

产抑菌活性物质菌株的筛选及其抑菌机理的研究

王文婧¹, 殷文政¹, 冀昌龙²

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

(2. 锡林郭勒盟疾病预防控制中心, 内蒙古锡林浩特 026000)

摘要: 从内蒙古锡林郭勒盟地区酸马奶酒中分离出的 9 株乳酸菌和 5 株酵母菌中筛选抑菌效果较好的菌株, 并对其发酵液的抑菌机理进行研究。以金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌肠亚种和荧光假单胞菌作为指示菌, 通过牛津杯琼脂扩散法筛选出乳酸菌 E13 和 D6 与酵母菌 J10A1 的共生发酵液具有较强的抑菌能力, 比乳酸菌单独发酵抑菌效果分别增加 2.48 mm 和 1.45 mm。两株乳酸菌产生的抑菌活性物质使沙门氏菌生长曲线延滞期延长, 对数期缩短, 对数期峰值降低; 电解质、可溶性总糖外渗, 导致菌液电导率和可溶性总糖含量增加; 糖吸收利用能力下降, 磷代谢先变缓慢, 随后趋于平稳。E13 产生的抑菌活性物质的抑菌性更强。结果表明, 乳酸菌产生的抑菌活性物质, 不仅破坏细菌的细胞壁和细胞膜结构, 还会影响菌体细胞代谢, 导致细菌无法进行正常的生长和繁殖, 从而发挥抑菌作用。

关键词: 酸马奶; 乳酸菌; 酵母菌; 混合发酵; 抗菌剂

文章编号: 1673-9078(2016)12-151-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.024

Screening of Antibacterial Active Substance-producing Strains and Determination of Antibacterial Mechanism

WANG Wen-jing¹, YIN Wen-zheng¹, JI Chang-long²

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

(2. Xilin Gol League Center for Disease Control and Prevention, Xilinhot 026000, China)

Abstract: A total of nine strains of lactic acid bacteria and five yeast strains isolated from koumiss from Xilin Gol League, Inner Mongolia, and strains with higher antibacterial capacity were screened, and antibacterial mechanism of their fermentation broth was studied. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp. Enteric, and *Pseudomonas fluorescens* were used as indicators, while co-fermentation of *Lactobacillus* D6 and E13 with yeast J10A1 was performed using oxford cup agar diffusion method. The antibacterial effects of *Lactobacillus* D6 and E13 exceeded that of lactic acid bacteria by 2.48 mm and 1.45 mm, respectively. The antibacterial substances produced by strains D6 and E13 affected *Salmonella* to a large extent. The lag phase of *Salmonella* growth curve was delayed and its logarithmic phase was shortened with logarithmic peak being reduced. Intracellular total soluble sugars and electrolytes were purged, leading to an increase in liquid conductivity and content of total soluble sugars in the *Salmonella* suspension. Sugar absorption capacity was decreased and phosphorus metabolism was reduced to a constant value. Antibacterial substances produced by E13 showed a stronger inhibitory action. The results showed that the antibacterial substances produced by lactic acid bacteria not only destroy the cell wall and cell membrane, but also affect the metabolism of bacteria, exerting an inhibitory effect by inhibiting normal growth and reproduction of the bacteria.

Key words: koumiss; lactic acid bacteria; yeast; fermentation; antibacterial agents

酸马奶, 又称马奶酒(koumiss), 是以鲜马奶为原料, 经乳酸菌和酵母菌共同发酵而成的一种乳酸—酒精发酵乳饮料^[1]。鲜马奶经微生物发酵剂发酵后, 可以形成抑制传染性疾

收稿日期: 2015-12-31

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2014MS0359)

作者简介: 王文婧(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 殷文政(1959-), 男, 教授, 研究方向: 食品微生物

[2,3]。乳酸菌可以产生有机酸、细菌素、过氧化氢和双乙酰等多种天然抑菌物质^[4]。细菌素(bacteriocin)是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成的一类具有抑菌活性的蛋白质或多肽, 能抑制食品中的多数腐败菌和致病菌的生长繁殖^[5,6]。Ishii 等^[7]研究发现: *Lactococcus lactis* 和 *Kluyveromyces marxianus* 混合培养过程中酵母菌可以不断中和代谢产物中的乳酸, 从而降低乳酸对乳酸菌生长的抑制, 使得产物 Nisin 不断富集^[8]。

