枯草芽孢杆菌 PW2 挥发性产物对黄曲霉的抑制作用

张凯歌[1,2]，魏 琛[1,2]，余 璐[1,2]，杜明艳[1,2]，
李晓冉[1,2]，林亲录[1,2]，王青云[*1,2]
（1. 中南林业科技大学 食品科学与工程学院，湖南 长沙 410004；2. 中南林业科技大学 稻谷及副产物深加工国家工程研究中心，湖南 长沙 410004）

摘要：为探寻安全、高效的黄曲霉新型抑制物，采用顶空固相微萃取-气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)PW2 所产具有抗霉活性的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)进行了成分鉴定，并利用平板对扣法从鉴定出的成分中筛选具有强抗霉活性的目标化合物，通过平板对扣法和 96 孔板梯度稀释法测定目标化合物对黄曲霉的最小抑菌体积分数(MIC)，使用黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1, AFB_1)ELISA 检测试剂盒分析了目标化合物对黄曲霉产 AFB_1 的抑制作用，使用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察受试黄曲霉孢子形态的变化和采用分光光度法测定受试黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量，以探讨抗霉机理。结果显示，从 PW2 所产 VOCs 中共鉴定出 41 种组分，并从中筛选出异辛醇为目标化合物；平板对扣法和 96 孔板梯度稀释法测得异辛醇对黄曲霉的 MIC 分别为 0.169 μL/mL 和 6.25 μL/mL；PDB 培养基中异辛醇体积分数分别为 3.13、6.25、12.50 μL/mL 时，均能有效抑制 AFB_1 的产生，且随异辛醇体积分数的升高，抑制效果增强；异辛醇处理可导致黄曲霉孢子表面凹陷和孢子破裂，并且影响细胞膜中麦角甾醇的相对含量，造成细胞膜受损。该研究可为开发以异辛醇为功能成分的黄曲霉抑制剂提供理论参考。

关键词：枯草芽孢杆菌；挥发性有机化合物；异辛醇；黄曲霉
中图分类号：TS 210.1；Q 939.92　**文章编号：**1673-1689(2024)05-0122-08　**DOI：**10.12441/spyswjs.20220929004

Inhibition of *Aspergillus flavus* by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* PW2

ZHANG Kaige[1,2], *WEI Chen*[1,2], *YU Lu*[1,2], *DU Mingyan*[1,2],
LI Xiaoran[1,2], *LIN Qinlu*[1,2], *WANG Qingyun*[*1,2]
(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. National Engineering Research Center of Rice and Byproduct Deep Processing, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: In order to investigate safe and efficient novel inhibitors of *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), the compounds of the antifungal volatile organic compounds (VOCs) produced by *Bacillus subtilis*

收稿日期：2022-09-29　**修回日期：**2022-10-14
基金项目：湖南省自然科学基金项目(2019JJ40541)；湖南省教育厅重点项目(20A513)。
*通信作者：王青云(1975—)，女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事农产品加工与贮藏工程研究。E-mail：t20041485@csuft.edu.cn

PW2 were identified by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometer (HS-SPME-GC-MS) technique. The target compounds with strong antifungal activity were screened from the identified components by double petri dish method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the target compound against *A. flavus* was determined by double petri dish method and 96-well plate gradient dilution method. The inhibitory effect of the target compound on aflatoxin B_1 (AFB_1) production by *A. flavus* was analyzed using an AFB_1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The morphological changes of the tested *A. flavus* spores were observed using scanning electron microscope (SEM), and the ergosterol relative content in the tested *A. flavus* cell membrane was analyzed using spectrophotometry method to explore the antifungal mechanisms. As a result, a total of 41 components were identified from the VOCs produced by PW2, and among them, 2-ethyl-1-hexanol was selected as the target compound. The MIC values of 2-ethyl-1-hexanol against *A. flavus* determined by the double petri dish method and 96-well plate gradient dilution method were 0.169 μL/mL and 6.25 μL/mL, respectively. The AFB_1 were effectively inhibited by 2-ethyl-1-hexanol at the volume fractions of 3.13, 6.25 μL/mL and 12.50 μL/mL in PDB medium, and the inhibition effect was enhanced as the volume fraction of 2-ethyl-1-hexanol increased. Treatment with 2-ethyl-1-hexanol resulted in surface depression and the rupture of *A. flavus* spores, as well as alteration in the relative content of ergosterol in the cell membrane, leading to cell membrane damage. This study can provide a theoretical reference for the development of aflatoxin inhibitors with 2-ethyl-1-hexanol as a functional component.

