吲哚对黄曲霉生长及产毒的抑制作用

沈青山，周威，王淼焱，莫海珍，胡梁斌
（河南科技学院食品学院，河南新乡 453003）

摘要：本文研究了吲哚对黄曲霉的生长以及产毒的抑制作用。通过 96 孔板微量法发现吲哚能够抑制黄曲霉的生长，其最小抑制浓度（MIC）为 100 μg/mL；进而采用差量法测定了吲哚对黄曲霉菌丝生长量的抑制作用，结果表明 200 μg/mL 的吲哚处理可以完全抑制黄曲霉的菌丝生长。此外，通过高效液相色谱分析发现吲哚浓度达到 50 μg/mL 时，尽管对菌丝生长量没有明显影响，但是可以有效地抑制黄曲霉毒素 B1 的产生。这些结果说明吲哚抑制毒素产生并不是通过抑制生长来实现的。为了进一步了解吲哚对毒素产生的抑制机制，本研究通过 RT-PCR 分析了吲哚对黄曲霉产毒相关基因表达的影响。结果显示吲哚对产毒调控基因 aflR 的影响与其对毒素的作用趋势相同，同时吲哚还能够下调其他一些产毒相关基因 aflK 和 alfD 的表达。我们的研究结果表明吲哚具有很高的开发价值应用于粮食和饲料中黄曲霉毒素污染的控制。

关键词：吲哚；黄曲霉；黄曲霉毒素；抑制作用

文章篇号：1673-9078(2015)12-156-160 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.023

Inhibitory Effects of Indole on the Mycelial Growth and Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus flavus*

SHEN Qing-shan, ZHOU Wei, WANG Miao-yan, MO Hai-zhen, HU Liang-bin
(Department of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The inhibitory effects of indole on the mycelial growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* were investigated in this study. It was found that indole could efficiently inhibit the growth of *A. flavus* in a 96-well plate with the minimum inhibitory concentration (MIC) value of 100 μg/mL. Furthermore, the difference method was used to determine the inhibitory effects of indole on the mycelial weight of *A. flavus*. The results showed that 200 μg/mL indole could lead to the complete arrest of *A. flavus* mycelial growth. In addition, high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that when the indole concentration was 50 μg/mL, the production of aflatoxin B1 was effectively inhibited whereas no significant impacts were observed on the mycelial growth of *A. flavus*. These results indicate that the inhibition of aflatoxin B1 production by indole is not achieved by inhibiting the mycelial growth of *A. flavus*. To further understand the mechanism underlying the inhibition of aflatoxin B1 production, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to analyze the effects of indole on the expression of genes relevant to aflatoxin production. The results showed that indole exerted the same impacts on the expression of *aflR*- the regulatory gene in aflatoxin biosynthesis- as on aflatoxin B1 production. Additionally, indole could also downregulate the expression of *aflD* and *aflK* that are related to aflatoxin production. In summary, our results indicate that indole can be a potential candidate for application in the control of *A. flavus* contamination in food and animal feed.

Key words: indole; *Aspergillus flavus*; aflatoxin; inhibition

黄曲霉（*Aspergillus flavus*）是一种分布极其广泛的常见丝状真菌，主要污染谷物等粮食作物和动物饲料[1]。黄曲霉能够产生次级代谢产物黄曲霉毒素（Aflatoxin，AF），该类毒素具有很强的肝毒性和致畸变性[2~3]。黄曲霉毒素通过原料、粮食产品的加工贮藏，以及污染动物饲料等环节污染粮源性食品、食用油类以及畜禽类产品。据联合国粮农组织（FAO）估计，黄曲霉毒素污染所造成的损失可达数千亿美元[4]。AFs 是一组化学结构类似的化合物，已分离鉴定出 12 种包括 B1、B2、G1、G2、M1、M2、P1、Q、H1、GM、B2a 和毒醇。黄曲霉毒素的的基本结构为二呋喃环和香豆素，B1 是二氢呋喃氧杂萘邻酮的衍生物，含有一个双呋喃环和一个香豆素，其中前者为基本毒性