抑菌机理 (Mode of Action) 是指杀菌剂通过影响靶标菌的某些生理生化过程导致菌体生长受到抑制或是死亡。关于抗菌物质抑菌机理的报道有很多, 一般认为抑菌剂的主要作用途径是膜攻击、抑制细胞呼吸或者抑制蛋白质的合成等^[9]。目前已知 Nisin 的抑菌机理是作用于细胞壁, 阻止细胞壁中肽聚糖的合成, 从而使细胞壁质膜与磷脂化的合成不能正常进行, 导致细胞内的物质和一些三磷酸腺苷渗漏到胞外, 最终使细胞破裂致死, 达到抑菌目的^[10]。

本研究从内蒙古锡林郭勒盟 (以下简称锡盟) 地区酸马奶酒中分离得到的乳酸菌和酵母菌中筛选抑菌效果较好的菌株, 并研究其发酵液的抑菌机理。通过测定抑菌活性物质对目标菌株作用前后生长曲线、电导率、可溶性总糖和磷代谢的变化, 研究酸马奶中生物活性物质对菌体细胞膜通透性和胞内分子代谢的影响, 为进一步研究马奶酒对病原菌的抑制作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

乳酸菌: 从内蒙古锡盟地区酸马奶酒中分离出的 9 株乳酸菌和 5 株酵母菌, 乳酸菌编号分别为 A1、A7、B2、C6、D6、E2、E13、E14 和 Y1。酵母菌编号为 J9A3、J10A1、J8C3、J9B1 和 J9B2。由内蒙古农业大学食品微生物实验室保存。

指示菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肠炎沙门氏菌肠亚种 (*Salmonella enterica subsp. enterica*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 购于中国科学院微生物研究所。

1.1.2 培养基

乳酸菌培养基: MRS 培养基, 脱脂乳培养基; 酵母菌培养基: 葡萄糖-酵母膏-蛋白胨 (YEPD) 培养基; 指示菌培养基: 普通肉汤培养基; 抑菌活性检测培养基: 水琼脂培养基和营养琼脂培养基。

配制方法见参考文献^[11,12]。

1.2 主要仪器设备

HFsafe-900 手动型生物安全柜, 上海力新仪器有限公司; 梅特勒 PB-10pH 计, 梅特勒托利多公司; KDC-140HR 高速冷冻离心机, 河南兄弟仪器设备有限公司; LRH-250 恒温生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; KG-SX-500 高压蒸汽灭菌器, 日本 Tomy Digital Biology 公司; T6 新悦可见分光光度计, 北京

普析通用仪器有限责任公司; IKA[®]RV 10 digital 型旋转蒸发仪, 广州仪科实验室技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 指示菌悬液的制备

指示菌接种于普通肉汤培养基, 金黄色葡萄球菌和肠炎沙门氏菌于 37 °C 培养 24 h, 荧光假单胞菌于 26 °C 培养 48 h, 连续活化培养三代, 利用平板活菌计数法将各菌株用无菌生理盐水配制成浓度为 10⁶ CFU/mL 的菌悬液作为指示菌悬液, 备用。

1.3.2 乳酸菌、酵母菌混合代谢产物的制备

供试乳酸菌和酵母菌活化三代, 以体积分数 2% 接种到 MRS 液体培养基和 YEPD 液体培养基中, 分别于 37 °C 培养 50 h 和 30 °C 培养 70 h 制成母发酵液, 将乳酸菌和酵母菌母液以体积比 2%:2% 的接种量接种于脱脂乳培养基, 共生发酵先在 30 °C 摇床培养 12 h, 再转到 37 °C 静置培养 20 h。发酵液 8000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.45 μm 孔径的滤菌器过滤, 收集无细胞发酵上清液, 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 产抑菌活性物质乳酸菌的筛选

初筛: 采用牛津杯琼脂扩散法^[13]进行初筛。指示菌悬液浓度为 10⁶ CFU/mL, 取混有指示菌悬液的营养琼脂培养基倾注于放有牛津杯的平皿中, 制成带孔的含菌平板。将乳酸菌代谢物 200 μL 注入小孔内, 4 °C 冰箱扩散 3~5 h, 将含沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的平皿 37 °C 培养 10 h, 含荧光假单胞菌的平皿 26 °C 培养 16 h 后, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。选取对三株指示菌均有较好抑菌效果的菌株进行复筛试验。

