

研究报告

## 对黄豆苷原具转化作用的耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 未知代谢产物分离、鉴定及抗氧化活性测定

张晨 李晓蕾 李梦 王秀伶\* 郝庆红 于秀梅

(河北农业大学生命科学学院 河北 保定 071001)

**摘要:**【目的】与原出发菌株 AUH-JLC140 相比,耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 在其生长过程中产生一种未知物质,且该未知物质的产生与添加底物黄豆苷原无关。对该未知物质进行分离纯化和结构鉴定,并测定其产生动态及抗氧化活性。【方法】利用高效液相色谱对未知物质进行分离,经紫外吸收图谱、质谱、核磁共振氢谱和碳谱等分析,对未知物质进行结构鉴定;通过 1,1-二苯基-2-苦味酰基自由基(DPPH)清除试验测定其抗氧化活性。【结果】Aeroto-AUH-JLC140 产生的未知物质被鉴定为吲哚,接种后 15 h 菌株产吲哚最高,所产吲哚量为 19.89 mg/L。浓度为 0.2 mmol/L (即 23.40 mg/L)的吲哚除对 DPPH 自由基具有明显清除作用外,还能有效降低脑心浸液(BHI)液体培养基的氧化-还原电位。【结论】耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 产生的未知代谢产物为吲哚,菌株通过产生吲哚降低培养基氧化-还原电位,进而为该菌株的生长提供适宜的低氧微环境。

**关键词:** 黄豆苷原转化菌株,耐氧突变株,去氧甲基安哥拉紫檀素,吲哚, DPPH 自由基

### Isolation, identification and anti-oxidative activity of metabolites from oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-AUH-JLC140 capable of biotransforming daidzein

ZHANG Chen LI Xiao-Lei LI Meng WANG Xiu-Ling\*  
HAO Qing-Hong YU Xiu-Mei

(College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** [Objective] Compared to the original bacterium strain AUH-JLC140, its oxygen-tolerant mutant strain named Aeroto-AUH-JLC140 was able to produce an unknown substance. In addition, the production of the unknown substance was not associated with the addition of the substrate daidzein to the cultural medium. The objective of this study was to isolate and identify the unknown substance, and then to study the kinetics and the anti-oxidative capacity of the unknown substance produced by the

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31170058); Service Center for Experts and Scholars of Hebei Province (No. CPRC027)

\*Corresponding author: Tel: 86-312-7528257; E-mail: wxling2000@hebau.edu.cn

Received: August 11, 2015; Accepted: January 21, 2016; Published online (www.cnki.net): January 21, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170058); 河北省百名优秀创新人才支持计划项目(No. CPRC027)

\*通讯作者: Tel: 86-312-7528257; E-mail: wxling2000@hebau.edu.cn

收稿日期: 2015-08-11; 接受日期: 2016-01-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-21

oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-AUH-JLC140. **[Methods]** The unknown substance was isolated by high-performance liquid chromatography (HPLC) method. Based on the analyses of the UV spectrum, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as well as the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy, the unknown substance was identified. The anti-oxidative activity of the unknown substance was determined by the 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity. **[Results]** The unknown substance produced by the oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-AUH-JLC140 was identified as indole. Kinetics study showed that indole reached to the highest after being incubated for 15 h and the highest amount of indole in the cultural broth was 19.89 mg/L. Study on free radical-scavenging activity indicated that 0.2 mmol/L (i.e. 23.40 mg/L) of indole not only showed an obvious DPPH radical-scavenging activity but also decreased the oxidation-reduction potential (ORP) of brain heart infusion (BHI) liquid medium. **[Conclusion]** The unknown metabolite produced by the oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-AUH-JLC140 is indole. The amount of indole produced by strain Aeroto-AUH-JLC140 can decrease the ORP of BHI liquid medium, which subsequently provides a suitable microenvironment with lower ORP for growth of strain Aeroto-AUH-JLC140 in the presence of atmospheric oxygen.

**Keywords:** Daidzein biotransforming bacterium, Oxygen-tolerant mutant strain, *O*-Desmethylangolensin (*O*-Dma), Indole, DPPH radicals

大豆异黄酮(Soy isoflavones)是大豆在其生长过程中形成的一类次生代谢产物, 主要包括黄豆苷原(Daidzein)、染料木素(Genistein)和黄豆黄素(Glycitein)。大豆异黄酮具有抗氧化<sup>[1]</sup>、抗癌<sup>[2-3]</sup>、预防骨质疏松<sup>[4-5]</sup>和改变血脂水平<sup>[6]</sup>等作用。体内外研究均表明, 被机体摄入的黄豆苷原可被胃肠道微生物代谢为二氢黄豆苷原(Dihydrodaidzein, DHD)、雌马酚(Equol)和去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Desmethylangolensin, *O*-Dma)等多种代谢产物<sup>[7-8]</sup>。

