

## 研究报告



## 氧脂素对赭曲霉在大豆培养基质中合成赭曲霉毒素 A 的影响

高婧 梁志宏\*

中国农业大学科学与营养工程学院 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心食品 北京 100083

**摘要:**【背景】赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 是曲霉属和青霉属等真菌的次级代谢产物, 严重威胁农产品及食品安全, 氧脂素羟基十八碳二烯酸(hydroxyoctadecadienoic acids, HODEs)被认为可能是曲霉属的群体感应信号分子, 调节曲霉的生长发育和次级代谢物生成。【目的】主要研究 HODEs 对赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)菌株 AS3.4412 产生 OTA 的影响, 检测孢子密度、培养基类别以及内、外源 HODEs 作用下 OTA 产量的不同变化。【方法】分别在 PDB、黄豆和黑豆培养基中进行赭曲霉的培养, 采用高效液相色谱-荧光检测法测定 OTA 含量, 采用高效液相色谱-质谱法测定氧脂素含量, 根据变化规律寻找赭曲霉群体密度、氧脂素、OTA 三者间的关系。【结果】低密度赭曲霉培养物( $10^3$  spores/mL)中 9(S)-HODE/13(S)-HODE 及 OTA 产量高于高密度赭曲霉( $10^6$  spores/mL); 外源添加 9(S)-HODE 能促进 OTA 合成, 13(S)-HODE 可以抑制 OTA 合成; 赭曲霉侵染抗氧化能力更高的黑豆产生更多的 OTA。【结论】OTA 的合成受到赭曲霉群体密度和氧脂素的影响, 推测 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 是赭曲霉群体感应信号分子, 并且二者在调节 OTA 合成中具有相反的作用。

关键词: 赭曲霉毒素 A, 群体感应, 氧脂素, 氧化应激

## Effect of oxylipins on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* in soybean culture medium

GAO Jing LIANG Zhi-Hong\*

Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract:** [Background] Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite of fungi such as *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., which poses a serious threat to agricultural products and food safety. Oxygenated hydroxy octadecadienoic acid (HODEs) is considered the Quorum sensing signal molecules to regulate the growth and development of *Aspergillus* and the production of secondary metabolites. [Objective] This experiment mainly studied the effect of HODEs on OTA production of *Aspergillus ochraceus* AS3.4412, and detected different changes of spore density, medium type and OTA yield under the action of endogenous and exogenous HODEs. [Methods] The culture of AS3.4412 was carried out in PDB, soybean

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31671947)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-62737055; E-mail: lzh105@cau.edu.cn

Received: 10-10-2019; Accepted: 05-01-2020; Published online: 22-02-2020  
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671947)

\*通信作者: Tel: 010-62737055; E-mail: lzh105@cau.edu.cn

收稿日期: 2019-10-10; 接受日期: 2020-01-05; 网络首发日期: 2020-02-22

and black bean medium respectively. The content of OTA was determined by high performance liquid chromatography-fluorescence detection and the content of oxylipins was determined by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The relationship among population density of *A. Ochraceus*, oxylipins and OTA was found according to the variation rule of the experimental results. **[Results]** The results showed that 9(S)-HODE/13(S)-HODE and OTA production in low density *A. ochraceus* ( $10^3$  spores/mL) culture was higher than high density ( $10^6$  spores/mL). Exogenous addition of 9(S)-HODE promoted OTA synthesis, and 13(S)-HODE inhibited OTA synthesis. *A. ochraceus* infects black beans with higher antioxidant capacity and produces more OTA. **[Conclusion]** The results showed that population density and HODEs could affect the OTA production of *A. ochraceus*. It is speculated that 9(S)-HODE and 13(S)-HODE are quorum sensing signals of *A. ochraceus*, and they have the opposite effect in regulating OTA synthesis.

**Keywords:** Ochratoxin A, Quorum sensing, Oxylipins, Oxidative stress

赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)是一种广泛分布于粮食和饲料中的丝状真菌,可以产生有害次级代谢产物赭曲霉毒素(ochratoxins, OTs)。目前已发现超过20种赭曲霉毒素,其中赭曲霉毒素A(OTA)分布最广、危害最大<sup>[1]</sup>。OTA广泛污染谷物、豆类、葡萄、咖啡等农副产品,海产品中也已检出<sup>[2]</sup>,可以引起人类和动物的肝脏、肾脏损伤,并有致畸、致突变、致癌和免疫抑制作用,被国际癌症研究机构 and 世界卫生组织列为 IIB 类致癌物质<sup>[3]</sup>。依据 Benford 等 2001 年收集的 21 367 种样本的 OTA 调查数据<sup>[4]</sup>,食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)认为 OTA 对人类威胁最重要的食品依次为:谷物>葡萄及其制品>咖啡及其制品>白酒>其他,农产品和食品中的 OTA 污染问题已经越来越受到重视。

