

不同动物肠道优势需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化能力的影响

罗景龙, 王秀伶*, 樊进茹, 王世英, 李佳

河北农业大学生命科学学院, 保定 071001

摘要 【目的】探讨不同动物肠道优势需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化能力的影响。【方法】有氧条件下, 采用稀释涂布法分别从 ICR 小鼠、芦花鸡、长白猪和獭兔等 4 种健康动物肠道中分离优势需氧菌, 将不同动物的优势需氧菌分别与不同类型黄豆苷原转化菌株进行厌氧混合培养, 高效液相色谱检测培养液中黄豆苷原的转化情况。【结果】16S rRNA 基因序列分析, 结合形态学及相关理化特性分析表明, 分离的 22 株优势需氧菌分属埃希氏菌属(10 株)、变形菌属(5 株)、肠球菌属(4 株)、芽胞杆菌属(2 株)和假单胞菌属(1 株)五个属。混菌培养结果显示, 兔源蜡样芽胞杆菌(R1)和铜绿假单胞菌(R5)与转化菌株混合并连续转接 2–3 次后, 转化菌株的转化活性完全丧失, 而其它用于混合培养的肠道优势需氧菌对转化菌株转化能力均无明显影响。菌株 R1 和 R5 分别与 30 只 ICR 小鼠肠道菌群在人工模拟肠道营养液中混合并连续 5 次转接培养后, 约 90% 的 ICR 小鼠肠道菌群完全丧失将黄豆苷原转化为雌马酚的能力。【结论】不同动物肠道优势需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化能力有不同影响, 兔源蜡样芽胞杆菌 R1 和铜绿假单胞菌 R5 对转化菌株的转化能力有明显抑制作用。

关键词: 肠道优势需氧菌, 黄豆苷原, 雌马酚, 微生物转化

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1042-10

黄豆苷原(daidzein)是大豆异黄酮的重要组成部分, 由于其抗氧化、降低心脑血管发病率、减少骨质疏松以及抗肿瘤等广泛生理活性而倍受人们关注^[1–3]。摄入机体内的黄豆苷原可被胃肠道微生物菌群代谢为二氢黄豆苷原(dihydrodaidzein, 简称 DHD)、雌马酚(equol)和去氧甲基安哥拉紫檀素(O-Desmethylangolensin, 简称 O-Dma)等多种代谢产物^[4–5]。雌马酚是所有大豆异黄酮代谢产物中活性最高的成分, 因此, 胃肠道内是否含有雌马酚产生菌株已作为菌群对大豆异黄酮转化质量的评判标

准^[6–7]。

近年来, 对黄豆苷原具有转化作用的特定功能微生物菌株已陆续从不同动物中分离出来, 按转化功能不同可将黄豆苷原转化菌株分为三类, 即分别将黄豆苷原转化为 DHD^[8–9]、雌马酚^[5, 10]和 O-Dma^[11–12]的转化菌株。然而, 由于受饮食、胃肠疾病、抗生素使用以及心理压力等众多因素影响, 不同宿主其肠道微生态环境各不相同, 导致了不同动物种类以及同种动物不同类群或个体在代谢黄豆苷原上存在较大差异, 如人群中只有 30%–50% 的个体

基金项目: 国家自然科学基金 (30570035, 30770047); 河北省百名优秀创新人才支持计划(CPRC027)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528257; Fax: +86-312-7528265; E-mail: wxling2000@hebau.edu.cn

作者简介: 罗景龙 (1985–), 男, 河北张家口人, 硕士研究生, 主要从事微生物转化研究。

收稿日期: 2011-01-29; 修回日期: 2011-03-17

能将摄入体内的黄豆苷原转化为雌马酚^[6]。通过采集保定动物园饲喂的32种不同动物新鲜粪样,我们发现只有14种动物能将黄豆苷原转化为雌马酚^[13]。此外,经长期试验我们还发现,由实验室饲喂的ICR小鼠新鲜粪样总能稳定高效地将黄豆苷原转化为雌马酚,且不同个体在转化活性上存在的差异较小;从养殖场及实验室饲喂的芦花鸡和长白猪采集的新鲜粪样90%以上能将黄豆苷原高效转化为雌马酚;相反,獭兔的新鲜粪样不能将黄豆苷原转化为雌马酚。因此,不同动物肠道微生物菌群将黄豆苷原转化为雌马酚的能力存在较大差异。

人和动物肠道中寄居的微生物绝大多数为厌氧菌,占到99%以上,而需氧菌的数量则不到1%。不同动物肠道内需氧菌数量虽少,但其对厌氧菌的存活及生理调节却起着至关重要的作用。一方面,肠道需氧菌可通过生物夺氧作用来维持肠道厌氧环境,从而促进厌氧菌的生长繁殖;另一方面,肠道需氧菌产生的消化酶和代谢物可为厌氧菌的生长提供必要的营养物质和生长因子^[14-15]。不同动物肠道需氧菌虽不乏报道,但大多是从染病动物体内分离的条件致病菌^[16],有关健康动物体内的需氧菌目前报道较少,而有关肠道需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化能力的影响方面目前尚未见报道。

本研究从能稳定转化黄豆苷原为雌马酚的健康ICR小鼠、芦花鸡、长白猪以及不能将黄豆苷原转化为雌马酚的獭兔肠道菌群中分离优势需氧菌,比较不同健康动物肠道中优势需氧菌种类的异同;另一方面,将分离的优势需氧菌与实验室以前分离的3种不同功能的黄豆苷原转化菌株进行混合培养,首次探讨肠道优势需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物:ICR小鼠、芦花鸡为本实验室饲喂的能稳定将黄豆苷原转化为雌马酚的健康动物;长白猪为河北农业大学动物科技学院饲喂的能稳定将黄豆苷原转化为雌马酚的健康实验动物;獭兔为本实验室饲喂的不能将黄豆苷原转化为雌马酚的健康动物。