严格厌氧细菌 AUH-JLC140 (*Clostridium* sp.)是本实验室从公鸡新鲜粪样中分离得到的革兰氏阳性梭菌, 该菌株在厌氧条件下能将底物黄豆苷原高效转化为 *O*-Dma<sup>[9]</sup>。*O*-Dma 不仅与人体雌激素受体 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的亲合力高于其前体黄豆苷原, 而且与 ER $\beta$  结合后, 在诱导基因转录方面也强于黄豆苷原<sup>[10-11]</sup>。此外, 当浓度高于 10  $\mu\text{mol/L}$  时, *O*-Dma 能够明显抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长<sup>[12]</sup>。

由于 AUH-JLC140 为严格厌氧菌株, 其转接、培养以及转化过程均必需在严格厌氧条件下进行, 而长期维持严格厌氧环境需要大量资金投入。为提高 AUH-JLC140 的耐氧能力, 本实验室对其进行了

耐氧驯化, 并得到其耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140<sup>[13]</sup>。与原出发菌株 AUH-JLC140 相比, 耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 培养液中检测到一种未知代谢产物。本研究对该未知代谢产物进行分离纯化和结构鉴定, 并测定其抗氧化能力, 从微生物代谢产物方面为菌株 Aeroto-AUH-JLC140 的耐氧机制提供新依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 细菌菌株:** 能将底物黄豆苷原高效转化为 *O*-Dma 的严格厌氧细菌菌株 AUH-JLC140 (*Clostridium* sp.)<sup>[9]</sup>以及菌株 AUH-JLC140 的耐氧突变菌株 Aeroto-AUH-JLC140<sup>[13]</sup>, 两菌株均由本实验室保藏。

**1.1.2 培养基及菌株培养条件:** 严格厌氧梭菌 AUH-JLC140 的培养条件为: 将-80  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保藏的菌株 AUH-JLC140 在 Concept 400 厌氧工作站内迅速解冻, 并以 10%接种量接种到盛有 1 mL 新鲜 BHI 液体培养基的带盖螺口玻璃试管中, 试管盖自然拧紧后松半扣, 接种后在厌氧工作站内静置培养 18-24 h 即为种子液。厌氧工作站内混合气体种类及配比为: 5%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$  和 85%  $\text{N}_2$ , 厌氧工作

站内温度设定为 37 °C。耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 的培养条件为: 将-80 °C 冷冻保藏的菌株 Aeroto-AUH-JLC140 在 37 °C 水浴下迅速解冻, 在超净工作台内以 10%接种量接种到盛有 4 mL 新鲜 BHI 液体培养基(培养基高度不低于 4 cm)的带盖螺口玻璃试管中, 试管盖自然拧紧后松半扣, 将接种后的试管放在 37 °C 普通生化培养箱内静置培养 8-12 h 即为种子液。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 所用培养基为脑心浸液培养基(Brain heart infusion, BHI), 美国 Bacto 公司; Kovac 试剂(有效成分对二甲氨基苯甲醛), 南京森贝伽生物科技有限公司; 乙腈、乙酸乙酯和甲醇等有机溶剂均为色谱纯, 美国 Fisher 公司。

Concept 400 厌氧工作站, 英国 Ruskinn 公司; 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 离心浓缩仪 DI-VCOIO-IR, 韩国 Daiki 公司; ESI 源 Finnigan LCQ Deca 离子阱质谱仪, 美国 Thermo Finnigan 公司; Bruker AVANCE 400 MHz 超导核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; DU-650 紫外可见分光光度计, 美国 Beckman 公司; pH211 型酸度计, 意大利 HANNA 公司; RE-2000 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.2 耐氧突变株所产未知物质的高效液相检测

在超净工作台内将 Aeroto-AUH-JLC140 的种子液接种在新鲜 BHI 液体培养基中, 具体接种及培养方法同 1.1.2。菌株在普通生化培养箱内静置培养 12 h 后, 用等体积乙酸乙酯进行萃取, 萃取液在离心浓缩仪内蒸干, 将蒸干物重新溶解在 100%甲醇溶剂中, 过 0.45 μm 有机滤膜, 用高效液相色谱进行检测。检测采用 C<sub>18</sub>-ODS 分析柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 流动相为乙腈和水, 其中 A 液为 90%水和 10%乙腈以及 0.1%冰醋酸, B 液为 90%乙腈和 10%水以及 0.1%冰醋酸, A:B 为 60:40, 检测波长为 285 nm, 流速为 1 mL/min。为确定未知物质产生是否与添加底物黄豆苷原有关, 按上述接种条件接种后, 向带盖螺口玻璃试管中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的底物黄豆苷原, 在普通生化培养箱内

静置培养 12 h 后对样品进行萃取, 萃取、蒸干以及高效液相检测方法同上。

为检测严格厌氧梭菌 AUH-JLC140 在生长过程中是否产生未知物质, 按 1.1.2 中所述方法, 在厌氧工作站内将菌株 AUH-JLC140 的种子液接种到新鲜 BHI 液体培养基中, 并添加终浓度 0.1 mmol/L 的底物黄豆苷原, 以不添加黄豆苷原的作为对照, 菌株 AUH-JLC140 的培养、样品萃取及检测方法同上。