收稿日期：2015-03-09
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31101231）；河南省高校科技创新团队项目（13IRTSTHN006）
作者简介：沈青山（1989-），男，研究生，研究方向黄曲霉毒素代谢与污染控制
通讯作者：胡梁斌（1979-），男，博士，副教授，研究方向：食源性病原物控制

结构后者与致癌有关。M1 是黄曲霉毒素 B1 在体内经过羟化而衍生成的代谢产物。尽管黄曲霉已经被广泛研究，但对其污染的根除依然没有找到快速有效的方法。黄曲霉污染控制仍是世界难题。目前控制策略主要涉及到通过遗传育种提高材料抗感染能力、抑制和清除病原菌本身、抑制毒素素产生以及降解或钝化已存在毒素。近年来天然产物广泛用于植物病原菌的控制，已有研究报道菊科植物藿香蓟提取的精油能够有效抑制黄曲霉毒素的产生[5]。这种挥发性物质具有很好的分散性，具有应用在粮食和饲料中控制毒素污染的潜力。但是目前发现的既能抑制黄曲霉生长又能抑制黄曲霉毒素产生的天然挥发性物质资源非常有限。

吲哚及其衍生物普遍存在于天然有机物中[6]，如茉莉花油、水仙花油等。吲哚是由吡咯和苯并联的化合物（如图 1），分子内含有亚氨基，具有抗癌、抗病毒[7,8]的药理功能。吲哚外观呈无色或浅黄色片状结晶，长时间暴露于空气中或见光颜色变红，并树脂化，易溶于醇类等有机溶剂，不溶于水，且能随水蒸气同时挥发。吲哚浓具有强烈的粪臭味，扩散力强而持久；高度稀释的溶液有香味，可以作为香料使用。LD50 大鼠口服：1000 mg/kg。吲哚通常可作为很多物质的中间体，研究表明吲哚类的衍生物对金黄色葡萄球菌有一定的抑菌活性[9]。在本研究中，我们通过对吲哚的生物学抑菌活性测定，研究了其对黄曲霉生长和产毒的影响，并通过 RT-PCR 分析了吲哚对部分黄曲霉产毒相关基因表达的影响，以期为吲哚在粮食和食品中黄曲霉污染控制提供理论参考。

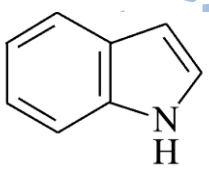


图 1 吲哚的化学结构

Fig.1 Chemical structure of indole

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料：黄曲霉菌 CGMCC3.2890，购于中国普通微生物菌种保藏管理中心，PDA 培养基 4 ℃保存。

试剂：吲哚（购于北京索莱宝科技有限公司），二甲基亚砜（DMSO），氯仿（分析纯），乙腈（色谱纯），甲醇（色谱纯），沙氏培养基。

1.2 仪器与设备

MOTIC BA210 生物显微镜，培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪，多功能酶标仪（Thermol 公司），高效液相色谱仪。

1.3 实验方法

1.3.1 吲哚的抑菌活性试验

挑取黄曲霉菌种到新的固体沙氏培养基上，28 ℃培养活化菌种，待菌板长成黄色时，用液体沙氏培养基收集新鲜的黄曲霉孢子，使孢子悬浮液浓度达到 1×10^5 CFU/mL，分装在 96 孔板中，每孔 200 μL，加入吲哚使其终浓度分别为 0、25、50、80、100、150、200 μg/mL（DMSO 为溶剂），同时用同样浓度 DMSO 处理黄曲霉孢子作为溶剂对照，28 ℃静置培养 24 h，用多功能酶标仪在波长 600 nm 的条件下测其吸光值。根据每孔黄曲霉的生长状况（可肉眼观察）以及吸光值得出吲哚对黄曲霉生长的最小抑制浓度 MIC 值。

1.3.2 菌丝鲜重的测定

取 400 μL 新鲜的黄曲霉孢子悬浮液（孢子浓度 1×10^5 CFU/mL）于 20 mL 沙氏培养基中，加入吲哚，使其终浓度分别为 0、25、50、150、200、250 μg/mL，轻微振荡使吲哚均匀分散，190 r/min，28 ℃摇培 48 h。真空抽滤，将菌丝体抽滤到定量滤纸上，放入烘箱内烘干，两次称量结果之差小于 0.01。同时，做平行试验，记录试验数据。