群体感应(quorum sensing, QS)最早在费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)的研究中被发现<sup>[5]</sup>,是微生物调节群体行为的信号交流机制,微生物可以分泌一些特定的小分子化学物质,即群体感应信号分子到胞外,当胞外信号分子在局部环境中积累达到一定水平时,可以进入其他微生物细胞内激活特定基因的表达,从而监测群体密度并调控自身的某些生理行为,如菌相转换、毒力因子产生、生物膜形成等生理活动,以适应环境的变化<sup>[6]</sup>。在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)<sup>[7-8]</sup>、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)<sup>[9]</sup>、赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)<sup>[10]</sup>等丝状真菌中发现,丝

状真菌能够通过 QS 调节其生长发育和真菌毒素合成。

真菌中已经发现的群体感应信号分子主要有氧脂素(oxylipins)、法尼醇(farnesol)、酪醇(tyrosol)、 $\gamma$ -丁内酯( $\gamma$ -butyrolactone)等,其中,氧脂素是多不饱和脂肪酸通过酶促或非酶促反应产生的一类氧合脂质物质,是丝状真菌、酵母菌、植物和动物等真核生物信号转导途径的重要信号分子<sup>[10-11]</sup>,可以调节真菌无性和有性发育之间的平衡,并与真菌毒素的合成有关<sup>[12]</sup>。亚油酸氧化产物如氢过氧化十八碳二烯酸(hydroperoxyoctadecadienoic acid, HPODE)和羟基十八碳二烯酸(hydroxyoctadecaenoic acid, HODE)不仅参与植物生长发育和防御反应,而且影响寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)中黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1)的合成以及构巢曲霉中杂色曲霉毒素(sterigmatocystin, ST)的合成<sup>[13]</sup>。在黄曲霉的研究中发现,13(S)-HODEs 可以抑制 AF 合成,9(S)-HPODE 能够促进 AF 合成<sup>[14]</sup>。Hell 等研究发现植物来源的 HODEs、HPODEs 和氢过氧化十八碳三烯酸(hydroperoxyoctadecatrienoic acid, HPOTE)等可以影响黄曲霉和构巢曲霉的生长发育、形态转换及真菌毒素的合成<sup>[15]</sup>,说明植物和真菌通过脂肪氧合酶(lipoxygenase, LOX)产生的氧脂素有相似功能<sup>[16-17]</sup>。根据添加氧原子的位置不同,植物的 LOX 包括 9-LOX (9-C 上添加)和

13-LOX (13-C 上添加), 源于 9-LOX 的氧脂素能增加真菌毒素合成, 而源于 13-LOX 的氧脂素可以抑制真菌毒素的合成<sup>[18-19]</sup>。

正常生长和生理条件下, 植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除保持平衡, 不会对机体造成损伤, 但当真菌侵染植物后, 受 LOX 和双加氧酶(dioxygenase, DOX)调节产生氧化应激物, 引起植物体内大分子物质的氧化损伤, 而植物可以利用自身的抗氧化防御机制, 包括酶促的抗氧化体系如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase from micrococcus lysodeikticus, CAT)、过氧化物酶(oxidase, POD)等以及非酶促抗氧化体系来清除活性氧的不利影响<sup>[20-24]</sup>, 而真菌则相应地产生更多的真菌毒素进行应对, 氧化胁迫已经在黄曲霉和构巢曲霉中发现, 与真菌毒素的生物合成和不同的发育状态紧密相关<sup>[25-26]</sup>。

赭曲霉对粮食的污染以及其产生的赭曲霉毒素 A 对人体健康的危害已经越来越受到重视, 赭曲霉的 OTA 合成受到群体密度调控, 但具体的群体感应信号分子及其调控机制尚不明确, 氧脂素可能是赭曲霉的群体感应信号分子之一。本文拟探究赭曲霉 OTA 的产生是否受到群体密度的影响, 且是否与氧脂素 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 有关, 同时阐明氧脂素在赭曲霉生长发育和毒素产生中所起的作用, 很有可能从源头找到控制赭曲霉污染的方法, 并丰富赭曲霉的毒素合成调控机理研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验菌株

赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)菌种 AS3.4412 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

氧脂素 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 标准品购

自 Cayman 化学公司; OTA 标准品购自 Sigma-Aldrich 公司; 其他常规试剂均为国产或进口分析纯级别。

高效液相色谱仪配荧光检测器、高效液相色谱-串联质谱, Agilent technologies 公司。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)均为常规培养基, 购自 Cayman 化学公司<sup>[7]</sup>。

### 1.2 赭曲霉孢子悬液的制备

所用赭曲霉菌种 AS3.4412 在 PDA 培养基上 30 °C 黑暗培养 6-7 d, 将孢子刮到含 0.01%吐温-20 的灭菌生理盐水中, 搅拌均匀后经灭菌的 4 层纱布过滤, 毛细吸管取滤液于血球计数板计数, 计数后的孢子悬浮液用无菌生理盐水稀释至  $10^1-10^7$  spores/mL 备用。

