

兔肠道大豆异黄酮还原菌株的分离鉴定及其转化特性

周博¹ 孟建青² 王秀伶^{1*}

(1. 河北农业大学 生命科学学院 河北 保定 071001)

(2. 泊头职业学院 河北 沧州 062150)

摘要:【目的】从兔新鲜粪样中分离对大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素具有转化作用的特定细菌菌株。【方法】在厌氧工作站内对獭兔新鲜粪样进行梯度稀释后涂板,挑取单菌落与底物黄豆苷原和染料木素分别厌氧混合培养,用高效液相色谱检测底物被转化情况。【结果】分离得到一株对大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素均具有转化作用的革兰氏阳性严格厌氧细菌菌株 AUH-JLR41 (KJ188150)。根据产物的高效液相保留时间、紫外吸收图谱和质谱分析结果,将菌株 AUH-JLR41 代谢底物黄豆苷原和染料木素生成的产物分别鉴定为二氢黄豆苷原和二氢染料木素。经手性高效液相系统检测,产物二氢黄豆苷原和二氢染料木素均呈现两个等面积物质峰,表明这两个产物的对映体过量率均为 0。通过转化动态研究发现,菌株 AUH-JLR41 分别在底物黄豆苷原和染料木素加入 48 h 和 72 h 后将底物全部转化为产物,该菌株能转化底物黄豆苷原和染料木素的最大浓度均为 0.6 mmol/L。经 BLAST 比对,菌株 AUH-JLR41 的 16S rRNA 基因序列与斯奈克氏菌属菌株 *Slackia equolifaciens* DZE (EU377663) 的相似性高达 99.6%。【结论】兔肠道分离的斯奈克氏菌属菌株 *Slackia* sp. AUH-JLR41 在厌氧条件下能将大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素分别还原为二氢黄豆苷原和二氢染料木素。

关键词: 黄豆苷原, 染料木素, 二氢黄豆苷原, 二氢染料木素, 菌株分离, 微生物转化

Isolation, identification and biotransforming property of an isoflavone reducing bacterium isolated from rabbit intestinal microflora

ZHOU Bo¹ MENG Jian-Qing² WANG Xiu-Ling^{1*}

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

(2. Botou Vocational College, Cangzhou, Hebei 062150, China)

Abstract: [Objective] To isolate specific bacteria capable of biotransforming isoflavones daidzein and genistein from fresh feces of rabbit. [Methods] In an anaerobic chamber, fresh fecal samples of rabbit were diluted before being spread on agar plate. Single colonies were picked randomly and incubated with daidzein or genistein. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect whether the isolated bacteria were able to biotransform the substrate daidzein or genistein.

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; ✉: wxling2000@hebau.edu.cn

收稿日期: 2014-02-09; 接受日期: 2014-03-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-18

[Results] A Gram-positive obligate anaerobic bacterium, which we named AUH-JLR41 (KJ188150), capable of biotransforming isoflavones daidzein and genistein was isolated. Based on the HPLC retention time, UV spectra and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis, the metabolites of daidzein and genistein were identified as dihydrodaidzein (DHD) and dihydrogenistein (DHG), respectively. Chiral stationary-phase HPLC successfully separated the two peaks which had the same peak area, indicating that the enantiomeric excess of biosynthesized DHD and DHG was zero. Biotransformation kinetics showed that daidzein was reduced to DHD completely after 48 h incubation and genistein was reduced to DHG after 72 h incubation under anaerobic conditions. Moreover, the maximal concentrations of daidzein and genistein that strain AUH-JLR41 was able to convert were 0.6 mmol/L. BLAST search on the GenBank revealed that the 16S rRNA gene sequence for strain AUH-JLR41 had the highest similarity to that of *Slackia equolifaciens* DZE (EU377663), the similarity of which was 99.6%. **[Conclusion]** Bacterium strain AUH-JLR41 isolated from rabbit feces was able to reduce isoflavones daidzein and genistein to DHD and DHG, respectively, under anaerobic conditions.

