



益生菌抑制曲霉菌生长及产毒机理

厚德達理

勵志勤工



实验背景

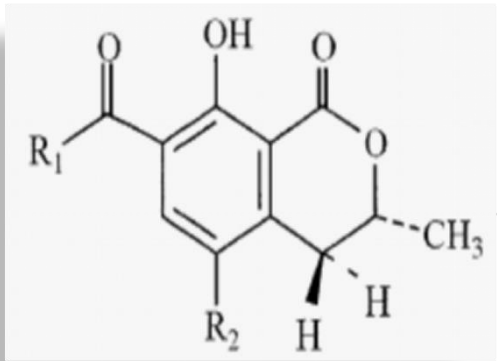
- 赭曲霉毒素A（OTA）在我国污染较为严重，在红酒中OTA阳性率达57%，超过国家限量标准；
- 抑制OTA产生菌的生长是防止食品和饲料中OTA污染最可靠的方法；
- Lappa等人分析了植物乳杆菌能抑制炭黑曲霉的生长，通过转录组分析发现植物乳杆菌可以显著下调AcOTA-nrps和laeA基因的表达，100%抑制炭黑曲霉产生OTA毒素。



赭曲霉毒素(OTA)、炭黑曲霉、赭曲霉、乳杆菌

- 赭曲霉毒素A（OTA）是一种有毒的真菌次级代谢产物；
- 赭曲霉、炭黑曲霉都是赭曲霉毒素A的主要产生菌，是造成葡萄污染的主要来源；
- 乳杆菌可以抑制真菌生长发育和毒素合成基因的转录，对OTA产生菌有很好的抑制活性。