### 1.3 培养基中赭曲霉的接种

#### 1.3.1 PDB 培养基

取 PDB 培养基溶于 1 L 蒸馏水, 分装于 250 mL 锥形瓶中(每瓶 45 mL), 封口膜封口后  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min, 待培养基冷却至室温后分别加入  $10^2-10^7$  spores/mL 的赭曲霉孢子悬浮液 5 mL, 配制成终浓度为  $10^1-10^6$  spores/mL 的孢子悬浮液, 恒温培养箱中 30 °C 黑暗培养。

#### 1.3.2 大豆培养基

大豆经破碎机粉碎 30 s, 称量 3 g 大豆粉末于 5×5 cm 小平皿中, 大豆粉末刚好铺满皿底部, 紫外灭菌 24 h, 将制备好的  $10^2-10^7$  spores/mL 的孢子悬浮液接种在大豆培养基中, 保证菌悬液均匀且充分浸没大豆粉末, 封口膜封口后于 28 °C 黑暗条件下培养。

### 1.4 高效液相色谱-荧光检测法检测 OTA 产量

#### 1.4.1 PDB 培养基中 OTA 的提取

每隔 48 h 取 1 mL PDB 培养基培养物, 8 000 r/min 离心后取 500 μL 上清液, 用 8 mol/L 盐酸调 pH 为 1.0-2.0, 用 1 mL 三氯甲烷提取 3 次, 取有机相汇总, 氮气吹干后用最小体积的甲醇溶解, 过 0.22 μm 有机滤膜以去除大颗粒的杂质, 滤

液装入进样瓶中待测。

#### 1.4.2 大豆培养基中 OTA 的提取

向每份大豆培养基(3 g)培养物中加 10 mL 三氯甲烷和 1 mL 0.1 mol/L 的磷酸, 150 r/min 转速摇床振摇 0.5 h–2 h。四层纱布漏斗过滤掉大豆残渣, 取滤液, 提取 2 遍, 滤液加 15 mL 1.5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液萃取, 分液漏斗分离, 取水层, 提取 2 遍, 加 8 mol/L HCl 调 pH 至 2.0–3.0, 加 15 mL 三氯甲烷摇 2 min, 取三氯甲烷层, 20 mL 去离子水洗涤, 取三氯甲烷层, 氮气吹干后用最小体积甲醇溶解, 过 0.22 μm 有机滤膜以去除大颗粒的杂质, 滤液装入进样瓶中待测。

#### 1.4.3 OTA 的测定

高效液相色谱串联荧光检测器参考条件: 色谱柱 C18 柱, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 流速 1 mL/min; 激发波长 333 nm, 发射波长 460 nm; 流动相 A 相: 冰乙酸:水(2:100, 体积比), B 相: 乙腈, 等度洗脱 A:B (50:50, 体积比)。

### 1.5 气相色谱仪测赭曲霉脂肪酸代谢产物

#### 1.5.1 脂肪酸代谢产物的提取

在 PDB 培养基中培养 6 d 的赭曲霉用滤纸将菌丝体与培养基分离, 无菌水冲洗菌丝体, 真空抽滤压干菌丝体中液体培养基, 于–80 °C 冷冻 8 h 后用冷冻真空干燥机干燥 24 h, 取出后加液氮研磨磨碎。

#### 1.5.2 衍生化反应

取磨碎的冻干赭曲霉菌丝体样品 100 mg, 加入 1.5 mL 甲醇:氯仿:水溶液(5:2:1, 体积比), 摇匀后超声(1 000 Hz)辅助提取 40 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液到新 EP 管中, 加入 400 μL 水和 400 μL 氯仿, 振荡混匀后发生分层, 上层为甲醇-水相, 下层为氯仿相, 上下两层分别转移 400 μL 至 2 mL 质谱小瓶中。为了降低代谢物的沸点, 提取物经氮气吹干后进行衍生化反应。采用两步衍生法, 第 1 步向小瓶中加入 50 μL 20 mg/mL 甲氧胺盐酸盐吡啶溶液, 目的是保护羰基及减少还原糖成环, 于 37 °C、150 r/min 摇床中

反应 2 h。第 2 步为三甲基硅烷化反应, 加入 100 μL N-甲基-N-三甲基硅烷(三氟乙酰胺 MSTFA), 于 37 °C、150 r/min 摇床中反应 30 min, 反应完冷却至室温, 气相色谱待测。

#### 1.5.3 气相色谱仪分析赭曲霉菌中脂肪酸代谢产物

衍生化后的菌丝体利用气相色谱仪测定脂肪酸代谢产物, 条件: C18 色谱柱 Agilent J&W HP-FFAP 30 m×250 μm×0.25 μm; 进样量 1 μL; 进样口温度 230 °C; 流速 1 mL/min, 按照 50:1 的分流比分流, 载气为氦气; 温度程序 180 °C 保持 5 min, 以 2 °C/min 速率升温到 210 °C 不保持, 再以 5 °C/min 速率升温到 250 °C 不保持; 氢火焰离子化检测器。