Keywords: Daidzein, Genistein, Dihydrodaidzein, Dihydrogenistein, Bacterial isolation, Microbial biotransformation

大豆异黄酮是大豆在其生长过程中形成的次生代谢产物,主要由染料木素(Genistein)、黄豆苷原(Daidzein)组成^[1]。大豆异黄酮由于能与雌激素受体结合,具有雌激素样作用,故被称为植物雌激素。此外,大豆异黄酮具有抗氧化^[2]、抗癌^[3]、预防骨质疏松^[4]以及降低心脑血管发病率^[5]等多种生理功能。大豆异黄酮被动物摄入体内后,在胃肠道微生物菌群作用下被转化为二氢黄豆苷原(Dihydrodaidzein, DHD)、二氢染料木素(Dihydrogenistein, DHG)、去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Desmethylangolensin, *O*-Dma)、雌马酚以及5-羟基-雌马酚等不同代谢产物^[6-8]。大量研究表明,大豆异黄酮代谢产物具有比大豆异黄酮更高、更广的生物学活性。Chin-Dusting等^[9]和Jiang等^[10]分别分析对比了黄豆苷原及化学合成的黄豆苷原不同代谢产物对心脑血管的保护作用,发现雌马酚、DHD等对心脑血管的保护作用远高于其亲本化合物黄豆苷原。笔者以往的研究结果表明,大豆异黄酮代谢产物雌马酚、DHD、DHG和*O*-Dma等对二苯代苦味酰基自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)的清除作用均显著高于其亲本化合物黄豆苷原和染料木素^[11]。

自从认识到大豆异黄酮被人或其他动物摄入体内将被代谢为生物活性更高的代谢产物,人们便

开始分离对大豆异黄酮具有特定转化功能的微生物菌株。迄今,国内外学者已从人^[12-14]、牛^[15]、鼠^[16]、猪^[17]、褐马鸡^[18]等多种动物新鲜粪样或胃液中分离得到具有不同转化功能的大豆异黄酮转化菌株20余株。然而,迄今尚未见从兔肠道微生物菌群中分离大豆异黄酮转化菌株的报道。在我们以往研究中,曾从小鼠、鸡、猪和兔等4种健康动物新鲜粪样中分离得到22株优势需氧菌。与小鼠、鸡、猪相比,兔肠道优势需氧菌存在多样性,其中蜡样芽孢杆菌(R1)和铜绿假单胞菌(R5)为兔肠道特有的肠道优势需氧菌。通过混菌试验发现,兔肠道优势需氧菌R1和R5对大豆异黄酮转化菌株的转化能力均存在明显抑制作用^[19]。因此,本研究尝试从兔肠道微生物菌群中分离大豆异黄酮转化菌,并与以往从其他动物肠道分离的大豆异黄酮转化菌进行对比分析。

1 材料与方法

1.1 材料

脑心浸液培养基(Brain heart infusion, BHI): 美国BD公司产品(批号:2107245)。

1.2 主要仪器和试剂

黄豆苷原和染料木素,美国Indofine公司产品;二氢黄豆苷原(DHD)标准品和二氢染料木素

(DHG) 标准品, 均由本实验室制备保存(纯度>99%); 乙腈、乙酸乙酯及甲醇, 均为色谱纯, 美国 Fisher 公司产品; DI-VCOIO-IR 真空离心浓缩仪, 韩国 DAIKI 产品; Concept 400 型厌氧工作站, 英国 Ruskinn 公司产品; CN15-T31 型光学显微镜, 北京永新诺华科技有限公司产品; JEOL-1010 型电子显微镜, 日本 JEOL 公司产品; 高效液相色谱(HPLC)系统, 美国 Waters 公司产品; ESI 源 Finnigan LCQ Advantage 离子阱质谱仪, 美国 Thermo Finnigan 公司产品。

