

酸马奶提取 *Kluyveromyces marxianus* 代谢抗菌复合物对致病性大肠杆菌的抑菌和细胞表面特性的影响

陈玉洁¹ 敖日格乐^{1*} 王纯洁² 斯木吉德¹

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古农业大学 兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】探究酸马奶提取马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)代谢产生的抗菌复合物 *K. marxianus* pH 2.0 和 *K. marxianus* pH 8.0 (简称为 K2 和 K8)对致病性大肠杆菌 *Escherichia coli* O₈ 的抑菌效果和细胞表面特性的影响。【方法】乙酸乙酯萃取法制备 K2 和 K8, 牛津杯法测定其对 *E. coli* O₈ 的抑菌圈, 高效液相色谱法测定其有机酸的组成, 试剂盒测定其毒素蛋白浓度, 肉汤稀释法测定其对 *E. coli* O₈ 的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC), 酶标比浊法测定其对 *E. coli* O₈ 生长曲线的影响, 微生物粘附法测定其对 *E. coli* O₈ 细胞表面疏水性的影响, 邻硝基苯 β-D-半乳糖苷(ONPG)法测定其对 *E. coli* O₈ 细胞膜渗透性的影响。【结果】乙酸乙酯萃取法获得抗菌复合物溶液, 其中 pH 2.0 水相与 pH 8.0 水相抑菌圈最大, 冻干得 K2 和 K8, 主要组分为丙酸等有机酸和毒素蛋白。K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MIC 分别为 0.025 g/mL 和 0.100 g/mL, MBC 分别为 0.100 g/mL 和 0.200 g/mL。K2 和 K8 能影响 *E. coli* O₈ 的生长曲线, 增加 *E. coli* O₈ 的疏水性和渗透性, 且 K2 优于 K8。【结论】酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 K2 和 K8 能抑制致病性 *E. coli* O₈ 生长, 影响其细胞表面特性。

关键词: 酵母菌, 抗菌复合物, 大肠杆菌, 疏水性, 渗透性

Effects of antimicrobial compounds of *Kluyveromyces marxianus* in Koumiss on pathogenic *Escherichia coli* and its cell surface characteristics

CHEN Yu-Jie¹ CHEN Aorigele^{1*} WANG Chun-Jie² HUASAI Simujide¹

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)
(2. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to investigate the effects of antimicrobial compounds of *Kluyveromyces marxianus* (K2 and K8) on wild pathogenic *Escherichia coli* and its cell surface characteristics. [Methods] K2 and K8 were extracted by ethyl acetate, and the inhibition zones of K2

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31060318, 31260570, 31260590); “十二五”国家科技支撑项目(No. 2012BAD12B09-3); 内蒙古自治区研究生教育创新计划项目(No. B20141012911)

*通讯作者: ✉: aori6009@163.com

收稿日期: 2014-09-28; 接受日期: 2015-03-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-06

and K8 against *E. coli* O₈ were determined by Oxford cup method. The organic acids were determined by HPLC, and the concentrations of killer toxin were determined by enhanced BCA Protein Assay Kit. The minimum inhibition concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by broth dilution method, the effects of K2 and K8 on the growth curve of *E. coli* O₈ were determined by turbidimetry. Moreover, the effects of K2 and K8 on the hydrophobicity of the *E. coli* O₈ cell surface was determined using the microbial adhesion to solvents method, and the permeation of *E. coli* O₈ cell membrane were determined by measuring the release of β -galactosidase activity into the culture medium using ONPG as a substrate. **[Results]** The aqueous phases of pH 2.0 and pH 8.0 had higher inhibition zones, they were dried for 48 h by freeze-drying, then, K2 and K8 were obtained, the main components were propanoic acid and some other organic acids, and killer toxins. The MICs of K2 and K8 were 0.025 g/mL and 0.100 g/mL, respectively. The MBCs of K2 and K8 were 0.100 g/mL and 0.200 g/mL, respectively. The growth curve of *E. coli* O₈ was S-shape. It changed obviously after adding K2 and K8. *E. coli* O₈ was basic character, and had a hydrophilic surface. The hydrophobicity increased after adding K2 and K8. In addition, the release of the β -galactosidase in permeation of *E. coli* O₈ was promoted gradually by K2 and K8, and it also caused membrane lesions allowing ONPG uptake into cells. These two factors resulted in the increasing permeation. K2 was better than K8. **[Conclusion]** K2 and K8 could inhibit the growth of pathogenic *E. coli* O₈ and influence its cell surface characteristics.

