

罗伊氏乳杆菌产罗伊氏细菌素的工艺优化

万心怡, 徐学明*, 吴凤凤

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)是一种安全、高效生产罗伊氏细菌素的菌株。作者优化了罗伊氏乳杆菌 ATCC 53608 转化甘油生产罗伊氏细菌素的工艺参数。结果表明:处于初期稳定期(26 h)的 *L. reuteri*, 其细胞内甘油脱水酶能达到最大酶活 2.2 U/mg, 有利于转化甘油生产罗伊氏细菌素。正交实验优化后的最佳生产工艺:甘油浓度 400 mmol/L, 接种量 110 mg/mL, 酶转化时间 2 h, 转化温度 30 °C, pH 6.2。优化后罗伊氏细菌素的平均产量达到(241.2±3.4) mmol/L。

关键词: 罗伊氏乳杆菌; 罗伊氏细菌素; 酶转化; 抑菌剂

中图分类号:Q 939.92 文章编号:1673-1689(2019)11-0063-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.009

Study on High Production of Reuterin by *Lactobacillus reutrei*

WAN Xinyi, XU Xueming*, WU fengfeng

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Lactobacillus reutrei* can product reuterin with safety and high efficiency. The objective of present study was to investigate the optimal conditions on the biotransformation of glycerol to enhance the yield of reuterin. The biotransformation conditions were optimized by orthogonal tests as follows: glycerol concentration 400 mmol/L, cell concentration 110 g/L, conversion time 2 h, temperature 30 °C and pH 6.2. An average yield of reuterin was 241.2±3.4 mmol/L under optimal conditions.

Keywords: *Lactobacillus reutrei*, reuterin, biotransformation, sterilant

罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reutrei*) 是美国 FDA 认证的一种安全和健康的食品补充剂, 广泛地存在于人、猪、家禽和其他动物的胃肠道中^[1]。在甘油溶液中, 罗伊氏乳杆菌能转化甘油生产的罗伊氏细菌素(Reuterin)。罗伊氏细菌素是一种由 3-羟基丙醛的单体、水合物和环状二聚物混合组成的天然广谱抑菌物质, 在水溶液中存在动态平衡^[2]。罗伊氏

细菌素能有效抑制革兰氏阴性菌、阳性菌、酵母菌、霉菌和原生动物的生长^[3], 可作为抑菌剂^[4-7]、抗感染治疗剂^[8-10]、生物交联剂^[11]、新型生物材料^[12]等。目前已知能转化甘油生成罗伊氏细菌素的微生物主要是杆菌属(*Bacillus*), 克雷伯菌属(*Klebsiella*), 柠檬菌属(*Citrobacter*), 肠杆菌属(*Enterobacter*), 梭菌属(*Clostridium*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)^[13-17]。其中

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501523); 国家“十三五”重点研发计划项目(2016YFD0400701-03); 公益性行业(农业)科研专项项目(201303070-02)。

* 通信作者: 徐学明(1968—), 男, 博士, 教授, 主要从事食品组分与物性方面的研究。E-mail:xmxu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 万心怡, 徐学明, 吴凤. 罗伊氏乳杆菌产罗伊氏细菌素的工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11):63-69.

Klebsiella pneumonia 和 *L. reuteri* 具有较高转化甘油生产罗伊氏细菌素的能力, 是研究较多的菌株。有研究指出: 在纯的甘油溶液中, *L. reuteri* 是已知微生物中产罗伊氏细菌素最强的菌株^[3]。

目前利用 *L. reuteri* 生产罗伊氏细菌素的产量普遍小于 150 mmol/L^[8,18-20]。Lüthi-Peng 等人在厌氧的条件下, 利用 *L. reuteri* 细胞转化 200 mmol/L 甘油生成 170 mmol/L 的罗伊氏细菌素^[21], 这是已有报道中较高的产量, 但仍然达不到工业生产的要求。由于罗伊氏细菌素对细胞有毒害作用, 限制了体外高浓度的积累。许多研究者在转化过程中添加氨基脲^[22-23]、亚硫酸氢钠^[24-25], 能有效降低这种影响, 使罗伊氏细菌素在体外较高浓度积累, 但这些方法也增加了产物分离纯化的难度。本研究旨在优化 *L. reuteri* 生产罗伊氏细菌素的条件, 提高罗伊氏细菌素的生产效率和产量, 为今后大规模的工业化生产提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