Keywords: *Bacillus subtilis*, volatile organic compounds, 2-ethyl-1-hexanol, *Aspergillus flavus*

黄曲霉（*Aspergillus flavus*）具有繁殖力强、生长快速和易扩散等特点，其主要次级代谢产物黄曲霉毒素（aflatoxin，AF）可污染多种食品及农产品，包括粮食、香料和坚果等[1]。AF 最终通过食物链进入人体，对人体造成危害[2]。常见的黄曲霉毒素有 B_1、B_2、G_1、G_2、M_1、M_2，其中黄曲霉毒素 B_1（AFB_1）因具有较高的耐热稳定性和难降解性，危害性最大[3-5]。防治食物中黄曲霉及其毒素的污染是我国乃至世界共同关注的课题。

目前已报道的关于黄曲霉及其毒素污染的控制技术，主要有物理法[6]、化学法[7]和生物防治法[8-9]。其中生物防治因适用面广、对自然环境友好等优势，受到研究者的普遍青睐，此类研究也逐渐增多。已有研究证明芽孢杆菌产生的脂肽类抗生素[10]、蛋白质[11]和 VOCs[12]都有抗真菌活性，其中使用 VOCs 来进行防霉抑菌，具有使用方式简便和残留量低等优点[11]，已成为当今研究的热点。

基于作者所在课题组在前期研究中从稻谷中筛选到的一株产强抗霉活性 VOCs 的枯草芽孢杆 PW2[13]，采用顶空固相微萃取-气质联用（HS-SPME-GC-MS）技术对其产生的 VOCs 组分进行鉴定，通过平板对扣法测定 VOCs 中单体化合物的抗霉活性，从中筛选出一种能高效抑制黄曲霉的食品级合成香料类物质——异辛醇。采用平板对扣法和 96 孔板梯度稀释法测定了异辛醇分别在熏蒸和混入方式下对黄曲霉的 MIC，通过黄曲霉毒素 B_1 ELISA 检测试剂盒测定异辛醇对黄曲霉产 AFB_1 的抑制效果。最后，利用扫描电子显微镜观察受试黄曲霉孢子形态的变化和采用分光光度法测定受试黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量，初步探讨了异辛醇抑制黄曲霉的作用机理，为开发新型黄曲霉抑制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄曲霉（编号为 3.6305）：中国普通微生物菌种保藏管理中心；枯草芽孢杆菌 PW2 分离自市售稻谷，由中南林业科技大学食品科学与工程学院食品微生物与发酵实验室保藏。

异辛醇、十二醇：美国 Sigma 公司；2-壬酮、异丁

酸、2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯(TXIB):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙醇、正庚烷、醋酸戊酯:上海国药集团化学试剂有限公司;黄曲霉毒素 B_1 ELISA 检测试剂盒:上海恒远生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD 型超净工作台:苏州净化设备有限公司;MJX-250B 型培养箱:上海博讯实业有限公司;DSX-30L-I 型手提式高压蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;FB223 型自动内校电子分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) 型萃取头:美国 Supelco 公司;7890B-5977B 型气相色谱-质谱联用仪:美国 Agilent 公司;SpectraMax i3X 型多功能酶标仪:美国 Molecular Devices 公司;H1650-W 型微量台式高速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SCD500 型高真空镀膜仪:美国 Leica 公司;Quanta FEG 250 型场发射扫描电子显微镜:美国 FEI 公司;SP-1920UV 型紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基配制 营养琼脂培养基 (NA 培养基):牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15~20 g、去离子水 1 000 mL,pH 7.4~7.6。营养肉汤培养基 (NB 培养基):NA 培养基中不添加琼脂。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基):去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、氯霉素 0.2 g、去离子水 1 000 mL,自然 pH。马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB 培养基):PDA 培养基中不添加琼脂。以上培养基均经 121 ℃、20 min 灭菌后使用。

1.3.2 PW2 所产 VOCs 的成分鉴定 利用 HS-SPME-GC-MS[14]对 PW2 所产 VOCs 进行成分鉴定。用接种环挑取一环在 NA 培养基上培养 36 h 的 PW2 接入装有 NB 培养基的顶空瓶中,以不接菌的培养基为对照,30 ℃、150 r/min 培养 3 d。将在 280 ℃活化 30 min 后的萃取头插进顶空瓶中,于 40 ℃水浴平衡 10 min 后,推出萃取头至距液面 1~2 cm 处顶空吸附 40 min。取萃取头后进样,280 ℃解析 5 min。

色谱条件:HP-5MS 型毛细管柱(30 m×0.25 μm, 0.25 mm);载气为高纯氦气,流量为 1 mL/min;进样口温度为 250 ℃,不分流进样。起始温度 40 ℃保持 2 min,以 3 ℃/min 升温至 180 ℃,保持 2 min,再以 8 ℃/min 升温至 260 ℃,保持 3 min。质谱条件:EI 离子源,温度 230 ℃,扫描范围 *m/z* 20~500。与美国国家标准与技术研究院 (National Institute of Standards and Technology,NIST)质谱库进行比对检索,并通过峰面积归一化法对挥发性有机化合物的相对含量进行分析。