Keywords: Yeast, Antimicrobial compounds, *Escherichia coli*, Hydrophobicity, Permeation

酸马奶是一种较好的乳制品保健饮料,能滋养血管、舒缓心情和促进消化,从而治疗心血管、神经系统、肺结核和糖尿病等疾病^[1-2]。酵母菌是酸马奶中的主要微生物类群之一,主要包括乳糖发酵酵母、非乳糖发酵酵母和非糖发酵酵母3种类型^[3]。马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* 为乳糖发酵酵母菌,在酸马奶发酵过程中起着特殊的作用,与酸马奶的营养价值和医疗保健功能有关^[4]。*K. marxianus* 是内蒙古和新疆地区酸马奶样品中的优势酵母菌^[5-6]。Goerges 等报道 *K. marxianus* 可以减少单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 等有害菌的数量^[7-8],认为该酵母菌代谢过程中会产生有抑菌作用的抗菌复合物,如毒素蛋白、有机酸、抗生素因子、挥发性酸、过氧化氢等物质^[9]。但尚未见到对其抑菌作用机理研究的报道。

致病性 *Escherichia coli* 造成的犊牛腹泻是1-3日龄犊牛急性死亡的主要原因之一^[10],一般采用抗生素治疗,但近些年抗生素的滥用使许多致病性 *E. coli* 产生耐药性,增加了治疗病牛的难度,亟待寻求有效的绿色药物^[11]。酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢产生的抗菌复合物 *K. marxianus* pH 2.0 和 *K.*

marxianus pH 8.0 (简称为 K2 和 K8)有望治疗该病。鉴于此,本文研究了 K2 和 K8 的主要组分,及其对致病性 *E. coli* O₈ 的抑菌效果、MIC、MBC 和对 *E. coli* O₈ 生长曲线的影响,并且研究了 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞表面疏水性和细胞膜渗透性的影响。为深入利用酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物防控致病性 *E. coli* O₈ 所引发的动物腹泻提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

指示菌: *E. coli* O₈, 从奶牛直肠粪样中分离鉴定的内蒙古地区优势血清型的致病性 *E. coli*。

K. marxianus 菌株: 从酸马奶中分离鉴定的酵母菌菌株。

1.2 试剂及仪器

1号液体培养基(g/L, 麦芽提取物 39, 酵母浸膏 3, 细菌学蛋白胨 5, 乳糖 10, pH 6.0)和营养琼脂培养基, 广东环凯生物技术有限公司; 邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)、KNO₃、氯仿、n-十六烷、乙酸乙酯、HNO₃、KOH 和磷酸盐缓冲液(PBS), 上海国药试剂有限公司; 增强型 BCA 蛋白检测试

剂盒, 江苏碧云天生物技术研究所。

Multifuge X1R 离心机, 美国 Thermo Scientific Heraeus 公司; ModulyoD 冻干机, 美国 Thermo Electron 公司; 酶标仪, 美国 BioTek 公司。

1.3 方法

1.3.1 K2 和 K8 的制备: 将 *K. marxianus* 接种到 1 号液体培养基中 25 °C 培养 72 h, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜。将滤液分成两份, 一份滤液 pH 调到 2.0, 另一份 pH 调到 8.0。在两份溶液中分别加入 2 倍体积的乙酸乙酯后振荡 4 h, 进行萃取。分离有机相和水相, 有机相中加入 50 mL 灭菌水进行旋蒸, 除去乙酸乙酯, 留剩余液体; 将水相 6 000 r/min 离心 15 min, 留上清液。牛津杯法测定各相溶液对 *E. coli* O₈ (10⁸ CFU/mL) 的抑菌圈直径^[12]。测得 pH 2.0 水相和 pH 8.0 水相抑菌效果较好, 将其冻干, 所得干粉状物质即为 K2 和 K8^[13]。