辅酶 CoB₁₂ 和 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮腙盐酸盐水合物(MBTH): 购于 Sigma 公司; 蛋白胨和酵母粉: 购于 Oxoid 公司; 其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

Shimadzu 高效液相色谱仪(LC-20AT); DWS 厌氧培养箱; 北京普析紫外/可见分光光度计 (TU-1900); 上海之信细胞破碎仪 (JYD-990L); Thermo 高速离心机。

1.2 静息细胞的制备

细胞的制备方法参照 Axelsson 等人^[4]并有稍许修改。罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) ATCC53608 在 MRS 培养基 (蛋白胨 1%, 牛肉膏 1%, 酵母粉 0.4%, 葡萄糖 2%, 硫酸镁 0.02%, 乙酸钠 0.5%, 柠檬酸三胺 0.2%, 磷酸氢二钾 0.2%, 硫酸锰 0.005%, 吐温 80 0.1%) 中 37 °C 静置过夜培养活化。活化两次后的种子液以 6% 的接种体积分数接种到 MRS 培养基中, 厌氧条件下静置发酵培养 24 h。发酵后的菌悬液经 5 000 r/min 离心 10 min, 并用磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗一次, 以收集湿细胞。

1.3 罗伊氏细菌素的制备

将收集的湿细胞加入到 7 mL 已灭菌的甘油溶液(100~500 mmol/L)中, 在不同的设定温度(20~50 °C)中厌氧静置培养(0.5~5 h)。菌悬液经 10 000 r/min

离心 5 min, 获得的上清液在 4 °C 下保存。

1.4 罗伊氏细菌素的检测

罗伊氏细菌素的检测方法参照 Circle 等人^[26]的方法。由于罗伊氏细菌素没有标品, 而罗伊氏细菌素在酸性条件下能脱水生成丙烯醛, 丙烯醛在浓盐酸的作用下可与色氨酸进行缩合反应, 生成紫色化合物, 其最大吸收峰在 560 nm 处。因此可以用比色的方法来检测罗伊氏细菌素的含量, 并且 1 mol 的罗伊氏细菌素反应后生产 1 mol 的丙烯醛, 故用丙烯醛标准品配置成 0~0.7 mmol/L 的溶液, 绘制标准曲线。样品检测时, 在 10 mL 的离心管中加入 1 mL 的样品、0.75 mL 的色氨酸试剂、3 mL 的浓盐酸混匀, 37 °C 下保温 20 min 后检测在 OD₅₆₀ 的吸光值。

1.5 甘油脱水酶酶活的检测

细胞悬浮液置于冰浴中超声细胞破碎 (功率 300 W, 破壁 1 s, 间歇 3 s, 重复 300 次)。破碎后于 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为粗酶液。甘油脱水酶活力的检测方法参照 Toraya 等人^[27]的 3-甲基-2-苯并咪唑腙法。甘油在甘油脱水酶的作用下生成 3-羟基丙醛, 生成的 3-羟基丙醛与 3-甲基-2-苯并咪唑腙(MBTH)反应生成腙类化合物, 因此可以用比色的方法来检测。在 5 mL 的离心管中加入 100 μL 的 2 mol/L 1,2-丙二醇, 100 μL 的 0.5 mol/L KCl, 10 μL 的 1.5 mmol/L 辅酶 B₁₂, 690 μL 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0), 100 μL 的粗酶液, 37 °C 保温 10 min。加入 1 mL 的 0.1 mol/L 柠檬酸钾缓冲液(pH 3.6)终止反应, 再加入 0.5 mL 的新配 0.1%MBTH, 37 °C 保温 15 min。最后加入 1 mL 的蒸馏水, 混合均匀后在 305 nm 处测吸光值。1 个酶活单位定义为: 在 37 °C、pH 7.0 条件下, 1 min 催化生成 1 μmol 丙醛所需的酶量。

粗酶液蛋白质含量测定方法参照 Bradford 法^[28], 以牛血清蛋白为标品。

1.6 甘油浓度的检测

甘油浓度通过高效液相色谱检测, 色谱条件为: ZORBAX NH₂ 柱, 柱温 30 °C, 流动相乙腈:水=9:1(V/V), 流速 1 mL/min, 示差折光检测器。样品检测前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 菌龄对罗伊氏细菌素产量的影响