1.1.2 细菌菌株:试验中选用的3种黄豆苷原转化

菌株分别为:能将黄豆苷原转化为二氢黄豆苷原(DHD)的牛瘤胃分离菌株 *Sharpea azabuensis* Niu-016 (AY263505);能将黄豆苷原转化为雌马酚的ICR小鼠肠道分离菌株 *Acinetobacter* sp. AUH-JLM455 (EU919867);能将黄豆苷原转化为去氧甲基安哥拉紫檀素(O-Dma)的 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 (EU919863)。供试病原菌:大肠杆菌(*Escherichia coli* CICC 10372)、甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* CMCC 50001)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 27217)均由河北农业大学食品科技学院张伟教授惠供。

1.1.3 培养基及培养条件:用于肠道优势需氧菌分离的培养基为LB培养基(上海生工),在普通生化培养箱内37℃培养;用于黄豆苷原转化菌株及混合菌株生长与转化的培养基为脑心浸液培养基(Brain Heart Infusion, BHI)(美国Bacto公司),在Concept 400厌氧工作站(英国Ruskin公司)内培养,工作站内气体种类及配比为:5% CO₂, 10% H₂和85% N₂;用于模拟动物肠道环境的ICR小鼠菌群接种在人工模拟肠道营养液中,在厌氧工作站内连续转接培养。人工模拟肠道营养液配制参照文献报道^[17]并稍有改进,具体方法为:100 mL GAM(日本Nissui公司)液体培养基中加入KH₂PO₄ 0.68 g,用0.4% NaOH溶液调至pH6.80,115℃灭菌15 min。冷却后按1%比例加入胰蛋白酶,并调节胆盐浓度至0.3%。

1.2 肠道优势需氧菌的分离筛选与菌种鉴定

采集供试健康动物新鲜粪样于BHI液体培养基中培养24 h,然后在LB固体培养基上进行稀释涂布并于37℃生化培养箱中培养,从稀释度为10⁻⁶平板上分别挑取单菌落。实验重复3次,将能够重复出现的单菌落分离纯化,按不同动物来源编号并在-80℃下进行冷冻保存。本研究将能在10⁻⁶稀释度平板上出现,且平均菌落个数在10个以上定义为优势需氧菌。

通过菌体菌落形态、革兰氏染色^[18]、常规生理生化试验^[19]以及16S rRNA基因序列分析对分离的优势需氧菌进行菌种鉴定。16S rRNA基因序列测定采用通用27F/1492R引物,PCR扩增条件及序列测定等同以前报道^[20]。PCR产物送交上海生工生物工程有限公司进行DNA测序,测序结果经BLAST比对并与GenBank数据库做相似性分析,将同源性

高的序列应用 Clustal X 和 MEGA4.0 软件采用邻位相连法(Neighbor-joining) 构建系统发育树。所用参比菌株均来自 GenBank。

1.3 优势需氧菌与黄豆苷原转化菌株的混合培养及代谢产物检测

从每种健康动物分离的优势需氧菌中按不同属各随机挑选一株,分别与3种不同功能的黄豆苷原转化菌株进行混合(优势需氧菌:转化菌=1:2(v/v)),在厌氧工作站内转接培养。混菌培养均按10%接种量连续转接5次后,分别向黄豆苷原转化菌纯培养物及混菌培养物中加入0.1 mmol/L的底物黄豆苷原,培养2-3天后(转化生成DHD培养2天;转化生成雌马酚或O-Dma培养3天)用乙酸乙酯分别萃取,蒸干后加入一定体积的甲醇溶液,用高效液相分别检测底物黄豆苷原被转化情况。具体方法:流动相A为90%水和10%乙腈;流动相B为90%乙腈和10%水。起始比例A:B=70:30持续8 min,A:B=50:50持续7 min,A:B=70:30持续5 min;流速为1 mL/min,检测波长270 nm,进样量20 μ L。

1.4 人工模拟肠道环境下的混菌培养

本研究选用ICR小鼠肠道菌群与所分离的各种肠道优势需氧菌在人工模拟肠道营养液中分别进行混合(优势需氧菌:ICR小鼠菌群培养物=1:1(v/v)),在厌氧工作站内转接培养,通过高效液相检测优势需氧菌对ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原的影响情况。本研究共选取ICR小鼠30只,分两批进行。将不同ICR小鼠肠道菌群(15只)分别与优势需氧菌进行混合,连续5次转接培养后加底物黄豆苷原,用高效液相检测优势需氧菌对ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原能力的影响。同时,从每批用于混菌培养的ICR小鼠中随机挑选3只,取新鲜粪单独培养,连续5次转接后加底物黄豆苷原作为未进行混菌培养的对照。

1.5 抑菌活性测定

黄豆苷原转化菌株与优势需氧菌混合后进行连续转接培养,由于转化菌的菌体形态与各种优势需氧菌的菌体形态完全不同,所以每次转接后均用显微镜观察混合培养物中黄豆苷原转化菌的形态及数量变化,以推测需氧菌对转化菌生长繁殖的影响,并对抑制转化菌生长的需氧菌的发酵液提取物进行抑菌活性测定。

1.5.1 发酵液中抑菌物质的分离提取:(1)蛋白粗提液的制备 将100 mL有抑制转化菌转化活性的需氧菌的纯培养液,4℃离心20 min(10600 \times g)去菌体,向上清液中添加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为80%,低温静置过夜,4℃下离心20 min(10600 \times g)弃上清,沉淀溶于10 mL 25 mmol/L pH=7.0的磷酸盐缓冲液,再置于透析袋透析,透析液在-80℃冰箱中冷冻后置于冷冻干燥仪中冻干,冻干物用5 mL的25 mmol/L的磷酸缓冲液溶解,得到蛋白粗提液。

(2)乙酸乙酯萃取物的制备:将100 mL有抑制转化菌转化活性的需氧菌的纯培养液用等体积乙酸乙酯进行萃取,静置分层后取上清于离心管中,在真空浓缩仪中蒸干后加入5 mL甲醇振荡溶解,得到乙酸乙酯萃取物。