1.3.3 黄曲霉毒素相对含量的测定

收集不同处理的黄曲霉培养液，加三倍体积氯仿萃取，在 60 ℃条件下用氮吹仪将其吹干，然后再分别将其溶解于甲醇中，过 0.22 μm 微孔滤膜，然后用 HPLC 测定黄曲霉毒素的含量[10~11]。色谱柱：COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column（4.6 mm ID×250 mm）（上海泉岛公司）；柱温：22 ℃；进样量：10 μL；紫外检测器检测波长：365 nm；流动相：乙腈:甲醇:水（1:1:2, *V/V/V*）；流速：1 mL/min。

1.3.4 吲哚对黄曲霉相关产毒基因转录水平的影响

首先制得新鲜的黄曲霉孢子母液，使孢子的浓度达到 1×10^6 CFU/mL，然后取 400 μL 孢子母液接种到 20 mL 的液体沙氏培养基中，加入吲哚，使其终浓度达到 0、25、50、100 μg/mL，在 28 ℃，190 r/min 的条件下摇培 48 h，将菌丝分别抽滤收集，迅速放入液氮中冷冻用于总 RNA 的提取。

总 RNA 的提取采用试剂盒提取，将提取后的 RNA 迅速用反转录试剂盒进行一步反转录成 cDNA，-20 ℃保存作为模板用于 RT-PCR 反应。PCR 反应：94 ℃ 1 min；94 ℃ 30 s；Tm(表 1) 30 s；72 ℃ 1 min；72 ℃ 10 min；4 ℃保存。该过程中所用的引物序列及

其退火温度如表 1 所示。

表 1 黄曲霉产毒相关基因的引物和退火温度

Table 1 Primers and annealing temperatures of the genes related to aflatoxin production

基因	引物序列	退火温度/℃
18S rDNA	Forward 5′-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3′ Reverse 5′ -GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3′	55
aflR	Forward 5'- GCACCCTGTCTTCCCTAACA-3' Reverse 5'-ACGACCATGCTCAGCAAGTA-3'	57
aflD	Forward 5'-TCCAGGCACACATGATGGTC-3' Reverse 5'-TGTGGATAACGAAGTGCCCC-3'	49
aflK	Forward 5'-GAACTGCTTCAGTTGCCGTG-3' Reverse 5'-ACGAGGGTTCGTTTCTGGAC-3'	49
aflQ	Forward 5'-TTAAGGCAGCGGAATACAAG-3' Reverse5'-GACGCCCAAAGCCGAACACAAA-3'	58

1.4 数据分析

实验数据均运用 SPSS 12.0 数据处理系统，采用 Duncan's 新复极差法(DMRT)进行显著性分析。文章图表数据的结果均是三次实验数据的平均值±SD。

2 结果与分析

2.1 吲哚对黄曲霉孢子生长的抑制作用

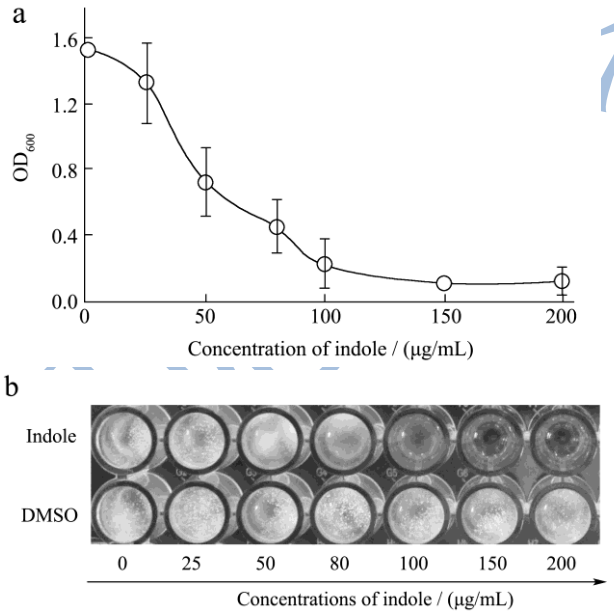


图 2 不同浓度的吲哚对黄曲霉生长的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect different concentrations of indole on the growth of *A. flavus*