### 1.6 高效液相色谱-质谱法检测氧脂素产量

#### 1.6.1 氧脂素的提取

每隔 48 h 取样, 每次取 1 mL PDB 培养基培养物或 3 g 大豆培养基, 用三氯甲烷:甲醇(2:1, 体积比)提取 3 次, 取有机相汇总, 每 1 mL 三氯甲烷体系中加入 2 mg 三苯基膦作为抗氧化剂防止氧脂素自动氧化, 加入硼氢化钾作还原剂, 将极不稳定的 HPODEs 还原为更稳定的 HODEs, 氮气吹干后用最小体积的乙醇溶解, 过 0.22 μm 有机滤膜以去除大颗粒的杂质, 滤液装入进样瓶中待测。

#### 1.6.2 氧脂素的测定

高效液相色谱条件如下, 流动相为乙腈:0.1% 甲酸水溶液(90:10, 体积比); 流速 0.3 mL/min; 进样量 5 μL; 色谱柱 Eclipse plus C18 (2.1 mm×50 mm×3.5 μm); 柱温: 30 °C。质谱条件为: 电喷雾离子源(ESI)负离子模式, 串联四极杆质量分析器; 离子源温度 100 °C; 干燥气温度 350 °C; 干燥气流速 8.0 L/min; 雾化气压力 35.0 Pa; 碎裂电压 135 V; 特征离子对(*m/z*) 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 分别为 171/295 和 195/295。

## 2 结果与分析

### 2.1 赭曲霉初始接种孢子密度的选择

PDB 培养基中接种系列浓度梯度的赭曲霉菌

株 AS3.4412 孢子悬液, 在 28 °C 黑暗条件下培养 6 d, 测定 OTA 浓度的结果(图 1)显示, 随着初始孢子密度的增加, OTA 产量逐渐增加; 当接种量达到  $10^3$  spores/mL 时, OTA 产量达到最大, 为 24.08  $\mu\text{g/mL}$ ; 之后逐渐降低, 到  $10^6$  spores/mL 时是一个转折点, 之后 OTA 产量又快速增加。Yan 等在黄曲霉的研究中也曾发现随着初始孢子密度的增加,  $10^3$  spores/mL 时 AF 产量最高, 随后下降<sup>[10,14]</sup>。基于 OTA 产量的变化趋势, 本实验采用  $10^3$  spores/mL 的孢子悬液为低群体密度代表、 $10^6$  spores/mL 的孢子悬液为高群体密度代表进行后续实验。

## 2.2 不同接种孢子密度下赭曲霉脂肪酸代谢产物的分析

PDB 培养基接种初始孢子浓度为  $10^3$  spores/mL 和  $10^6$  spores/mL 的赭曲霉, 于 28 °C 黑暗条件下 160 r/min 摇床培养 6 d, 获得的菌丝体培养物经气相色谱分析, 脂肪酸代谢成分结果如图 2 所示。菌

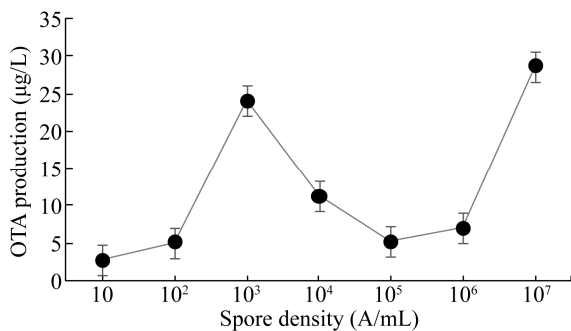


图 1 赭曲霉初始接种的孢子密度与 OTA 产量关系  
Figure 1 Relationship between initial spore inoculation density and OTA yield

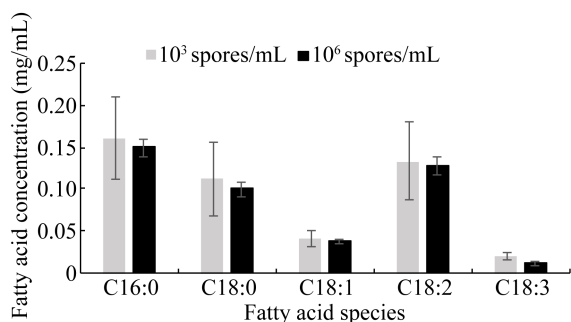


图 2 不同接种孢子密度赭曲霉菌丝体脂肪酸代谢成分分析  
Figure 2 Fatty acid components produced by *Aspergillus ochraceus* in different spore concentrations

丝体中的主要脂肪酸为 C16:0、C18:0、C18:2, 且接种量为  $10^3$  spores/mL 的菌丝体含有的 C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3 比接种量为  $10^6$  spores/mL 的菌丝体含量略高。