1.3.3 PW2 所产 VOCs 中有效抑制黄曲霉的成分筛选 从鉴定出的 VOCs 中选择单个的化合物,通过平板对扣法(见图 1)测定各单体化合物标准品对黄曲霉的抑制效果[15]。将 5 μL 1×10^6 CFU/mL 的黄曲霉孢子悬浮液接种在 PDA 平板(对扣双培养皿直径 9 cm,高 2.8 cm,体积 0.178 L)中部,取 30 μL 单体化合物标准品(在对扣培养皿中的顶空体积分数为 0.169 μL/mL) 分别滴加在另一培养皿中的无菌滤纸片上,相同条件下滤纸片上不加任何物质的培养皿作为空白对照 (CK),迅速将两培养皿对扣,PDA 平板在上,含滤纸片的培养皿在下,并用 Parafilm 封口膜封好两培养皿接口处,在(28±2) ℃条件下培养 5 d。按下式计算抑制率:

$$Y=\frac{D_C-D_T}{D_C}\times100\%$$

式中:Y 为抑制率,%;D_C 为空白对照培养皿中菌落直径,cm;D_T 为放入 VOCs 单体化合物标准品培养皿中菌落直径,cm。

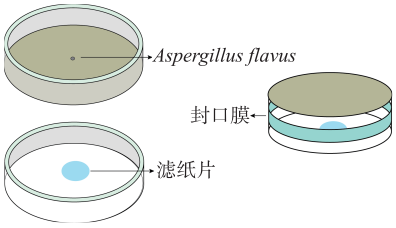


图 1 平板对扣法示意

Fig. 1 Schematic of double petri dish method

通过比较抑制率的大小,选取抑制率高的化合物作为目标化合物进一步研究其对黄曲霉生长和产毒的抑制作用。

1.3.4 目标化合物(异辛醇)对黄曲霉 MIC 的测定 分别通过平板对扣法与 96 孔板梯度稀释法[16],测定目标化合物在熏蒸和混入两种作用方式下对黄曲霉的 MIC。

平板对扣法的操作参照 1.3.3。目标化合物的体积分数分别为 0、0.040、0.080、0.169 μL/mL,在(28±2) ℃条件下静置培养 5 d 后观察黄曲霉菌落

生长情况,以肉眼观察的 PDA 平板上无黄曲霉生长的处理组对应的目标化合物的最低体积分数为目标化合物在熏蒸方式下对黄曲霉的 MIC。

96 孔板梯度稀释法的操作如下:将黄曲霉孢子悬浮液加入 PDB 培养基中,调至孢子浓度为 1×10^6 CFU/mL,取 100 μL 置于 96 孔板中,再加入目标化合物使得 96 孔板前 10 孔的体积分数分别为 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.19 μL/mL,第 11 孔作为空白对照(不添加异辛醇),第 12 孔作为阴性对照(不加黄曲霉孢子悬浮液),每孔液体终体积为 100 μL。用 Parafilm 封口膜密封,在(28±2) ℃条件下静置培养 48 h。在无菌条件下,每孔加入 20 μL 质量浓度为 0.75 mg/mL 的刃天青溶液,静置培养 3 h,观察各孔中颜色变化后,利用酶标仪在 600 nm 处测量吸光度。刃天青作为常用的指示剂,颜色变化受溶解氧浓度和酸碱度两方面因素影响,随着霉菌生长过程中对氧气的消耗及代谢产酸,刃天青的颜色由最初的蓝色逐渐变为蓝紫色,进而变为粉色、浅粉色,直至颜色消失变为无色[17]。将 96 孔板中刃天青颜色无明显变化的目标化合物体积分数定义为混入方式的 MIC。

1.3.5 异辛醇对黄曲霉产 AFB_1 的影响 在 100 mL 锥形瓶中加入 20 mL 含 1×10^6 CFU/mL 黄曲霉孢子的 PDB 培养基,再加入目标化合物使其体积分数分别为 0、3.13、6.25、12.50 μL/mL。在(28±2) ℃、150 r/min 条件下摇床培养 5 d 后,采用 AFB_1 ELISA 检测试剂盒[18],按说明书中的步骤来测定各培养物中 AFB_1 质量浓度。