1.3.2 K2 和 K8 主要组分的测定: 采用高效液相色谱法(GB/T5009.157-2003)测定 K2 和 K8 有机酸的组成。采用增强型 BCA 蛋白检测试剂盒测定 K2 和 K8 毒素蛋白浓度。

1.3.3 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MIC 和 MBC 的测定: 采用肉汤稀释法测定^[14]。取 96 孔板, 每排 1-6 孔加入肉汤 2 倍梯度稀释的 K2 和 K8, 每孔 100 μL, 共 6 个浓度, 分别为 0.200、0.100、0.050、0.025、0.013、0.006 g/mL。在 1-6 孔中加入 100 μL *E. coli* O₈ 菌悬液(10⁶ CFU/mL)。第 7 孔为空白对照(纯菌

液)。振荡混匀, 37 °C 培养 24 h, 观察结果。以空白对照中细菌生长呈混浊状为前提, 观察其他孔内混浊情况。若孔内混浊, 说明细菌生长; 若孔内透明, 说明无细菌生长。无细菌生长的 K2 和 K8 的最低浓度, 分别为 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MIC。从无细菌生长的各孔中取 100 μL 涂布于营养琼脂平板上, 37 °C 培养 24 h, 生长的菌落数低于 5-10 个的 K2 和 K8 最低浓度分别为 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MBC。实验重复 3 次。

1.3.4 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 生长曲线的影响: 用肉汤配制 5 mL K2 和 K8 (MIC 浓度), 加入 200 μL *E. coli* O₈ 菌悬液(约 1.0×10⁶-1.0×10⁷ CFU/mL), 设定空白对照(纯菌液), 37 °C、110 r/min 连续培养, 每隔 2 h 取样一次, 酶标仪测定 OD₆₃₀ 值, 在 *E. coli* O₈ 培养至稳定期后结束测定, 重复 3 次, 取平均值绘制生长曲线图^[15]。

1.3.5 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞表面特性的影响: (1) K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞表面疏水性的影响: 将生长到对数期的 *E. coli* O₈ 菌液 5 000 r/min 离心 10 min, 留沉淀, 用 0.1 mol/L 灭菌 PBS (pH 7.2) 洗 2 次, 然后重悬于 0.1 mol/L KNO₃ (pH 6.2) 中, 调整 *E. coli* O₈ 细胞浓度 (A₀) 为 OD₄₀₀=0.4 (约 1.0×10⁶-1.0×10⁷ CFU/mL)。按表 1 加入各溶液, 室温下孵育 10 min, 涡旋 2 min。静置 15 min 后快速吸取上清液, 测定 OD₄₀₀ (A₁), 以 0.1 mol/L KNO₃ 加 *E. coli* O₈ 细胞悬液为空白对照, *E. coli* O₈ 对各溶剂的粘附性计算公式为: (1-A₁/A₀)×100^[16]。

表 1 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞表面疏水性影响的实验方案

Table 1 The testing program of the effect of K2 and K8 on the hydrophobicity of *E. coli* O₈

分组 Groups	实验方案 Testing program
空白对照组 The control group	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL 0.1 mol/L KNO ₃
十六烷组 Hexadecane	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL Hexadecane
氯仿组 Chloroform	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL Chloroform
乙酸乙酯组 Ethyl acetate	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL Ethyl acetate
K2 组 K2 group	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL K2 (MIC 浓度)
K8 组 K8 group	1.2 mL <i>E. coli</i> O ₈ 细胞悬液+0.2 mL K8 (MIC 浓度)

(2) K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞膜渗透性的影响: 测定培养液中 β -半乳糖苷酶与 ONPG 反应生成黄色 o-硝基酚(ONP)的 OD 值, 确定 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 细胞膜渗透性的影响^[17]。将 *E. coli* O₈ 在含 2% 乳糖的 LB 培养基中培养到对数期, 5 000 r/min 离心 10 min, 留沉淀, 用 0.1 mol/L 灭菌 PBS 洗 2 次, 并重悬于 0.01 mol/L pH 7.5 PBS 中, 调整 *E. coli* O₈ 浓度为 10⁹ CFU/mL。在 96 孔板空白对照孔中加入 200 μ L *E. coli* O₈ 菌悬液和 10 μ L 0.03 mol/L ONPG, 实验孔中加入 *E. coli* O₈ 和 ONPG, 再加入 10 μ L K2 和 K8 (MIC 浓度)。37 °C 下培养, 测定 0、10、30、60、90、120 min 时各孔溶液的 OD₄₁₅。