复筛: 将代谢物排除有机酸和过氧化氢进行复筛。将空白脱脂乳培养基分别用乳酸和乙酸调节 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 进行抑菌试验, 确定有机酸排除的对照 pH 值。将代谢物调至 pH 7.0, 按浓度 10 mg/mL 加入过氧化氢酶, 37 °C 水浴 2 h 后调至有机酸排除对照 pH 值, 在旋转蒸发仪中浓缩 10 倍, 以相同 pH 值的乳酸和乙酸作为对照, 采用牛津杯法进行抑菌试验。

1.3.4 抑菌活性物质对指示菌生长曲线的影响

在 5 mL 普通肉汤培养基中加入含活菌数为 10⁶ CFU/mL 的沙门氏菌悬液和体积分数为 2% 和 6% 的浓缩 20 倍代谢物, 以加等量无菌水作为空白对照, 37 °C 恒温培养, 每隔 2 h 在 600 nm 处测吸光值, 连续测定 38 h, 制作沙门氏菌在抑菌物质作用下的生长曲线。

1.3.5 抑菌活性物质对指示菌细胞膜通透性的影响

采用电导率法^[14]测定指示菌细胞膜离子通透性的变化。分别取 50 mL 菌浓度为 10^6 CFU/mL 的沙门氏菌菌悬液, 加入体积分数为 2%、3% 和 4% 的 20 倍浓缩代谢物, 以加等量无菌水作为空白对照, 37 °C 恒温培养。分别在 0、0.5、1、2、3、6 和 9 h 取出菌悬液 5 mL, 离心(4000 r/min, 10 min), 上清液用于电导率的测定。

1.3.6 抑菌活性物质对指示菌液中可溶性总糖含量的影响

采用蒽酮法^[15]测定指示菌液中可溶性总糖含量。在浓度为 1 mg/mL 葡萄糖溶液中加入沙门氏菌菌悬液, 调节菌浓度为 10^6 CFU/mL, 分别加入体积分数为 2%、3% 和 4% 的 20 倍代谢物浓缩液, 以加等量无菌水作为空白对照。37 °C 分别处理 0、2、4、6、8、10 和 12 h 后取出 1 mL 离心 (4000 r/min, 10 min), 取上清液, 加入蒽酮试剂, 混匀后置于沸水浴中加热 10 min, 冷却后测定其在 620 nm 处吸光值, 以标准葡萄糖溶液作标准曲线, 从标准曲线中查得相应的总糖含量。

1.3.7 抑菌活性物质对指示菌磷代谢的影响

根据翟培等^[16]的方法测定指示菌液中的总磷含量。用活化三代指示菌, 以 0.1 mol/L, PH=7.4 的磷酸缓冲液稀释菌体, 获得 10^6 CFU/mL 的菌悬液。取

0.5 mL 菌悬液加入 40 mL 浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖溶液和 10 mL 0.04 mg/mL 的磷标准溶液, 分别加入体积分数为 2%、3% 和 4% 的 20 倍代谢物浓缩液, 以加等量无菌水作为空白对照。混匀后 37 °C 处理 0、2、4、6、8、10 和 12 h 后取出 1 mL 于离心管, 用三氯乙酸-硫酸亚铁和钼酸铵溶液处理后, 30 °C 恒温水浴 15 min, 在 630 nm 处测吸光值。

1.3.8 数据统计分析

数据采用 SPSS 22.0 软件的 ANOVA 进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 产抑菌活性物质乳酸菌的筛选

2.1.1 初筛

以肠炎沙门氏菌肠亚种、荧光假单胞菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 对分离出的均具有抑菌活性的 9 株乳酸菌进行抑菌试验。由表 1 可知, 乳酸菌对不同指示菌表现出不同的抑菌活性, 其中 D6、E2、E13 和 E14 的抑菌作用比较显著, 对各指示菌的抑菌圈直径均在 20 mm 以上, 选取这 4 株乳酸菌进行下一步的复筛试验。

表 1 产抑菌活性物质乳酸菌的初筛结果

Table 1 Preliminary screening result of lactic acid bacteria producing antibacterial active substances

| 指示菌 | 抑菌圈直径/mm | | | | |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | A1 | A7 | B2 | C6 | D6 |
| 沙门氏菌 | 16.90±0.17 | 17.59±0.06 | 18.83±0.21 | 17.70±0.10 | 24.49±0.27 |
| 荧光假单胞菌 | 13.50±0.43 | 15.71±0.69 | 14.03±0.39 | 18.21±0.52 | 20.94±0.76 |
| 金黄色葡萄球菌 | 15.28±0.38 | 16.53±0.35 | 16.85±0.51 | 18.48±0.29 | 20.82±0.56 |
| 指示菌 | 抑菌圈直径/mm | | | | |
| | E2 | E13 | E14 | Y1 | |
| 沙门氏菌 | 24.87±0.09 | 26.20±0.07 | 22.42±0.31 | 16.07±0.14 | |
| 荧光假单胞菌 | 22.34±0.61 | 23.93±0.47 | 20.75±0.28 | 14.31±0.17 | |
| 金黄色葡萄球菌 | 24.02±0.25 | 24.75±0.19 | 21.36±0.21 | 15.55±0.46 | |

