

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11): 1323–1332; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.010

人肠道产柚苷酶菌株分离、鉴定及其对柚皮苷的转化特性

陈静¹, 孟建青², 王烨¹, 王秀伶^{1*}

¹ 河北农业大学生命科技学院, 河北 保定 071001

² 河北泊头职业学院, 河北 沧州 061001

摘要: 【目的】从健康人肠道微生物菌群中分离能将柚皮苷高效转化为柚皮素的特定细菌菌株, 对分离得到的菌株进行菌种鉴定并研究菌株对柚皮苷转化特性, 目的是为柚皮素的高效生物合成提供新细菌资源。【方法】取健康人新鲜粪样, 在厌氧工作站内培养 24 h 后进行梯度稀释并涂板, 从板上挑取单菌落与底物柚皮苷进行厌氧培养, 用高效液相色谱检测底物被转化情况。根据 16S rDNA 序列及相关生理生化特性分析, 对所分离的柚皮苷转化菌进行菌种鉴定, 并测定转化菌株对底物柚皮苷的转化动态和转化能力。【结果】从人肠道菌群中分离得到 4 株能将柚皮苷转化为柚皮素的细菌菌株, 分别命名为 AUH-JLD3、AUH-JLD7、AUH-JLD104 和 AUH-JLD109。根据 16S rDNA 序列分析, 结合形态学及相关生理生化特性等, 将其分别鉴定为布劳特氏菌 (*Blautia* sp. AUH-JLD3)、肠球菌 (*Enterococcus* sp. AUH-JLD7)、拟杆菌 (*Bacteroides* sp. AUH-JLD104) 和巴氏链球菌 (*Streptococcus pasteurianus* subsp. AUH-JLD109)。转化动态研究结果表明, 所分离的 4 株细菌菌株均能在 12 h 内将 0.2 mmol/L 底物柚皮苷转化为柚皮素; 转化能力测定结果显示, 菌株 AUH-JLD3、AUH-JLD7、AUH-JLD104 及 AUH-JLD109 能够高效转化底物柚皮苷的最大浓度分别为 0.2 mmol/L (平均转化率 66.67%)、0.8 mmol/L (平均转化率 86.49%)、0.2 mmol/L (平均转化率 73.68%) 以及 1.6 mmol/L (平均转化率 93.20%)。【结论】本研究首次从人肠道菌群中分离得到 4 株能将柚皮苷转化为柚皮素的细菌菌株, 其中巴氏链球菌 AUH-JLD109 对底物柚皮苷转化能力最强。

关键词: 柚皮苷, 柚皮素, 人肠道菌群, 菌株分离鉴定, 微生物转化

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1323-10

柚皮素 (Naringenin) 属二氢黄酮类化合物, 具有抗癌^[1]、抗高血糖^[2]、抗动脉粥样硬化^[3]、抗血小板凝集^[4] 以及抗氧化^[5] 等多种药理或生理功能。柚皮素在桃叶中虽有分布, 但含量低微, 很难通过提取大量获得^[6]。Hwang 等^[7] 和 Leonard 等^[8] 分别以酪氨酸和苯丙酸为底物利用重组大肠杆菌合成柚皮素, 但柚皮素产量较低 (400 $\mu\text{g/L}$ 和 186 mg/L)。

用丝状真菌产生的柚苷酶水解柚皮苷是目前获得柚皮素的主要途径。柚苷酶是一种由 $\alpha\text{-L}$ -鼠李糖苷酶和 $\beta\text{-D}$ -葡萄糖苷酶组成的复合酶, 可将底物柚皮苷分别脱去鼠李糖和葡萄糖生成柚皮素^[9]。根据已有文献报道, 产柚苷酶的丝状真菌大多集中在曲霉属^[10-11] 和青霉属^[12-13]。除丝状真菌外, 我国集美大学的蔡慧农研究组在 2010 年和 2011 年报道了两

基金项目: 国家自然科学基金 (31170058); 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: 陈静 (1984–), 女, 河北新乐人, 硕士研究生, 主要从事天然药物分析与应用研究。E-mail: cj7414197@126.com

收稿日期: 2014-01-14; **修回日期:** 2014-04-27

株产柚苷酶的酵母状真菌,即罗伦隐球酵母(*Cryptococcus* sp. Jmudeb008)^[14]和加利福尼亚拟威尔酵母(*Williopsis californica* Jmudeb007)^[15]。然而,由于缺乏高产柚苷酶的菌株,加之真菌大多发酵周期长、需氧量大,发酵液粘稠度较高,所有这些因素致使目前柚苷酶制剂售价较高(如 Sigma-Aldrich 销售的活力为 300 U/g 的柚苷酶制剂的售价为 19427 RMB/250 g)。因此,采用成品柚苷酶水解柚皮苷来生产柚皮素成本较高。

与真菌相比,细菌具有生长速度快、发酵周期短、发酵液粘稠度低等优点。尤为值得一提的是,利用细菌转化柚皮苷为柚皮素时,可直接利用细菌活体细胞代替柚苷酶进行转化,通过发酵工艺优化容易建立稳定的发酵系统。因而,与使用成品柚苷酶相比,利用细菌细胞转化系统可大大降低柚皮素的生产成本。然而,国内外报道的产柚苷酶细菌的数量却十分有限,目前仅有分自土壤样品的木糖葡萄糖菌(*Staphylococcus xylosus* MAK2)^[16]和甲基芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus* PMY)^[17],而其中的木糖葡萄糖菌曾被报道具有潜在致病性^[18]。因而,从细菌资源中挖掘安全高效的柚皮苷转化菌,可有效解决柚皮素资源匮乏问题,对加速柚皮素在医药或食品领域的应用具有重要意义。