## 1.3 未知物质的分离与制备

将 20 mL 培养好的 Aeroto-AUH-JLC140 种子液接种到装有 200 mL 新鲜 BHI 液体培养基的输液瓶中, 输液瓶口用铝箔纸盖好, 于普通生化培养箱内 37 °C 培养 12 h。培养液用等体积乙酸乙酯萃取后用旋转蒸发器蒸干, 蒸干后样品处理方法同 1.2, 最后用半制备高效液相色谱对未知物质进行分离。所用色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> (5 μm, 250 mm×10 mm), 将未知物质放置 4 °C 保存待用。

## 1.4 未知物质的化学结构鉴定

**1.4.1 吲哚显色反应:** 取 2 mL 耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 的培养液于带盖螺口玻璃试管中, 向试管中加入 1 mL 乙醚进行萃取, 静置分层后沿着试管壁缓缓加入 150 μL Kovac 试剂, 观察颜色变化, 具体方法参考文献[14]。

**1.4.2 质谱检测:** 将纯化后的未知物质注入 ESI 源质谱仪进行测定。

**1.4.3 核磁共振检测:** 将纯化后的未知物质进行核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)分析, 溶剂采用 CDCl<sub>3</sub>。

## 1.5 吲哚产生动态

取 Aeroto-AUH-JLC140 的种子液 400 μL 接种于装有 4 mL 新鲜 BHI 液体培养基的带盖螺口玻璃试管中, 于 37 °C 普通生化培养箱中静置培养。分别在接种后 3、6、9、12、15、18 和 21 h 取样, 样品的萃取及高效液相色谱检测方法同 1.2, 试验重复 3 次。分别记录不同取样时间吲哚的出峰面积, 根据吲哚标准曲线绘制 Aeroto-AUH-JLC140 的吲

啉产生动态。

## 1.6 吲哚抗氧化活性测定

**1.6.1 DPPH 自由基清除试验:** 1,1-二苯基-2-苦味酰基自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)是一种稳定的单电子自由基,在 517 nm 下有强的吸收。以乙醇作为溶剂,以不加吲哚的比色管为对照,用紫外可见分光光度计进行测定。具体操作按本实验室以往报道的方法进行<sup>[15]</sup>,反应时间和温度稍有改进。具体方法为:取 1 mL 用乙醇溶解的样品加到比色管中,再与 0.5 mL DPPH (0.4 mmol/L)混匀,在 20 °C 黑暗环境中分别反应 1、24、48 和 96 h,在 517 nm 下测定吸光度,根据对照和样品的吸光度计算清除率。清除率的计算公式为:自由基清除率(%)=(1- $A_i/A_0$ ) $\times$ 100,其中  $A_i$  为将待测样品加入 DPPH 反应体系后测得的吸光度,  $A_0$  为不加待测样品(用 100%乙醇替代样品)时 DPPH 反应体系本身的吸光度。所用吲哚浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40 和 0.50 mmol/L。试验至少重复 3 次,数据用平均值 $\pm$ 标准误差表示,统计分析用 One-way ANOVA 来比较。显著性以“\*” ( $P<0.05$ )或“\*\*” ( $P<0.01$ )表示。

**1.6.2 氧化-还原电位的测定:** 以盛有 12 mL BHI 新鲜液体培养基(培养基高度约 4 cm)的带盖螺口玻璃试管(试管口直径 2.5 cm)为对照,向试管中分别添加终浓度为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的吲哚,将螺口试管静置在 37 °C 普通生化培养箱内,静置 1、12、24 和 48 h 后,用酸度计测定不同试管内的氧化-还原电位。

## 2 结果与分析

### 2.1 原出发菌株和耐氧突变株发酵液未知物质检测

经高效液相检测发现,不论是否添加底物黄豆苷原,在耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 的发酵液中,均在保留时间 15.8 min 处检测到一未知物质峰(图 1A 和 B),且图 1A 和图 1B 中未知物质峰的紫外吸收图谱完全一致,分别在 215 nm 和 269 nm 有

最大紫外吸收(图 1C)。然而,对原出发菌株 AUH-JLC140 而言,不论是否添加底物黄豆苷原,在其发酵液中均未检测到未知物质峰(图 1D 和 E)。由于未知物质的产生与添加底物黄豆苷原无关,由此可以断定,耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 发酵液中的未知物质为该菌株产生的次生代谢产物。

### 2.2 未知物质的结构鉴定

由于耐氧突变株所产未知物质的紫外吸收图谱(图 1C)与吲哚的<sup>[16]</sup>完全吻合,因此对未知物质进行了吲哚显色反应验证。结果发现,在 Aeroto-AUH-JLC140 培养液萃取物中加入一定量 Kovac 试剂后,可明显观察到玫瑰红色,表明 Aeroto-AUH-JLC140 在其生长过程中可能产生了吲哚。