注: 表中数值为三次试验的平均值±标准误差; 牛津杯直径 8 mm, 下同。

2.1.2 复筛

将乳酸菌代谢物排除过氧化氢, 并把 pH 值调整为排除酸影响 pH 值 5.0 后, 4 株供试菌株均保持较好的抑菌活性, 说明供试菌株的代谢物中含有除乳酸、乙酸和过氧化氢以外的其他抑菌活性物质。从表 2 可以看出, 菌株 D6 和 E13 的抑菌活性较好, 4 株供试菌株对沙门氏菌的抑菌活性显著高于其他两株指示菌, 所以选择 D6 和 E13 作为混合发酵的试验菌株,

选择沙门氏菌作为研究抑菌机理的指示菌。

将 5 株酵母菌与 D6 和 E13 混合发酵, 与乳酸菌单独发酵的抑菌圈大小进行比较, 结果见表 3。酵母菌 J10A1 和乳酸菌 E13 和 D6 的共生发酵比乳酸菌单独发酵抑菌效果分别增加 2.48 mm 和 1.45 mm 左右, 具有极显著 ($p<0.01$) 促进抑菌物质生成的效果, 所以选择 J10A1 和乳酸菌 E13、D6 共生发酵作进一步试验。

表2 产抑菌活性物质乳酸菌的复筛结果

Table 2 Rescreening result of lactic acid bacteria producing antibacterial active substances

| 指示菌 | 抑菌圈直径/mm | | | |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| | D6 | E2 | E13 | E14 |
| 沙门氏菌 | 25.02±0.27 | 24.64±0.09 | 25.82±0.50 | 24.18±0.17 |
| 荧光假单胞菌 | 23.95±0.55 | 23.78±0.42 | 24.58±0.26 | 23.05±0.31 |
| 金黄色葡萄球菌 | 24.44±0.23 | 24.17±0.07 | 24.66±0.19 | 23.01±0.29 |

表3 混合发酵液的抑菌效果

Table 3 Antibacterial effect during mixed fermentation

| 乳酸菌 | 抑菌圈直径/mm | | | | |
|-----|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| | J9A3 | J10A1 | J8C3 | J9B1 | J9B2 |
| D6 | -2.08±0.28** | +1.45±0.22** | -0.29±0.19 | +0.43±0.19* | -0.36±0.12 |
| E13 | -0.61±0.10* | +2.48±0.20** | +0.41±0.31 | +0.31±0.11 | +0.75±0.09* |

注：表中“+”为混合培养促进抑菌效果，“-”为混合培养抑制抑菌效果；“*”为实验组与对照组比较差异显著 ($p < 0.05$)，“**”为实验组与对照组比较差异极显著 ($p < 0.01$)。

2.2 抑菌活性物质对指示菌生长曲线的影响

菌液光密度值 (OD 值) 的变化可以间接反映抑菌活性物质对沙门氏菌生长的影响程度, 在适宜生长条件下, 菌体生长表现出具有规律性的 4 个阶段: 延滞期、对数期、稳定期以及衰亡期。图 1 显示, 与对照组正常生长的沙门氏菌相比, 试验组生长曲线相对较为平缓, 延滞期延长, 且对数期的峰值低于对照菌。E13 所产抑菌物质作用下的沙门氏菌受到更大的影响, 说明菌株 E13 对沙门氏菌的抑菌作用强于菌株 D6, 且随着加入 20 倍浓缩代谢物的体积分数由 2% 增加到 6%, 生长曲线变化明显, OD_{600nm} 增加的幅度大大减小, 说明在一定范围内, 抑菌活性物质的抑菌作用随其浓度的增加而增强。