实验目的



赭曲霉毒素化学式

• 1

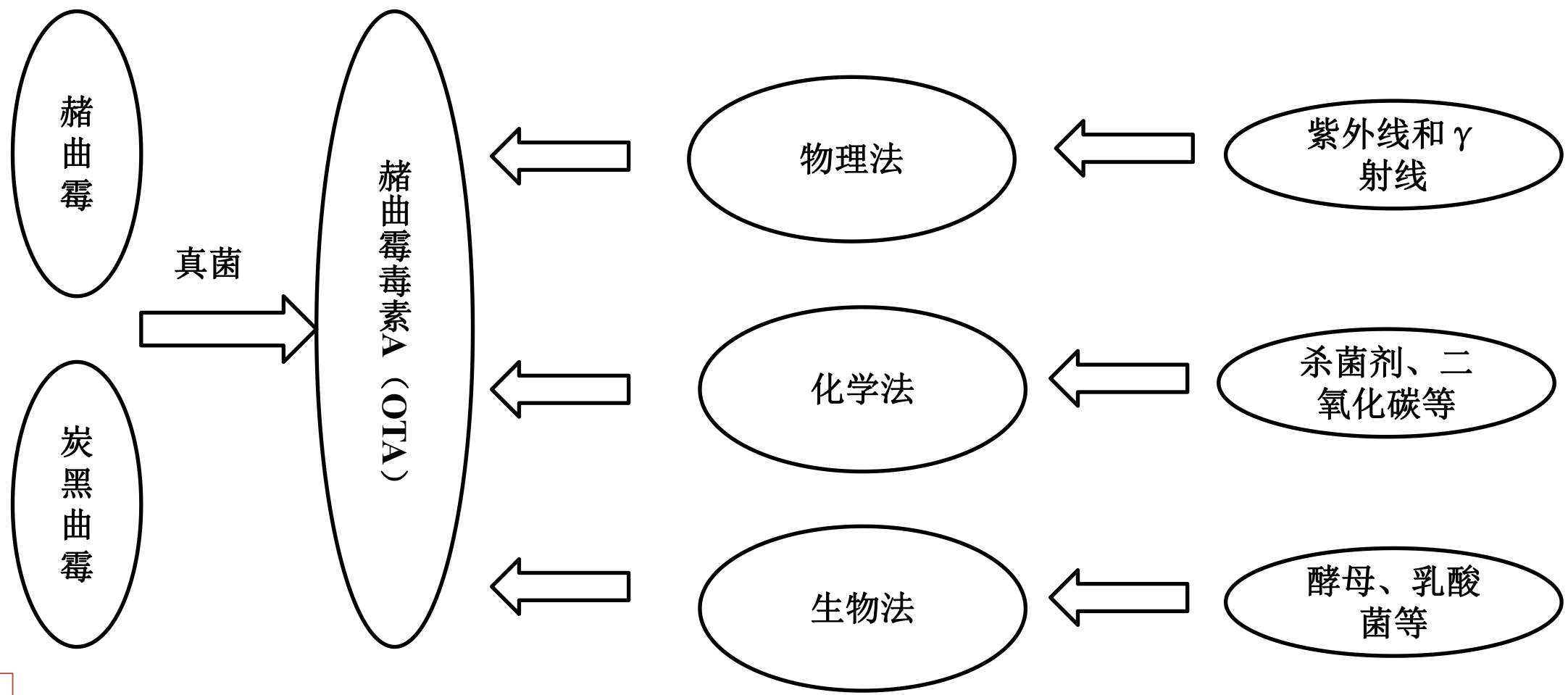
• 2

• 3

- 从葡萄中筛选抑制炭黑曲霉生长的微生物
- 研究和评价微生物对炭黑曲霉的抑制机理和抑制效果
- 分析微生物对OTA（赭曲霉毒素）合成基因簇的影响

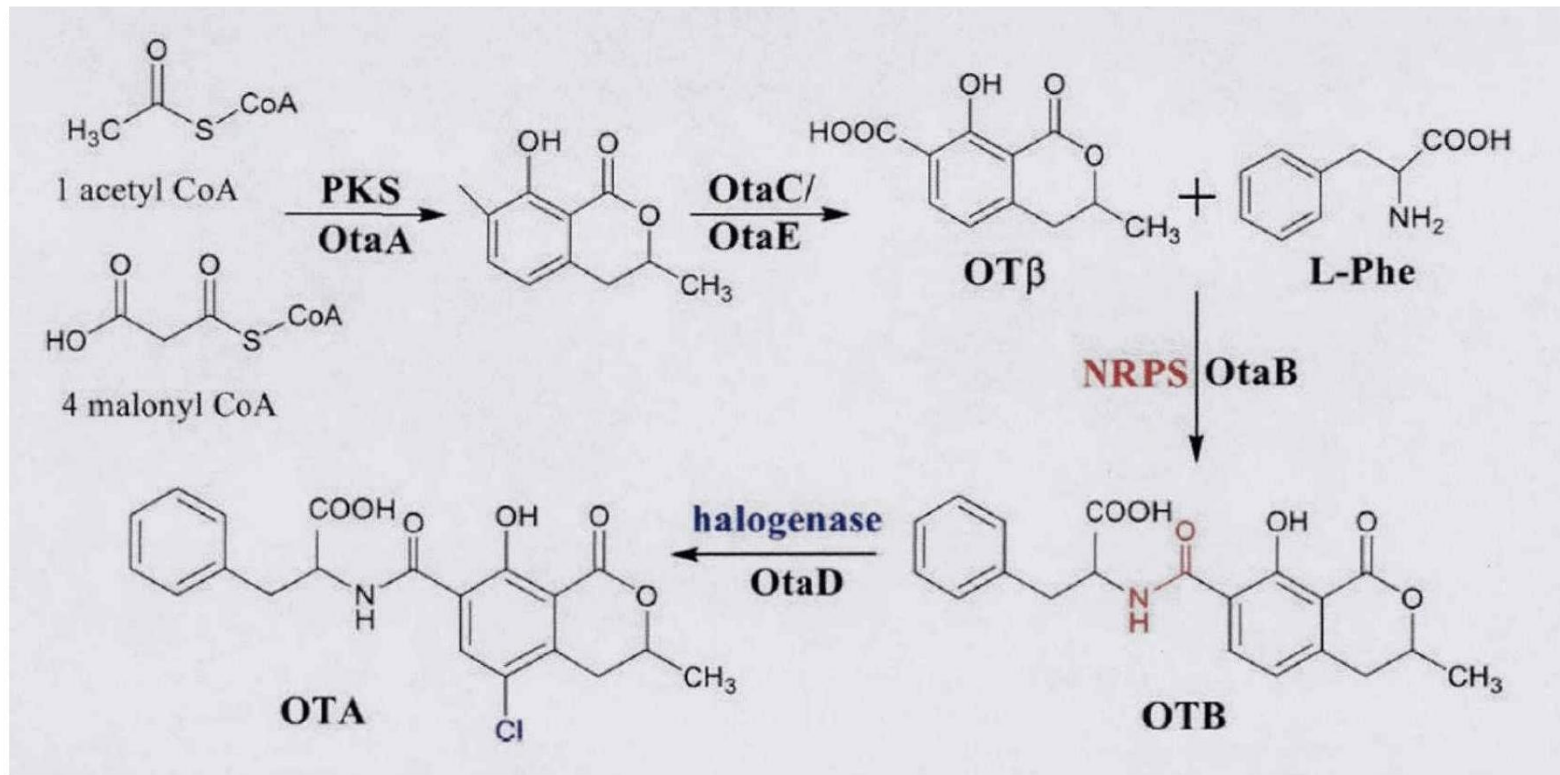


炭黑曲霉及毒素污染防控技术





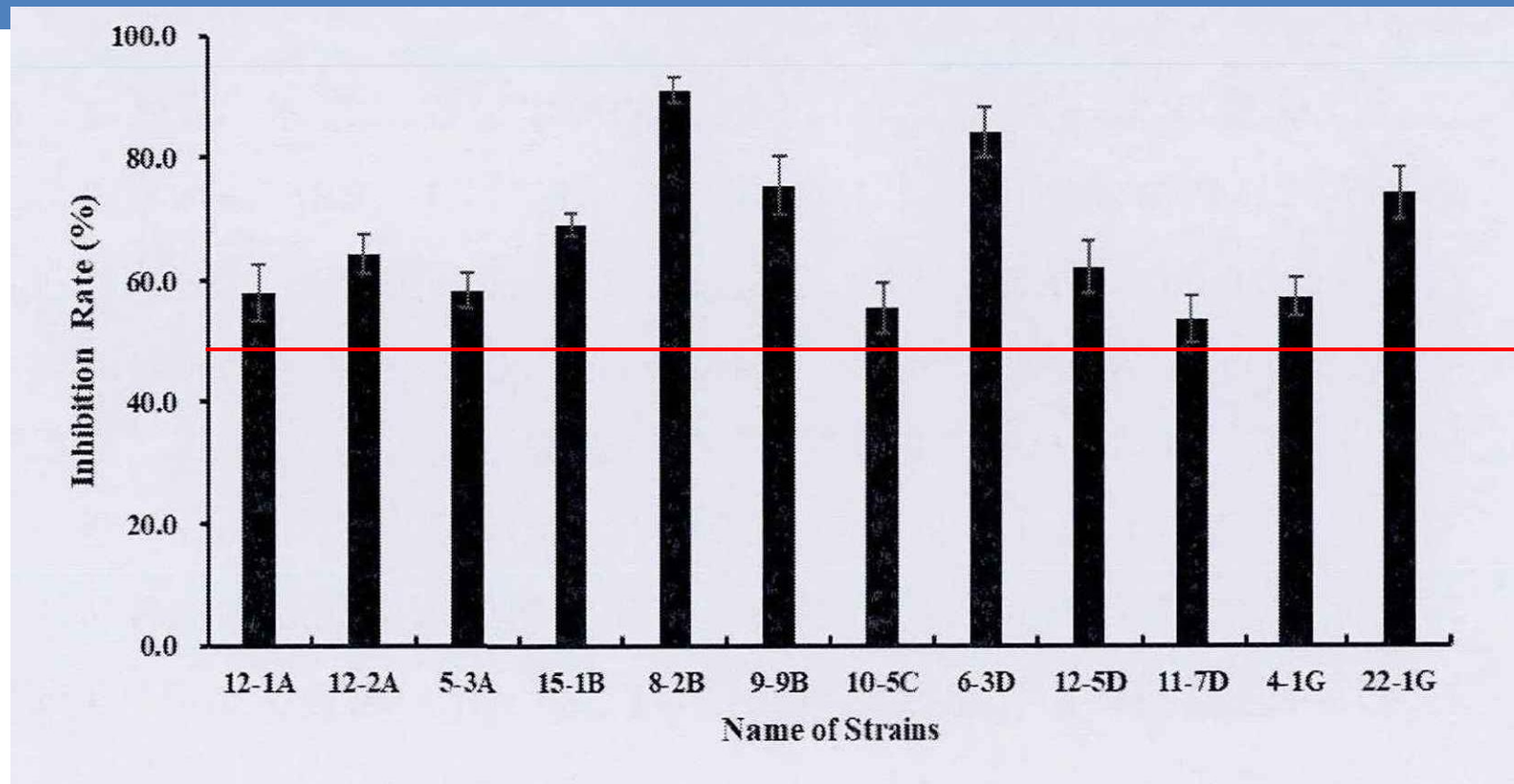
赭曲霉毒素A (OTA) 合成途径



OTA合成途径：
 $\text{OT}\beta \longrightarrow \text{OTB} \longrightarrow \text{OTA}$



微生物的筛选及抑制炭黑曲霉效果评价



50% **8-2B菌株**抑制效果最好
(91.1%)