为确定未知物质的分子量,将分离纯化后的未知物质进行质谱分析(ESI-MS),发现其[M-H]<sup>-</sup>为 116,因此确定 Aeroto-AUH-JLC140 所产未知物质的分子量应为 117,这恰与吲哚(C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N)的分子量一致。为进一步准确鉴定未知物质的化学结构,将未知物质分别进行核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)测定,结果如图 2A (<sup>1</sup>H-NMR)和图 2B (<sup>13</sup>C-NMR)所示。

未知物质核磁共振氢谱的解析结果为:<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$ 6.38 (1H, d,  $J=2.88$  Hz, H-3), 6.93–6.97 (1H, t,  $J=7.13$  Hz, H-5), 7.02–7.06 (1H, t,  $J=7.12$  Hz, H-6), 7.10 (1H, t,  $J=2.88$  Hz, H-2), 7.30–7.32 (1H, d,  $J=8.02$  Hz, H-7), 7.48–7.50 (1H, d,  $J=7.82$  Hz, H-4), 8.85 (1H, N-H)。该结果与已报道的吲哚的氢谱解析结果一致<sup>[17]</sup>。

未知物质核磁共振碳谱的解析结果为:<sup>13</sup>C NMR:  $\delta$ 135.84 (C-9), 127.76 (C-8), 124.43 (C-2), 121.44 (C-6), 120.30 (C-4), 119.29 (C-5), 111.15 (C-7), 101.71 (C-3)。该结果与吲哚的碳骨架结构也完全相一致<sup>[18]</sup>。

