pathogen *Escherichia coli* 3-2 infection of chickens [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 1–6.

[31] O'Flaherty S, Ross R P, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(4): 801–819.

[32] Dunne M, Rupf B, Tala M, et al. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins [J]. Cell Reports, 2019, 29(5): 1336–1350.

[33] Clark J R, March J B. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials [J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 212–218.

[34] Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, et al. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica:* a fresh appraisal of bacteriophage therapy [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2010, 201(1): 52–61.

[35] Rochefort L, Caille O, Van Nedervelde L. Sequentially pitching lactic acid bacteria and active dry yeasts for sour beer production [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2024, 82(2): 141–149.

[36] Dong Weiwei, Peng Yaxuan, Ma Jiyuan, et al. Yeasts in traditional Baijiu fermentation: diversity, functions, microbial interactions and applications [J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1652173.

[37] Altvater M, Tomico-Cuenca I, Mattanovich D, et al. Long-term adaptive laboratory evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titer lactic acid production at low pH [J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 242.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)