Bokkenheuser 等^[19]早在 1987 年就曾报道人肠道细菌菌群可将柚皮苷转化为柚皮素。北京大学杨秀伟实验室于 2013 年利用人粪样菌群转化底物柚皮苷时发现,底物柚皮苷可被转化为 4 种代谢产物,其中以柚皮素含量最高(18.3%)^[20]。然而,迄今国内外尚未见从人粪样菌群中分离产柚苷酶的细菌的报道。本研究拟首次以人粪样菌群为菌源,从中分离筛选能将底物柚皮苷高效转化为柚皮素的特定细菌菌株,对所分离菌株进行菌种鉴定,研究菌体细胞对底物柚皮苷的转化特性,为实现以柚皮苷为底物的柚皮素的高效微生物合成奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:脑心浸液(BHI)培养基(美国 BD 公司)。柚皮苷和柚皮素标准品购于成都曼斯特生物科技有限公司。中药化橘红(购于保定市华兴大药厂,产地:中国广州)。甲醇、乙酸乙酯和乙腈均

为色谱纯(美国 Fisher 公司)。

1.1.2 主要仪器: Concept 400 型厌氧工作站(英国 Ruskin 公司),工作站内气体种类及配比为:5% CO₂, 10% H₂ 和 85% N₂。HPLC 系统(美国 Waters 公司),1525 型双泵,二极管阵列检测器, C₁₈-ODS 分析柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm)。光学显微镜(CN15-T31 型,北京永新)。DK-VC010-IR 真空离心浓缩仪(韩国 DAIKI), pH211 型酸度计(意大利 HANNA 公司)。Lambda35 紫外可见分光光度计(Perkin/Elmer 公司), PTP-1 数字温度控制仪。API 20A 试剂盒(法国 bioMérieux)。有机酸种类及含量测定所用色谱柱:TSKgel ODS-100V 酸性柱(5 μm, 4.0 mm × 250 mm)。

1.2 柚皮苷的分离提取

用粉碎机将化橘红粉粹至粉末状。称取粉碎后的化橘红粉 10 g 加到 250 mL 三角瓶中,同时加入 50 mL 70% 的乙醇水溶液(固液比为 1:5) 50℃ 浸提 1 h,将粗提液用滤纸过滤,滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,稀释 100 倍后用高效液相色谱检测提取效果。流动相为乙腈和水,具体为:A 液为 10% 乙腈水溶液加入 0.1% 乙酸,B 液为 90% 乙腈水溶液同时加入 0.1% 乙酸;检测方法为:0-9 min (A:B=80:20), 14 min (A:B=40:60), 20 min (A:B=80:20) (V/V),流速为 1 mL/min,检测波长为 283 nm。进样量 20 μL。

1.3 柚皮苷转化菌株的分离筛选

人粪样菌群的分离方法参照于飞等^[21]进行。待菌落在 BHI 平板上长出后,挑取单菌落到 1 mL BHI 液体培养基中,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的柚皮苷粗提液作为底物,培养 2 d 后取样检测底物转化情况,具体取样方法见 Wang^[22]的报道。HPLC 检测方法同上所述。通过与柚皮素标准品对比高效液相保留时间和紫外吸收图谱,确定待检测菌落能否将底物柚皮苷转化为柚皮素。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 菌体及菌落形态观察:将厌氧工作站内分离得到的具有柚皮苷转化活性的菌株进行纯化培养,分别接种到 BHI 液体及固体培养基上,培养 24 h 后光学显微镜下观察菌体形态,48 h 后观察菌落形态。

1.4.2 革兰氏染色及耐氧性试验:参照沈萍等^[23]对分离得到的各转化菌株进行革兰氏染色。同时,

对各转化菌株进行等量接种,分别放置在 37℃ 普通生化培养箱和厌氧工作站内进行培养,根据菌株生长情况确定所分离转化菌株的耐氧性。为降低培养基氧化-还原电位,向 BHI 液体培养基中添加 0.05% 的半胱氨酸。根据本实验室以往报道^[24],该培养基灭菌后经自然冷却,用 pH211 型酸度计测得的平均氧化-还原电位为 -275 mV。将转化菌株分别接种在氧化-还原电位为 -275 mV 左右的 BHI 培养基中,并在 37℃ 普通生化培养箱培养,观察菌株能否正常生长繁殖。

1.4.3 16S rDNA 序列分析:采用通用 27F/1492R 引物,PCR 扩增条件及序列测定等同以前报道^[21]。PCR 产物送华大基因测序,序列上交美国 NCBI 核苷酸序列库,并通过 BLAST 比对,对菌株进行系统分类并构建系统发育树。

1.4.4 生理生化鉴定:参照细菌鉴定手册^[25]进行,使用 API 20A 试剂盒进行厌氧菌生化指标鉴定。

1.4.5 菌株(G + C) mol% 含量测定:采用热变性法^[25]进行测定。

1.4.6 有机酸种类及含量测定:HPLC 法^[26]测定菌株发酵葡萄糖后产酸种类及含量,流动相:0.01 mol/L 磷酸水溶液 pH2.6,流速:1 mL/min,检测波长:210 nm。

1.5 菌株转化动态测定

将保藏在 -80℃ 的转化菌株在厌氧工作站内融化后,取 100 μL 接种到 1 mL 新鲜 BHI 培养基中,再按同样方法转接一次作为种子液。取种子液 100 μL