筛选抑制炭黑曲霉的菌株



菌株8-2B生理生化结果

表 2-1 菌株 8-2B 生理生化结果

Table2-1. Physiological and biochemical detection results of strain 8-2B

Items	Detection results	Items	Detection results	Items	Detection results
Oxidase	-	Citronellol	-	Inulin	-
Catalase	-	Inositol	-	Trisaccharide	-
Glycerol	-	Mannitol	-	Raffinose	-
Erythritol	-	Sorbitol	-	Starch	-
D-arabinose	-	α -methyl-d mannose	-	Glycogen	-
L-arabinose	+	α -methyl-d-mannoside	+	Xylitol	-
D-ribose	+	N-acetylglucosamine	+	Gentian disaccharide	-
D-xylose	+	Amygdalin	-	Turanose	-
L-Xylose	+	Arbutin	-	D-Lyxose	-
Aspartol	-	Qiyeling	+	Tagatose	-
β -methyl-d-xyloside	+	Salicin	-	D-fucose	-
D-galactose	-	Cellobiose	-	L-fucose	-
D-glucose	+	Maltose	+	D-arabinose alcohol	-
D-fructose	+	Lactose	+	L-arabinose alcohol	-
D-mannose	-	Honey disaccharide	+	Gluconate	+
L-Sorbose	-	Sucrose	+	2-keto-gluconate	+
L-rhamnose	-	Trehalose	-		

菌株8-2B可以利用L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖和葡萄糖、 β -甲基-D-木糖甙等，氧化酶和过氧化氢酶实验均为阴性。

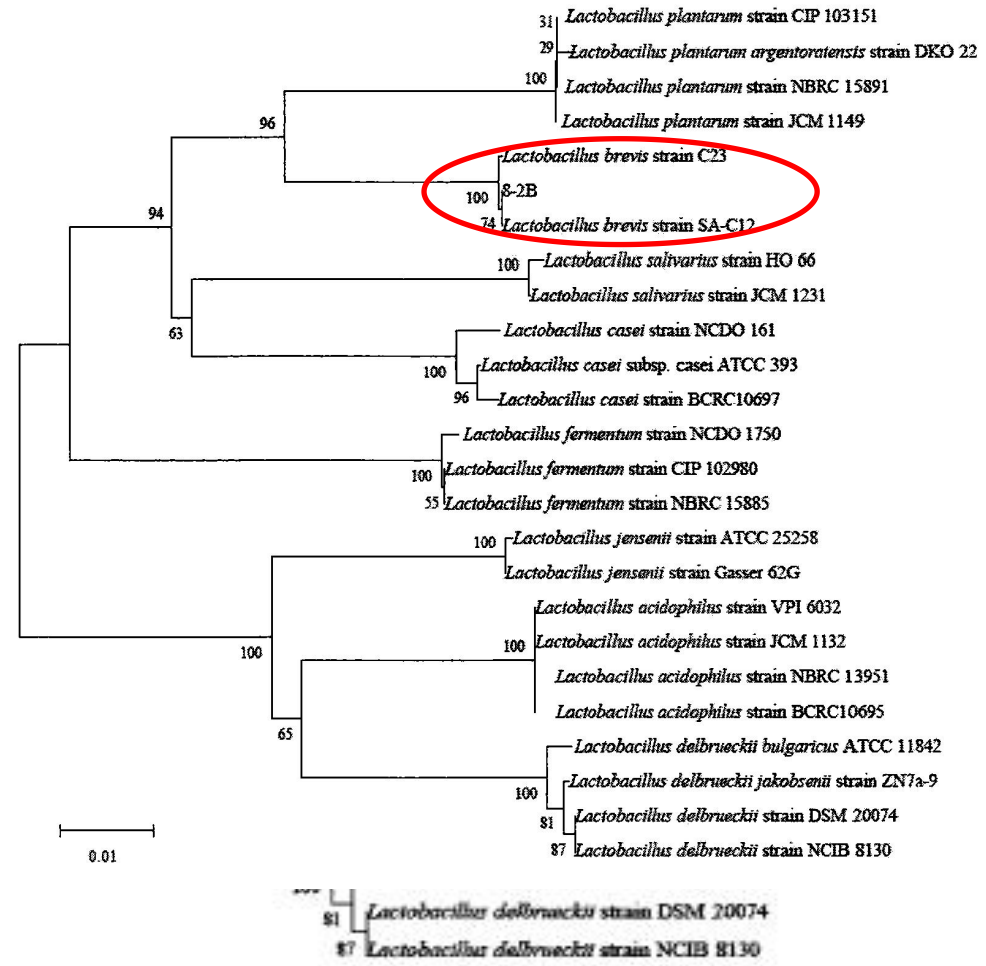
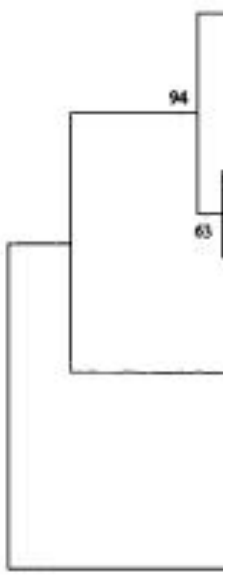
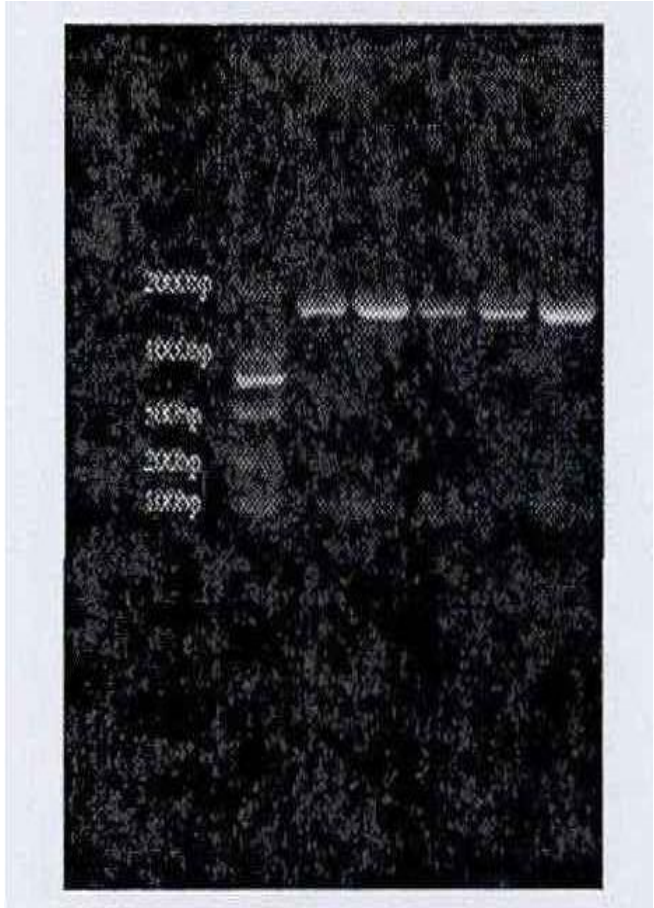