将 K2、K8 (MIC 浓度) 分别和 *E. coli* O₈ 一起培养 60 min, 5 000 r/min 离心 10 min 移除细胞沉淀, 并测定无细胞上清液的 OD₄₁₅。每分钟每毫升生成的 ONP 的计算公式为: (A₄₁₅ × 1 000 / 样品体积(μ L)) / 反应时间(min) × 4.86, A₄₁₅ 为无细胞上清液的吸光值, 4.86 为 ONP 消光系数[L/(mmol·cm)]。每个样品重复 3 次。

1.3.6 数据分析: 采用 Excel 作图。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 K2 和 K8 的制备

由表 2 可知, *K. marxianus* 代谢抗菌复合物制备中各相溶液对 *E. coli* O₈ 的抑菌圈直径彼此之间呈显著性差异($P < 0.05$), 其中 pH 2.0 水相与 pH 8.0 水相抑菌圈最大, 冻干后得 K2 和 K8。pH 2.0 对照是将灭菌水 pH 调为 2.0 测得的抑菌圈, 可见低 pH 值本身对 *E. coli* O₈ 有抑菌作用, 但与 pH 2.0 水相的抑菌圈相比差别很大, 表明主要起抑菌作用的仍为抗菌复合物。

2.2 K2 和 K8 主要组分

由表 3 可知, K2 和 K8 含有多种有机酸, 其中丙酸最多, 并含有毒素蛋白。除乙酸外, 其他有机酸和毒素蛋白含量 K2 比 K8 多。

表 2 各相溶液对 *E. coli* O₈ 的抑菌圈直径
Table 2 The inhibition zones of each phase solutions against *E. coli* O₈

溶液 Solution	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)
pH 2.0 水相 pH 2.0 aqueous phase	24.31±0.81 ^a
pH 2.0 有机相 pH 2.0 organic phase	15.22±0.80 ^e
pH 2.0 混合相 Mixture of pH 2.0	20.76±0.46 ^c
pH 2.0 对照 pH 2.0 control	13.74±0.47 ^f
pH 8.0 水相 pH 8.0 aqueous phase	22.67±0.38 ^b
pH 8.0 有机相 pH 8.0 organic phase	8.17±0.08 ^g
pH 8.0 混合相 Mixture of pH 8.0	16.86±0.34 ^d
pH 8.0 对照 pH 8.0 control	—

注: 同列肩注字母不同者表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同者或未标注者表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

表 3 K2 和 K8 主要组分
Table 3 Main components of K2 and K8

抗菌复合物 Antimicrobial compounds	K2 (mg/100 g)	K8 (mg/100 g)
草酸 Oxalic acid	83.43	50.63
酒石酸 Tartaric acid	259.80	212.00
甲酸 Formic acid	484.80	248.10
抗坏血酸 Ascorbic acid	743.90	405.30
乙酸 Acetic acid	49.67	62.96
乳酸 Lactic acid	680.80	672.00
丙酸 Propionic acid	2 711.30	1 874.70
柠檬酸 Citric acid	281.10	190.00
苹果酸 Malic acid	673.10	13.15
蛋白浓度 Protein concentrations	74.99	74.13

2.3 K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MIC 和 MBC

由表 4 可知, K2 和 K8 对 *E. coli* O₈ 的 MIC 分别为 0.025 g/mL 和 0.100 g/mL; MBC 分别为 0.100 g/mL 和 0.200 g/mL。K2 的 MIC 和 MBC 低于 K8。

表4 K2和K8的MIC和MBC
Table 4 MIC and MBC of K2 and K8

抗菌复合物 Antimicrobial compounds	最小抑菌浓度 MIC (g/mL)	最小杀菌浓度 MBC (g/mL)
K2	0.025	0.100
K8	0.100	0.200

2.4 K2和K8对*E. coli* O₈生长曲线的影响

由图1可知,空白对照组*E. coli* O₈正常生长曲线呈S形,随着培养时间的延长其菌体浓度逐渐增加,0-6 h为*E. coli* O₈生长延滞期,8-12 h *E. coli* O₈进入对数期,12 h后进入生长稳定期。实验组添加K2和K8可以较好地抑制*E. coli* O₈的生长。