注：a：不同浓度吲哚处理 24 h 的黄曲霉孢子液在 600 nm 处的吸光值；b：不同浓度吲哚处理 24 h 的黄曲霉在 96 孔板中的生长状态。

不同浓度的吲哚处理黄曲霉孢子后对其生长具有显著的抑制作用，当浓度达到 100 μg/mL，处理 24 h，与对照组相比已经对黄曲霉的生长产生很明显的抑制作用，继续增大吲哚的浓度黄曲霉基本不再生长。因此，吲哚对黄曲霉生长最小抑制浓度为 100 μg/mL（图 2）。

2.2 吲哚对黄曲菌丝的生长及产毒的抑制作用

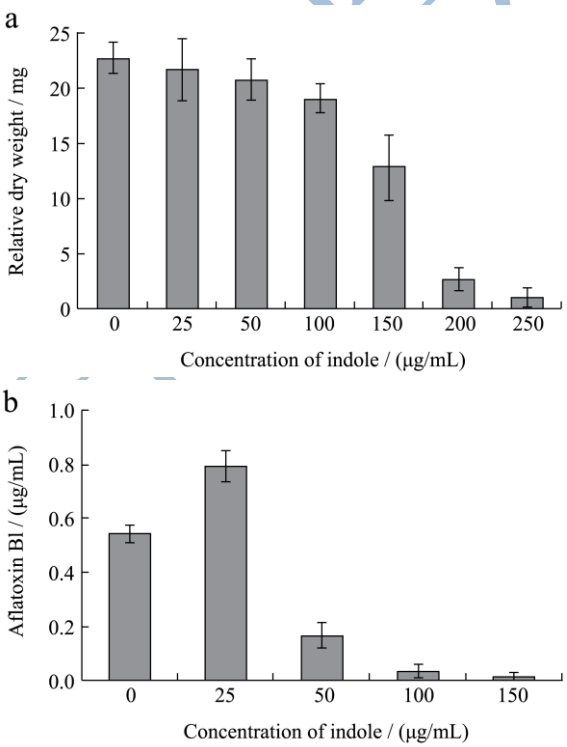


图 3 不同浓度的吲哚对黄曲霉菌丝生长及产毒的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effects of indole on the mycelial growth and aflatoxin B1 production of *A. flavus*

注：a：吲哚对黄曲霉菌丝量的影响；b：吲哚对黄曲霉毒素 B1 产生的影响。

用不同浓度（0、25、50、100、150、200、250 μg/mL）的吲哚处理黄曲霉孢子，28 ℃避光摇培 48 h 后，用差量法测量菌丝的相对鲜重。然后，用高效液相检测不同浓度下菌液中黄曲霉毒素的含量。结果显示随着吲哚浓度的增加，菌丝的相对干重逐渐减少（图 3a），当处理浓度达到 200 μg/mL 时，黄曲霉菌丝基本不生长。这表明，随着吲哚浓度的增加其对黄曲霉菌丝生长的抑制作用增强，当达到 2 倍 MIC 时可以完全抑制菌丝的生长；对产毒的抑制作用表现为：低浓度的吲哚促进毒素的产生；随着浓度的增加，表现为抑制效应；当浓度达到 50 μg/mL（0.5 倍 MIC）时，黄曲霉

毒素 B1 的含量已显著降低；随着浓度的增加达到 150 μg/mL 时，黄曲霉毒素 B1 的含量几乎为 0（图 3b），毒素的产生已被完全抑制。这表明，当吲哚浓度接近或大于其对黄曲霉生长的 MIC 时可以有效抑制黄曲霉毒素的产生。