菌株8-2B鉴定

- 在PDA琼脂平板上菌株8-2B菌落呈圆形，乳白色，边缘整齐，菌落中心稍隆起；菌株形态呈杆状，革兰氏染色阳性；
- 通过形态特征、生理生化特征测定等，根据《常见细菌系统鉴定》以及《伯杰系统细菌学手册》对其形态进行初步鉴定，菌株8-2B为短乳杆菌。



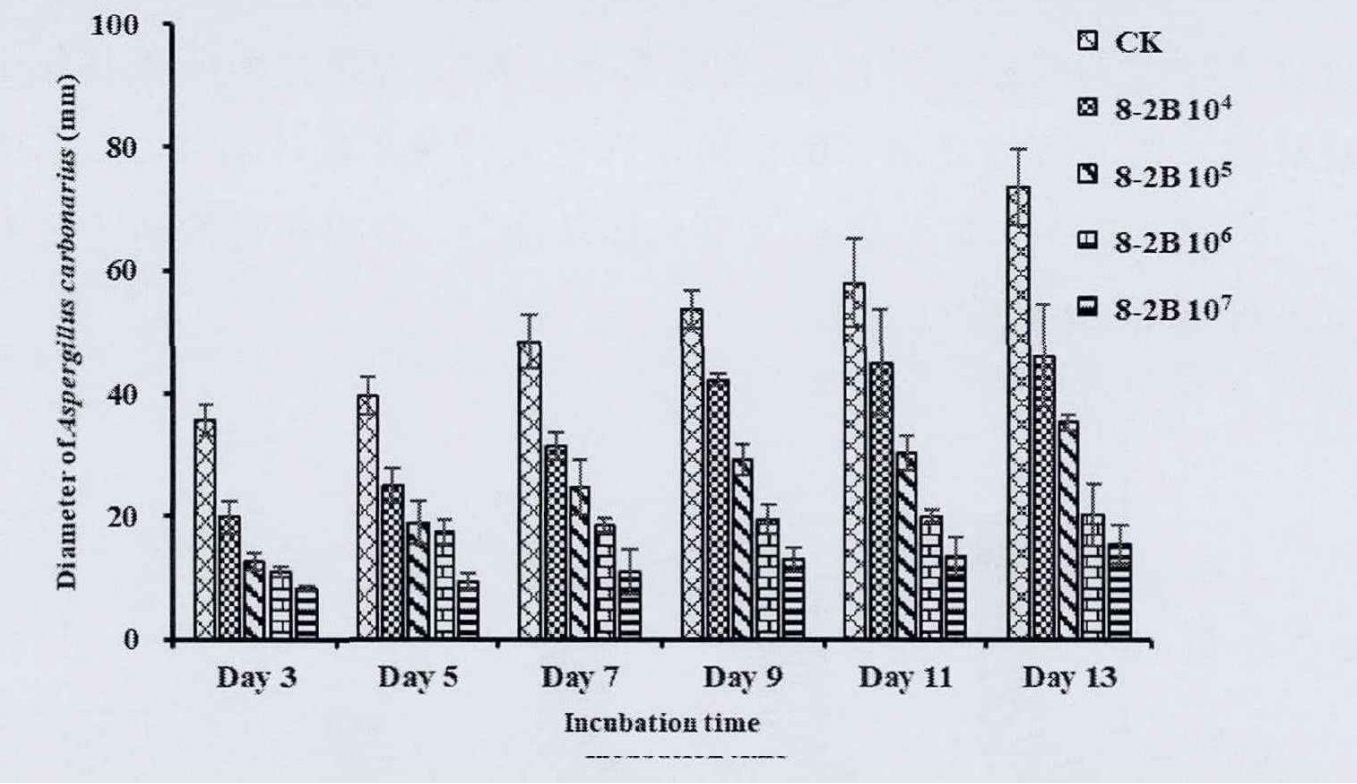
菌株8-2B的鉴定



菌株8-2B是短乳杆菌。



短乳杆菌8-2B对炭黑曲霉的影响

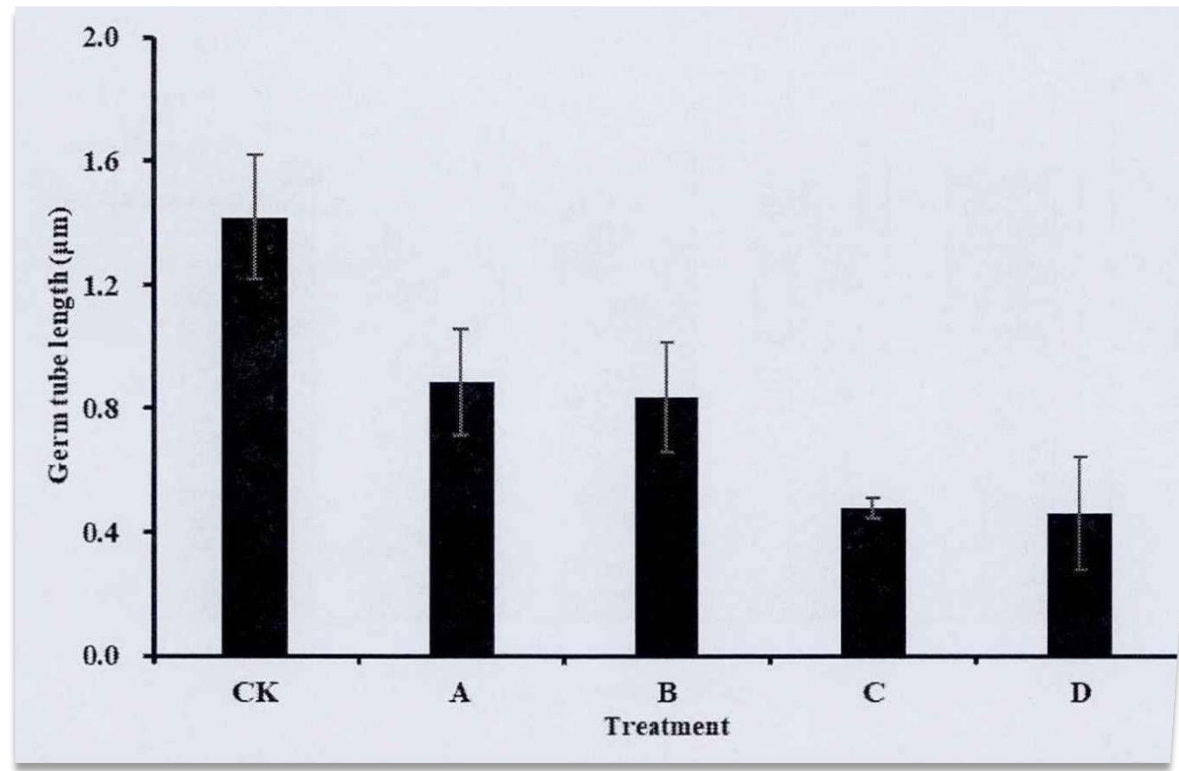
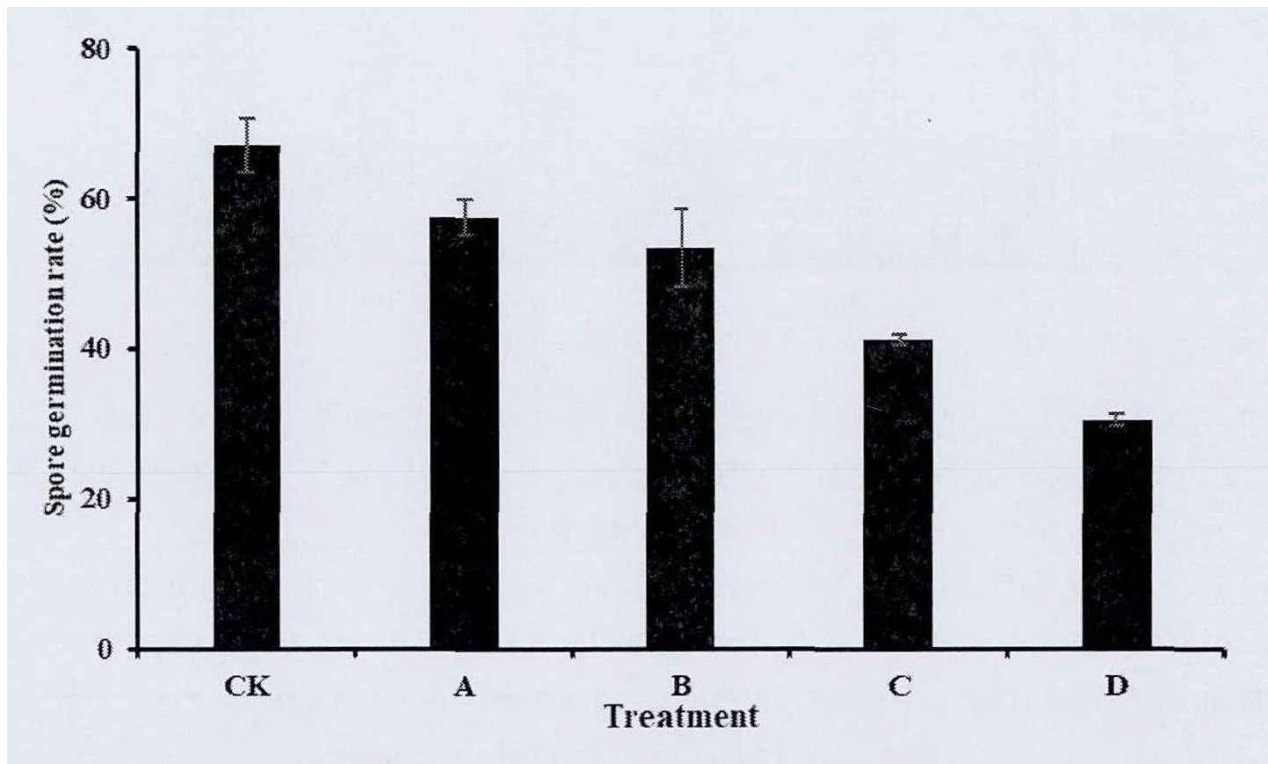