因此,根据紫外吸收图谱、颜色反应、质谱以及核磁共振氢谱和碳谱的解析结果,最终将

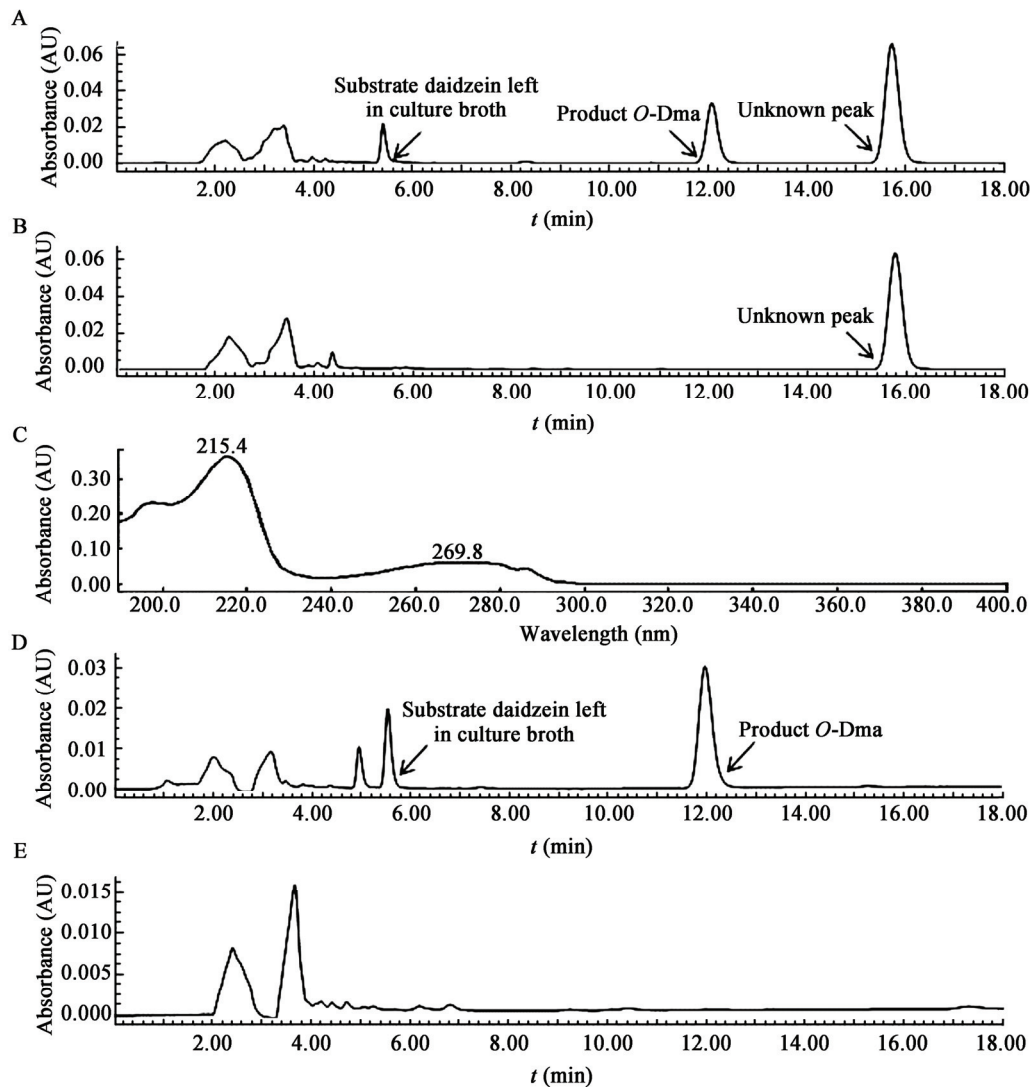


图 1 未知物质高效液相色谱图

Figure 1 HPLC elution profiles of the unknown substance

注: A: 耐氧突变株 *Aeroto-AUH-JLC140* 在添加底物黄豆苷原时未知物质峰的高效液相色谱图; B: 耐氧突变株 *Aeroto-AUH-JLC140* 不添加黄豆苷原时未知物质峰的高效液相色谱图; C: 未知物质峰紫外吸收图谱; D: 原出发菌株 *AUH-JLC140* 在添加黄豆苷原时的高效液相色谱图; E: 原出发菌株 *AUH-JLC140* 不添加黄豆苷原时的高效液相色谱图。

Note: A: HPLC elution profile of the unknown peak produced by the oxygen-tolerant mutant strain *Aeroto-AUH-JLC140* when incubated with the substrate daidzein; B: HPLC elution profile of the unknown peak produced by the oxygen-tolerant mutant strain *Aeroto-AUH-JLC140* when daidzein was not added; C: UV spectrum of the unknown substance; D: HPLC elution profile of the culture broth extract of the original bacterium strain *AUH-JLC140* when incubated with daidzein; E: HPLC elution profile of the culture broth extract of the original bacterium strain *AUH-JLC140* when daidzein was not added.

*Aeroto-AUH-JLC140* 产生的未知物质鉴定为吲哚。

### 2.3 吲哚产生动态

为了解 *Aeroto-AUH-JLC140* 在培养过程中何时开始产生吲哚及其产生量, 对该耐氧突变株产吲哚的动态进行了测定, 结果如图 3 所示。由图 3 可

以看出, *Aeroto-AUH-JLC140* 在接种后 6 h 开始有吲哚生成, 在 6 h 之前检测到的少量吲哚应该为种子液中的吲哚(10%接种量); 从 6–15 h 吲哚生成量几乎成直线上升, 到 15 h 吲哚生成量达到最高, 为 19.89 mg/L; 15–21 h 吲哚量急剧降低, 在培养时间