2.3 吲哚对黄曲霉相关产毒基因转录的影响

黄曲霉的产毒受基因调控，毒素的产生受到基因组中相关基因簇表达量的调节[12]。本研究选择了部分与产毒密切相关的基因 *aflR*、*aflD*、*aflK*、*aflQ* 进行检测分析，并对其转录水平进行检测。这些基因涵盖了基因簇中的上，中，下游[13]。其中，*aflD* 为上游基因，*aflK*、*aflQ* 为下游基因。*aflR* 编码一个锌指结构的 DNA 结合蛋白，能够激活黄曲霉毒素生物合成通路上基因的表达[14]，属于毒素的调控基因。RT-PCR 结果显示，吲哚能够明显影响 *aflR* 的转录水平，而且影响趋势与其对产毒的抑制趋势相同。此外，除了 *aflQ*，其他上下游基因 *aflD* 和 *aflK* 的转录水平也随着吲哚浓度的增大受到了不同程度的抑制（图 4）。

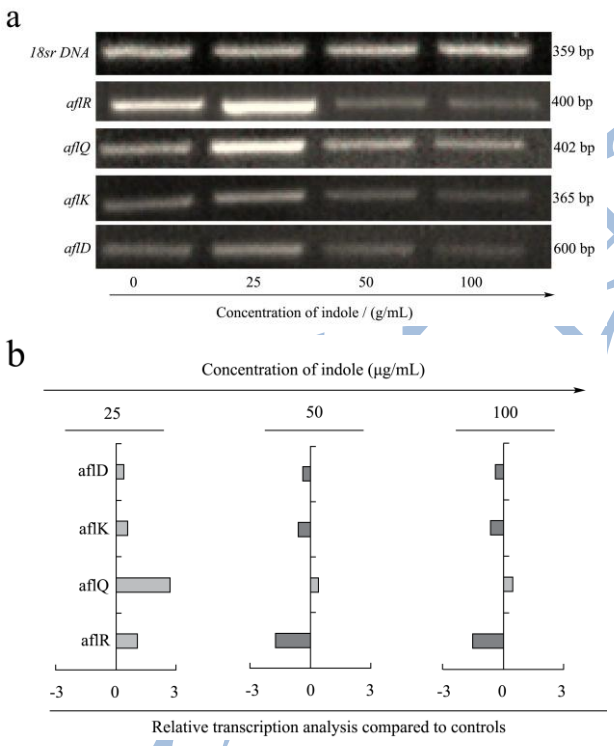


图 4 不同浓度吲哚处理对黄曲霉相关产毒基因的转录水平的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of indole on the transcriptional level of genes related to aflatoxin B1 production

Notes: A: the PCR products in the agarose gel, and their sizes were shown at the right; B: the relative gene transcription normalized on 18S rRNA level compared to control were reported. The value of column equals the relative transcription of treatment minus that of control .

3 讨论

吲哚在生命体内通常通过色氨酸降解途径生成，并作为信号分子广泛参与了生命体各种活动的调控[15]。已有研究表明吲哚可以降低细菌类病原物的致病能力，影响其生物膜和抗药性的形成[16,17]。最近更有研究表明吲哚可以作为一种跨界信号分子，促进不同界生命间的相互感应[18]。我们的研究发现吲哚能够抑制黄曲霉的生长。细菌可以通过产生吲哚拮抗黄曲霉，争取生存空间。已有报道链霉菌能够产生抗真菌类的抗生素 3-(4-氯-5-恶唑基)-1H-吲哚[19]，由此可见吲哚家族的抗真菌活性可能是普遍的。由于吲哚的母体结构具有很多化学活性位点，可以进行新型杀菌剂的设计、合成和研发。

吲哚除了能够抑制黄曲霉的生长，还可以抑制毒素的产生。作为一种易挥发性物质，吲哚具有应用在粮食或者食品贮藏中黄曲霉污染控制的优势。吲哚被报道能够启动全局调控因子，调控氧化胁迫[20]。而氧化胁迫与黄曲霉毒素调控密切相关；抗氧化转录因子 Ap1 就结合在 *aflR* 的启动子区域[21]。吲哚对 *aflR* 的调控很可能也是通过调控氧化胁迫水平来完成的。

4 结论

吲哚既可以有效地抑制黄曲霉的生长，又能抑制黄曲霉毒素的产生；吲哚处理能够抑制黄曲霉毒素产生的相关基因的表达，尤其是能够下调产毒调控基因 *aflR* 基因的表达。吲哚是一种活泼的化学中间体，又是挥发性较强的物质，因此可以被进一步开发用于控制粮食和饲料中黄曲霉毒素的污染。