项目	OTA含量 ($\mu\text{g/kg}$)
CK	265.60 ± 19.59
8-2B 10^4	166.85 ± 5.34
8-2B 10^5	80.02 ± 16.03
8-2B 10^6	25.53 ± 5.02
8-2B 10^7	8.51 ± 3.56

短乳杆菌8-2B抑制炭黑曲霉生长效果



短乳杆菌8-2B对炭黑曲霉孢子萌发和芽管长度的影响

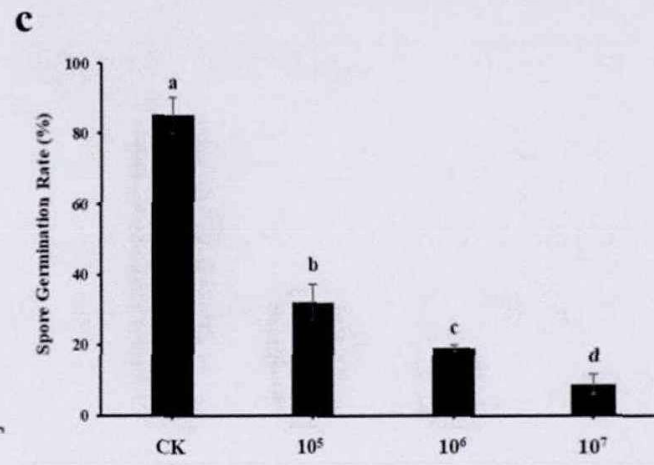
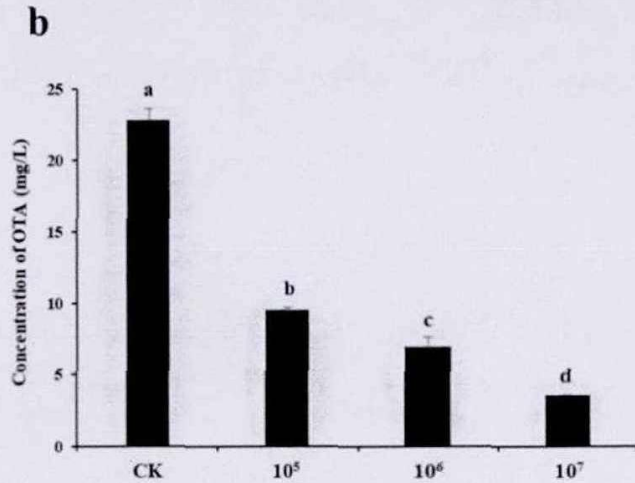
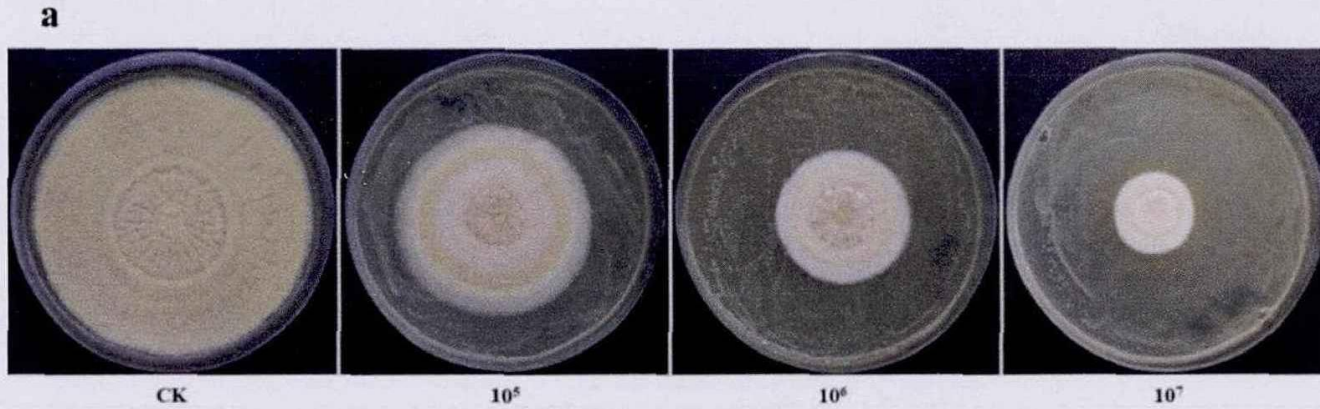