处于不同菌龄的细胞, 它的生理状态有一定的

差异,这会显著影响 *L. reuteri* 细胞内甘油脱水酶的酶活。如图 1 所示,在厌氧发酵的早期阶段,*L. reuteri* 细胞内甘油脱水酶的酶活非常低,14 h 后酶活显著增加。当细胞处于稳定期初期(26 h),细胞内甘油脱水酶的酶活达到最大 2.2 U/mg,之后稳定在 2 U/mg 左右。因此,使用稳定期初期的细胞用于酶转化,有利于提高罗伊氏细菌素的产量,这与 Stevens 等人^[24]的研究结果类似。

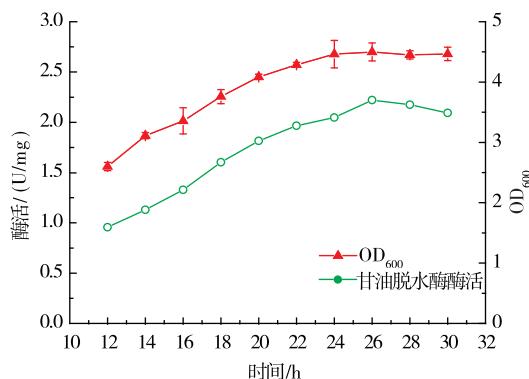


图 1 菌龄对罗伊氏细菌素产量的影响

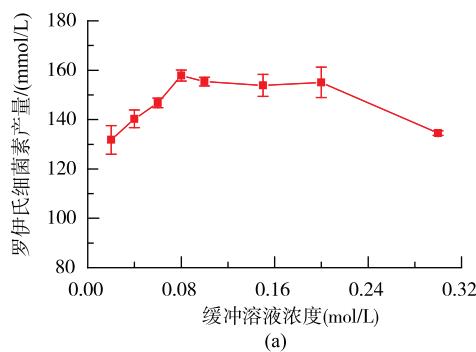
Fig. 1 Effects of cells age on the reuterin production

2.2 缓冲溶液浓度和 pH 对罗伊氏细菌素产量的影响

不同离子浓度会影响微生物的生理活性,因此研究不同缓冲溶液浓度对罗伊氏乳杆菌生产罗伊氏细菌素的影响。如图 2(a)所示,以不同浓度的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾(PBS)作为甘油溶液的缓冲体系,控制 pH 稳定在 6.0。随着缓冲溶液浓度的增加,罗伊氏细菌素的产量显著增加。当缓冲溶液浓度为 0.08 mol/L 时,产量达到峰值。当浓度超过 0.2 mol/L 后,罗伊氏细菌素浓度急剧下降。这是因为当缓冲溶液浓度较低时,缓冲稳定性相对较差,甘油溶液 pH 不能稳定在最适值;当缓冲溶液浓度超过 0.08 mol/L 后,细胞有一定的自我调节能力,而超过一定浓度后,溶液中离子强度过高,影响细胞的生理活性,细胞转化能力急剧下降。

pH 值能显著影响罗伊氏乳杆菌内甘油脱水酶的活性,不同微生物来源的甘油脱水酶的最适 pH 差异较大。肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)和弗劳地枸橼酸杆菌(*C. freundii* DSM 30040)来源的甘油脱水酶,其最适 pH 为 8.5^[29-31]。与其他来源的甘油脱水酶相比,*L. reuteri* 来源的甘油脱水酶的最适 pH 偏低。马会亮等人研究发现罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*

CG001)中的甘油脱水酶最适 pH 在 6.2 左右^[32]。因此研究了不同 pH 值对 *L. reuteri* 生产罗伊氏细菌素的影响,并比较了用缓冲溶液控制恒定 pH 和只调节初始 pH 的差异。分别利用磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲体系控制甘油溶液保持不同的恒定 pH,以及用 HCl、NaOH 把甘油溶液配置成不同的初始 pH。分别检测酶转化 1 h 后罗伊氏细菌素产量。如图 2(b)所示,在两种不同的 pH 调节方式下,当 pH 6 时罗伊氏细菌素的产量都表现为最大值。并且在弱酸的条件下,有利于 *L. reuteri* 生产罗伊氏细菌素。



(a)