接种到 1 mL 新鲜 BHI 培养基中,同时加入终浓度为 0.2 mmol/L 柚皮苷粗提液共培养,加入底物后分别在培养 2 h、4 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h,按 1.3 所述方法取样并进行高效液相检测,每个样品重复 3 次,记录数据,绘制转化动态曲线。对分离得到的兼性厌氧柚皮苷转化菌株,则分别在厌氧工作站和普通生化培养箱内测定菌株在无氧和有氧条件下的转化动态。

1.6 菌株转化能力测定

种子液制备方法同上所述。在厌氧工作站内,取种子液 500 μL 接种到 4.5 mL 新鲜 BHI 培养基中,同时分别加入终浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0 mmol/L 的底物柚皮苷粗提液,共培养 48 h 后采用 1.3 所述方法取样,HPLC 检测培养基中剩余的底物和生成的产物的浓度,每个浓度重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 底物柚皮苷的分离提取与结构鉴定

经高效液相色谱检测,发现化橘红粗提液在保留时间 6.4 min 有一主要物质峰(图 1),该物质峰的保留时间与柚皮苷标准品(图 1 中的虚线色谱图)的保留时间完全一致。经紫外吸收图谱分析,发现化橘红粗提液中的主要物质峰在 283 nm 波长有最大紫外吸收,在 327 nm 波长下有较弱紫外吸收(图 1 中的紫外吸收图谱),这与文献中报道的柚皮苷标准品的紫外吸收图谱^[27]完全吻合。通过高效

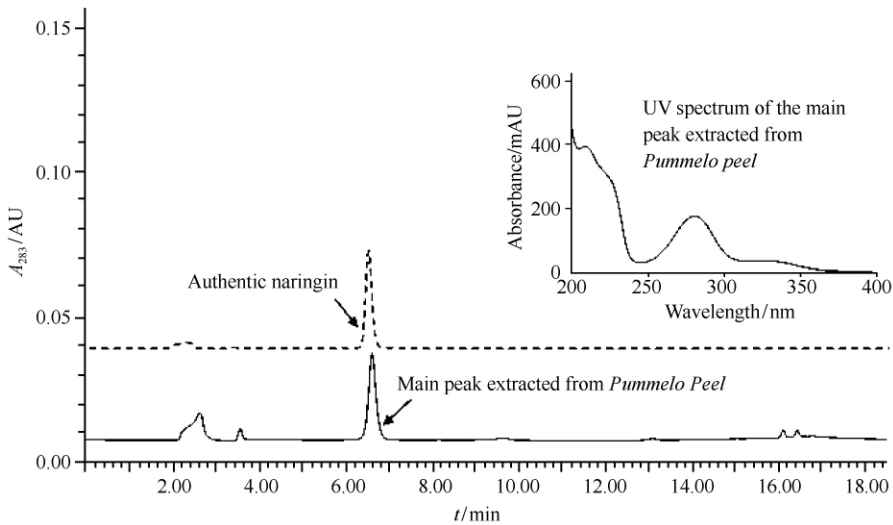


图 1. 化橘红乙醇水溶液提取物的高效液相色谱图

Figure 1. HPLC elution profile of the extract of Pummelo Peel extracted by ethanol and water.

液相色谱保留时间和紫外吸收图谱,化橘红粗提液中的主要物质峰可初步鉴定为柚皮苷。为进一步准确鉴定化橘红粗提液主要物质峰的化学结构,将分离纯化后的化橘红提取物进行质谱分析(ESI-MS),发现其 $[M-H]^-$ 为 579,表明从化橘红中提取的主要物质峰的分子量应为 580,该分子量与化合物柚皮苷($C_{27}H_{32}O_{14}$)的分子量一致。因此,根据高效液相色谱保留时间、紫外吸收图谱以及质谱等分析结果,将化橘红粗提液中的主要物质峰准确鉴定为柚皮苷。

2.2 转化菌株的分离及柚皮苷转化产物的结构鉴定

经高效液相色谱检测,发现所加入的底物柚皮苷的保留时间为 6.4 min(即图 2 中的短线虚线图)。将底物柚皮苷与梯度稀释平皿上长出的单菌落共培养后,发现有 4 个单菌落的培养液可使底物柚皮苷的物质峰基本消失,而在保留时间 16.2 min 处均出现一新的物质峰(即图 2 中的实线色谱图),且该新出现的物质峰的峰面积随底物柚皮苷的减少而逐渐增加。此外,当增大底物柚皮苷浓度时,该新物质峰的峰面积也呈比例增加。因而,将保留时间为 16.2 min 的新物质峰确定为底物柚皮苷被转化后生成的产物。我们将 4 株具有柚皮苷转化能力的人肠道细菌菌株分别命名为菌株 AUH-JLD3、菌株

AUH-JLD7、菌株 AUH-JLD104 和菌株 AUH-JLD109。由于 4 个单菌落的培养液转化底物柚皮苷的高效液相色谱极为相似,故仅显示了菌株 AUH-JLD109 转化底物柚皮苷的高效液相色谱图(图 2)。