1.3.6 扫描电子显微镜观察异辛醇对黄曲霉孢子形态的影响 参考 Tian 等的方法[19],在(28±2) ℃、150 r/min 条件下,分别使用体积分数为 0、3.13、6.25、12.50 μL/mL 的异辛醇处理黄曲霉孢子 9 h,以 8 000 *g* 离心 3 min 弃去上清液,用 PBS 缓冲液洗涤进行离心,重复操作 3 次。经质量分数为 2.5%戊二醛固定过夜,再经不同体积分数的乙醇脱水后,用醋酸戊酯置换剩余的乙醇。将处理后的黄曲霉孢子放置于盖玻片上,干燥后将样品置于高真空镀膜仪中,15 mA、镀金 120 s 后置于扫描电子显微镜内观察。

1.3.7 异辛醇对黄曲霉细胞膜中麦角甾醇相对含量的影响 在 100 mL 锥形瓶中加入 20 mL 含 1×10^6 CFU/mL 黄曲霉孢子的 PDB 培养基,(28±2) ℃、150 r/min 条件下培养 48 h 至有菌丝球形成后加入目标化合物,使其体积分数分别为 0、3.13、6.25、12.50 μL/mL,继续培养 24 h。使用无菌定量滤纸过滤得菌丝球,PBS 缓冲液冲洗 3 次,将过滤后的菌丝重悬于 PBS 缓冲液中,洗去多余的杂质,50 ℃烘干至质量恒定。参考 Hu 等的方法[20]测定菌丝中麦角甾醇相对含量。麦角甾醇和 24(28)脱氢麦角甾醇在 282 nm 处都有吸收峰,230 nm 处 24(28)脱氢麦角甾醇会出现特征吸收峰。麦角甾醇相对含量可通过总的麦角甾醇计算。

1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次,采用 SPSS 16.0 进行方差分析(ANOVA),使用 Duncan 多重比较分析统计学差异,采用 OriginPro 2019b 64Bit 制图。

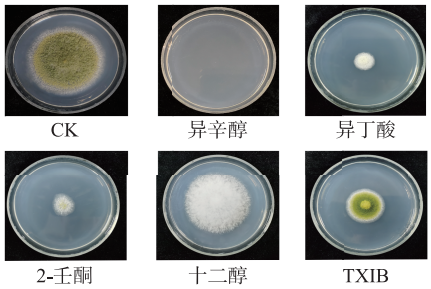
2 结果与分析

2.1 PW2 菌株所产 VOCs 的成分组成

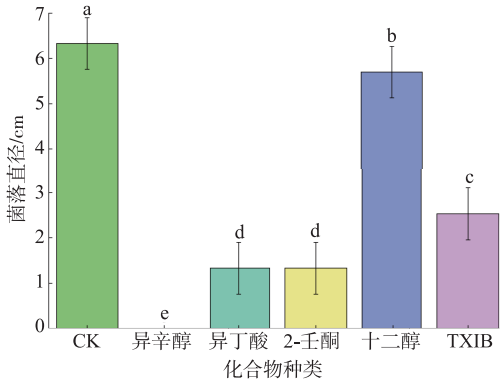
PW2 所产 VOCs 中共鉴定出 41 种组分[21],包括醇类、酮类、醛类、酯类、酸类、烷烃类、烯烃类等多种化合物。以往研究表明,芽孢杆菌所产VOCs 中,抗霉活性较强的主要有醇类[21-22]、酚类[14,22]、酮类[22-23]、酸类[24]和醛类[21]化合物,酯类中的一些化合物也具有抗霉活性[24],部分烷烃类和烯烃类化合物具有抗霉活性但通常活性较弱[25]。结合 41 种组分的相对含量,同时考虑化合物的安全性,初步选择十二醇、2-壬酮、异丁酸、异辛醇和 TXIB 这 5 种化合物进行下一步的目标化合物筛选实验。

2.2 PW2 所产 VOCs 中关键抗霉活性物质的筛选

采用平板对扣法测定初步挑选的 5 种化合物对黄曲霉的抑制作用,结果显示(见图 2),5 种化合物对黄曲霉的生长均有不同程度的抑制作用,其中异辛醇、异丁酸、2-壬酮、十二醇和 TXIB 的抑制率分别为 100.00%、78.99%、78.99%、9.95%和 59.98%。其中异辛醇可完全抑制黄曲霉的生长,培养基上未见菌丝的生长,表明异辛醇对黄曲霉的抑制效果最强。同时,异辛醇还是我国 GB 2760—2014 及美国香料和提取物制造商协会 (Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States, FEMA)规定允许使用的食品香料。因此,选用异辛醇作为目标化合物,进一步测定其对黄曲霉生长和产毒的抑制作用。