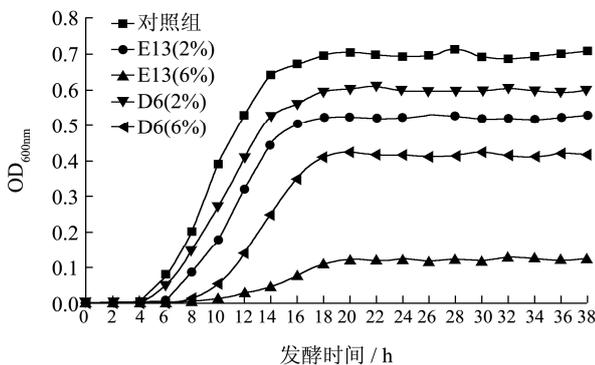


图1 抑菌活性物质对沙门氏菌生长曲线的影响

Fig.1 Effect of antimicrobial active substances on the growth curve of *Salmonella*

2.3 抑菌活性物质对指示菌细胞膜通透性的影响

细胞膜是细菌的保护屏障, 而强抑菌剂能破坏细菌的细胞膜, 导致菌体的保护屏障被打破, 其内部电解质 (如 K^+) 渗漏到细胞外的培养液中, 使培养液的电导率上升。因此, 菌液电导率的变化可以反映抑菌物质对指示菌细胞膜通透性的影响^[17]。

排除浓缩代谢物自身的电导率影响 (见表 4), 沙门氏菌菌悬液的电导率变化如图 2 和图 3 所示, 试验组和对照组的电导率在 0~0.5 h 下降, 其原因可能是菌悬液中的电解质与细胞膜外表面发生了静电结合, 导致带电离子减少。2~3 h 试验组电导率显著高于对照组, 说明抑菌物质在 2 h 抑菌作用明显。随着所加代谢物体积分数的增大, 试验组电导率也随之增大, 说明抑菌活性物质浓度越高对细胞膜的破坏越大。观察相同时间的电导率值, E13 高于 D6, 说明 E13 产生的抑菌活性物质对沙门氏菌细胞膜通透性的影响大于 D6。

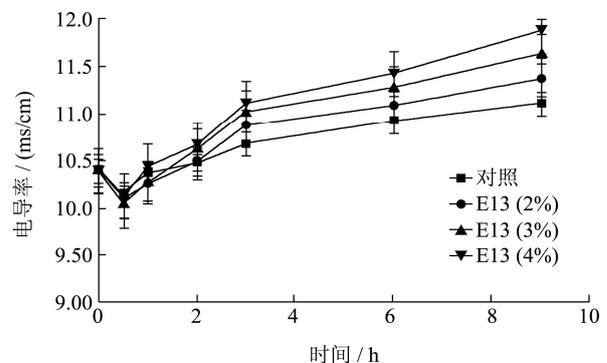


图1 E13 产抑菌活性物质对沙门氏菌菌悬液电导率的影响

Fig.2 Effect of antimicrobial active substances from E13 on the electrical conductivity of *Salmonella* suspension

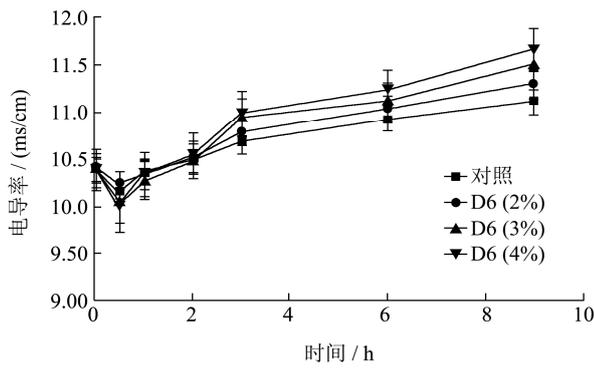


图3 D6 产抑菌活性物质对沙门氏菌悬液电导率的影响
Fig.3 Effect of antimicrobial active substances from D6 on the electrical conductivity of *Salmonella* suspension

表4 浓缩代谢物电导率

| 乳酸菌 | 电导率/(ms/cm) | | |
|-----|-------------|------|------|
| | 2% | 3% | 4% |
| E13 | 3.37 | 4.96 | 6.40 |
| D6 | 2.12 | 3.05 | 4.07 |

2.4 抑菌活性物质对指示菌液中可溶性总糖含量的影响

糖类是微生物主要的碳源和能源。细菌处于正常生理状态时，会吸收利用外源的营养成分，而当膜结构遭到破坏时，细胞内容物包括糖类发生外泄，菌液糖浓度的变化，可以反映细菌膜结构的完整性^[18]。

2.4.1 葡萄糖标准曲线的绘制

以标准葡萄糖溶液作标准曲线，结果如图4所示。可得其线性回归方程为 $y=0.7606x+0.0184$ ，其中 $R^2=0.9937$ ($0.9937>0.99$)。