1.5.2 发酵液抑菌活性测定:将刚灭完菌的琼脂培养基(LB或BHI)凉至50℃左右,加入10%(v/v)预先培养好的标准病原菌或黄豆苷原转化菌的菌液,摇匀后倒在直径9 cm的平皿中。培养基凝固后在培养基上打直径为0.5 cm大小的孔,每孔加入20 μ L蛋白粗提液或乙酸乙酯萃取物,于37℃生化培养箱中(病原菌)或厌氧工作站中(黄豆苷原转化菌株)分别培养24 h后测量抑菌圈直径。以上均选用0.1万单位的链霉素20 μ L作为阳性对照,采用琼脂孔穴扩散法进行抑菌试验。

2 结果和分析

2.1 不同动物肠道优势需氧菌的分离与鉴定

2.1.1 不同动物肠道优势需氧菌的分离:经分离纯化后4种供试健康动物新鲜粪样培养物在 10^{-6} 稀释度平板上共分离出22个在菌落或菌体形态上存在一定差异的单菌落。其中鼠源6个,分别标记为M1,M2,M3,M4,M5和M6;鸡源5个,分别标记为G1,G2,G3,G4和G7;猪源6个,分别标记为Z1,Z2,Z3,Z4,Z5和Z6;兔源5个,分别标记为R1,R3,R4,R5和R6。在该稀释度下的固体培养皿中出现菌落数最少的为R5(平均10个左右),出现菌落数较多的为M3和Z3(平均40个左右)。

2.1.2 不同动物肠道优势需氧菌的菌种鉴定:(1)不同动物肠道优势需氧菌16S rRNA基因序列分析:采用通用引物对分离的22株优势需氧菌的16S rRNA基因进行PCR扩增和基因测序,测序结果包

括 10 个可操作分类单元(OTU) ,其中 2 个 OTU(M3; M5 ,M6 ,Z5 ,G2 ,Z3 ,Z6 ,G3 ,G7 和 R3) 与埃希氏菌属(*Escherichia*) 同源性极高; 3 个 OTU(Z2; M2; M1 ,G1 和 Z1) 与变形菌属(*Proteus*) 同源性极高; 2 个 OTU(R1 和 R6) 与芽胞杆菌属(*Bacillus*) 同源性极高; 2 个 OTU(Z4 和 R4; G4 和 M4) 与肠球菌属(*Enterococcus*) 同源性极高; 1 个 OTU(R5) 与假单胞菌属(*Pseudomonas*) 同源性极高。各优势需氧菌与相关菌株同源性均在 99% 以上(表 1) 。

表 1 从不同健康动物肠道分离的可操作分类单元
与其相关菌株的同源性

Table 1 The homology between each OTU isolated
from different healthy animals and relative strains

| OTU | Related strains | Homology /% |
|--|---|-------------|
| M3 | <i>Escherichia coli</i> (HM194886) | 99. 8 |
| M5 , M6 , Z5 , G2 , Z3 , Z6 , G3 , G7 , R3 | <i>Escherichia coli</i> (AB548581) <i>Escherichia fergusonii</i> (NR_027549) | 99. 8 |
| Z2 | <i>Proteus vulgaris</i> (DQ885257) | 99. 6 |
| M2 | <i>Proteus vulgaris</i> (DQ885257) | 99. 7 |
| M1 , G1 , Z1 | <i>Proteus mirabilis</i> (DQ885256) | 99. 9 |
| R1 | <i>Bacillus cereus</i> (AF290547) | 99. 7 |
| R6 | <i>Bacillus fusiformis</i> (AJ310083) | 99. 2 |
| Z4 , R4 | <i>Enterococcus faecalis</i> (DQ411814) | 99. 9 |
| G4 , M4 | <i>Enterococcus faecium</i> (AJ276355) | 100 |
| R5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AF094713) | 100 |

将测得的 16S rRNA 基因序列全部上交美国 NCBI 核苷酸库 ,各菌株 GenBank 登陆号见系统发育树中。将各序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对 ,获得同源性较高的 16S rRNA 基因序列 ,采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树(图 1) 。

(2) 不同动物优势需氧菌生物学特征比较: 对分离的 22 株优势需氧菌分别进行菌体及菌落形态观察、革兰氏染色、耐氧性及相关生理生化特性测定 ,结果如下: 菌株 M1 ,G1 ,Z1 ,M2 和 Z2 的革兰氏染色结果均呈阴性 ,菌体为直杆状 ,在 LB 琼脂培养基上菌落扩散为同心环状 ,有粘性 ,菌落颜色发黄; 菌株能氧化苯丙氨酸脱氨、水解尿素、产硫化氢气体 ,以上特性与变形菌属(*Proteus*) 特征一致。通过 V. P 试验和色氨酸脱羧反应进一步确定 M1 ,G1 ,Z1 为奇异变形菌(*Proteus mirabilis*) ,M2 ,Z2 为普通变形菌(*Proteus vulgaris*) 。这与依据 16S rRNA 基因序列的系统发育树中的分类结果完全一致。

兔源菌株 R1 革兰氏染色呈阳性 ,菌体为杆状 ,产椭圆形芽孢 ,在厌氧工作站和普通生化培养箱内均可生长; 菌落较大 ,似蜡融状 ,符合蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) 的特征。另一兔源菌株 R5 革兰氏染色结果呈阴性 ,菌体为短杆状 ,菌落呈扁平状 ,绿色有粘性 ,有光泽; 不能利用乳糖但能使明胶液化 ,氧化酶呈阳性 ,符合铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 的特征 ,这与 16S rRNA 基因序列的系统发育树中的分类结果完全一致。

菌株 M4 ,G4 ,Z4 和 R4 的菌体呈球形 ,成对或短链排列 ,无芽孢 ,革兰氏阳性 ,接触酶阴性 ,V. P 阳性 ,在 10℃ 到 45℃ 间均能生长 ,但在 37℃ 下生长速度最快 ,这些特性均与肠球菌属(*Enterococcus*) 菌株特征一致。

菌株 M3 ,M5 ,M6 ,G2 ,G3 ,G7 ,Z3 ,Z5 ,Z6 ,R3 的革兰氏染色均呈阴性 ,菌体为直杆 ,在厌氧工作站和普通生化培养箱内均可快速生长; 菌落为圆形或不规则形状 ,但都湿润光滑 ,呈灰色或乳白色 ,氧化酶阴性 ,发酵糖类产酸产气 ,不能利用柠檬酸盐 ,这些特性符合埃希氏菌属(*Escherichia*) 的基本特征。通过乳糖发酵和鸟氨酸脱羧反应将 M6 和 Z5 鉴定为弗氏埃希氏菌(*Escherichia fergusonii*) ,其余均为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 。