## 2.3 PDB 培养基中 OTA 及氧脂素产量变化趋势

不同接种初始孢子密度的赭曲霉于 28 °C 霉菌培养箱中黑暗培养 1–15 d, 每隔 48 h 取样测定, OTA 变化趋势见图 3A, 考虑到 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 分别可以促进和抑制黄曲霉毒素的产生<sup>[11]</sup>, 因此以二者比值 9(S)-HODE/13(S)-HODE 进行分析, 变化趋势见图 3B。培养初期赭曲霉生长滞后, OTA 生成缓慢, 第 5 天开始赭曲霉进入成熟期, 次级代谢产物 OTA 开始快速合成; 第 9 天之后 OTA 积累缓慢, 赭曲霉进入繁殖阶段, 并不产生 OTA; 11 d 之后 OTA 有所下降, 其原因可能是 OTA 在自身羧肽酶的催化下水解成苯丙氨酸和赭曲霉毒素  $\alpha$  (ochratoxin  $\alpha$ , OT $\alpha$ ), 低孢子密度时产生比高孢子密度更多的 OTA。在 OTA 大幅度变化的时间节点氧脂素也发生转折性变化,

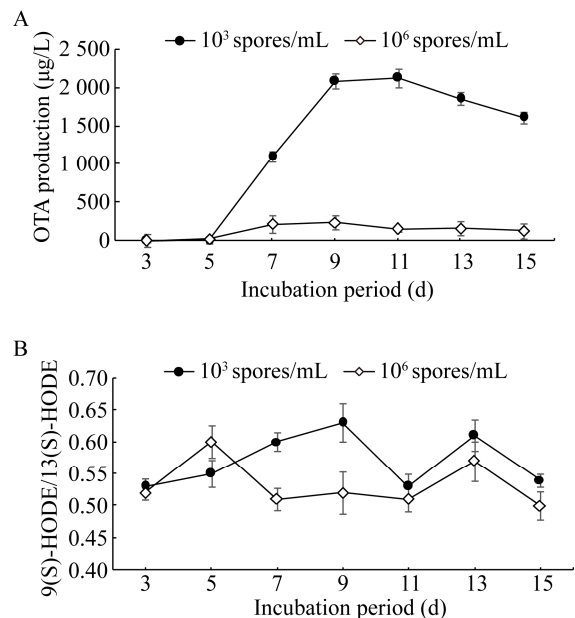


图 3 PDB 液体培养基中赭曲霉 OTA (A)及氧脂素(B)产量变化趋势

Figure 3 Trends of OTA (A) and oxytocin (B) production by *Aspergillus* in PDB liquid medium

第 5 天之后低群体密度的赭曲霉 9(S)-HODE/13(S)-HODE 高于高群体密度的赭曲霉, 之后低群体密度下产生相对更大比例的 9(S)-HODE。

#### 2.4 氧脂素对赭曲霉产 OTA 的影响

外源添加氧脂素 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE, 乙醇作为对照, 霉菌培养箱中 28 °C 黑暗条件下培养 5 d 测定 OTA 产量, 研究它们对赭曲霉产 OTA 的影响。结果如图 4 所示, 添加 9(S)-HODE 可以促进 OTA 产生, 而添加 13(S)-HODE 抑制 OTA 产生。

#### 2.5 大豆培养基中 OTA 及氧脂素产量变化趋势

大豆作为大宗作物油料作物, 含丰富的不饱和脂肪酸, 也是最易受赭曲霉污染的粮食之一<sup>[27]</sup>。1947 年 Theorell 等首次发现大豆中含催化氧脂素生成的脂肪氧合酶 LOX, Tsitsigiannis 等研究发现大豆中产生的氧脂素和真菌内生氧脂素有相似的作用<sup>[16]</sup>。OTA 产量变化如图 5A 所示, 大豆培养基中 OTA 产量整体呈现先上升后达到稳定的趋势, 低群体密度的赭曲霉产生更多的 OTA, 这与 PDB 培养基中变化趋势相似。氧脂素变化趋势如图 5B 所示, 9(S)-HODE 所占比例呈上升状态, 开始时高群体密度的赭曲霉产生更大比例的 9(S)-HODE, 培养后期低群体密度的赭曲霉产生更大比例的 9(S)-HODE。