CK: 对照组; A, B, C, D分别表示短乳杆菌8-2B的浓度分别为 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7

炭黑曲霉孢子比芽管对8-2B敏感性高。



短乳杆菌8-2B对赭曲霉生长、OTA产生和孢子萌发的影响



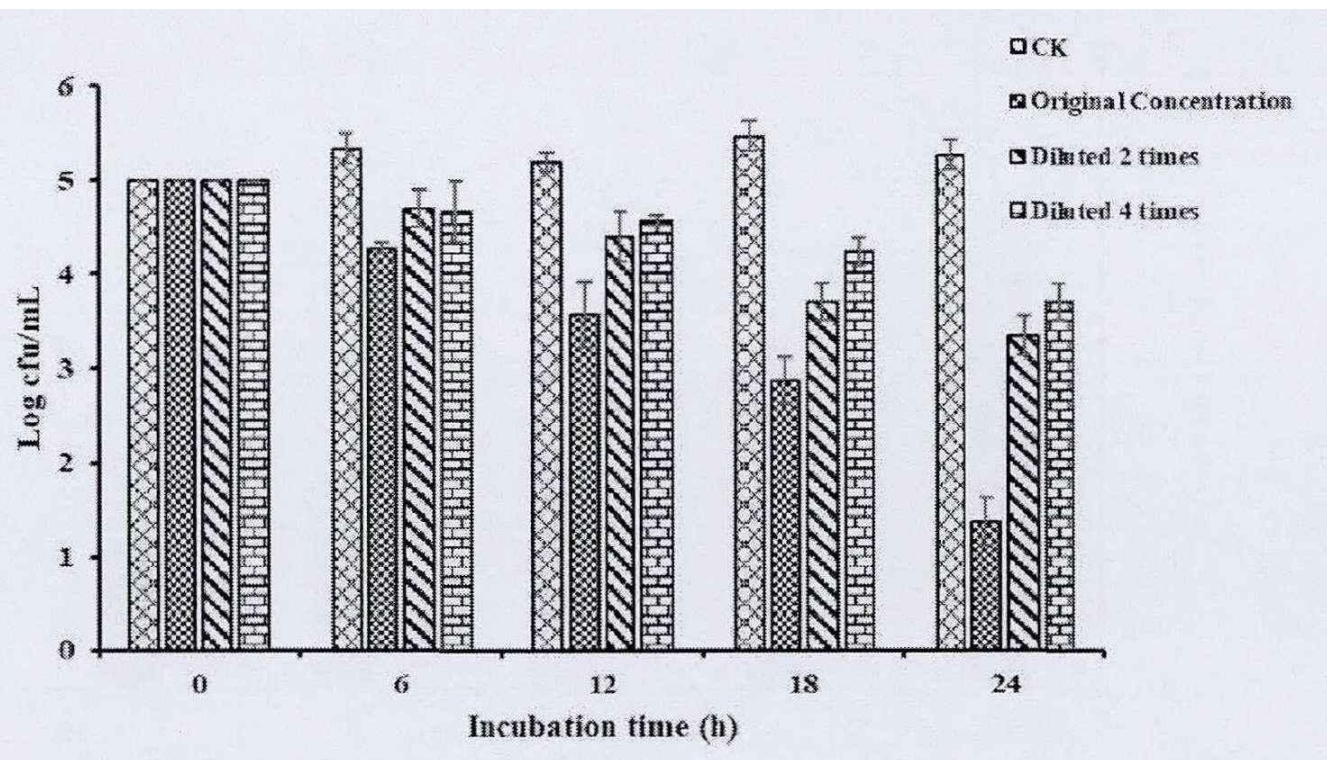
菌落直径:

CK: 79mm; 10^5 : 54mm;
 10^6 : 40mm; 10^7 : 23mm; 抑制率分别为32%、49%、71%。

短乳杆菌8-2B能有效抑制OTA的产生, 且OTA生产能力随着8-2B浓度的增大而显著减少; 赭曲霉孢子萌发率显著低于对照组。



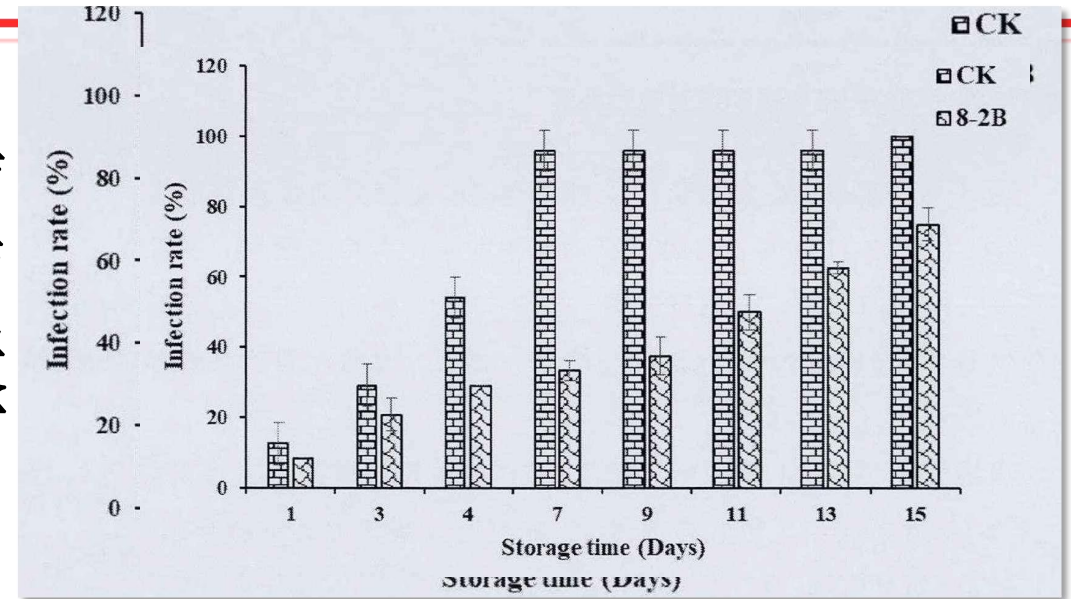
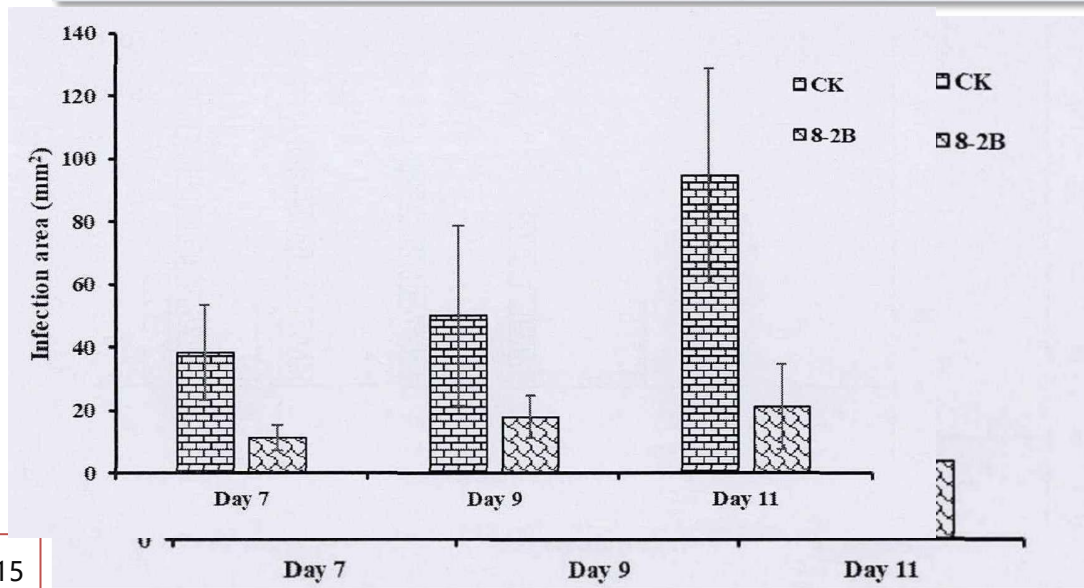
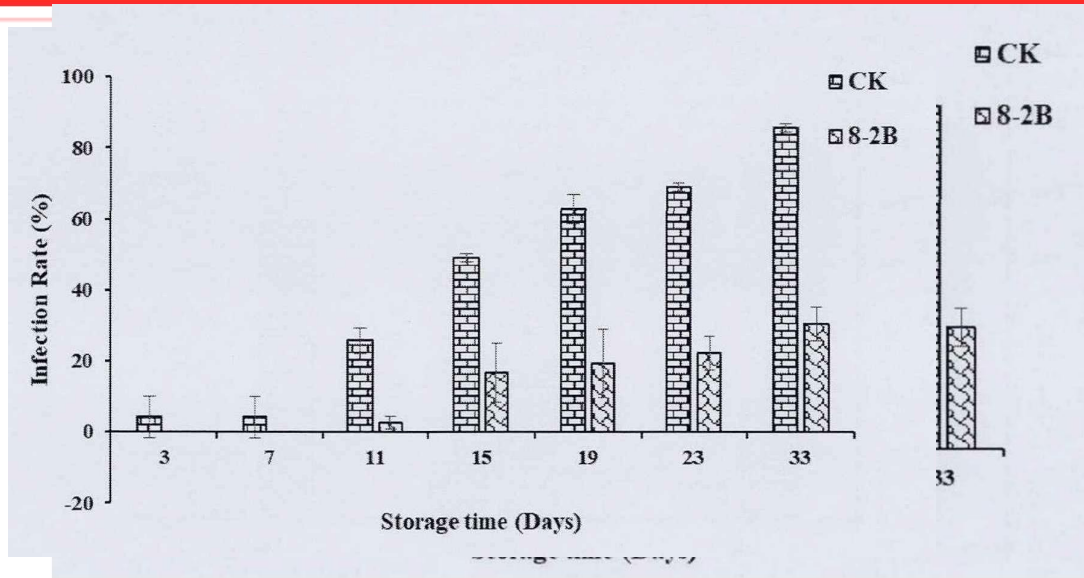
短乳杆菌8-2B发酵无细胞上清液对炭黑曲霉生长的影响



CFS对炭黑曲霉有很强的抑制效果（抑制率达73%），CFS稀释2倍和4倍时，抑制效果相对较弱。



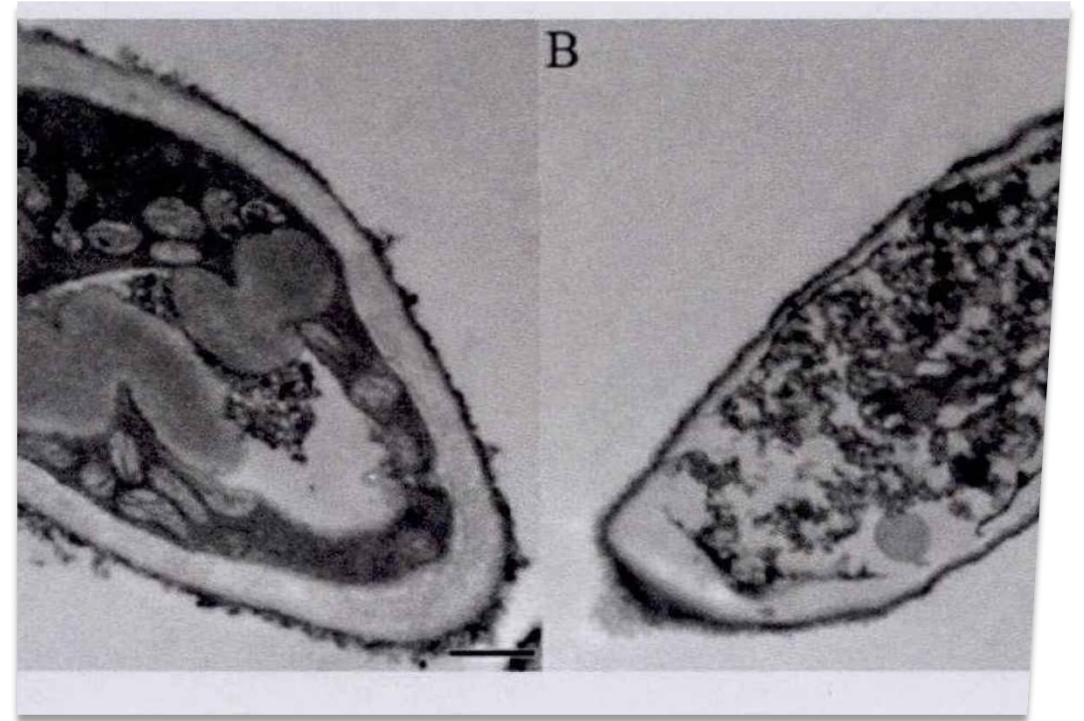
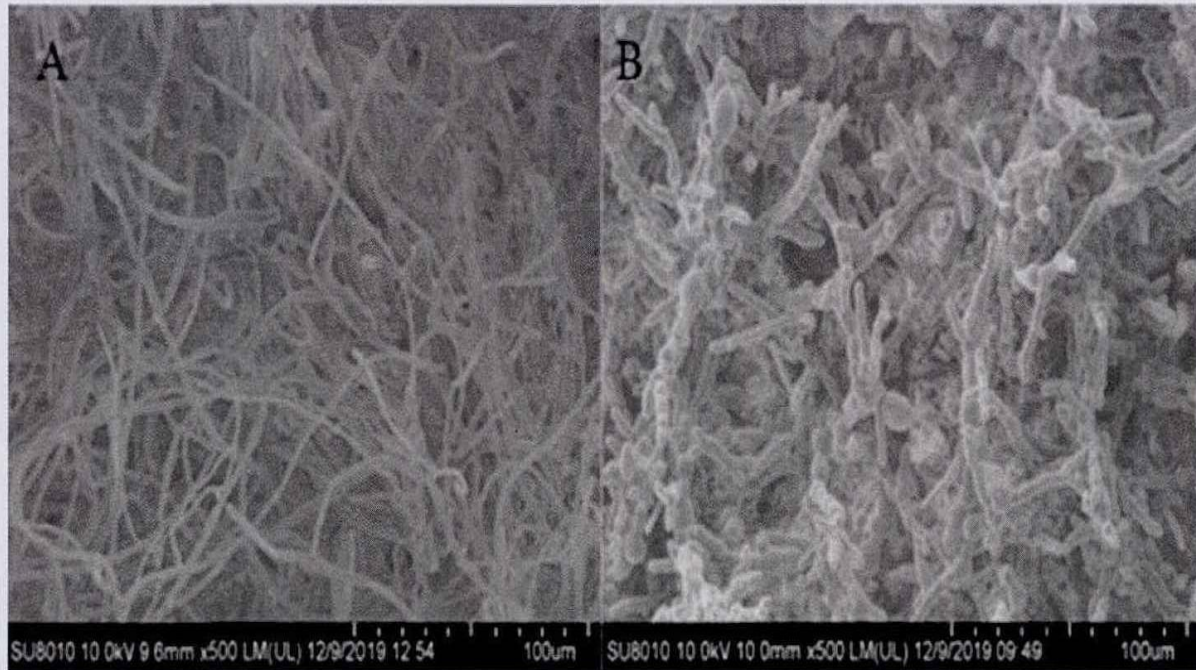
短乳杆菌8-2B在葡萄上对炭黑曲霉的抗性评价