2. 1. 3 不同动物肠道优势需氧菌种类比较: 通过对 22 株优势需氧菌菌种鉴定结果的比较发现 ,从 ICR 小鼠、芦花鸡和长白猪肠道中分离的优势需氧菌种类及数量较为相似 ,均分属埃希氏菌属、变形菌属和肠球菌属这 3 个属; 从獭兔肠道菌群中分离的优势需氧菌则呈现多样性 ,分离的 5 株优势需氧菌分属埃希氏菌属(R3) 、肠球菌属(R4) 、芽胞杆菌属(R1 和 R6) 和假单胞菌属(R5) 4 个属。在獭兔肠道菌群中 ,从稀释度 10^{-6} 平板上未分离到变形菌属菌株 ,但却分离出其它 3 种动物肠道菌群中未能分离到的芽胞杆菌属和假单胞菌属菌株。该研究结果表明 ,獭兔肠道的优势需氧菌种类明显不同于其它 3 种供试健康动物 ,分离的芽胞杆菌属和假单胞菌属菌株对肠道中的黄豆苷原转化菌株是否有影响需进一步研究。

2. 2 不同动物肠道优势需氧菌对黄豆苷原转化菌株转化活性的影响

2. 2. 1 优势需氧菌与黄豆苷原转化菌株的在厌氧工作站内两两混合: 从 ICR 小鼠、芦花鸡和长白猪

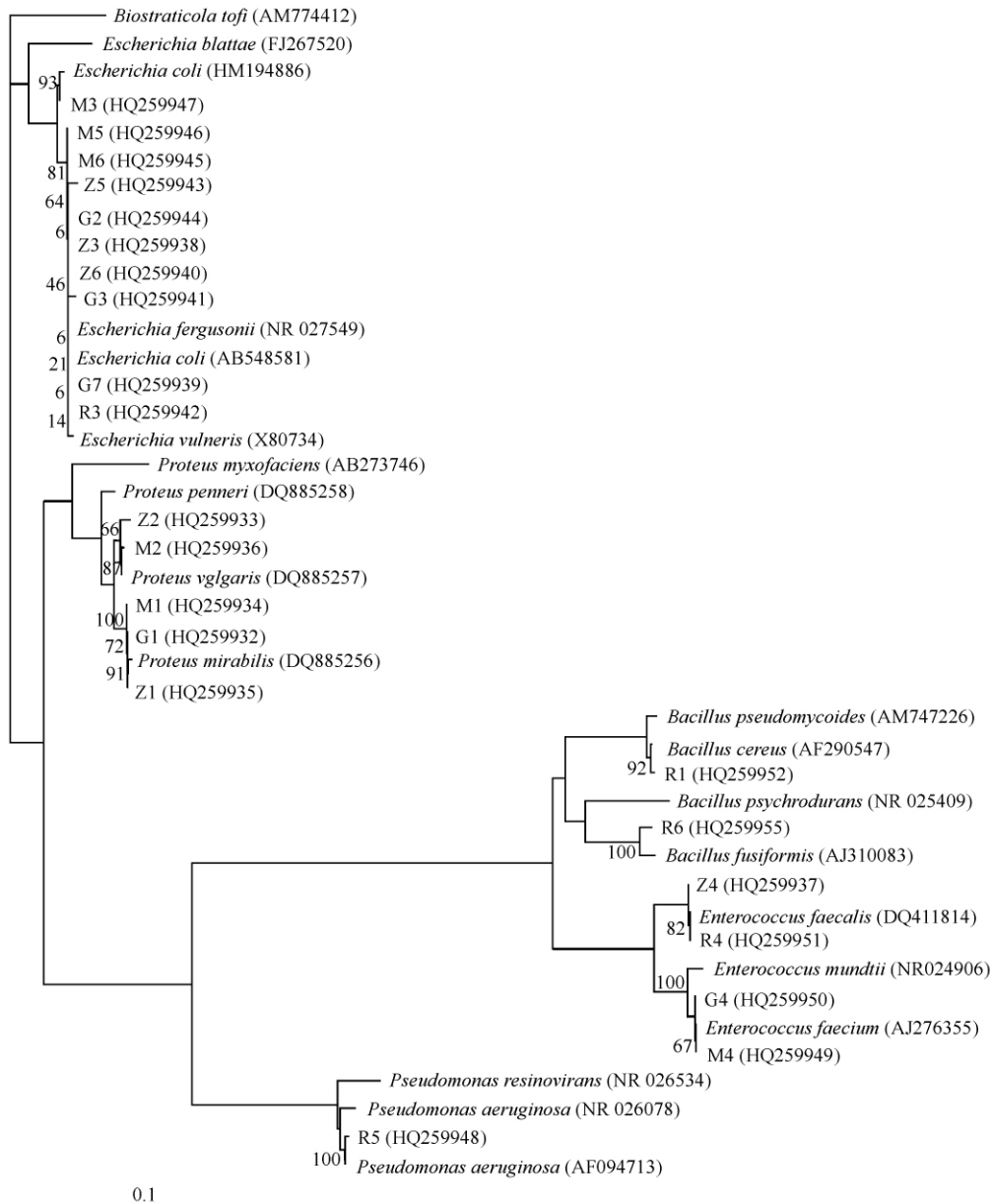


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的不同健康动物肠道优势需氧菌与相关菌株系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences showing the relationships between the dominant aerobic bacterial strains isolated from different healthy animals and the relative strains.