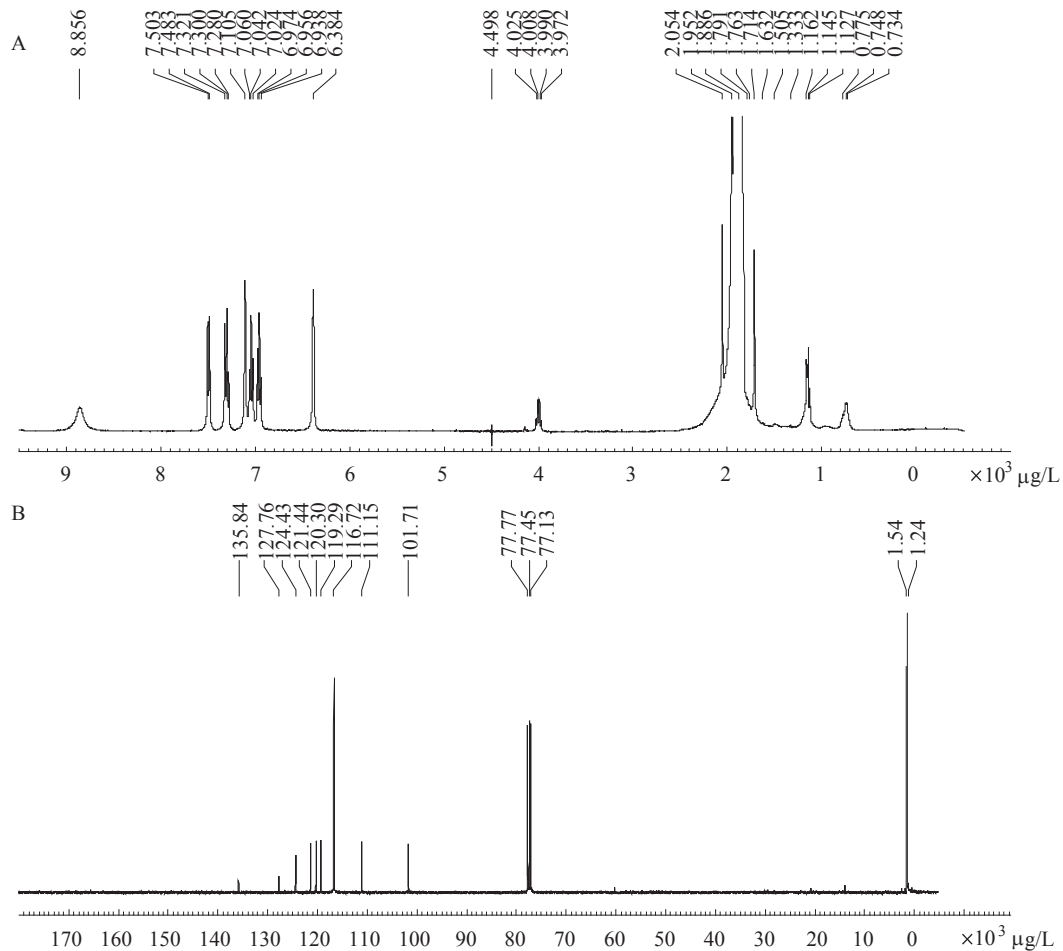


图 2 未知物质核磁共振氢谱和碳谱图

Figure 2  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the unknown substance

注: A: 耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 所产未知物质的核磁共振氢谱图; B: 核磁共振碳谱图。

Note: A:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the unknown substance produced by the oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-AUH-JLC140; B:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the unknown substance.

21 h 时, 吡啶量下降为 8.19 mg/L。

## 2.4 吡啶抗氧化能力测定

### 2.4.1 吡啶对 DPPH 自由基的清除作用: 氧气本身虽然没有毒性, 但进入细胞内的氧气一旦接受氧化酶(如 NADPH 氧化酶)传递的电子时, 会产生超氧阴离子, 超氧阴离子经歧化作用可产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等活性氧。正常条件下, 细胞内产生的活性氧与其清除系统保持平衡。然而, 当产生的活性氧超出活性氧清除系统的清除能力时, 过量的活性氧则可对细胞造成各种损伤。Aeroto-AUH-JLC140 虽能在有氧条件下生长和转化, 但该突变株对氧气的耐受仍是有

条件的, 即接种量不能低于 2.5%, 同时液体培养基高度不能低于  $2\text{ cm}^{[13]}$ 。由于吡啶为还原性物质, 推测耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 产生的吡啶可能对活性氧自由基有清除作用, 进而为该菌株在有空气氧条件下的生长营造一个相对的低氧环境。

通过将不同浓度吡啶(0.05、0.10、0.20、0.40 和 0.50 mmol/L)与 DPPH 自由基共孵育, 发现不同浓度吡啶均具有一定的 DPPH 自由基清除能力(图 4)。由图 4 可以看出, 相同浓度的吡啶随反应时间延长, 其对 DPPH 自由基的清除能力也逐渐升高, 这表明吡啶与多数天然产物一样, 对自由基清除

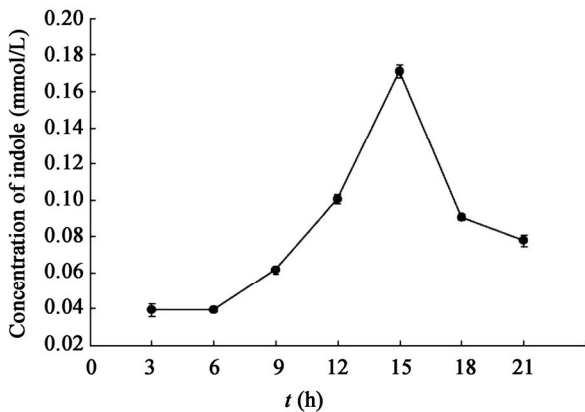


图3 耐氧突变株 *Aeroto-AUH-JLC140* 的吲哚产生动态  
Figure 3 Kinetics study of indole produced by the oxygen-tolerant mutant strain *Aeroto-AUH-JLC140*

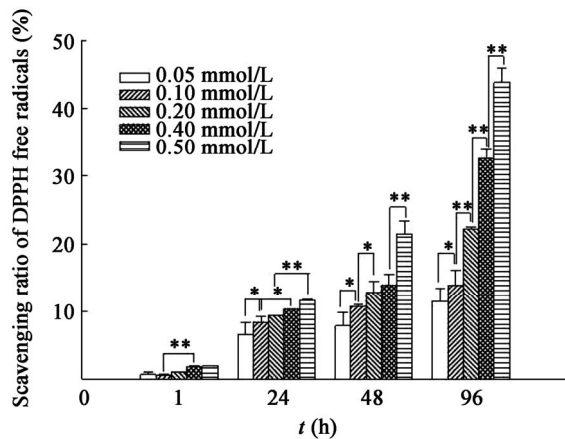


图4 不同浓度吲哚对 DPPH 自由基的清除能力比较  
Figure 4 Comparison of the DPPH radical-scavenging capacity of indole at different concentrations

速度较慢,属于迟效型化合物<sup>[15]</sup>。另外,浓度为 0.2 mmol/L 的吲哚即可表现出明显的 DPPH 自由基清除能力。在反应时间为 48 h 和 96 h 时,浓度为 0.2 mmol/L 的吲哚对 DPPH 自由基的清除率分别为 14.72%和 22.16%。