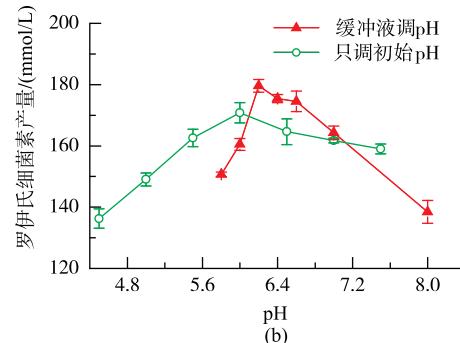


图 2 不同缓冲溶液浓度和 pH 对罗伊氏细菌素产量的影响

Fig. 2 Effects of buffer concentration and pH on the reuterin production

2.3 甘油浓度对罗伊氏细菌素产量的影响

甘油作为催化反应的底物,其浓度对罗伊氏细菌素产量有显著影响。作者研究了不同浓度的甘油作为底物,催化 1 h 后罗伊氏细菌素的产量,见图 3。甘油浓度低于 300 mmol/L 时,罗伊氏细菌素的产量随着甘油浓度的增加而增加,甘油转化为罗伊氏细菌素的比例(甘油转化率)均在 50% 以上。之后随着甘油浓度再增加,产量逐渐降低。实验表明,在一定范围内增加甘油浓度有利于罗伊氏细菌素产量的提高,由于甘油是罗伊氏乳杆菌的自杀底物,过高的甘油浓度会抑制菌体的生长。因此,静置培养时,

300 mmol/L 的甘油浓度是最适合的底物浓度,同时在实际生产时可以采取流加甘油的形式,使甘油浓度维持在一定范围,从而降低甘油对菌体的抑制作用。

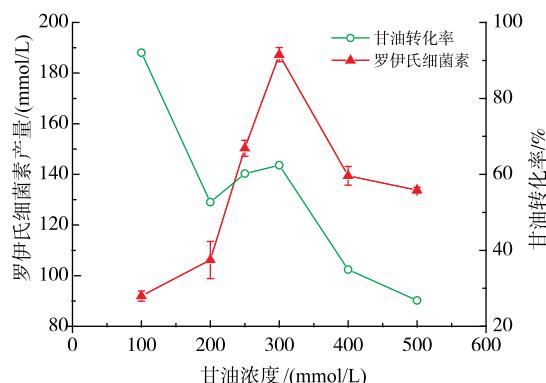


图 3 甘油浓度对罗伊氏细菌素产量的影响

Fig. 3 Effect of glycerol concentration on the reuterin production

2.4 酶转化时间对罗伊氏细菌素产量的影响

罗伊氏乳杆菌体内存在代谢甘油的还原途径^[3,33]。甘油经依赖辅酶 B₁₂ 的甘油脱水酶转化为罗伊氏细菌素^[30,34],再经依赖 NAD⁺的 1,3-丙二醇脱氢酶转化为 1,3-丙二醇^[35-37]。罗伊氏细菌素是甘油两步代谢的中间产物,酶转化时间能影响罗伊氏细菌素和副产物 1,3-丙二醇的产量。如图 4 所示,随着时间的增加,罗伊氏细菌素的产量显著增加,在 1 h 后达到最大值 154 mmol/L,之后随着反应时间的延长产量逐渐降低。由于甘油转化成罗伊氏细菌素的途径中,需要依赖辅酶 B₁₂ 的甘油脱水酶的催化,并且在催化的同时,辅酶 B₁₂ 的 C-Co 键由于底物甘油的作用,发生不可逆的断裂形成 5'-脱氧腺苷和烷基钴氨素类似物,而甘油脱水酶与形成的烷基钴氨素结合,致使甘油脱水酶失活^[38]。推测随着发酵时间的延长,胞内的甘油脱水酶由于甘油的自杀抑制作用逐渐失活。1 h 后大部分的甘油脱水酶失活,这时细胞不再能转化甘油,而胞内还残留有 NADH,罗伊氏细菌素经依赖 NADH 的 1,3-丙二醇脱氢酶继续转化形成 1,3-丙二醇;或是能转化少量甘油,但产生罗伊氏细菌素的量低于罗伊氏细菌素反应生成 1,3-丙二醇的量,这都能使得检测到的罗伊氏细菌素浓度降低。

2.5 接种量对罗伊氏细菌素产量的影响

甘油脱水酶作为反应的关键限速酶,其浓度直

接决定催化反应速率。在酶转化过程中,反应速率表现为甘油溶液中的细胞浓度。如图 5 所示,接种量从 20 mg/mL 增加到 80 mg/mL 时,罗伊氏细菌素产量呈线性增加;接种量超过 100 mg/mL 之后,随着接种量的增加,罗伊氏细菌素的产量反而减少。这可能是因为细胞浓度过高,细胞与甘油的接触比表面积减小,导致传质阻力增大而酶转化速率下降。