肠道分离的优势需氧菌中按属各随机挑选一株与黄豆苷原转化菌株进行混合培养,包括鼠源菌株 M1, M3 和 M4,鸡源菌株 G1, G3 和 G4,猪源菌株 Z2, Z4 和 Z5,兔源菌株 R1、R3、R4、R5 和 R6(两株芽胞杆菌 R1 和 R6 全部参与混合)。混合培养连续 5 次转接后,向混合培养物中加入底物黄豆苷原,同时分别向 3 种不同功能的黄豆苷原转化菌株纯培养物中加入底物黄豆苷原作为对照,用高效液相色谱检测黄豆苷原被转化情况。检测结果显示,在参与混合培

养的全部 14 株优势需氧菌中,只有两株(兔源蜡样芽胞杆菌 R1 和铜绿假单胞菌 R5)在与 3 种不同功能的黄豆苷原转化菌株混合并连续转接培养后,混合培养物完全丧失对底物黄豆苷原的转化功能,即只检测到底物黄豆苷原,无任何产物生成(图 2-D)。其余 12 株优势需氧菌与 3 种不同功能的黄豆苷原转化菌株混合并连续转接培养后,混合培养物对黄豆苷原转化能力与转化菌单独培养相比无明显变化(图 2-A、2-B 和 2-C)。

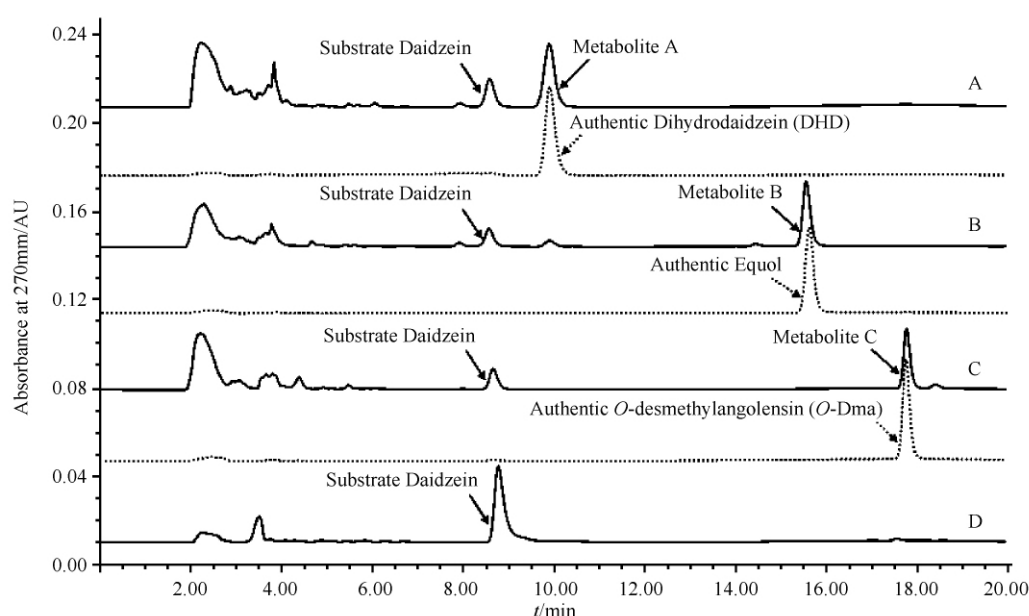


图2 不同功能黄豆苷原转化菌株与不同动物肠道优势需氧菌混合并连续5次转接培养后的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC elution profiles for daidzein biotransformation by co-culturing of different daidzein biotransforming bacteria with different predominant aerobic bacteria isolated from different animals after continuous incubation for 5 passages. A stands for the co-culture with daidzein biotransforming bacterium Niu-O16 which can bioconvert daidzein into dihydrodaidzein (DHD); B stands for the co-culture with daidzein biotransforming bacterium AUH-JLM455 which can bioconvert daidzein into equol; C stands for the co-culture with daidzein biotransforming bacterium AUH-HM195 which can bioconvert daidzein into *O*-desmethylangolensin (*O*-Dma); D stands for co-culture of bacterial strain R1 or R5 with different daidzein biotransforming bacteria after being continuously inoculated for 5 passages. No metabolite was produced except the substrate daidzein.

为进一步确定黄豆苷原转化菌株与兔源菌株 R1 和 R5 混合后连续转接几次时转化活性完全丧失,从菌株混合后第一次转接开始用 HPLC 连续检测底物黄豆苷原被转化情况。结果发现,当黄豆苷原转化菌株与菌株 R1 混合培养时,连续转接2次加入底物黄豆苷原时混合菌就已完全丧失转化活性;当黄豆苷原转化菌株与菌株 R5 混合连续转接3次时混合菌便完全丧失其转化能力(图3),这与显微镜检连续转接混合培养物中黄豆苷原转化菌株数量变化的结果相一致,推测菌株 R1 和 R5 对转化菌株有抑杀作用。

2.2.2 优势需氧菌与 ICR 小鼠肠道菌群的混合培养: 上述黄豆苷原转化菌株与优势需氧菌之间的混菌培养仅局限于菌株的两两混合,实际上在动物肠道中寄居着数量庞大的微生物菌群,为探讨优势需氧菌在菌群环境中对黄豆苷原转化菌株的影响,将两两混合中对黄豆苷原转化菌转化活性有明显抑制作用的兔源菌株 R1 和 R5 以及无明显抑制作用的优势需氧菌 G3、Z5、R6(随机挑选)分别与能稳定转化黄豆苷原为雌马酚的 ICR 小鼠肠道菌群在厌氧

条件下进行混菌培养。研究结果表明,在第一批进行混菌培养的15只 ICR 小鼠中,与 R5 进行混合并连续5次转接培养后,有14只小鼠的肠道菌群完全丧失了将黄豆苷原转化为雌马酚的能力;有一只 ICR 小鼠(5号)菌群与菌株 R5 混合培养后,混合培养物将黄豆苷原转化为雌马酚的能力稍有下降(转化率由混菌培养前的88%降低到混菌培养后的81%)。与菌株 R1 混合并连续5次转接培养后,有13只小鼠的肠道菌群完全丧失了将黄豆苷原转化为雌马酚的能力;有一只 ICR 小鼠(7号)菌群转化黄豆苷原为雌马酚能力未受到明显影响;一只转化活性(5号)明显下降,黄豆苷原转化率由原来的86%降低到15%,推测再继续转接几次后雌马酚合成能力可能会完全丧失。而参与混合培养的优势需氧菌株 G3、Z5、R6 对 ICR 小鼠肠道菌群合成雌马酚能力无明显影响。