**2.4.2 氧化-还原电位:**通过对比添加与不添加吲哚的 BHI 液体培养基的氧化-还原电位可以看出,添加浓度为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的吲哚均可有效减慢 BHI 液体培养基氧化-还原电位上升的速度(表 1)。由吲哚产生动态可知, *Aeroto-AUH-JLC140* 在接种后 15 h 产生的吲哚量达到 19.89 mg/L (即 0.17 mmol/L)。因此,菌株 *Aeroto-AUH-JLC140* 产生的吲哚可有效降低 BHI 液体培养基的氧化-还原电位,进而为该菌株生长提供适宜的相对低氧环境。

### 3 讨论

有关耐氧菌的耐氧机制,目前大多认为是菌体细胞能够产生 SOD 和过氧化物酶(但缺乏过氧化氢酶)。本研究发现,耐氧突变株 *Aeroto-AUH-JLC140* 可通过产生吲哚为菌株生长提供适宜的低氧微环境。菌株 *Bacillus alvei*<sup>[19]</sup>、*Klebsiella oxytoca*<sup>[20]</sup>、*Proteus vulgaris*<sup>[21]</sup>、*Porphyromonas gingivalis*<sup>[22]</sup>、*Fusobacterium nucleatum*<sup>[23]</sup>、*Prevotella intermedia*<sup>[24]</sup> 和 *Escherichia coli*<sup>[25]</sup>均产生吲哚,但不同菌株以及同一菌株在不同培养条件下产吲哚量各不相同。有研究报道,大肠杆菌 MG1655 在 LB 培养基中产吲哚量为 0.5–0.6 mmol/L,当向 LB 培养基中添加足

表 1 添加及不添加吲哚的 BHI 液体培养基放置不同时间的氧化-还原电位比较

Table 1 Comparison of the oxidation-reduction potential in the BHI liquid medium added with or without indole at different laying time

放置时间 Laying time (h)	BHI 液体培养基 BHI liquid medium	添加 0.1 mmol/L 吲哚 Add 0.1 mmol/L of indole to medium	添加 0.2 mmol/L 吲哚 Add 0.2 mmol/L of indole to medium
1	-60.5	-62.8	-66.1
12	-15.3	-19.9	-26.6
24	36.8	27.3	11.7
48	69.3	41.7	24.8

量色氨酸后, 该菌株产吲哚量竟高达 4–5 mmol/L<sup>[25]</sup>。除大肠杆菌外, Sasaki-Imamura 等还对具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 和普雷沃菌 (*Prevotella* sp.) 等无芽孢革兰氏阴性厌氧菌的吲哚产量进行了定量分析。具核梭杆菌 ATCC 25586 在哥伦比亚培养基中产吲哚量为 0.06 mmol/L<sup>[23]</sup>, 在 BHI 培养基中产吲哚量为 0.22 mmol/L; 普雷沃菌属菌株在 BHI 培养基中产吲哚量为 0.05–0.10 mmol/L<sup>[24]</sup>。本研究中的耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 产吲哚量为 0.17 mmol/L, 这一吲哚产量与具核梭杆菌的相近。DPPH 自由基清除试验结果表明, 浓度为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的吲哚均能有效清除 DPPH 自由基。此外, 通过测定培养基氧化-还原电位还发现, 添加吲哚的 BHI 液体培养基的氧化-还原电位比不添加吲哚的上升缓慢, 添加高浓度 (0.2 mmol/L) 吲哚的 BHI 液体培养基的氧化-还原电位比添加低浓度 (0.1 mmol/L) 的上升缓慢, 说明吲哚具有一定的抗氧化活性, 而有关吲哚的抗氧化能力目前尚未见报道。

长期以来, 吲哚一直作为具有恶臭气味的化学排斥物为人们所认知<sup>[26]</sup>。最新研究表明, 吲哚可作为信号分子影响氨基酸代谢<sup>[17]</sup>、生物膜形成<sup>[23]</sup>、质粒维持<sup>[27]</sup>、药物运输<sup>[28]</sup>、菌株致病性<sup>[29]</sup>及多糖产生<sup>[30]</sup>等关键基因的表达。本实验室前期研究结果证实, 当耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 在有空气氧条件下 (即普通生化培养箱中培养) 生长时, 在菌体外壁会形成一层以多糖为主要成分的“保护膜”结构<sup>[13]</sup>, 这层“保护膜”结构可有效阻挡培养基溶氧进入菌体进而对菌体造成伤害。有关耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC140 形成的多糖“保护膜”结构是否也同时受到了吲哚的调控, 尚有待进一步研究。