2.5 K2和K8对*E. coli* O₈细胞表面特性的影响

2.5.1 K2和K8对*E. coli* O₈细胞表面疏水性的影响:

由表5可知,乙酸乙酯组*E. coli* O₈疏水性最低,十六烷组与乙酸乙酯组疏水性无显著性差异($P>0.05$),空白对照组疏水性显著高于这两组($P<0.05$);其他组之间的疏水性差异显著($P<0.05$)。*E. coli* O₈对氯仿粘附性较高,对乙酸乙酯粘附性低,对十六烷粘附性较弱,推断*E. coli* O₈为强碱弱酸特性和相对亲水性。添加K2和K8后,增加了*E. coli* O₈疏水性,且K2比K8对*E. coli* O₈疏水性增加的幅度更大。

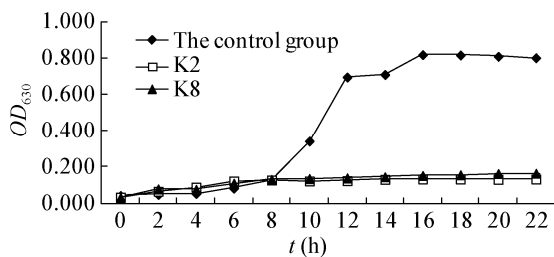


图1 K2和K8对*E. coli* O₈生长曲线的影响

Figure 1 Effect of K2 and K8 on the growth curve of *E. coli* O₈

表5 K2和K8对*E. coli* O₈细胞表面疏水性影响
Table 5 Effect of K2 and K8 on the hydrophobicity of *E. coli* O₈

组别 Groups	疏水性 Hydrophobicity (%)
空白对照组 The control group	50.37±2.28 ^d
十六烷组 Hexadecane	42.96±1.39 ^c
氯仿组 Chloroform	68.89±0.91 ^c
乙酸乙酯组 Ethyl acetate	42.22±0.91 ^c
K2组 K2 group	89.63±4.09 ^a
K8组 K8 group	81.85±3.63 ^b

注: 同列肩注字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 字母相同者或未标注者表示差异不显著($P>0.05$).

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.5.2 K2和K8对*E. coli* O₈细胞膜渗透性的影响:

由图2A可知,不同组别之间OD值差异显著($P<0.05$)。不同时间相比,0 min OD值最低;30 min显著高于0 min OD值($P<0.05$);60 min显著高于10 min内OD值($P<0.05$);60-120 min 3个时间点的OD值差异显著($P<0.05$)。随着作用时间的延长,K2和K8增加了培养液中的β-半乳糖苷酶,K2优于K8组。且培养液中β-半乳糖苷酶的增加速度0-30 min内低于30 min后。

由图2B可知,K2和K8两组之间β-半乳糖苷酶释放量值差异不显著($P>0.05$);但两组的β-半乳糖苷酶释放量值显著高于空白对照组($P<0.05$)。结合图2A可见,在60 min内,K2和K8使较多的β-半乳糖苷酶释放到无细胞上清液中与ONPG反应。但是,生成的ONP小于图2A中同等时间有细胞液体中的计算量[K2和K8组β-半乳糖苷酶释放量值分别为0.666 μmol/L ONP/(min·mL)和0.475 μmol/L ONP/(min·mL)]。表明K2和K8增加了*E. coli* O₈的渗透性,认为是*E. coli* O₈细胞膜损伤引起细胞质β-半乳糖苷酶的释放及细胞对ONPG的吸收共同作用的结果。