为确定底物柚皮苷被菌株转化后所生成的产物的化学结构,首先对比分析了柚皮苷代谢产物(即图 2 中的实线色谱图)和柚皮素标准品(即图 2 中的点线虚线色谱图)的高效液相保留时间和紫外吸收图谱。结果发现,柚皮苷代谢产物的保留时间与柚皮素标准品完全一致(图 2);通过测定柚皮苷代谢产物的紫外吸收图谱,我们发现该代谢产物在 288 nm 波长有最大紫外吸收,在 328 nm 波长下有较弱紫外吸收(图 2 中的紫外吸收图谱),这与文献中报道的柚皮素标准品的紫外吸收图谱完全吻合^[28]。因而,通过高效液相色谱保留时间和紫外吸收图谱,柚皮苷经菌体代谢后生成的产物初步鉴定为柚皮素。为进一步准确鉴定柚皮苷代谢产物的化学结构,将图 2 中的新物质峰(即图 2 实线色谱图)分离纯化后进行质谱分析(ESI-MS),发现其 $[M-H]^-$ 为 271,因而,该新物质峰的分子量应为 272,该分子量与柚皮素($C_{15}H_{12}O_5$)的分子量一致。因此,根据高效液相保留时间、紫外吸收图谱以及质谱等分析结果,我们将底物柚皮苷经菌体转化后生成的产物准确鉴定为柚皮素。

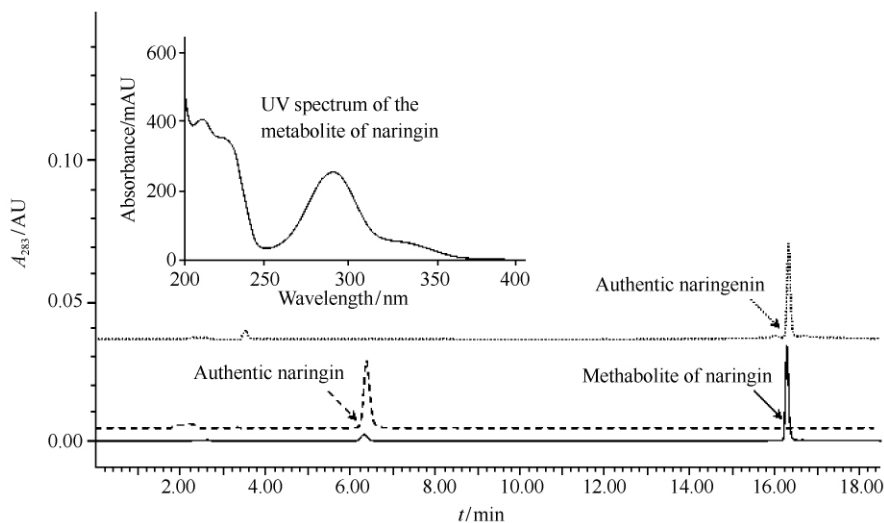


图 2. 人肠道细菌菌株 AUH-JLD109 在厌氧条件下对底物柚皮苷转化的高效液相色谱图

Figure 2. HPLC elution profile of naringin after 24 h incubation with human intestinal bacterial strain AUH-JLD109 under anaerobic conditions. Insert: UV spectrum of the metabolite.

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌体及菌落形态特征: 分离的 4 株柚皮苷转化菌在 BHI 液体培养基中厌氧培养 24 h 后, 在光学显微镜下观察发现, 菌株 AUH-JLD104 的菌体呈短杆状, 其余 3 株菌的菌体均呈球形或卵圆形, 其中菌株 AUH-JLD109 和 AUH-JLD7 的菌体以单个、成对或短链状存在。在 BHI 固体培养基上厌氧培养 48 h 后, 发现 4 株转化菌的菌落均为圆形, 中间呈乳白色, 有凸起, 菌落直径为 2 mm – 4 mm, 除菌株 AUH-JLD3 边缘有裂痕外, 其余 3 株菌落边缘整齐。

2.3.2 革兰氏染色与耐氧特性: 革兰氏染色结果表明, 菌株 AUH-JLD104 为革兰氏阴性, 其余 3 株转化菌为革兰氏阳性。耐氧性试验结果表明, 4 株柚皮苷转化菌中只有菌株 AUH-JLD109 在厌氧 (厌氧工作站) 和有氧 (普通生化培养箱) 条件下均能正常生长繁殖, 因而, 菌株 AUH-JLD109 为兼性厌氧菌株。而其余 3 株转化菌只能在厌氧条件下正常生长繁殖, 表明这 3 株菌为厌氧细菌菌株。根据 Sowers 等^[29] 的报道, 严格厌氧细菌在氧化-还原电位高于 (– 275) – (– 300) mV 左右的培养基中不能生长。

为确定本研究分离的 3 株柚皮苷转化菌是否为严格厌氧细菌, 我们将 3 株菌分别接入到氧化还原电位调至 – 275 mV 左右的 BHI 液体培养基, 并在普通生化培养箱中培养。结果发现, 这 3 株柚皮苷转化菌均不能正常生长, 表明这 3 株柚皮苷转化菌均为严格厌氧细菌。

2.3.3 16S rDNA 序列分析: 通过 BLAST 比对发现, 菌株 AUH-JLD109 的 16S rDNA 序列与巴氏链球菌 (*Streptococcus pasteurianus* CIP107122) (NR043660) 的相似性为 100%; 菌株 AUH-JLD104 的 16S rDNA 序列与多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron* JCM5827) (AB510710) 的相似性为 99.75%; 菌株 AUH-JLD7 的 16S rDNA 序列与粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC 19433) (DQ411814) 的相似性为 99.24%; 菌株 AUH-JLD3 的 16S rDNA 序列与布劳特氏菌 (*Blautia* sp. M25) (HM626178) 的相似性为 97.99%。为确定所分离的 4 株柚皮苷转化菌的分类地位, 采用 MEGA5.05 软件, Neighbor-Joining 法构建系统发育树 (图 3)。