在第二批用于混合培养的15只 ICR 小鼠中,与 R5 进行混合并连续转接5次后,有13只小鼠的肠道菌群完全丧失了将黄豆苷原转化为雌马酚的能力;其中3号小鼠雌马酚转化活性有所降低(转化

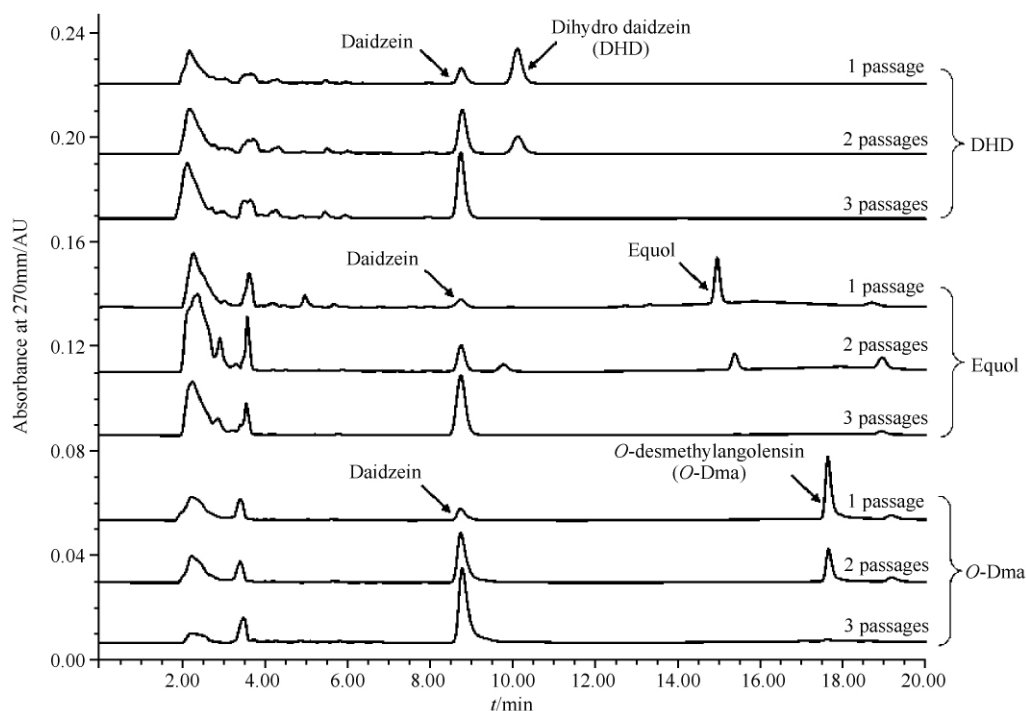


图3 不同功能转化菌株与 R5 混合后对黄豆苷原转化的高效液相色谱图

Fig.3 HPLC elution profiles of different daidzein biotransforming bacteria with *Pseudomonas aeruginosa* R5 isolated from rabbit feces after being continuously inoculated for three passages. Note: Three different daidzein biotransforming bacteria can bioconvert daidzein into dihydrodaidzein (DHD) , equol and *O*-desmethylangolensin (*O*-Dma) , respectively.

率由混菌培养前的 88% 降低到混菌培养后的 54%) ; 9 号小鼠转化能力未受影响。与菌株 R1 混合并连续转接 5 次后, 3 号和 9 号小鼠的雌马酚合成能力均未受到明显影响, 其余 13 只小鼠菌群与 R1 连续 5 次转接培养后, 混合培养物完全丧失了将黄豆苷原转化为雌马酚的能力。综合两批与 ICR 小鼠肠道菌群的混菌试验结果发现, 兔源菌株 R1 和 R5 对 ICR 小鼠肠道菌群转化合成雌马酚的能力有显著抑制作用, 抑制的有效率高达 89.9% 。

2.3 优势需氧菌抑菌活性测定

2.3.1 混合培养物中黄豆苷原转化菌株的菌体形态和数目观察: 通过显微镜观察混合培养过程中转化菌株的形态和数量变化, 结果发现, 与 R1 相混合的转化菌在第 2 次转接培养 24 h 几乎完全消失, 与 R5 相混合的转化菌在第 3 次转接培养 24 h 几乎完全消失。其余供试优势需氧菌在与转化菌株混合培养过程中, 随转接次数增加转化菌株的菌体形态及数量无明显变化, 推测兔源菌株 R1 和 R5 在混合培养过程中可能产生抑制转化菌株生长和繁殖的物质。

2.3.2 兔肠道优势需氧菌 R1 和 R5 发酵液提取物的抑菌活性检测: 对兔源菌株 R1 和 R5 的发酵液提取物进行抑菌活性检测, 结果发现, 菌株 R1 和 R5 的蛋白粗提液和乙酸乙酯萃取物(终浓度为原发酵液 20 倍)对 3 种不同功能的黄豆苷原转化菌株和标准病原菌大肠杆菌(*Escherichia coli* CICC 10372)、甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* CMCC 50001) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 27217) 均有不同程度的抑制作用。对于菌株 Niu-O16(图 4-A) 和甲型副伤寒沙门氏菌(图 4-D) 而言, 兔源菌株 R1, R5 的蛋白粗提液和乙酸乙酯萃取物均表现出较强的抑菌活性; 然而, 对于标准病原菌大肠杆菌(图 4-B) 和金黄色葡萄球菌(图 4-C) 而言, 菌株 R1 和 R5 仅蛋白粗提液表现出明显的抑菌活性。此外, 由于蛋白粗提液和乙酸乙酯萃取物对三种不同功能黄豆苷原转化菌的抑菌活性极为相似, 结果中仅显示了对菌株 Niu-O16 的抑制作用。从图 4 可以看出, 菌株 R1 和 R5 发酵液中的蛋白粗提液及乙酸乙酯萃取物对转化菌 Niu-O16(图 4-A) 的抑菌活性均强于另外 3 种标准病原菌。