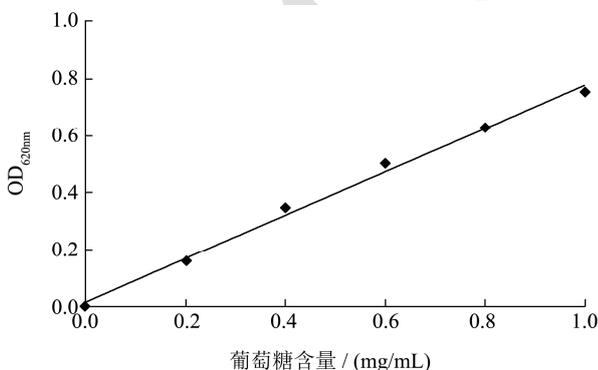


图4 葡萄糖标准曲线

Fig.4 Standard curve of glucose

2.4.2 菌液中总糖含量的变化

沙门氏菌与不同体积分数代谢浓缩物混合处理不同时间后，在 620 nm 处测吸光值，从标准曲线中查得相应的总糖含量，排除代谢浓缩物本身葡萄糖含量

影响（见表5），结果见图5和图6。经抑菌物质作用后，试验组菌液中可溶性总糖含量先升高，这说明沙门氏菌的细胞膜结构遭到破坏，使胞内糖类物质外渗；4 h 后试验组糖含量均有不同程度下降，说明细菌开始增殖，利用培养基中的糖类物质。但相对于对照组降低程度较小，表现出对糖吸收利用能力的下降，干扰菌体正常生长代谢。代谢物体积分数越大，以上抑菌表现越突出，对沙门氏菌生长代谢影响越大。

表5 浓缩代谢物葡萄糖含量

Table 5 Glucose content of concentrated metabolites

| 乳酸菌 | 葡萄糖含量/(mg/mL) | | |
|-----|---------------|------|------|
| | 2% | 3% | 4% |
| E13 | 3.85 | 5.71 | 7.55 |
| D6 | 5.11 | 6.83 | 8.46 |

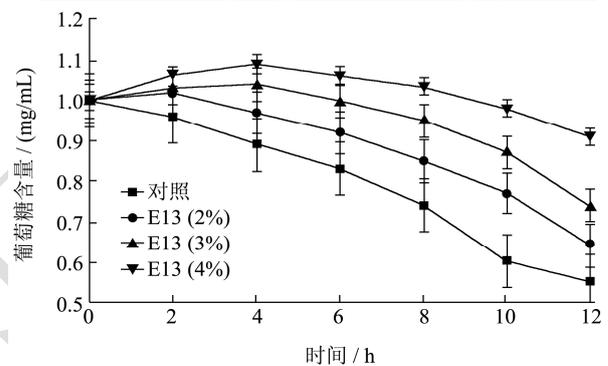


图5 E13 产抑菌活性物质对沙门氏菌悬液中可溶性总糖的影响

Fig.5 Effect of antimicrobial active substances from E13 on soluble total sugar content of *Salmonella* suspension

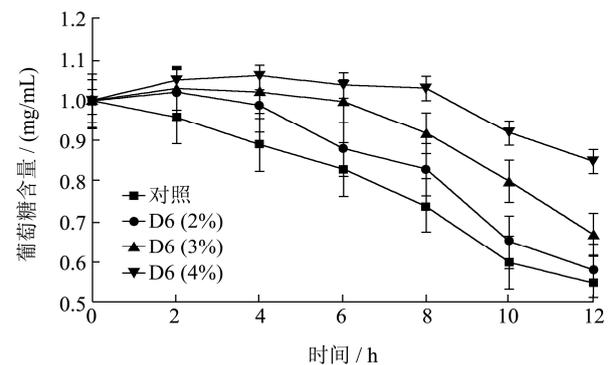


图6 D6 产抑菌活性物质对沙门氏菌悬液中可溶性总糖的影响

Fig.6 Effect of antimicrobial active substances from D6 on soluble total sugar content of *Salmonella* suspension

2.5 抑菌活性物质对指示菌磷代谢的影响

磷是所有包括微生物在内的生物所需要的微量元素，它是核酸、磷脂以及糖代谢中间产物的重要组成成分，而且在细胞的能量代谢中起到十分关键的作用^[19]。细菌利用葡萄糖经过一系列磷酸化反应过程，是