（a）各化合物作用下黄曲霉菌落生长情况



（b）化合物对黄曲霉菌落直径的影响

CK 为空白对照，不含有鉴定出的化合物；不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。

图 2　不同化合物对黄曲霉菌落生长的影响

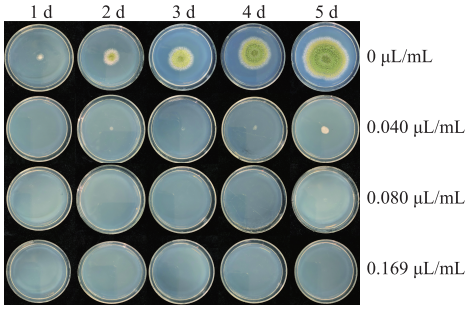
Fig. 2　Effect of different compounds on the growth of *A. flavus* colonies

2.3　异辛醇对黄曲霉的 MIC 测定结果

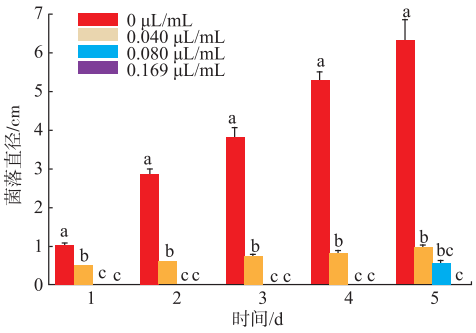
采用平板对扣法测得不同体积分数异辛醇对黄曲霉菌落生长的抑制作用，结果如图 3 所示，培养 5 d 后，空白对照组（异辛醇体积分数为0 μL/mL）菌落直径为（6.0±0.2）cm，0.080 μL/mL 异辛醇处理组黄曲霉有稍许生长，而 0.169 μL/mL 异辛醇处理组黄曲霉的生长完全被抑制。因此，熏蒸方式下异辛醇对黄曲霉的 MIC 为 0.169 μL/mL。

采用 96 孔板梯度稀释法测得不同体积分数异辛醇对黄曲霉抑制作用的结果如图 4 所示，能维持刃天青不变色的异辛醇的最低体积分数为6.25 μL/mL，即为混入方式下异辛醇对黄曲霉的 MIC。

比较熏蒸和混入两种不同作用方式下异辛醇对黄曲霉的 MIC 可知，熏蒸方式下异辛醇对黄曲霉的 MIC 比混入方式下的 MIC 低。以往的报道显示[26-29]，一些天然 VOCs 对真菌的熏蒸抑制效果好于混入抑制效果，这与本研究的结果一致。有研究表明，VOCs 可以直接作用于菌体，由于细胞膜的亲脂性使得 VOCs 被细胞优先吸收，而且 VOCs 还可吸附在培



（a）异辛醇熏蒸处理下黄曲霉菌落生长情况

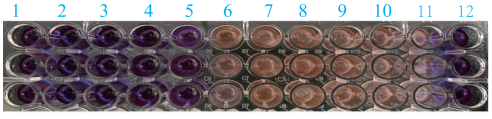


（b）异辛醇熏蒸处理对黄曲霉菌落直径的影响

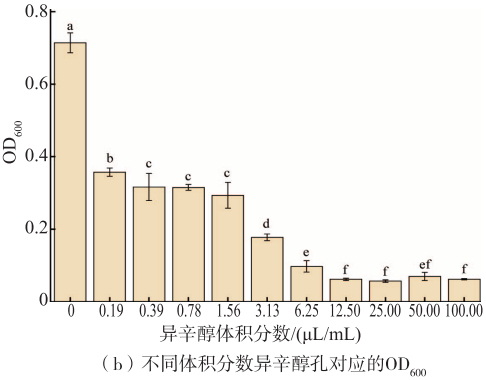
不同小写字母代表同一时间内各组间差异显著（P<0.05）。

图 3　平板对扣法测得不同体积分数异辛醇对黄曲霉生长的抑制作用

Fig. 3　Effects of different volume fractions of 2-ethyl-1-hexanol on the growth of *A. flavus* by double petri dish method



（a）孔中加入刃天青指示剂后颜色的变化



（b）不同体积分数异辛醇孔对应的OD_{600}

1~10. 异辛醇体积分数分别为 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.19 μL/mL；11. 空白对照；12. 阴性对照；不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。

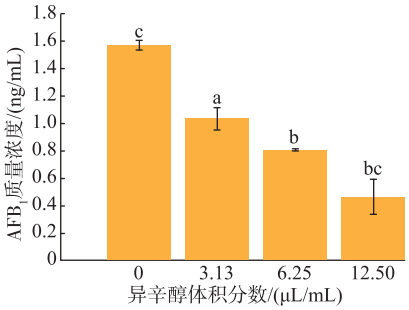
图 4　96 孔板梯度稀释法测得不同体积分数异辛醇对黄曲霉的抑制效果

Fig. 4　Inhibitory effect of different volume fractions of 2-ethyl-1-hexanol on *A. flavus* by 96-well plate gradient dilution method