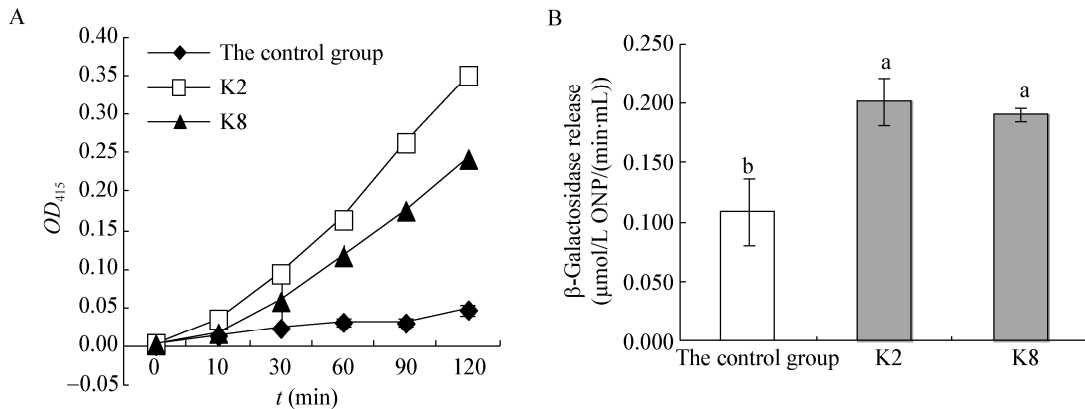


图2 K2和K8对*E. coli* O₈渗透性的影响

Figure 2 Permeation of *E. coli* O₈ by K2 and K8

注: A: 不同时间下的β-半乳糖苷酶活性; B: *E. coli* O₈细胞和K2和K8作用60 min后, 无细胞上清液中β-半乳糖苷酶活性。

Note: A: Activity of β-galactosidase at different time; B: Bacteria (after 60 min incubation) were removed after treated with K2 and K8, and the activity of β-galactosidase release was assayed in the cell-free supernatant.

3 讨论

有些酵母菌代谢会产生有机酸和毒素蛋白等抑菌物质, 产生有机酸和毒素蛋白的类型和多少取决于该酵母菌的来源和菌种特征。*K. marxianus* 代谢产生的抗菌复合物K2和K8中含有许多有机酸和毒素蛋白, 且K2多于K8。

K2和K8对致病性*E. coli* O₈的MIC分别为0.025 g/mL和0.100 g/mL, 结合其对*E. coli* O₈生长曲线的影响, 显示K2和K8可以有效抑制*E. coli* O₈生长, 与贺银凤报道相类似^[13]。常用中草药, 像甘草、大黄、苦参等药物, 其单药或几味药组合后对*E. coli*的MIC在0.004–0.375 g/mL之间^[18]。K2和K8的MIC值与常用中草药的MIC值较相近, 推断酸马奶提取*K. marxianus*代谢产生的抗菌复合物K2和K8与常用中草药对*E. coli*的抑菌效果相似。

菌液的OD值可以衡量菌液中细菌的数目, 因此, OD值的变化可以反映K2和K8对*E. coli* O₈抑菌作用的大小。空白对照组*E. coli* O₈正常生长曲线呈S形, 添加K2和K8后其生长曲线接近水平直线, 认为是酸马奶提取*K. marxianus*代谢产生的抗菌复合物K2和K8抑制了*E. coli* O₈对数生长期的菌体分裂。

*E. coli*细胞表面结构复杂, 同时有亲水性和疏水性位点。细胞表面的糖类蛋白多, 则疏水性较高; 而细胞表面的多糖、磷脂酸和其他细胞壁物质多, 则亲水性较高。十六烷是非极性溶剂, 氯仿是单极性酸性溶剂, 乙酸乙酯是单极性碱性溶剂。微生物粘附到十六烷的强弱可反映细菌表面是疏水性或亲水性。微生物粘附到氯仿和乙酸乙酯的数值的高低可以反映其电子供体(碱性)或电子受体(酸性)特性^[16,19]。结果显示:*E. coli* O₈为相对亲水性(表3), 且*E. coli* O₈是强电子供体弱电子受体, 呈强碱弱酸特征。K2为酸性, 与氯仿性质相似, 增加了*E. coli* O₈的疏水性。而K8为碱性, 与乙酸乙酯性质相似, 应该降低*E. coli* O₈的疏水性, 但实际结果不一致, 推测K8改变了*E. coli* O₈菌体表面极性和非极性残基的相对分布, 使菌体疏水性一面暴露在表面, 这还有待于进一步证实。

细菌受到乳糖诱导后均可产生β-半乳糖苷酶。ONPG是乳糖的替代物, β-半乳糖苷酶可将ONPG水解成半乳糖和黄色的ONP。因此, 可通过测定培养液中ONP的颜色变化确定β-半乳糖苷酶活性的大小。β-半乳糖苷酶位于细胞膜内, 胞外一般没有, 所以, 正常情况下胞外检测不到其活性。若细胞膜