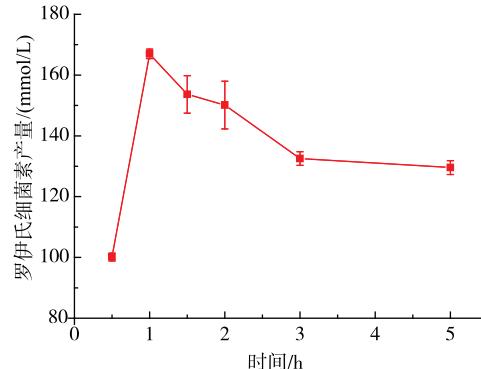


图 4 发酵时间对罗伊氏细菌素产量的影响

Fig. 4 Effect of enzyme conversion time on the reuterin production

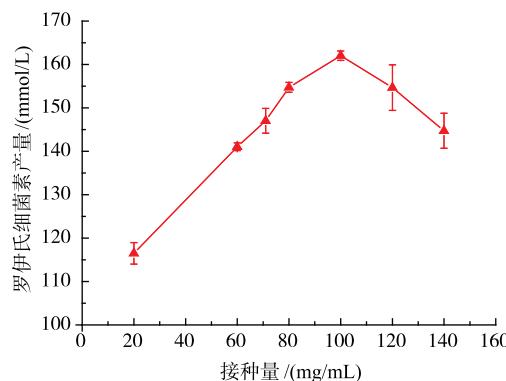


图 5 接种量对罗伊氏细菌素产量的影响

Fig. 5 Effect of cell concentration on the reuterin production

2.6 温度对罗伊氏细菌素产量的影响

温度不仅能影响细胞内甘油脱水酶的酶活,还能影响罗伊氏细菌素对细胞的毒害作用^[20],因此设置不同温度,观察温度对细胞产罗伊氏细菌素的影响。图 6 表明,30 °C 时罗伊氏细菌素的产量最大,同时在较低的温度下(20 °C),还能保持较高的罗伊氏细菌的产量,推测低温有利于罗伊氏细菌素的积累。此结果不同于 Chen 等人报道的罗伊氏乳杆菌酶转化的最佳温度为 37 °C,以及温度对酶转化影

响的规律^[18],但与 Doleires 等人研究的温度对罗伊氏乳杆菌 ATCC 53608 的影响结果相似^[20]。

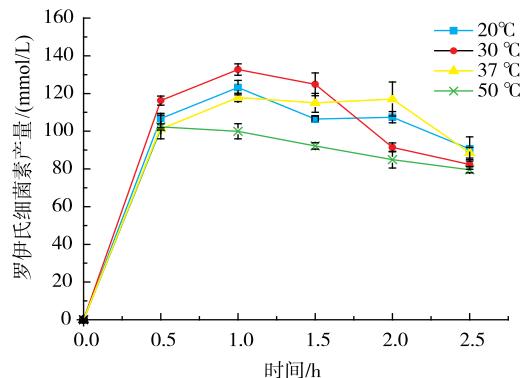


图 6 温度对罗伊氏细菌素产量的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the reuterin production

2.7 正交实验优化

在单因素实验的基础上,采用 L₁₆(4⁵)正交表设计实验,研究了缓冲溶液 pH 值、甘油浓度、酶转化时间、接种量、温度对罗伊氏细菌素产量的影响,实验安排及结果见表 1-2。

由表 2 可以看出,实验的 5 个因素对罗伊氏细菌素的产量都有极显著影响($P < 0.01$),影响罗伊氏细菌素产量因素的主次排序依次是: B (甘油浓度) $>$ D (接种量) $>$ C (时间) $>$ E (温度) $>$ A (pH)。根据多重比较确定各因素的最佳水平组合为 $B_4D_4C_4E_3A_4$, 其中 A_3 和 A_4 无显著性差异。考虑到甘油脱水酶的最适 pH 为 6.2,为了节约在实际应用中控制 pH 使用的碱液的量,最佳 pH 定为 6.2。因此,全细胞转化生产罗伊氏细菌素的最佳条件为:甘油浓度 400 mmol/L,接种量 110 g/L,酶转化时间 120 min,温度 30 °C,发酵 pH 6.2。