#### 2.6 黑豆和黄豆培养基中 OTA 产量变化趋势

已有研究发现真菌毒素的产量与宿主的氧化应激有关, 不同种类的大豆抗氧化能力不同, 所以

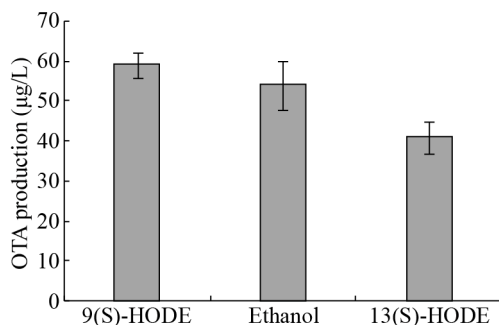


图 4 氧脂素对赭曲霉产 OTA 的影响

Figure 4 Effect of oxylipins on OTA production by *Aspergillus*

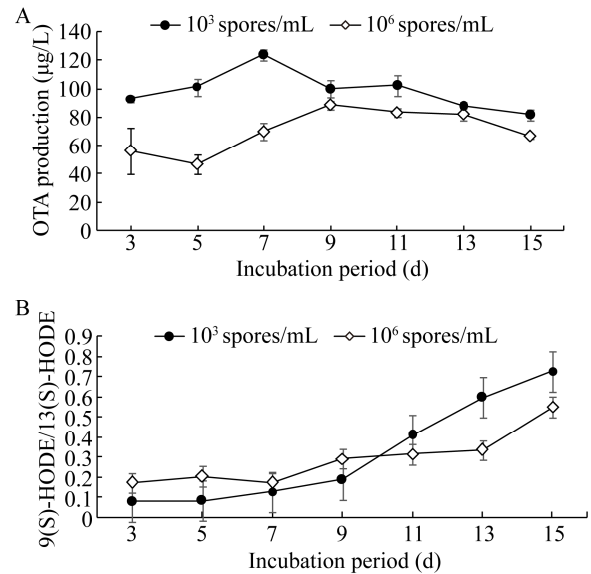


图 5 大豆培养基中赭曲霉 OTA (A)及氧脂素(B)产量变化趋势

Figure 5 Trends in OTA (A) and oxytocin production (B) by *Aspergillus* in soybean medium

选择黑豆和黄豆作为对比。黑豆与黄豆中赭曲霉产 OTA 变化趋势如图 6 所示, 培养初期 OTA 浓度增加缓慢, 5 d 之后开始快速升高, 至第 10 天时达到峰值, 之后下降, 13 d 之后再次上升, 这与 PDB 培养基中的变化趋势相似, 与赭曲霉生长周期相关; 培养初期黑豆和黄豆中 OTA 产量无较大差别, 培养后期黑豆中 OTA 产量开始远高于黄豆, 且波动范围更大。袁利鹏等发现, 黑豆的总抗氧化能力及清除自由基的能力均高于黄豆<sup>[28]</sup>, 这可能导致赭曲霉应对黑豆的氧化应激需要做出更强烈的防御反应。

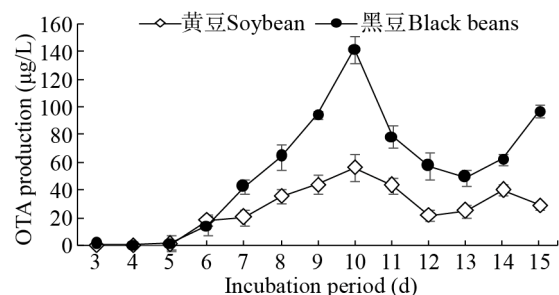


图 6 黑豆和黄豆培养基中 OTA 产量变化趋势

Figure 6 Trend of OTA production in black bean and soybean medium

### 3 讨论与结论

随着全球范围内的食品赭曲霉毒素污染问题越来越受到重视,副作用小且环境友好的 OTA 生物脱毒技术成为目前研究的热点<sup>[29]</sup>。已有研究发现群体感应现象是微生物间普遍存在的一种交流机制,微生物在群体密度达到一定阈值时能产生调节其生长发育和次级代谢物产生的信号分子,氧脂素作为已发现的重要信号分子之一,与真菌毒素的合成密切相关<sup>[26]</sup>。本实验选定产 OTA 的模式菌株赭曲霉 AS3.4412 作为试验对象,从群体感应角度研究群体密度、氧脂素、OTA 产量三者之间的关系。

Keller 课题组发现曲霉属真菌如构巢曲霉和黄曲霉的生长发育与群体密度有关,并且黄曲霉菌产生 AF 受群体密度的调节,在低密度( $10^3$  spore/皿)培养环境下 AF 产量更高;高密度( $10^7$  个孢子/皿)培养时产生的 AF 降低<sup>[30]</sup>。本研究发现了类似的结果,低群体密度下( $10^3$  spores/mL)赭曲霉产生比高群体密度( $10^6$  spores/mL)下更多的 OTA。氧脂素作为真核生物重要的信号分子,9(S)-HPODE 和 13(S)-HPODE 对寄生曲霉和构巢曲霉的产毒具有不同作用,13(S)-HPODE 抑制寄生曲霉和构巢曲霉的毒素合成基因(*ver-1* 和 *stcU*)表达,显著降低了 AFB1 以及 ST 的产量,而相同浓度的 9(S)-HPODE 对产毒的影响不明显<sup>[13]</sup>。当黄曲霉同时敲除 *ppo* 基因(*ppoA*、*ppoB*、*ppoC* 和 *ppoD*)和 *lox* 基因,即使群体密度发生变化,其孢子的生理学特征也不会产生变化,这些敲除 *ppo* 和 *lox* 基因的黄曲霉感染玉米和花生种子后,AF 产量增加,表明氧脂素种类和浓度对目标真菌的生长发育和次级代谢物产生具有不同的调节作用<sup>[19]</sup>。与黄曲霉类似,赭曲霉中存在一个类 *lox* 基因 *AoloxA* 基因,该基因的产物脂氧合酶能够催化亚油酸发生加氧反应,生成脂过氧化物 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE,影响赭曲霉形态及 OTA 的合成,敲除 *AoloxA* 基因后的赭曲霉菌株氧脂素水平显著降低,OTA 合成受到