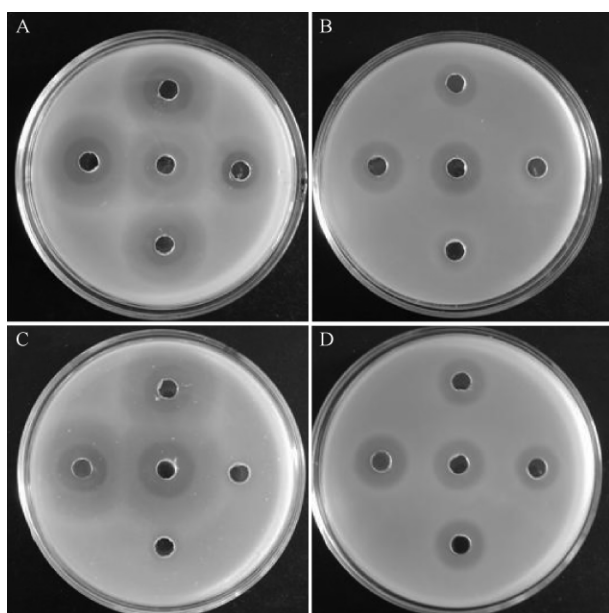


图4 菌株 R1 和 R5 的蛋白粗提液和乙酸乙酯萃取物对黄豆苷原转化菌株以及标准病原菌的抑菌活性测定

Fig. 4 The antibacterial activity of the crude protein and the materials extracted by ethyl acetate from the cultural broth of R1 and R5 on both daidzein biotransforming bacterial strains and standard pathogenic bacterial strains. A: Bovine rumen bacterial strain Niu-016 (AY263505); B: *Escherichia coli* (CICC10372); C: *Staphylococcus aureus* (ATCC27217); D: *Salmonella paratyphi* (CMCC50001). The hole in the upper part of the plate: crude protein extracted from the cultural broth of R1; The hole in the lower part of the plate: non-protein compounds extracted from the cultural broth of R1; The hole in the left part of the plate: crude protein extracted from the cultural broth of R5; The hole in right part of the plate: non-protein compounds extracted from the cultural broth of R5; The hole in the middle: CK (positive) stands for 0.1×10^4 unit Streptomycin.

3 讨论

大豆异黄酮是具有弱雌激素和抗雌激素双重调节功能的天然植物雌激素。被机体摄入体内的大豆异黄酮可被定居在胃肠道内的特定细菌代谢为生理活性比大豆异黄酮更高更广的各种不同代谢产物。目前已分离的能降解黄豆苷原及其代谢产物的细菌主要集中于红蜡菌科(*Coriobacteriaceae*)的真杆菌属(*Eubacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)等几个属^[5, 21-23]。本研究用于混菌培养的的牛瘤胃分离菌株 Niu-016 为革兰氏阳性乳杆菌属菌株(能将黄豆苷原转化为 DHD); 褐马鸡肠

道分离菌株 AUH-HM195 为革兰氏阳性肠球菌属菌株(能将黄豆苷原转化为 O-Dma); ICR 小鼠肠道分离菌株 AUH-JLM455 为革兰氏阴性不动杆菌属菌株(能将黄豆苷原转化为雌马酚)。本研究用于混菌培养的肠道优势需氧菌是按不同动物种类中的优势需氧菌所在属进行随机选取,与3种不同功能的黄豆苷原转化菌株分别进行混菌培养使试验更具代表性。此外,在混菌方式上也从黄豆苷原转化菌株与优势需氧菌的两两混合扩大到优势需氧菌与 ICR 小鼠肠道菌群的厌氧混合培养,使试验更接近肠道内的真实环境。ICR 小鼠形体小,饲喂食物单一,不同个体在代谢黄豆苷原为雌马酚能力上具有极高的稳定性和一致性。尤为值得一提的是 ICR 小鼠肠道菌群在人工模拟肠道营养液中连续5次转接培养后,其代谢黄豆苷原为雌马酚的能力均无明显变化。此外,ICR 小鼠新鲜粪样取样方便,容易做到无污染取样。因而,本研究选用 ICR 小鼠肠道菌群与分离的优势需氧菌进行混菌培养,研究优势需氧菌对菌群转化合成雌马酚能力的影响。此外,我们还将兔肠道分离菌株 R1 和 R5 分别对 ICR 小鼠进行灌菌试验(每天早晚各灌1次,每次灌菌1 mL),被灌菌的小鼠灌至第4天开始出现萎靡,食欲下降,活动量减少。连续灌菌一周后,用高效液相检测 ICR 小鼠肠道菌群转化黄豆苷原为雌马酚能力是否受到影响。结果发现,灌菌一周后菌群转化黄豆苷原为雌马酚的能力并未受到明显影响,推测来自兔肠道的优势需氧菌 R1 和 R5 可能难于在 ICR 小鼠肠道内成功定植。

大量流行病学研究发现,将黄豆苷原转化为雌马酚能力上不同人种间差异显著,韩裔美国人肠道菌群产雌马酚比例远高于美国白种人^[24]。实际上,早在1983年 Van de Merwe JP 等发现宿主基因对肠道正常菌群有明显影响^[25]。此外,膳食结构可能会影响肠道细菌组成,研究发现素食者产雌马酚比例高于非素食者^[26]。因此,目前普遍认为肠道菌群对雌马酚的合成能力可能与宿主基因以及膳食结构等因素有密切关系。然而,迄今尚无人将这种差异与寄居肠道的优势需氧菌相联系。通过本研究发现,与来自兔肠道的蜡样芽胞杆菌 R1 和铜绿假单胞菌 R5 厌氧混合并连续5次转接培养后,黄豆苷原转化菌株及 ICR 小鼠肠道菌群转化黄豆苷原能力几乎完全丧失,而其根本原因在于菌株 R1 和 R5 的蛋白粗提液和乙酸乙酯萃取物对黄豆苷原转化菌株均具较强的抑杀作用。因此,除宿主基因以及膳食结构、药物使用(特别是抗生素类药物)和长期心理压力等环境因