1.3 菌株的分离和筛选

取獭兔新鲜粪样进行转化菌株的筛选, 具体方法参照文献[18]。

1.4 高效液相检测

以黄豆苷原为底物, 以兔肠道分离菌株 AUH-JLR41 为生物酶源, 利用 HPLC 检测黄豆苷原被转化情况。检测采用 C₁₈-ODS 分析柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 流动相为乙腈和水, 检测波长为 270 nm。将分离纯化的黄豆苷原和染料木素代谢产物注入 Sumi Chiral OA-7000 手性分析柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm)进行检测, 检测方法参照 Wang 等^[15]报道。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 菌体形态特征、革兰氏染色及耐氧特性的研究: 通过固体板培养观察菌落形态, 通过光学显微镜和透射电子显微镜观察菌体形态。参考沈萍等^[20]的方法将筛选到的菌株进行革兰氏染色, 耐氧性测定是将相同接种量转化菌接种后分别放置在厌氧工作站和普通生化培养箱中, 观察菌体生长情况, 如菌体在普通生化培养箱中不能生长, 就向培养基中添加半胱氨酸, 以降低培养基氧化-还原电位至-300 mV 左右, 观察菌体能否在有氧条件下生长。

1.5.2 所得菌株的 16S rRNA 基因序列分析: 提取转化菌株的基因组 DNA, 以通用引物 27F 和 1492R 为引物, 以菌株 AUH-JLR41 总 DNA 为模板进行 16S rRNA 基因扩增, DNA 提取具体方法参考 Lane

报道^[21]。PCR 扩增条件同笔者以前的报道^[15]。测序得到的 16S rRNA 基因序列提交美国 NCBI 核苷酸序列库, 得到菌株序列号为 KJ188150。通过 BLAST 比对构建系统发育树。

1.6 产物的分离纯化和结构鉴定

转化后所得到的产物经高效液相色谱进行分离纯化, 纯化后的产物进行对映体过量率(e.e.%)测定。通过与标准品比对 HPLC 保留时间、紫外吸收图谱结合质谱分析对代谢产物进行结构鉴定。

1.7 黄豆苷原及染料木素代谢产物的对映体过量率测定

将纯化后的产物注入 Sumi Chiral OA-7000 手性分析柱中, 根据峰面积计算产物的对映体过量率。流速 0.8 mL/min, 其他参照文献[15]。

1.8 转化菌株对底物的转化动态测定

为了解菌株 AUH-JLR41 在不同时间对底物黄豆苷原和染料木素的转化情况, 分别测定菌株 AUH-JLR41 对底物黄豆苷原和染料木素的转化动态。以 10%接种量将转化菌株接种到 1 mL 新鲜 BHI 液体培养基中, 同时加入 10 mmol/L 的底物黄豆苷原 20 μL, 使得底物黄豆苷原初始浓度为 0.2 mmol/L。分别在培养 0、12、24、36、48、60 和 72 h 取样, 用等体积乙酸乙酯萃取蒸干后, 加入 100%甲醇溶液, 用 HPLC 检测转化后生成的底物量以及培养基中没有被转化的剩余底物量, 并绘制转化动态曲线。有关染料木素的转化动态同黄豆苷原。

1.9 转化菌株对底物最大转化能力测定

为确定菌株 AUH-JLR41 对底物黄豆苷原的最大转化能力, 对浓度为 0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol/L 的底物黄豆苷原和染料木素分别进行了转化尝试。向转化菌株培养液中分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol/L 的底物黄豆苷原, 并在厌氧工作站内培养 3 d 后萃取, 通过 HPLC 检测底物黄豆苷原被转化情况。有关染料木素加入浓度同黄豆苷原, 但在厌氧工作站内培养 4 d 后萃取, 萃取液蒸干后用 HPLC 检测底物染料木素被转化情况。

2 结果与分析

2.1 菌株 AUH-JLR41 菌体形态、革兰氏染色及耐氧特性

从兔粪样中分离得到一株对大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素均具有转化功能的细菌菌株, 将其命名为菌株 AUH-JLR41。菌株 AUH-JLR41 在光学显微镜下呈杆状, 在透射电子显微镜下菌体呈杆状, 两端钝圆, 无鞭毛(图 1); 在固体培养皿上菌落为圆形透明, 边缘整齐, 中央有凸起, 37 °C 培养 48 h 后菌落大小为 1.5–2.5 mm。经革兰氏染色发现菌株 AUH-JLR41 为阳性。厌氧特性研究发现, 该菌株只能在厌氧工作站内生长繁殖。向培养基中添加还原剂使培养基氧化-还原电位降低至 -300 mV 左右时, 菌株 AUH-JLR41 仍不能在普通生化培养箱内生长。因此, 菌株 AUH-JLR41 为杆状革兰氏阳性严格厌氧细菌。