养基的表面，然后通过扩散再次作用于菌体，造成二次损伤；而在混入方式下大部分 VOCs 受自身的疏水性影响不能很好地与液体培养基混合，从而导致菌体受到的损伤减小[30-31]。

2.4 异辛醇对 AFB_1 的抑制效果

黄曲霉在含不同体积分数异辛醇的 PDB 培养基中培养 5 d 后产 AFB_1 的情况如图 5 所示。未添加异辛醇的样品中 AFB_1 质量浓度为 1.57 ng/mL，所有经过异辛醇处理后的样品中 AFB_1 质量浓度均显著降低，且随着异辛醇体积分数的升高，抑制作用增强。异辛醇抑制黄曲霉产 AFB_1 的作用机理有待进一步研究。



不同小写字母代表组间差异显著（$P<0.05$）。

图 5 不同体积分数异辛醇对黄曲霉产 AFB_1 的影响

Fig. 5 Effects of different volume fractions of 2–ethyl–1–hexanol on the production of AFB_1 by *A. flavus*

2.5 异辛醇对黄曲霉孢子形态的影响

SEM 可以直观、清晰地观察异辛醇对黄曲霉孢子的损伤情况[32]。通过观察不同体积分数异辛醇处理后的黄曲霉孢子（见图 6），可知正常生长的黄曲霉孢子形态饱满，表面纹路清晰可见，但经过异辛醇处理后黄曲霉孢子表面纹路消失、凹陷、破裂，且低体积分数异辛醇（3.13 μL/mL）处理后的孢子周围有渗出物，高体积分数异辛醇（12.50 μL/mL）处理后的孢子大量破裂。这与海藻希瓦氏菌 YM8 所产的 VOCs 作用于花生中黄曲霉后观察的结果相似[15]。

2.6 异辛醇对黄曲霉细胞膜中麦角甾醇相对含量的影响

麦角甾醇是构成真菌细胞膜的重要成分，对于维持细胞膜的正常功能必不可少[33]。一旦细胞膜的完整性被破坏，细胞内容物就会泄漏，可能导致细胞的损伤及死亡[34]。由图 7 可知，异辛醇可以降低细胞膜中麦角甾醇的相对含量，并且对细胞膜的损伤程度与异辛醇体积分数相关。

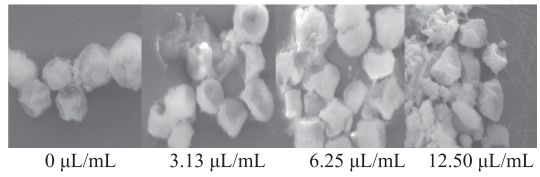
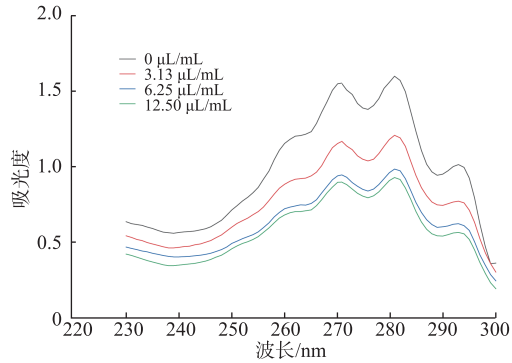
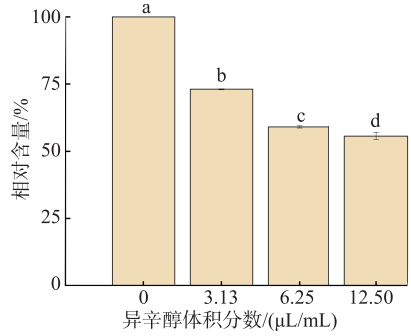


图 6 不同体积分数异辛醇处理后黄曲霉孢子形态变化

Fig. 6 Changes in the morphology of *A. flavus* spores treated with different volume fractions of 2–ethyl–1–hexanol



（a）不同体积分数异辛醇处理后黄曲霉细胞膜麦角甾醇的光谱扫描结果



（b）不同体积分数异辛醇处理后黄曲霉细胞膜麦角甾醇的相对含量

不同小写字母代表组间差异显著（$P<0.05$）。

图 7 不同体积分数异辛醇处理后的黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量

Fig. 7 Ergosterol relative content in *A. flavus* cells after treatment with different volume fractions of 2–ethyl–1–hexanol

综合 SEM 观察和麦角甾醇相对含量测定的结果可知，异辛醇能引起黄曲霉孢子内容物渗出，导致孢子表面凹陷和破裂；异辛醇处理能使黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量显著下降，破坏细胞膜的正常结构，引起细胞膜受损，从而导致细胞内容物外流，这与 SEM 观察结果是一致的。