素外,肠道内能产生有毒代谢产物的某些特殊优势需氧菌可能直接决定着黄豆苷原转化菌株在肠道中的长期生存与否,而造成不同动物肠道优势需氧菌种类不同的原因尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 94: 499-518.
- [2] Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British Journal of Nutrition*, 2004, 91: 513-531.
- [3] Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach S, Goldin B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet*, 1992, 339: 1233.
- [4] Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germfree and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41: 631-636.
- [5] Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 214-219.
- [6] Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 2002, 132: 3577-3584.
- [7] Hwang J, Wang J, Morazzoni P, Hodis HN, Sevanian A. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 34(10): 1271-1282.
- [8] Wang XL, Shin KH, Hur HG, Kim SI. Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115: 261-269.
- [9] Hur HG, Lay Jr JO, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Archives of Microbiology*, 2000, 174: 422-428.
- [10] Minamida K, Tanaka M, Abe A, Sone T, Tomita F, Hara H, Asano K. Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102: 247-250.
- [11] Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay JO, Freeman JP, Dore J, Rafii F. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Archives of Microbiology*, 2002, 178: 8-12.
- [12] Wang XL, Kim KT, Lee JH, Hur HG, Kim SI. C-ring cleavage of isoflavones daidzein and genistein by a newly isolated human intestinal bacterium *Eubacterium ramulus* Julong 601. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 14(4): 766-771.
- [13] 王秀伶, 邵建柱, 朱宝成, 袁洪水, 王世英. 不同动物肠道微生物对黄豆苷原的转化研究. 河北农业大学学报(*Journal of Agricultural University of Hebei*), 2007, 30(1): 79-83.
- [14] 张柏林, 秦贵信, 孙泽威, 刘宁, 赵元, 王涛. 仔猪胃肠道微生物菌群定植规律及其功能的研究进展. 中国畜牧杂志(*Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 2009, 45(19): 6668.
- [15] 温俊, 孙冬岩, 孙笑非. 肠道菌群的重要性及微生态制剂对肠道的调节作用. 饲料研究(*Feed Research*), 2009, 70-72.
- [16] 史煜曼, 刘赛琴, 翁奕敏. 微生物鉴定系统在肠道病原菌检测中的应用. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 2009, 21(6): 565-569.
- [17] Guo XH, Li DF, Lu WQ, Piao XS, Chen XL. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, (90): 139-146.
- [18] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] 于飞, 王世英, 李佳, 张琪, 李朝东, 王秀伶. 兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷原的开环转化. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(4): 479-484.
- [21] Tamura M, Tsushida T, Shinohara K. Isolation of an isoflavone-metabolizing, *Clostridium*-like bacterium, strain TM-40, from human faeces. *Anaerobe*, 2007, 13: 32-35.
- [22] Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Archives of Microbiology*, 2005, 183: 45-55.
- [23] Uchiyama S, Tomomi U, Suzuki T. Identification of a Newly Isolated Equol-Producing Lactic Acid Bacterium from the Human Feces. *Journal of Enteric Bacteria*, 2007, 21: 217-220.
- [24] Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wahala K, Thomas WK, Lampe JW. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between

- Caucasian and Korean American women and girls. *Journal of Nutrition*, 2006, 136: 1347-1351.
- [25] Van de Merwe JP, Stegeman JH, Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1983, 49: 119-124.
- [26] Nagata C, Ueno T, Uchiyama S, Nagao Y, Yamamoto S, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Dietary and lifestyle correlates of urinary excretion status of equol in Japanese women. *Nutrition and Cancer*, 2008, 60: 49-54.

Influence of predominant aerobic bacteria isolated from different healthy animals on daidzein biotransforming capacity by co-culture with different daidzein biotransforming bacteria

Jinglong Luo, Xiuling Wang*, Jinru Fan, Shiyang Wang, Jia Li

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

Abstract [**Objective**] To investigate the influence of isolated predominant aerobic bacteria on daidzein biotransformation capacity by co-culture with daidzein biotransforming bacteria. [**Methods**] Predominant aerobic bacteria were isolated from diluted feces solutions of different healthy animals, including ICR mice, Luhua chicken, Landrace pigs and Rex rabbits. Daidzein biotransforming bacteria were anaerobically co-cultured with the isolated predominant aerobic bacteria and the cultural broth was extracted and detected by high performance liquid chromatography (HPLC). [**Results**] Twenty two predominant aerobic bacteria were isolated from the four different healthy animals mentioned above. Based on the analyses of 16S rRNA gene sequences, morphology study and relative biophysico-biochemical characteristics, all 22 isolates belong to the 5 genera, i. e. *Escherichia* (10), *Proteus* (5), *Enterococcus* (4), *Bacillus* (2) and *Pseudomonas* (1). Co-culture between predominant aerobic bacteria and daidzein biotransforming bacteria was carried out under anaerobic conditions. The results showed that the biotransformation capacity was totally lost when different daidzein biotransforming bacterium was co-cultured with either *Bacillus cereus* (R1) or *Pseudomonas aeruginosa* (R5) and continuously inoculated for 2 or 3 passages. However, no obvious influence was observed when daidzein biotransforming bacteria were co-cultured with all the other isolated predominant aerobic bacteria except R1 and R5. In addition, when strain R1 and R5 was co-cultured with the intestinal microflora of the ICR mice anaerobically and continuously inoculated for 5 passages, about 90% of the co-cultures totally lost the activity to convert daidzein to equol effectively. [**Conclusion**] Different predominant aerobic bacteria showed different influence on daidzein biotransformation capacity after being co-cultured with different daidzein biotransforming bacteria. Among all the isolated predominant aerobic bacteria used for co-culture, both *Bacillus cereus* (R1) and *Pseudomonas aeruginosa* (R5) were detected significant inhibition on biotransformation activity of different daidzein biotransforming bacteria.

Keywords: predominant aerobic bacteria, daidzein, equol, microbial biotransformation, co-culture

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the "National Natural Science Foundation of China" (30570035, 30770047) and by the Talent Supporting Project of Hebei Province (CPRC027)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528257; Fax: +86-312-7528265; E-mail: wxling2000@hebau.edu.cn

Received: 29 January 2011/Revised: 17 March 2011