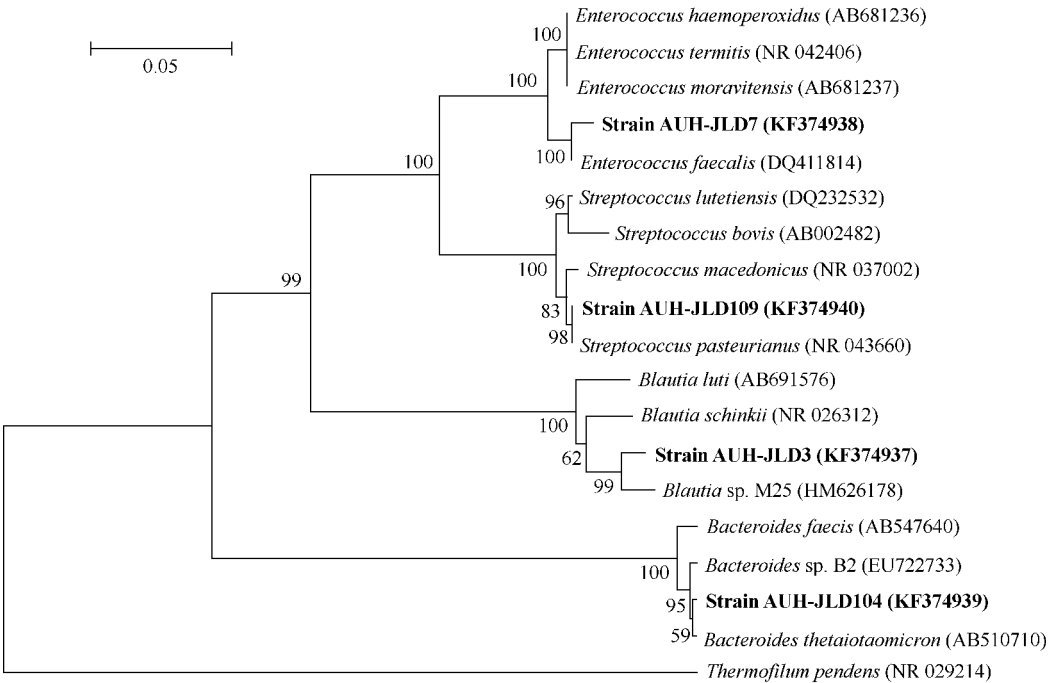


图 3. 基于 16S rDNA 序列的人肠道柚皮苷转化菌亲缘关系图

Figure 3. 16S rDNA based dendrogram showing the phylogenetic affiliation of naringin conversion bacteria isolated from human intestinal microflora. The number at each node indicates the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. Bar, 0.05% sequence divergence. The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets.

2.3.4 生理生化特征、有机酸类型及(G + C)

mol%含量:经检测所分离的3株严格厌氧转化菌的相关生理生化指标中除菌株AUH-JLD104的吡嗪实验表现为阳性外,其余均表现为阴性。菌株AUH-JLD104不能发酵GLU(葡萄糖)、SAC(蔗糖)和LAC(乳糖)产酸,而16S rDNA序列与之相似性最高(99.75%)的多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)则能够发酵葡萄糖、蔗糖和乳糖^[25]。菌株AUH-JLD7在耐盐[6.5% NaCl(+)]、耐碱[pH9.6(+)]以及耐高、低温[45℃(+)]和10℃(+)]等特性上与肠球菌属菌株表现一致,但菌株AUH-JLD7不能利用SAC(蔗糖)、LAC(乳糖)和MAN(甘露醇)发酵产酸,而16S rDNA序列与之相似性最高(99.24%)的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)则可以利用蔗糖、乳糖和甘露醇产酸^[25]。转化菌株AUH-JLD3在糖发酵方面的特性与布劳特氏菌属菌株^[30]存在明显差异。因此,根据3株严格厌氧柚皮苷转化菌的16S rDNA序列分析结果,结合相关生理生化特性,将菌株AUH-JLD104,菌株AUH-JLD7和菌株AUH-JLD3分别鉴定为*Bacteroides* sp. AUH-JLD104, *Enterococcus* sp. AUH-JLD7和*Blautia* sp. AUH-JLD3。

经相关指标测定,产柚苷酶的兼性厌氧菌株AUH-JLD109在某些糖的利用及溶血特性上与巴氏链球菌(*Streptococcus pasteurianus* CIP107122)存在明显不同。菌株AUH-JLD109能利用ARA(阿拉伯糖)、SOR(山梨醇)和MAN(甘露醇),而巴氏链球菌CIP107122则不能利用^[31];此外,巴氏链球菌CIP107122具有 α 溶血特性,而菌株AUH-JLD109则不具有溶血特性。然而,经(G + C) mol%含量测定发现,菌株AUH-JLD109的(G + C) mol%含量为35.61%,这与Lin等^[32]2011年报道的巴氏链球菌ATCC43144的(G + C) mol%(37.4%)仅相差1.79%(有关巴氏链球菌CIP107122(G + C) mol%含量目前尚未见报道)。另外,经测定发现,菌株AUH-JLD109发酵液中有有机酸主要为乳酸(含量为0.234%),其次为乙酸(0.075%)和甲酸(0.015%),这与链球菌属主要产乳酸特性相一致^[25]。因此,根据16S rDNA序列分析,结合相关生理生化特性、(G + C) mol%含量及优势有机酸种类,