参考文献

[1] Amaike S, Keller N P. *Aspergillus flavus* [J]. Annual Review of Phytopathology, 2011, 49: 107-133

[2] Piekkola S, Tumer P C, Aadel-Hamid M, et al. Characterisation of aflatoxin and deoxynivalenol exposure among pregnant Egyptian women [J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2012, 29(6): 962-971

[3] Calvo A M, Wilson R A, Bok J W, et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 447-459

[4] 郭耀东,陈璐,袁亚宏,等.基于概率分析的玉米食品中黄曲霉毒素 B1 膳食暴露及风险评估[J].食品科学,2013,34(11):

24-27
GUO Yao-dong, CHEN Lu, YUAN Ya-hong, et al. Dietary exposure and risk assessment of aflatoxin B1 in corn-based foods in China using probabilistic approach [J]. Food Science, 2013, 34(11): 24-27

[5] Nogueira JH, Gonçalez E, Galleti SR, et al. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus* [J]. International Journal of Food Microbiology. 2010, 137(1): 55-60

[6] Garbe T R, Kobayashi M, Shimizu N, et a1. Indolyl carboxylic acids by condensation of indoles with α-Keto acids [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(5):596-598

[7] Chen I, Safe S, Bjeldanes L. lndole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists in T47D human breast cancer cells [J]. Biochemical Pharmacology, 1996, 51(8):1069-1076

[8] Suzen S, Buyukbingol E. Anti-cancer activity studies of indolalthio-hydantoin (PIT) on certain cancer cell lines [J]. Farmaco, 2000, 55(4): 246-248

[9] 刘培均,刘小卒,王思倚.四氢吡咯并吲哚啉衍生物的晶体结构及抗菌活性研究[J].广东化工,2014,41(19):39-40
LIU Pei-jun, LIU Xiao-zu, WANG Si-yi. Crystal structure and biological activity of pyrroloindoline derivates [J]. Guangdong Chemical Industry, 2014, 41(19): 39-40

[10] Alberts J F, Engelbrecht Y, Steyn P S, et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109: 121-126

[11] Mo H Z, Zhang H, Wu Q H, et al. Inhibitory effects of tea extract on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 56: 462-467

[12] 王淼焱,张浩,杨洁,等.槲皮素抑制黄曲霉毒素产生的机制初探 [J].现代食品科技,2014,30(7):56-62
WANG Miao-yan, ZHANG Hao, YANG Jie, et al. Inhibition effect of quercetin on aflatoxin B1 production [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 56-62

[13] Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, et al. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene [J]. Eukaryot Cell, 2008. 7(6): 988-1000

[14] 李红波.香菇纤维素衍生物鉴定及其抑制黄曲霉菌产毒机制研究[D].河南新乡:河南科技学院,2012
LI Hong-bo. Structural identification and mechanisms of *lentinus edodes* cellulose derivative against aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [D]. Henan Institute of Science and Technology, 2012

[15] Chu W, Zere T R, Weber M M, et al. Indole production promotes Escherichia coli mixed-culture growth with Pseudomonas aeruginosa by inhibiting quorum signaling [J]. Applied and Environmental Microbiology. 2012, 78(2): 411-419

[16] Lee J, Jayaraman A, Wood T K. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA [J]. BMC Microbiology, 2007, 7:42

[17] Bartlett D H, Mueller R S, Beyhan S, et al. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholera* [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191:3504 -3516

[18] Melander R J, Minvielle M J, Melander C. Controlling bacterial behavior with indole-containing natural products and derivatives [J]. Tetrahedron, 2014, 70(37):6363-6372

[19] Zhang M Z, Chen Q, Xie C H, et al. Synthesis and antifungal activity of novel streptochlorin analogues [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 92:776-83

[20] Lee H H, Molla M N, Cantor C R, et al. Bacterial charity work leads to population-wide resistance [J]. Nature, 2010, 467:82-85

[21] Georgianna D R, Payne G A. *Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis*: *from gene to genome [J]*. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46: 113-125