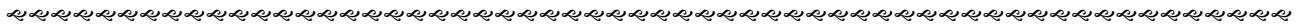
## 参考文献

- [1] Yu Q, Wang WW, Li AL, et al. The study of the effects of soybean isoflavone on antioxidation and bone morphology in ovariectomized rats[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2007, 38(2): 222-225 (in Chinese)  
余清, 王文蔚, 李安乐, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠抗氧化及骨形态学影响的研究[J]. *解剖学报*, 2007, 38(2): 222-225
- [2] Zhou J, Wei HM, Rong R, et al. Effects of soy isoflavones on

- the invasion and metastasis of human breast cancer MCF-7 cells and its correlation with PPAR $\gamma$ [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2012, 34(1): 58-63 (in Chinese)  
周静, 韦红梅, 戎嵘, 等. 大豆异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移能力的影响及其与 PPAR $\gamma$  的关系研究[J]. *营养学报*, 2012, 34(1): 58-63
- [3] Sun Q, Xu JP, Xu HX, et al. Anti-tumor effect of soybean isoflavones[J]. *Food Science and Technology*, 2009, 34(8): 60-62 (in Chinese)  
孙权, 徐俊萍, 许惠仙, 等. 大豆异黄酮抗肿瘤作用的研究[J]. *食品科技*, 2009, 34(8): 60-62
  - [4] Potter SM, Baum JA, Teng H, et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 68(6): 1375S-1379S
  - [5] Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72(3): 844-852
  - [6] Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 333(5): 276-282
  - [7] Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, et al. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin[J]. *Archives of Microbiology*, 2000, 174(6): 422-428
  - [8] Wang XL, Hur HG, Lee JH, et al. Enantioselective synthesis of S-equal from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 214-219
  - [9] Wang XL, Zhang ZX, Li H, et al. *Clostridium* sp. AUH-JLC140 and application of the bacterium for biosynthesis of O-Desmethylangolensin: China, ZL201110367963.1[P]. 2012-03-28 (in Chinese)  
王秀伶, 张志贤, 李慧, 等. 梭菌 AUH-JLC140 及其在去氧甲基安哥拉紫檀素生物合成中的应用: 中国, ZL201110367963.1[P]. 2012-03-28
  - [10] Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, et al. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(2): 185-188
  - [11] Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 24(4): 351-356
  - [12] Schmitt E, Dekant W, Stopper H. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues[J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15(4/5): 433-439
  - [13] Li H. Isolation, oxygen-tolerant domestication of isoflavone biotransforming bacteria and oxygen-tolerant mechanisms for the obtained oxygen-tolerant mutant[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2013 (in Chinese)  
李慧. 大豆异黄酮转化菌株的分离、耐氧驯化及耐氧机制研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2013
  - [14] Dong XZ, Cai MY. Systematic Identification Manual of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 379 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 379
  - [15] Liang XL, Wang XL, Li Z, et al. Improved *in vitro* assays of superoxide anion and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(22): 11548-11552
  - [16] Catalán J. The first UV absorption band for indole is not due to two simultaneous orthogonal electronic transitions differing in



- dipole moment[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, 17(19): 12515-12520
- [17] Wang D, Ding X, Rather PN. Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(14): 4210-4216
- [18] Panasenko AA, Caprosh AF, Radul OM, et al. <sup>13</sup>C NMR spectra of some indole derivatives[J]. *Russian Chemical Bulletin*, 1994, 43(1): 60-63
- [19] Fenske JD, DeMoss RD. Substrate-protein interaction in tryptophanase from *Bacillus alvei*. Kinetic and spectral evaluations[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(19): 7554-7563
- [20] Maslow JN, Brecher SM, Adams KS, et al. Relationship between indole production and differentiation of *Klebsiella* species: indole-positive and-negative isolates of *Klebsiella* determined to be clonal[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(8): 2000-2003
- [21] Zakomirdina LN, Kulikova VV, Gogoleva OI, et al. Tryptophan indole-lyase from *Proteus vulgaris*: kinetic and spectral properties[J]. *Biochemistry*, 2002, 67(10): 1189-1196
- [22] Yoshida Y, Sasaki T, Ito S, et al. Identification and molecular characterization of tryptophanase encoded by *tnaA* in *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(3): 968-978
- [23] Sasaki-Imamura T, Yano A, Yoshida Y. Production of indole from L-tryptophan and effects of these compounds on biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4260-4268
- [24] Sasaki-Imamura T, Yoshida Y, Suwabe K, et al. Molecular basis of indole production catalyzed by tryptophanase in the genus *Prevotella*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 322(1): 51-59
- [25] Li G, Young KD. Indole production by the tryptophanase *TnaA* in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 2): 402-410
- [26] Tso WW, Adler J. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 118(2): 560-576
- [27] Chant EL, Summers DK. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(1): 35-43
- [28] Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, et al. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1113-1126
- [29] Anyanful A, Dolan-Livengood JM, Lewis T, et al. Paralysis and killing of *Caenorhabditis elegans* by enteropathogenic *Escherichia coli* requires the bacterial tryptophanase gene[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(4): 988-1007
- [30] Mueller RS, Beyhan S, Saini SG, et al. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11): 3504-3516



编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