抑制<sup>[31]</sup>。

AF 主要积累在玉米种子中富含脂肪酸的胚及糊粉层部位<sup>[30]</sup>,相比于高淀粉含量的种子,高油脂含量的种子如大豆和花生在感染曲霉属真菌之后更容易产生 AF<sup>[32]</sup>,未脱脂的种子要比脱脂后的种子更易累积 AF<sup>[33-34]</sup>,这些结果间接说明脂肪酸与 AF 合成有关。黄曲霉菌在侵染油酸含量高的花生种子后,产生比油酸含量低的花生种子多一倍的 AF<sup>[35]</sup>,但也有实验结果表明曲霉真菌在感染亚油酸含量高的花生种子后所产生的毒素却比低亚油酸的种子少<sup>[36]</sup>,说明不同类型的脂肪酸在调控毒素合成过程中发挥的作用可能是不同的。另一方面,Li 等发现赭曲霉侵染脂肪含量较高的作物如花生和大豆,可以引起抗氧化酶活性降低、活性氧产量升高<sup>[10]</sup>,营养成分中具有抗氧化作用的维生素 E 显著下降,产生比玉米和小麦更多的 OTA<sup>[37]</sup>,说明赭曲霉中 OTA 的产生除了与脂肪代谢紧密相关外,植物受真菌侵染后的氧化应激作用也能够对 OTA 的合成产生影响。本实验中赭曲霉侵染抗氧化能力相对较高的黑豆产生更多的 OTA 也证实了这点。植物受到真菌侵染后的氧化应激作用也会影响真菌毒素的产生,对真菌产毒机理的研究还需要深入的探索。

本文主要研究了氧脂素 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 作为曲霉属群体感应信号分子对赭曲霉产生 OTA 的影响,结果表明赭曲霉的群体密度可以影响 9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 以及 OTA 的合成,在低密度群体下赭曲霉产生的 9(S)-HODE/13(S)-HODE 比值高于高群体密度,同时会产生更多的 OTA,9(S)-HODE 促进 OTA 产生,而 13(S)-HODE 抑制 OTA 产生,9(S)-HODE 和 13(S)-HODE 可能作为赭曲霉的群体感应的信号分子调节赭曲霉的生长发育和 OTA 的产量,群体感应可能是 OTA 合成的调控机理之一。另外,通过赭曲霉侵染抗氧化能力更强的黑豆时产生比黄豆更多的 OTA 这一结果发现,氧化应激反应也是影