3 结 语

对枯草芽孢杆菌 PW2 所产具抗霉活性的

VOCs 进行鉴定，并从中筛选出具有强抗霉活性的食品级合成香料异辛醇，进而测定了异辛醇分别在熏蒸和混入方式下对黄曲霉的 MIC，发现熏蒸方式下的 MIC 为 0.169 μL/mL，远低于混入方式下的 MIC（6.25 μL/mL）。AFB_1 测定结果表明，PDB 培养基中体积分数为 3.13、6.25、12.50 μL/mL 的异辛醇对黄曲霉产 AFB_1 均有抑制作用，且随着体积分数升高抑制效果增强。SEM 观察结果表明，异辛醇处理可使黄曲霉孢子表面凹陷，内容物渗出，且随着异辛醇体积分数的升高，孢子表面变形加重并出现大量破裂。黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量测定结果表明，异辛醇处理可降低黄曲霉细胞膜麦角甾醇相对含量，推测异辛醇抑制黄曲霉的作用机理与破坏其细胞膜结构有关。本研究结果为开发以异辛醇为功能成分的黄曲霉抑制剂提供了参考。

参考文献：

[1] KHAN R, GHAZALI F M, MAHYUDIN N A, et al. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: a review[J]. **Journal of Fungi**, 2021, 7(8): 606.

[2] 罗自生，秦雨，徐艳群，等. 黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展[J]. 食品科学，2015，36(3)：250-257.
LUO Z S, QIN Y, XU Y Q, et al. Recent progress in the biosynthesis, metabolism and toxicity of aflatoxins[J]. **Food Science**, 2015, 36(3): 250-257. (in Chinese)

[3] 张焕，高亚男，郑楠，等. 黄曲霉毒素 M_1 与赭曲霉毒素 A 联合作用诱导分化 Caco-2 细胞凋亡的机制[J]. 中国食品学报，2019，19(3)：93-101.
ZHANG H, GAO Y N, ZHENG N, et al. Combined effects of aflatoxin M_1 and ochratoxin A on the apoptosis and mechanism in differentiated Caco-2 cells[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2019, 19(3): 93-101. (in Chinese)

[4] RAO K R, VIPIN A V, VENKATESWARAN G. Mechanism of inhibition of aflatoxin synthesis by non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*[J]. **Microbial Pathogenesis**, 2020, 147: 104280.

[5] 纪剑，于坚，王良哲，等. 真菌毒素的降解技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(5)：1-10.
JI J, YU J, WANG L Z, et al. Research progress in mycotoxin degradation technology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(5): 1-10. (in Chinese)

[6] UDOVICKI B, STANKOVIC S, TOMIC N, et al. Evaluation of ultraviolet irradiation effects on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B_1 in maize and peanut using innovative vibrating decontamination equipment[J]. **Food Control**, 2022, 134: 108691.

[7] LI Y F, LI K, WAN Q Q, et al. Inactivation of fungal spores in water by CuO-activated peracetic acid: kinetics, mechanism and regrowth[J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2022, 439: 129611.

[8] 王昌禄，刘彤，李王强，等. 微生物对黄曲霉毒素的抑制机制研究进展[J]. 食品科学技术学报，2021，39(1)：27-36.
WANG C L, LIU T, LI W Q, et al. Research progress on inhibition mechanism of aflatoxins by microorganisms[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2021, 39(1): 27-36. (in Chinese)

[9] 杨阳，邱天宇，袁晓，等. 黑曲霉降解黄曲霉毒素 B_1 的研究及转录组分析[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(9)：16-25.
YANG Y, QIU T Y, YUAN X, et al. Biodegradation of aflatoxin B_1 by *Aspergillus niger* and transcriptome analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(9): 16-25. (in Chinese)

[10] DEVI M S, SASHIDHAR R B. Antiaflatoxigenic effects of selected antifungal peptides[J]. **Peptides**, 2019, 115: 15-26.

[11] 王蕊，胡辉帆，陈文兰，等. 一株甲基营养型芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定[J]. 中国调味品，2020，45(9)：5-10.
WANG R, HU H F, CHEN W L, et al. Identification of antibacterial active substances of a strain of *Bacillus methylotrophicus*[J]. **China Condiment**, 2020, 45(9): 5-10. (in Chinese)

[12] OSAKI C, YAMAGUCHI K, URAKAWA S, et al. The bacteriological properties of *Bacillus* strain TM-I-3 and analysis of the volatile antifungal compounds emitted by this bacteria[J]. **Biocontrol Science**, 2019, 24(3): 129-136.

[13] 魏琛. 芽孢杆菌挥发性物质对稻谷霉变的防控研究[D]. 长沙：中南林业科技大学，2021.

[14] GAO Z F, ZHANG B J, LIU H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. **Biological Control**, 2017, 105: 27-39.