的结构遭到破坏, 细胞膜的渗透性改变, β -半乳糖苷酶才会释放到胞外或 ONPG 进入到胞内, 则培养液的 OD 值会快速升高^[20-21]。从图 2 可知, K2 和 K8 作用于 *E. coli* O₈ 30 min 后, 溶液中 β -半乳糖苷酶与底物 ONPG 产生的 ONP 开始快速增加, 且 K2 比 K8 对 *E. coli* O₈ 渗透性影响更大, 此结果与疏水性结果相一致。

4 结论

酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢产生的抗菌复合物 K2 和 K8 的主要组分为有机酸和毒素蛋白, 且 K2 中含量高于 K8。

E. coli O₈ 正常生长曲线呈 S 形, 添加 K2 和 K8 能抑制 *E. coli* O₈ 生长。

添加 K2 和 K8 能增加 *E. coli* O₈ 的细胞表面疏水性, 并破坏其细胞膜, 增加细胞膜渗透性。

参考文献

- [1] Liu S, Han Y, Zhou Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651
- [2] Wu R, Wang L, Wang J, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 318-326
- [3] Khrisanfova LP. Antimicrobial properties of Koumiss from cow and mare milk[J]. Moloch Prom, 1969, 30(10): 16-19
- [4] Quan S, Burentegusi, Yu B. Microflora in Hurunge, traditional starter culture, from Inner Mongolia, China[J]. Animal Science Journal, 2006, 77(2): 235-241
- [5] Ishii S, Kikuchi M, Takao S. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from "Chigo" in Inner Mongolia, China[J]. Animal Science and Technology, 1997, 68(3): 325-329
- [6] Ni HJ, Bao QH, Sun TS, et al. Identification and biodiversity of yeasts isolated from Koumiss in Xinjiang of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 578-582 (in Chinese)
倪慧娟, 包秋华, 孙天松, 等. 新疆地区酸马奶中酵母菌的鉴定及其生物多样性分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 578-582
- [7] Goerges S, Aigner U, Silakowski B, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 313-318
- [8] Goerges S, Koslowsky M, Velagic S, et al. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(2): 83-89
- [9] Viljoen B. Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents[A]//Querol A, Fleet G. Yeasts in Food and Beverages[M]. Berlin: Springer, 2006: 83-110
- [10] Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(3): 497-503
- [11] Piao FZ, Xia C. The occurrence characteristics of cow disease and their popular trend[J]. Veterinary Orientation, 2011(2): 33-35 (in Chinese)
朴范泽, 夏成. 当前牛病的发生特点和流行趋势[J]. 兽医导刊, 2011(2): 33-35
- [12] Zhang GW, Hu MM, He L, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities *in vitro*[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 91(2): 158-168
- [13] He YF. Studies on isolation, identification of microorganisms and their antibacterial factors from Koumiss[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2008 (in Chinese)
贺银凤. 酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌因子的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2008
- [14] Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, et al. Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(10): 2226-2233
- [15] Lee HJ, Choi GJ, Cho KY. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46(2): 737-741
- [16] Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, et al. Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 1725-1731
- [17] Ibrahim HR, Sugimoto Y, Aoki T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1523(2/3): 196-205
- [18] Liu FL, Chen ZH, Feng CL, et al. Test on chinese herbal medicine against poultry colibacillosis *in vitro*[J]. China Poultry, 2003, 25(1): 14-16 (in Chinese)
刘富来, 陈志华, 冯翠兰, 等. 中草药对禽大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 中国家禽, 2003, 25(1): 14-16
- [19] Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial-cells[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, 7(1): 47-53
- [20] Jing YJ, Hao YJ, Qu H, et al. Preliminary studies on antibacterial mechanism and analysis of antibacterial activity of chitosans[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(6): 361-365 (in Chinese)
荆迎军, 郝友进, 渠晖, 等. 壳聚糖的抑菌活性分析及其抑菌机理的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(6): 361-365
- [21] Hou LX, Zhai P, Shi YH, et al. Effect on the bacterial cell surface characteristics and cell membrane of the antibacterial peptide of housefly (*Musca domestica*)[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 434-437 (in Chinese)
侯利霞, 翟培, 施用晖, 等. 家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性影响及其作用机理的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 434-437