对最佳条件进行验证试验,6 次独立重复实验,罗伊氏细菌素平均产量达到(241.2±3.4) mmol/L,较

单因素实验中最佳产量提高了 30%。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factor level of orthogonal design

因素水平	A pH	B 甘油浓度/ (mmol/L)	C 时间/min	D 接种量/ (mg/mL)	E 温度/°C
1	5.5	250	45	80	20
2	5.8	300	60	90	25
3	6.2	350	90	100	30
4	6.5	400	120	110	37

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance for the orthogonal design

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
pH	880.629	3	293.543	118.359	< 0.01
甘油浓度	34 429.496	3	11 476.499	4 627.426	< 0.01
时间	2 874.269	3	958.090	386.310	< 0.01
接种量	9 012.012	3	3 004.004	1 211.241	< 0.01
温度	1 431.569	3	477.190	192.407	< 0.01
误差	119.045	48	2.480		

注: $R^2=99.8\%$, $R^2(\text{adjusted})=99.7\%$ 。

3 结语

研究发现,处于稳定期初期的 *L. reuteri*,其细胞内甘油脱水酶的酶活最大,有利于转化甘油生产罗伊氏细菌素。通过单因素和正交实验的优化,*L. reuteri* 转化甘油生产罗伊氏细菌素的产量达到了(241.2±3.4) mmol/L,生产的效率和产量得到了显著提高,为今后大规模的工业化生产提供一定的指导。

参考文献:

- [1] CASAS I A, DOBROGOSZ W J. Validation of the probiotic concept: confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals[J]. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2000, 12(4): 247-285.
- [2] VOLLENWEIDER S, GRASSI G, KONIG I, et al. Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(11): 3287-3293.
- [3] VOLLENWEIDER S, LACROIX C. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(1): 16-27.
- [4] AXELSSON L T, CHUNG T C, DOBROGOSZ W J, et al. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by

- Lactobacillus reuteri*[J]. **Microbial Ecology in Health & Disease**, 1989, 2(2):131-136.
- [5] MONTIEL R, MARTIN-CABREJAS I, LANGA S, et al. Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon[J]. **Food Microbiology**, 2014, 44(44):1-5.
- [6] LANGA S, LANDETE J M, MARTIN-CABREJAS I, et al. In situ reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products [J]. **Food Control**, 2013, 33(1):200-206.
- [7] LANGA S, MARTINCABREJAS I, MONTIEL R, et al. Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens[J]. **Journal of Dairy Science**, 2014, 97(10):6116-6121.
- [8] TALARICO T L, CASAS I A, CHUNG T C, et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*[J]. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, 1988, 32(32):1854-1858.
- [9] SUNG H W, CHEN C N, LIANG H F, et al. A natural compound(reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation[J]. **Biomaterials**, 2003, 24(8):1335-1347.
- [10] ZHANG D, LI R, LI J. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and L22 display probiotic potential in vitro and protect against Salmonella-induced pullorum disease in a chick model of infection[J]. **Research in Veterinary Science**, 2012, 93(1):366-373.
- [11] LIONETTI E, MINIELLO V L, CASTELLANETA S P, et al. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-Helicobacter pylori treatment in children;a randomized placebo controlled trial [J]. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 2006, 24(10):1461-1468.
- [12] CHEN C N, SUNG H W, LIANG H F, et al. Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues[J]. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2002, 61(3):360 - 369.
- [13] SLININGER P J, BOTHAST R J. Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 1986, 50(6):1444-1450.
- [14] BARBIRATO F, GRIVET J P, SOUCAILLE P, et al. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 1996, 62(4):1448-1451.
- [15] MILLS D E, BAUGH W D, CONNER H A. Studies on the formation of acrolein in distillery mashes[J]. **Applied Microbiology**, 1954, 2(1):9-13.
- [16] HUMPHREYS F B. Formation of acrolein from glycerol by *B. welchii*[J]. **Journal of Infectious Diseases**, 1924, 35(1):282-290.
- [17] SERJAK W C, DAY W H, VAN LANEN J M, et al. Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes[J]. **Applied Microbiology**, 1954, 2(1):14-20.
- [18] CHEN C N, LIANG H F, LIN M H, et al. A natural sterilant (reuterin) fermented from glycerol using *Lactobacillus reuteri*: fermentation conditions[J]. 2001, (21):205-212.
- [19] KINOVA S H, BILKOVA A. Isolation and identification of new lactobacilli from goatling stomach and investigation of reuterin production in *Lactobacillus reuteri* strains[J]. **Folia Microbiologica**, 2013, 58(1):33-38.
- [20] DOLEYRES Y, BECK P, VOLLENWEIDER S, et al. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2005, 68(4):467-474.
- [21] LUTHI-PENG Q, SCHÄRER S, PUHAN Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 60(1):73-80.
- [22] VANCAUWENBERGE J E, SLININGER P J, BOTHAST R J. Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde [J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 1990, 56(2):329-.
- [23] SARDARI R R R, DISHISHA T, PYO S H, et al. Semicarbazide-functionalized resin as a new scavenger for in situ recovery of 3-hydroxypropionaldehyde during biotransformation of glycerol by *Lactobacillus reuteri*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 192: 223-230.
- [24] STEVENS M J A, VOLLENWEIDER S, MERTES P, et al. Bisulfite as scavenger for enhanced biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri*[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2013, 79(41):239-245.
- [25] SARDARI R R, DISHISHA T, PYO S H, et al. Improved production of 3-hydroxypropionaldehyde by complex formation with bisulfite during biotransformation of glycerol[J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2013, 110(4):1243-1248.
- [26] CIRCLE S J, STONE L, BORUFF C S. Acrolein determination by means of tryptophane. a colorimetric micromethod [J]. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, 1945, 17(4):259-262.