短乳杆菌8-2B能抑制葡萄上炭黑曲霉的生长，显著延缓葡萄的腐烂。



炭黑曲霉的扫描电镜和透射电镜观察

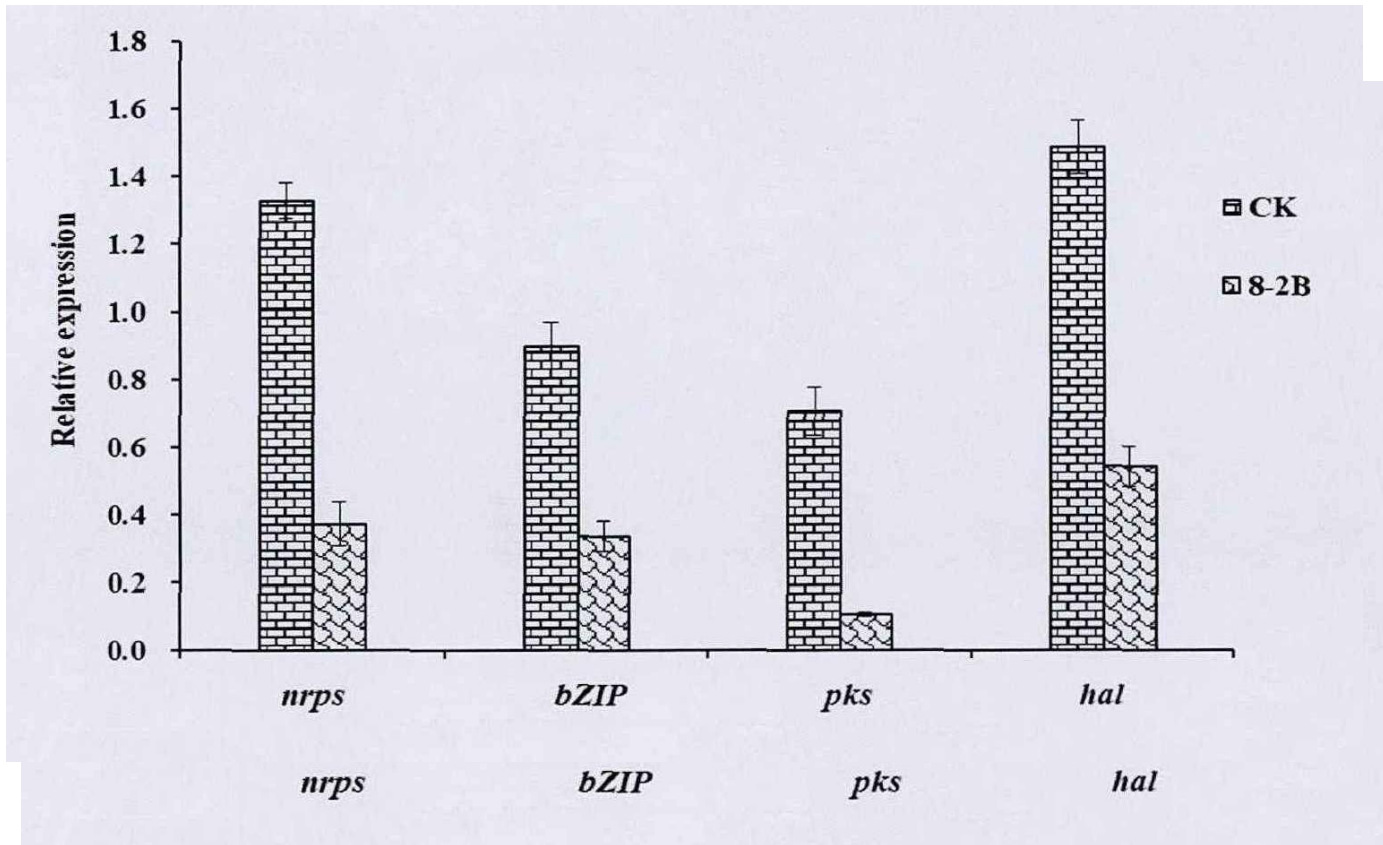


SEM图

TEM图



短乳杆菌8-2B对炭黑曲霉OTA合成基因表达的影响



实验组nrps、bZIP、pks和hal的表达较对照组明显下调。



本章小结

- 短乳杆菌8-2B能显著抑制炭黑曲霉、赭曲霉的生长、孢子萌芽、芽管长度和OTA产生；
- 短乳杆菌8-2B能显著抑制炭黑曲霉在葡萄上的生长，防止葡萄腐烂，延长葡萄的保质期；
- 活性成分存在于短乳杆菌8-2B的上清液；
- 短乳杆菌8-2B通过破坏菌丝体和细胞结构以及下调OTA合成基因能抑制炭黑曲霉的生长和产生OTA毒素。