2.2 菌株 AUH-JLR41 的 16S rRNA 基因序列经过 PCR 扩增, 得到该菌株 16S rRNA 基因

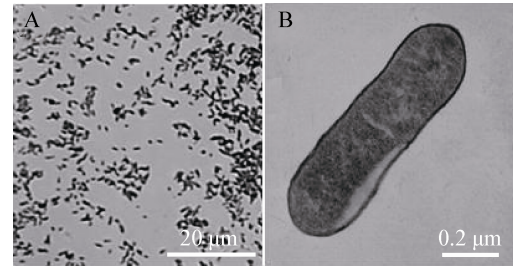


图 1 菌株 AUH-JLR41 在光学显微镜(400×, A)和透射电子显微镜(8 000×, B)下的菌体形态

Figure 1 Cell morphology of strain AUH-JLR41 under both light microscopy (400×, A) and transmission electron microscopy (8 000×, B)

全长为 1 435 bp。经 BLAST 比对, 菌株 AUH-JLR41 的 16S rRNA 基因序列与斯奈克氏菌属菌株 *Slackia equolifaciens* DZE (EU377663) 相似性高达 99.6% (图 2)。根据菌株 AUH-JLR41 的 16S rRNA 基因序列分析, 结合其形态特征、革兰氏染色及耐氧特性, 将菌株 AUH-JLR41 鉴定为斯奈克氏菌属菌株, 即 *Slackia* sp. AUH-JLR41。

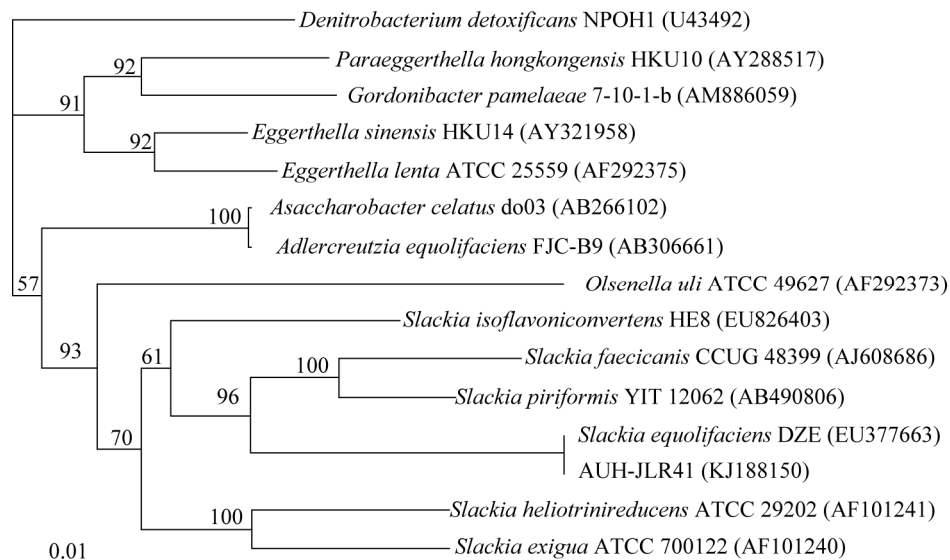


图 2 兔肠道细菌菌株 AUH-JLR41 与其近缘菌株 16S rRNA 基因亲缘关系图

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene similarity of rabbit intestinal bacterium strain AUH-JLR41 and relative strains

注: 发育树节点的数字表示自展值; 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号; 标尺代表遗传距离。

Note: Numbers at nodes represent bootstrap value. The numbers in the brackets are accession numbers of sequences in GenBank. The scale bar "0.01" represents sequence divergence.