我们将菌株AUH-JLD109鉴定为巴氏链球菌下的一个亚种,即*Streptococcus pasteurianus* subsp. AUH-JLD109。

2.4 菌株对底物柚皮苷的转化动态

结果表明,在厌氧条件下,3株厌氧菌株均在与底物共培养12 h后对底物柚皮苷的转化率达到最高。兼性厌氧菌株AUH-JLD109在与底物共培养4 h内底物柚皮苷浓度迅速降低,产物柚皮素浓度则急剧增加,此时菌体对柚皮苷的转化率达到最高,此后随培养时间延长产物浓度基本保持不变(图4中虚线图)。兼性厌氧菌株AUH-JLD109在有氧条件下的转化动态(图4中实线图)与该菌株在厌氧工作站内的转化动态基本一致。

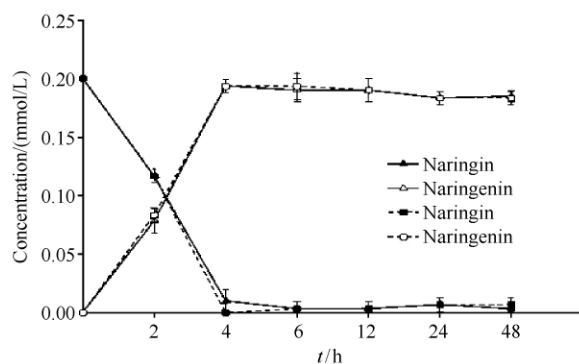


图4. 兼性厌氧细菌AUH-JLD109在厌氧(—)或有氧(—)条件下对底物柚皮苷的转化动态

Figure 4. Biotransformation kinetics of naringin while the facultative bacterium strain AUH-JLD109 was grown anaerobically (—) or aerobically (—).

2.5 菌株对柚皮苷的转化能力

为测定不同柚皮苷转化菌对底物柚皮苷的转化能力,将4株柚皮苷转化菌分别与不同浓度的底物柚皮苷共培养。结果发现巴氏链球菌AUH-JLD109对柚皮苷的转化能力最强,该菌株能高效转化底物柚皮苷的最大浓度为1.6 mmol/L,该浓度下的平均转化率为93.20%。当柚皮苷浓度继续增大至2.0 mmol/L时,菌株转化能力急剧下降,平均转化率仅为13.70%(图5-A)。肠球菌AUH-JLD7能高效转化底物柚皮苷的最大浓度为0.8 mmol/L,此浓度下的平均转化率为86.49%,当柚皮苷浓度继续增大至1.2 mmol/L时,菌株平均转化率降为72.48%(图5-B)。所分离的4株柚皮苷转化菌中,以布劳

特氏菌属菌株 AUH-JLD3 和拟杆菌 AUH-JLD104 对柚皮苷转化能力最弱,两株菌能高效转化底物柚皮苷的最大浓度均为 0.2 mmol/L,平均转化率分别为 66.67% 和 73.68%。

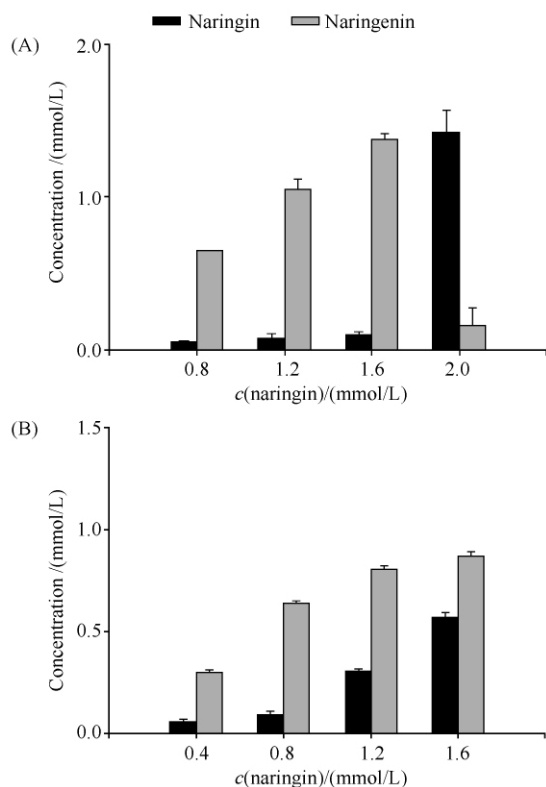


图 5. 菌株 AUH-JLD109 (A) 和菌株 AUH-JLD7 (B) 在厌氧条件下对不同浓度底物柚皮苷转化能力

Figure 5. Bioconversion capacity of strain AUH-JLD109 (A) and strain AUH-JLD7 (B) after 2 days of incubation with different concentrations of the substrate naringin under anaerobic conditions.