细菌生长繁殖所需能量的主要途径。通过检测细胞代谢活动中磷的消耗状况可反映细菌细胞的整体代谢功能和生长状态^[16]。排除代谢浓缩物本身磷含量影响(见表6),沙门氏菌菌液中磷含量变化如图7和8所示,OD_{630nm}值越高,表示菌液中磷含量越高。与对照组相比,试验组磷消耗量均随着作用时间的延长而逐渐降低,抑菌物质体积分数增大后,磷代谢先变缓慢,随后趋于平稳,表明沙门氏菌的磷代谢受到严重影响。由此可知两株乳酸菌产生的抑菌活性物质不仅破坏细菌的细胞壁和细胞膜结构,还会影响细菌的细胞代谢,导致细菌死亡。

表6 浓缩代谢物磷含量

Table 6 Phosphorus content of concentrated metabolite

| 乳酸菌 | OD _{630nm} | | |
|-----|---------------------|-------|-------|
| | 2% | 3% | 4% |
| E13 | 0.855 | 1.395 | 1.703 |
| D6 | 1.174 | 1.630 | 1.945 |

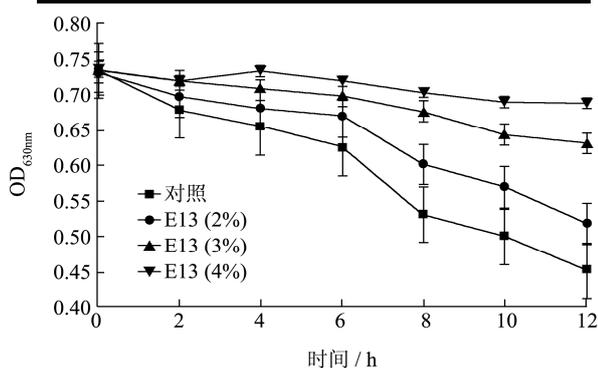


图7 E13产抑菌活性物质对沙门氏菌磷代谢的影响

Fig.7 Effect of antimicrobial active substances from E13 on phosphorus metabolism of *Salmonella*

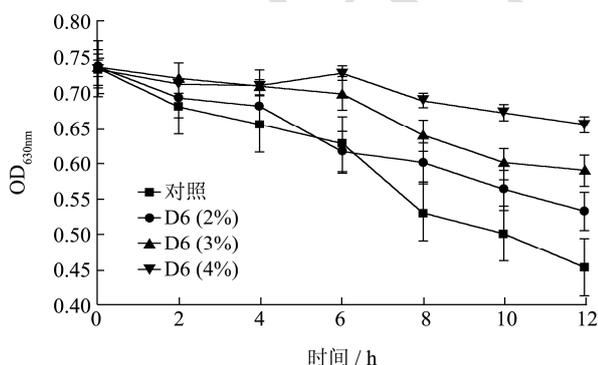


图8 D6产抑菌活性物质对沙门氏菌磷代谢的影响

Fig.8 Effect of antimicrobial active substances from D6 on phosphorus metabolism of *Salmonella*

3 结论

3.1 经过初筛和复筛,酵母菌 J10A1 和乳酸菌 E13、D6 共生发酵,比乳酸菌单独发酵抑菌效果分别增加

2.48 mm 和 1.45 mm,对抑菌活性物质的形成表现出极显著($p < 0.01$)的促进作用。沙门氏菌对 E13 和 D6 产生的抑菌活性物质敏感,经抑菌活性物质作用后,其生长曲线延滞期延长,对数期缩短,对数期的峰值明显降低;菌体细胞内电解质和可溶性总糖外渗,菌液电导率和可溶性总糖含量增加,说明抑菌活性物质能改变沙门氏菌细胞膜的通透性;糖吸收利用能力下降,磷代谢先变缓慢,随后趋于平稳,细胞代谢受到严重影响。

3.2 研究结果表明,乳酸菌产生的抑菌活性物质,不仅破坏细菌的细胞壁和细胞膜结构,还会影响细菌的细胞代谢,导致细菌无法进行正常的生长和繁殖,从而发挥抑菌作用。菌株 E13 产生的抑菌活性物质的抑菌活性强于菌株 D6。