[15] GONG A D, LI H P, SHEN L, et al. The *Shewanella algae* strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against

Aspergillus pathogens and aflatoxins[J]. **Frontiers in Microbiology**，2015，6：1091.
[16] QU S，YANG K L，CHEN L，et al. Cinnamaldehyde，a promising natural preservative against *Aspergillus flavus*[J]. **Frontiers in Microbiology**，2019，10：2895.
[17] 王青云. Bna05 菌株抗霉成分的分离鉴定及对稻谷防霉效果研究[D]. 长沙：中南林业科技大学，2017.
[18] 朱丽娟，国果，田竺青，等. 抗菌肽 AMP-17 对黄曲霉抑制作用的初步研究[J]. 食品与发酵工业，2022，48(10)：64-69.
ZHU L J，GUO G，TIAN Z Q，et al. Preliminary study on the inhibitory effect of antibacterial peptide AMP-17 on *Aspergillus flavus*[J]. **Food and Fermentation Industries**，2022，48(10)：64-69.（in Chinese）
[19] TIAN P P，LYU Y Y，WEI S，et al. Antifungal properties of recombinant puroindoline B protein against aflatoxigenic *Aspergillus flavus*[J]. **LWT–Food Science and Technology**，2021，144：111130.
[20] HU Z Y，YUAN K，ZHOU Q，et al. Mechanism of antifungal activity of *Perilla frutescens* essential oil against *Aspergillus flavus* by transcriptomic analysis[J]. **Food Control**，2021，123：107703.
[21] 余璐，魏琛，张凯歌，等. 枯草芽孢杆菌 PW2 产挥发性物质对赭曲霉的抑制作用[J]. 食品科学，2023，44(14)：125-133.
YU L，WEI C，ZHANG K G，et al. Effect of volatile compounds from *Bacillus subtilis* PW2 against *Aspergillus ochraceus*[J]. **Food Science**，2023，44 (14)：125-133.(in Chinese)
[22] LIM S M，YOON M Y，CHOI G J，et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi[J]. **The Plant Pathology Journal**，2017，33(5)：488-498.
[23] YOU W J，GE C H，JIANG Z C，et al. Screening of a broad-spectrum antagonist-*Bacillus siamensis*，and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits[J]. **Biological Control**，2021，157：104584.
[24] CHAVES-LÓPEZ C，SERIO A，GIANOTTI A，et al. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth[J]. **Journal of Applied Microbiology**，2015，119(2)：487-499.
[25] YUAN J，RAZA W，SHEN Q R，et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2012，78(16)：5942-5944.
[26] MA W B，JOHNSON E T. Natural flavour （*E*，*E*）-2，4-heptadienal as a potential fumigant for control of *Aspergillus flavus* in stored peanut seeds：finding new antifungal agents based on preservative sorbic acid[J]. **Food Control**，2021，124：107938.
[27] TIAN J，ZENG X B，FENG Z Z，et al. *Zanthoxylum molle* Rehd. essential oil as a potential natural preservative in management of *Aspergillus flavus*[J]. **Industrial Crops and Products**，2014，60：151-159.
[28] LI S F，ZHANG S B，LYU Y Y，et al. Heptanal inhibits the growth of *Aspergillus flavus* through disturbance of plasma membrane integrity，mitochondrial function and antioxidant enzyme activity[J]. **LWT-Food Science and Technology**，2022，154：112655.
[29] TIAN J，ZENG X B，ZENG H，et al. Investigations on the antifungal effect of nerol against *Aspergillus flavus* causing food spoilage[J]. **The Scientific World Journal**，2013，2013：230795.
[30] EDRIS A E，FARRAG E S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase[J]. **Die Nahrung**，2003，47(2)：117-121.
[31] INOUYE S，TSURUOKA T，WATANABE M，et al. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact[J]. **Mycoses**，2000，43(1/2)：17-23.
[32] 耿一鸣，李婷婷，励建荣，等. 松油烯 -4- 醇对荧光假单胞菌抑菌能力及作用机理[J]. 食品科学，2022，43(1)：30-36.
GENG Y M，LI T T，LI J R，et al. Antibacterial activity and mechanism of terpinene-4-ol against *Pseudomonas fluorescens*[J]. **Food Science**，2022，43(1)：30-36.（in Chinese）
[33] GALLUZZI L，VITALE I，AARONSON S A，et al. Molecular mechanisms of cell death：recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. **Cell Death and Differentiation**，2018，25(3)：486-541.
[34] LI L R，SHI Y H，CHESEREK M J，et al. Antibacterial activity and dual mechanisms of peptide analog derived from cell-penetrating peptide against *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pyogenes*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2013，97(4)：1711-1723.

（责任编辑：许艳超）