3 讨论

尽管目前报道的产 α -L-鼠李糖苷酶的细菌种类较多,如芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. GL1) [33]、梭杆菌 (*Fusobacterium* K-60) [34] 和粪堆梭菌 (*Clostridium stercoreum*) [35] 等,但已报道的产柚苷酶 (α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶) 的细菌则仅有两株,即来自土壤的木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus* MAK2) [16] 和甲基芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus* PMY) [17],且两株细菌菌株产酶能力较低。通过本研究,国内外首次从人粪样菌群中分离得到了分属布劳特氏菌属、肠球菌属、拟杆菌属和链球菌属的 4

株产柚苷酶细菌菌株,这 4 个属的细菌菌株具有产柚苷酶能力均为首次报道。另外,这 4 株产柚苷酶的细菌菌株中,除巴氏链球菌 AUH-JLD109 为兼性厌氧菌外,其余 3 株均为严格厌氧细菌菌株。本研究进一步扩大了产柚苷酶细菌菌株的分布范围,对今后从其他动物粪样菌群中分离产柚苷酶细菌菌株具有一定指导意义。

另一方面,从人粪样菌群中分离得到的 4 株细菌菌株对底物柚皮苷的转化能力相差悬殊,其中兼性厌氧巴氏链球菌 AUH-JLD109 在无氧条件下对底物柚皮苷的转化能力远高于其余 3 株严格厌氧细菌菌株。此外,通过检测发现,巴氏链球菌 AUH-JLD109 在有氧条件下对底物柚皮苷的最大转化能力与该菌株在厌氧条件下的最大转化能力相近,兼性厌氧巴氏链球菌 AUH-JLD109 在有氧转化柚皮苷方面呈现出广阔的开发利用前景。巴氏链球菌 AUH-JLD109 在有氧条件下生长迅速,对底物柚皮苷转化效率高且稳定,但该菌株却只能在营养丰富、价格昂贵的 BHI 培养基中生长。今后拟筛选适合巴氏链球菌 AUH-JLD109 生长和转化的廉价培养基,通过优化转化工艺进一步提高菌株转化效率,使巴氏链球菌 AUH-JLD109 早日应用于规模化生产。

参考文献

- [1] Guengerich FP, Kim DH. In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis*, 1990, 11 (12): 2275-2279.
- [2] Harmon AW, Patel YM. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305 (2): 229-234.
- [3] Lee CH, Jeong TS, Choi YK, Hyun BH, Oh GT, Kim EH, Kim JR, Han JI, Bok SH. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 284 (3): 681-688.
- [4] 廖霞, 刘文, 丁航. 柚皮素对凝血酶诱导的兔血小板聚集的影响. *时珍国医国药*, 2010, 21 (11): 2909 -

- 2910.
- [5] Li T, Wang X, Zhao X, Li D, Wang S, Zhang G. Experimental study on the effect of naringenin on oxidative stress medium generated in carbon tetrachloride-induced chemical hepatic injury in mice. *China Journal of Clinical Pharmacology*, 2010, 26 (6): 420-423. (in Chinese)
- 李桃园, 王昕, 赵旋, 李丹, 王淑梅, 章国良. 柚皮素对四氯化碳致小鼠化学性肝损伤中氧化应激介质生成影响的研究. *中国临床药理学杂志*, 2010, 26 (6): 420-423.
- [6] Chen X, Ban L, Wu L. Naringenin in the organic solvent extraction and separation attempt. *Food Science and Technology*, 2009, 34 (5): 209-212. (in Chinese)
- 陈雪峰, 班黎黎, 吴丽萍. 有机溶剂提取桃叶中柚皮素的工艺研究. *食品科技*, 2009, 34 (5): 209-212.
- [7] Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (5): 2699-2706.
- [8] Leonard E, Yan Y, Fowler ZL, Li Z, Lim CG, Lim KH, Koffas MA. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5 (2): 257-265.
- [9] Ribeiro H. Naringinase: occurrence, characteristics, and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93 (1): 49-60.
- [10] Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (1): 195-201.
- [11] Wang D, Ni H, Chen F, Xiao A, Cai H, Su W. Identification and characterization of *Aspergillus aculeatus* JMudb058 for naringinase production. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (7): 691-701. (in Chinese)
- 王迪, 倪辉, 李利君, 陈峰, 肖安凤, 蔡慧农, 苏文金. 一株棘孢曲霉的鉴定及其柚苷酶合成规律. *微生物学报*, 2013, 53 (7): 691-701.
- [12] Norouzain D, Hosseinzadeh A, Nouri Inanlou D, Mozami N. Production and partial purification of naringase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16 (5): 471-473.
- [13] Magario I, Vielhauer O, Neumann A, Hausmann R, Syldatk C. Kinetic analysis and modeling of the liquid-liquid conversion of emulsified di-rhamnolipids by Naringinase from *Penicillium decumbens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102 (1): 9-19.
- [14] Li L, Ni H, Xiao A, Cai H. Characterization of *Cryptococcus* sp. Jmudeb008 and regulation of naringinase activity by glucose. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (9): 1202-1207. (in Chinese)
- 李利君, 倪辉, 肖安凤, 蔡慧农. 一株产柚苷酶的罗伦隐球酵母的鉴定及柚苷酶表达. *微生物学报*, 2010, 50 (9): 1202-1207.
- [15] Ni H, Li LJ, Xiao AF, Cao Y, Chen YL, Cai HN. Identification and characterization of a new naringinase producing strain, *Williopsis californica* Jmudeb007. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27 (12): 2857-2862.
- [16] Puri M, Kaur A, Singh RS, Singh A. Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162 (1): 181-191.
- [17] Mukund P, Belur PD, Saidutta MB. Production of naringinase from a new soil isolate, *Bacillus methylotrophicus*: isolation, optimization and scale-up studies. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 44 (2): 146-163.
- [18] Tselenis-Kotsowilis AD, Koliomichails MP, Papavassiliou JT. Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 16 (3): 593-594.
- [19] Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochemical Journal*, 1987, 248 (3): 953-956.
- [20] Ran L, Wu S, Xu W, Zhang YB, Yang XW. Biotransformation of naringin by human intestinal flora. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2013, 22 (4): 329-333.
- [21] Yu F, Wang S, Li J, Zhang Q, Li C, Wang X. C-ring cleavage of isoflavone daidzein by a newly-isolated facultative *Enterococcus hirae* AUH-HM195 from *Crossophilum mantchuricum* feces. *Acta Microbiologica*