参考文献

- [1] 殷文政,乌尼,钱建伟,等.锡林郭勒牧区马奶酒生物活性动态的研究(一)[J].内蒙古农业大学学报,2001,23(1):9-16
YIN Wen-zheng, WU Ni, QIAN Jian-wei, et al. Study on biological activity dynamic of kumys from Xilinguole(一) [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 2001, 23(1): 9-16
- [2] 殷文政,刘立一,马玉玲,等.马奶酒抑菌活性的研究[J].中国乳品工业,2005,33(7):15-17
YIN Wen-zheng, LIU Li-yi, MA Yu-ling, et al. Study on inhibitory affection pathogens of kumis [J]. China Dairy Industry, 2005, 33(7): 15-17
- [3] Szakaly S. Role of fermented milk products in protection of human health [J]. Tejgazdasag, 1999, 59(2): 15-18
- [4] Gulahmadov S G, Abdullaeva N F, Guseinova N F, et al. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from azerbaijan cheeses [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, 45: 266-271
- [5] De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria production, purification, and food application [J]. Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology, 2007,13(4):194-199
- [6] 黎杰,韩磊,殷文政.一株产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素特性研究[J].安徽农业科学,2015,43(22):225-227,230
LI Jie, HAN Lei, YIN Wen-zheng. Screening of bacteriocin-producing *Lactic acid bacteria* and the characteristics of bacteriocin [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(22): 225-227, 230
- [7] Ishii S, Kikuchi M, Takao S. Identification of compounds

- causing symbiotic growth of *Lactobacillus piracies* subsp. tolerance and *kluyveromyces marxianus* var.lactis in chigo, inner mongolia. China [J]. Animal Science Journal, 1999, 70(2): 81-89
- [8] Shimizu H, Mizuguchi T, Tanaka E, et al. Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus Lactis* and *Kluyveromyces Marxianus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 3134-3141
- [9] LI Jun-lin, YANG Xiao-hui, WANG Teng-fei, et al. Studies on antibacterial mechanism of 10-hda against staphylococcus aureus [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(12): 73-79
- [10] 丁立孝,何国庆,孔青,等.微生物防腐剂在食品工业中应用现状及发展前景[J].粮食加工与食品机械,2002,11:29-32
DING Li-xiao, HE Guo-qing, KONG Qing, et al. Application status and development prospect of microbial preservatives in food industry [J]. Food Processing and Food Machinery, 2002, 11: 29-32
- [11] 贾盘兴,蔡金科.微生物遗传学实验技术[M].北京:科学出版社,1992
JIA Pan-xing, CAI Jin-ke. Experimental technique of microbial genetics [M]. Beijing: Science Press, 1992
- [12] 周庆德.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986
ZHOU Qing-de. Microbiology laboratory manual [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986
- [13] 石金舟,陈丽园,张明.1株产细菌素乳酸菌的筛选和鉴定[J].中国微生态学杂志,2005,17(6):413-414
SHI Jin-zhou, CHEN Li-yuan, ZHANG Ming. Identification and screening of bacteriocin-producing *Lactic acid Bacteria* strains [J]. Journal of Chinese Microecology, 2005, 17(6): 413-414
- [14] 陈忠军,李海瑄,高鹤尘.乳杆菌产生的抑菌活性物质对酵母细胞膜通透性的影响[J].中国乳品工业,2015,43(2):28-31
CHEN Zhong-jun, LI Hai-xuan, GAO He-chen. Study on the Effect of active substances produced by *lactobacillus* on permeability of the yeast cell membrane [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(2): 28-31
- [15] 钱丽红,陶妍,谢晶.茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J].微生物学通报,2010,37(11):1628-1633
QIAN Li-hong, TAO Yan, XIE Jing. Antimicrobial mechanisms of tea polyphenol against staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa [J]. Microbiology Bulletin, 2010, 37(11): 1628-1633
- [16] 翟培,韩晋辉,侯丽霞,等.家蝇抗菌肽的抑菌动力学研究及其机理初探[J].中国生物工程杂志,2006,26(11):33-39
ZHAI Pei, HAN Jin-hui, HOU Li-xia, et al. Investigate antibiosis dynamics and antibacterial mechanisms of antibacterial peptides from muscadomestica larvae [J]. China Biotechnology, 2006, 26(11): 33-39
- [17] M T Madigan, J M Martinko. Brock biology of microorganisms [M]. Beijing: Science Press, 2009: 95-113
- [18] 曾亮,黄建安,李赤翎,等.儿茶素的抑菌效果及机理研究[J].食品工业科技,2009,30(5):89-92
ZENG Liang, HUANG Jian-an, LI Chi-ling, et al. Research on the Bacteriostatic activity and mechanism of catechins [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(5): 89-92
- [19] 刘志恒.现代微生物学[M].北京:科学出版社,2008
LIU Zhi-heng. Current microbiology [M]. Beijing: Science Press, 2008