2.3 黄豆苷原代谢产物的结构鉴定

通过 HPLC 检测发现, 在保留时间 8.5 min 处的底物黄豆苷原的峰面积明显减少, 而在保留时间 9.6 min 处出现一新物质峰, 且随底物黄豆苷原减少, 新物质峰峰面积呈比例增加。因此, 将保留时间 9.6 min 出现的新物质峰确定为菌株 AUH-JLR41 代谢底物黄豆苷原后生成的产物。该产物的 HPLC 保留时间与 DHD 标准品的保留时间一致(图 3A); 此外, 在保留时间 9.6 min 出现的黄豆苷原代谢产物分别在 275 nm 和 325 nm 有两个最大紫外吸收, 这与 DHD 标准品的紫外吸收图谱相吻合。为进一步准确鉴定产物结构, 将纯化后的产物进行正离子模式 ESI 质谱分析, 质谱解析结果为: ESI(+): m/z 257 ($[M+H]^+$); MS/MS (rel. int. %): m/z 137(75), 120(57), 91(33), 提示黄豆苷原代谢产物峰的分子量应该为 256, 这与 DHD 的分子量相吻合。因此, 通过与标准品 DHD 比对 HPLC 保留时间和紫外吸收图谱, 结合产物质谱分析结果, 将菌株 AUH-JLR41 代谢底物黄豆苷原所生成的产物准确鉴定为 DHD。

同样, 以染料木素为底物时, 通过 HPLC 检测发现, 在保留时间 15.0 min 处的底物染料木素的峰面积明显减少, 而在保留时间 14.1 min 处出现一新物质峰, 且随底物染料木素减少新物质峰峰面积呈比例增加。因此, 将保留时间 14.1 min 出现的新物质峰确定为菌株 AUH-JLR41 代谢底物染料木素后生成的产物。该产物的 HPLC 保留时间与 DHG 标准品的保留时间一致(图 3B); 此外, 在保留时间 14.1 min 出现的染料木素代谢产物在 290 nm 有一个最大紫外吸收, 这与 DHG 标准品的紫外吸收图谱相吻合。为进一步准确鉴定产物结构, 将纯化后的产物进行正离子模式 ESI 质谱分析, 质谱解析结果为: ESI(+): m/z 273 ($[M+H]^+$); MS/MS (rel. int. %): m/z 153(87), 120(39), 91(23), 65(8), 提示染料木素代谢产物峰的分子量应该为 272, 这与 DHD 的分子量相吻合。因此, 通过与标准品 DHG 比对 HPLC 保留时间和紫外吸收图谱, 结合产物质谱分析结果, 将菌株 AUH-JLR41 代谢底物染料木素所生成的产物准确鉴定为 DHG。