- Sinica, 2009, 49 (4) : 479-484. (in Chinese)
- 于飞, 王世英, 李佳, 张琪, 李朝东, 王秀伶. 兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷元的开环转化. 微生物学报, 2009, 49 (4) : 479-484.
- [22] 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 (1) : 214-219.
- [23] 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.
- [24] Zhao H, Wang XL, Zhang HL, Li CD, Wang SY. Production of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a novel oxygen-tolerant bovine rumen bacterium in the presence of atmospheric oxygen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92 (4) : 803-813.
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] Guo Y, Xiao C, Wang H, Huang T. Determination of organic acids in fructus mume by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 32 (12) : 1624-1626. (in Chinese)
- 郭瑛, 肖朝萍, 王红, 黄天宝. 高效液相色谱法测定乌梅有机酸. 分析化学研究简报, 2004, 32 (12) : 1624-1626.
- [27] 陈德昌. 中药化学对照品工作手册. 北京: 中国医药科技出版社, 2000.
- [28] Lu H, Li Q, Zhong J, Liao L, HAJIAKBER A. Studies on flavonoids from *helichrysum arenarium*. *China Pharmaceutical Journal*, 2008, 43 (1) : 11-13. (in Chinese)
- 吕辉, 李茜, 仲婕, 廖立新, 阿吉艾克拜尔·艾萨. 沙生蜡菊黄酮类成分的研究. 中国药学杂志, 2008, 43 (1) : 11-13.
- [29] Sowers KR, Watts JEM. The study of strictly anaerobic microorganisms. *Methods in Microbiology*, 2002, 35: 757-782.
- [30] Park SK, Kim MS, Bae JW. *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human feces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (2) : 599-603.
- [31] Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganesedependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences : reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. coli' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II. 2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52 (4) : 1247-1255.
- [32] Lin IH, Liu TT, Teng YT, Wu HL, Liu YM, Wu KM, Chang CH, Hsu MT. Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS One*, 2011, 6 (5) : e20519.
- [33] Hashimoto W, Maesaka K, Sato N, Kimura S, Yamamoto K, Kumagai, Murata K. Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic route for gellan depolymerization by *Bacillus* sp. GL1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, 339 (1) : 17-23.
- [34] Kim DH, Kim SY, Park SY, Han MJ. Metabolism of quercitrin by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 1999, 22 (7) : 749-751.
- [35] Zverlov VV, Hertel C, Bronnermeier K, Hroch A, Kellermann J, SchwarzWH. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoararium*: biochemical characterization and primary structure of bacterial α -L-rhamnose hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular Microbiology*, 2000, 35: 173-179.

Isolation, identification and naringin biotransforming properties of naringinase producing bacteria isolated from human intestinal microflora

Jing Chen¹, Jianqing Meng², Ye Wang¹, Xiuling Wang^{1*}

¹ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China

² Botou Vocational College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Abstract: [Objective] Isolation of specific bacteria from human intestinal microflora to convert naringin to naringenin efficiently. [Methods] Fresh human feces from healthy individual was cultured in an anaerobic chamber for 24 h before being diluted and spread on agar medium. We cultured and incubated each single colony with the substrate naringin. The biotransformation of naringin by each single colony was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). We identified the isolated bacteria based on the analyses of 16S rDNA sequence and biochemical traits. We also studied the bioconversion kinetics of the bacteria. [Results] Four bacterial strains, named AUH-JLD3, AUH-JLD7, AUH-JLD104 and AUH-JLD109, capable of biotransforming naringin to naringenin, were isolated and identified as *Blautia* sp. AUH-JLD3, *Enterococcus* sp. AUH-JLD7, *Bacteroides* sp. AUH-JLD104 and *Streptococcus pasteurianus* subsp. AUH-JLD109 respectively based on the 16S rDNA sequence analysis, bacterial cell morphology, and biochemical traits. Study on biotransforming kinetics showed that all the four isolated bacterial strains were able to convert naringin (0.2 mmol/L) to naringenin within 12 h. The maximal concentration of the substrate naringin that strain AUH-JLD3, strain AUH-JLD7, strain AUH-JLD104 and strain AUH-JLD109 could biotransform efficiently were 0.2 mmol/L (the average biotransforming rate was 66.67%), 0.8 mmol/L (the average biotransforming rate was 86.49%), 0.2 mmol/L (the average biotransforming rate was 73.68%) and 1.6 mmol/L (the average biotransforming rate was 93.20%), respectively. [Conclusion] The four bacterial strains were capable of biotransforming naringin to naringenin, among which *Streptococcus pasteurianus* subsp. AUH-JLD109 has the highest naringin biotransforming capacity.

Keywords: naringin, naringenin, human intestinal microflora, bacteria isolation and identification, microbial biotransformation (本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170058) 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: 14 January 2014 / Revised: 27 April 2014

《微生物学报》对英文摘要的写作要求

2007年12月修订

1. 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中给出 [Objective], [Methods], [Results], [Conclusion] 等 words。英文摘要完成后,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。

2. 英文摘要的撰写要点:

- (1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
- (2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
- (3) 摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
- (4) 句子的开头处最好不要使用阿拉伯数字。
- (5) 不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP等。
- (6) 不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。