响真菌毒素产生的重要因素,之后将对此进行深入的实验验证。

致谢:感谢中国农业大学食品科学与营养工程学院提供的设备支持和技术指导。

## REFERENCES

- [1] Huffman J, Gerber R, Du LC. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins[J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 764-776
- [2] Xu XY, He F, Zhang XY, et al. New mycotoxins from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF0093[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 46-51
- [3] Kőszegi T, Poór M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level[J]. *Toxins*, 2016, 8(4): 111
- [4] Benford D, Boyle C, Dekant W, et al. Ochratoxin A[A]//Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food[M]. World Health Organization, 2001
- [5] Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 104(1): 313-322
- [6] Pappenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588
- [7] Affeldt KJ, Brodhagen M, Keller NP. *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G Protein-Coupled Receptors[J]. *Toxins*, 2012, 4(9): 695-717
- [8] Affeldt KJ, Carrig J, Amare M, et al. Global survey of canonical *Aspergillus flavus* G Protein-Coupled Receptors[J]. *mBio*, 2014, 5(5): e01501-14
- [9] Herrero-Garcia E, Garzia A, Cordobés S, et al. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(4/5): 393-400
- [10] Li CY, Song YM, Xiong L, et al. Initial spore density has an influence on ochratoxin A content in *Aspergillus ochraceus* CGMCC 3.4412 in PDB and its interaction with seeds[J]. *Toxins*, 2017, 9(4): 146
- [11] Li CY, Liang ZH. Research progress on quorum sensing in bacteria and fungi[J]. *Journal of Yan'an University (Natural Science Edition)*, 2016, 35(2): 39-44 (in Chinese)  
李彩艳, 梁志宏. 细菌和真菌群体感应研究进展[J]. *延安大学学报: 自然科学版*, 2016, 35(2): 39-44
- [12] Christensen SA, Kolomiets MV. The lipid language of plant-fungal interactions[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(1): 4-14
- [13] Burow GB, Nesbitt TC, Dunlap J, et al. Seed lipoxigenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(3): 380-387
- [14] Yan SJ, Liang YT, Zhang JD, et al. Autoxidated linolenic acid inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* via oxylipin species[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 81: 229-237
- [15] Hell K, Mutegi C. Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(5): 459-466
- [16] Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(3): 109-118
- [17] Calvo AM, Hinze LL, Gardner HW, et al. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3668-3673
- [18] Lou QR, Huang JQ, Wang HM, et al. Advances of research on relationship between lipoxigenase and resistance to aflatoxin in crops[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, 36(1): 127-134 (in Chinese)  
娄庆任, 黄家权, 王后苗, 等. 脂氧合酶与作物黄曲霉毒素污染抗性关系研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(1): 127-134
- [19] Brown SH, Scott JB, Bhaheetharan J, et al. Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(7): 882-894
- [20] Lu P, Zhang Y, Li JH, et al. The production and scavenging mechanism of reactive oxygen species in plant cell[J]. *Biology Teaching*, 2010, 35(2): 4-5 (in Chinese)  
吕品, 张岩, 李建华, 等. 植物细胞活性氧的产生和清除机制[J]. *生物学教学*, 2010, 35(2): 4-5
- [21] Du XM, Yin WX, Zhao YX, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 121-125 (in Chinese)  
杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125
- [22] 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]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(6): 988-1000
- [23] Tian M, Rao LB, Li JY. Reactive oxygen species (ROS) and its physiological functions in plant cells[J]. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41(2): 235-241 (in Chinese)  
田敏, 饶龙兵, 李纪元. 植物细胞中的活性氧及其生理作用[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 235-241
- [24] Wu S, Xiao LT. Metabolism and signaling conduction of the reactive oxygen species in plant[J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences*, 2003, 29(5): 450-456 (in Chinese)  
吴顺, 萧浪涛. 植物体内活性氧代谢及其信号传导[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 29(5): 450-456
- [25] Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*[J]. *Genetics*, 2001, 157(2): 591-600



- [26] Li CY, Liang ZH, Huang KL. Research progress on quorum sensing of *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(8): 3205-3210 (in Chinese)  
李彩艳, 梁志宏, 黄昆仑. 黄曲霉群体感应研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3205-3210
- [27] Chen Y, Zhang SR, Wang L, et al. Characteristics of oil components and its relationship with domestication of oil components in wild and cultivated soybean accessions[J]. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(7): 1038-1049 (in Chinese)  
陈影, 张晟瑞, 王岚, 等. 野生和栽培大豆种质油脂组成特点及其与演化的关系[J]. 作物学报, 2019, 45(7): 1038-1049
- [28] Yuan LP, Yang J, Lai LZ, et al. Nutritional functions of black soybean and suggestions on exploiting soybean pigment[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2009(1): 49-52 (in Chinese)  
袁利鹏, 杨君, 赖来展, 等. 黑大豆营养功能及开发豆皮色素的探讨[J]. 农产品加工: 学刊, 2009(1): 49-52
- [29] Wang YP, Huang KL, Liang ZH. The Progress on the mechanism of biological detoxification of ochratoxin a by microbes[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(2): 316-323 (in Chinese)  
王玉萍, 黄昆仑, 梁志宏. 微生物对赭曲霉毒素 A 的生物脱毒机理研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(2): 316-323
- [30] Keller NP, Butchko RAE, Sarr B, et al. A visual pattern of mycotoxin production in maize kernels by *Aspergillus*[J]. Phytopathology, 1994, 84(5): 483-488
- [31] Reverberi M, Punelli F, Scarpari M, et al. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1935-1946
- [32] Molyneux RJ, Mahoney N, Kim JH, et al. Mycotoxins in edible tree nuts[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(1/2): 72-78
- [33] Reddy MJ, Shetty HS, Fanelli C, et al. Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992, 59(2): 177-181
- [34] Mellon JE, Cotty PJ, Dowd MK. Influence of lipids with and without other cottonseed reserve materials on aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3611-3615
- [35] Xue HQ, Isleib TG, Payne GA, et al. Comparison of aflatoxin production in normal- and high-oleic backcross-derived peanut lines[J]. Plant Disease, 2003, 87(11): 1360-1365
- [36] Xue HQ, Isleib TG, Payne GA, et al. Aflatoxin production in peanut lines selected to represent a range of linoleic acid concentrations[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(1): 126-132
- [37] Gao J, Li CY, Li KX, et al. Effects of oxylipins on spore production and ochratoxin A synthesis of *Aspergillus ochraceus* and grain infection[J]. Food Science, 2019, 40(4): 116-121 (in Chinese)  
高婧, 李彩艳, 李可馨, 等. 氧脂素对赭曲霉孢子产生、赭曲霉毒素 A 合成及粮食受感染程度的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 116-121