- [27] TORAYA T, SHIRAKASHI T, KOSUGA T, et al. Substrate specificity of coenzyme B12-dependent diol dehydratase: Glycerol as both a good substrate and a potent inactivator[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1976, 69(2):475-480.
- [28] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2):248-254.
- [29] WANG F, QU H, TIAN P, et al. Heterologous expression and characterization of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(6):736-742.
- [30] SEIFERT C, BOWIEN S, GOTTSCHALK G, et al. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Eur J Biochem*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(8):2369-2378.
- [31] SHAO Jingwei, LIU Changjiang. Cloning and Sequencing of gene encoding α -subunit of glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2004, 23(2):27-30.(in Chinese)
- [32] MA Huiliang, CHEN Guo, ZHAO Jun. Characteristics and in situ reactivation of glycerol dehydratase in *Lactobacillus reuteri*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, 19(1):30-36.(in Chinese)
- [33] SUNG H W, CHEN C N, CHANG Y, et al. Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15):3203-3214.
- [34] TALARICO T L, AXELSSON L T, NOVOTNY J, et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1990, 56(4):943-948.
- [35] TALARICO T L, DOBROGOSZ W J. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1990, 56(56):1195-1197.
- [36] VEIGADACUNHA M, FOSTER M A. 1,3-Propanediol:NAD⁺ oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1992, 58(6):2005-2010.
- [37] AHRENS K, MENZEL K, ZENG A P, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 1998, 59(5):544-552.
- [38] TOBIMATSU T, KAJIURA H, YUNOKI M, et al. Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(13):4110-4113.

会议消息

会议名称:第 7 届食品安全与营养国际会议(ICFSN 2020)

会议时间:2020-03-13 至 2020-03-15

会议地点:兰阿姆斯特丹

主办单位:ICFSN 2020

联系人:蔺女士

电 话:+852-3500-0137

Email:icfsn@cbees.net

会议简介:(ICFSN 2020) 第 7 届食品安全与营养国际会议将于 2020 年 3 月 13-15 日在荷兰阿姆斯特丹隆重召开。ICFSN 2020 录用的文章能发表在国际论文集,并被 WorldCat, Google Scholar, Cross ref, ProQuest, CABI 等检索。三位顶级教授受邀参加会议并将为会议呈现学术前沿的大会报告和研究成果。第一位是来自 Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK 的教授 Martin A.J. Parry。第二位是来自 Polytechnic Institute of Viseu, Portugal 的教授 Raquel de Pinho Ferreira Guiné。第三位是来自西班牙巴塞罗那大学的教授 Jose Luis Araus Ortega。2020 年 3 月 15 日将在荷兰阿姆斯特丹将进行为期一日旅游和观光。

会议网址:<http://www.icfsn.org/>

投稿方式:<http://confsys.iconf.org/submission/icfsn2020>

会议邮箱:icfsn@cbees.net

联系电话:+852-3500-0137

会议专员:蔺女士