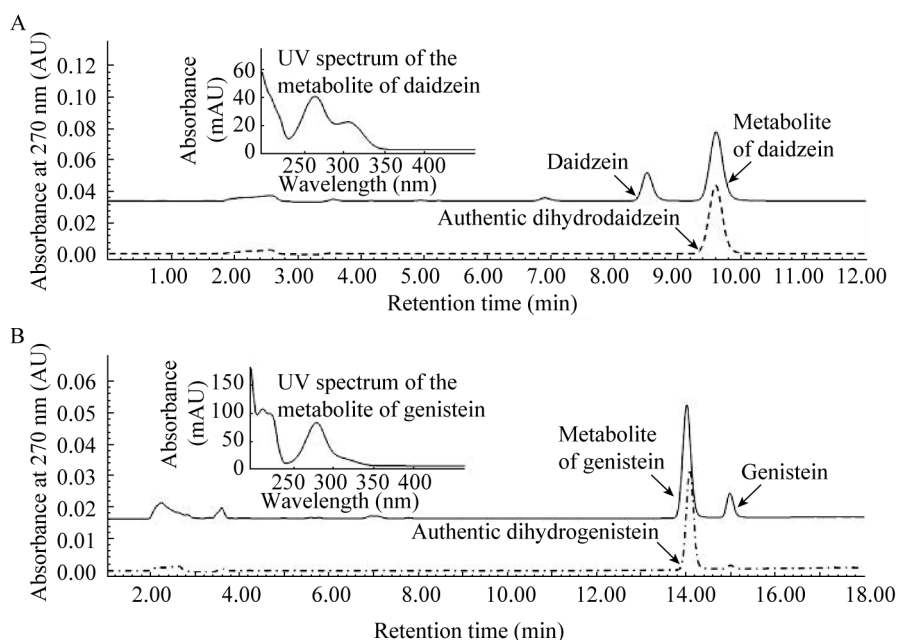


图 3 细菌菌株 *Slackia* sp. AUH-JLR41 转化底物黄豆苷原(A)和染料木素(B)的高效液相色谱图

Figure 3 HPLC elution profiles for the metabolism of daidzein and genistein by bacterium strain *Slackia* sp. AUH-JLR41

Note: The insert shows the UV spectrum of the metabolite.

2.4 黄豆苷原代谢产物的对映体过量率

经手性柱检测发现, 黄豆苷原代谢产物 DHD 分别在保留时间 16.6 min 和 34.6 min 处出现两物质峰(图 4A), 两物质峰的峰面积相同, 表明产物 DHD 的对映体过量率为 0。同样, 发现染料木素代谢产物 DHG 分别在保留时间 7.7 min 和 15.1 min 处出现两物质峰(图 4B), 两物质峰的峰面积几乎完全相同, 表明产物 DHG 的对映体过量率为 0。该结果与笔者 2005 年从牛瘤胃液中分离的大豆异黄酮还原菌株 Niu-O16 代谢底物黄豆苷原和染

料木素后所生成产物的对映体过量率完全相同^[15]。推测导致该现象的原因也是由于酮式和烯醇式之间的自动转化而引起的 *R*-型 DHD 和 *S*-型 DHD 以及 *R*-型 DHG 和 *S*-型 DHG 之间的相互转化^[15]。

2.5 菌株 AUH-JLR41 对底物黄豆苷原和染料木素的转化动态

研究结果表明, 当底物黄豆苷原浓度为 0.2 mmol/L 时, AUH-JLR41 可在底物加入后 48 h 将底物全部转化为产物 DHD (图 5A)。与底物黄豆苷原相比, 菌株 AUH-JLR41 对底物染料木素转化

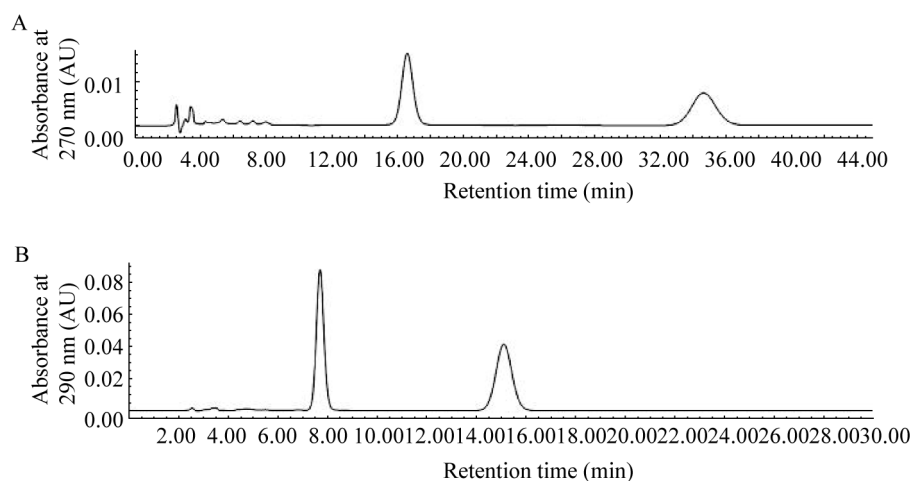


图 4 细菌菌株 AUH-JLR41 代谢底物黄豆苷原(A)和染料木素(B)生成的产物在手性柱上的高效液相色谱图
Figure 4 HPLC elution profile of the metabolite of daidzein (A) and genistein (B) by bacterium strain AUH-JLR41 on a Sumi Chiral OA-7000 column

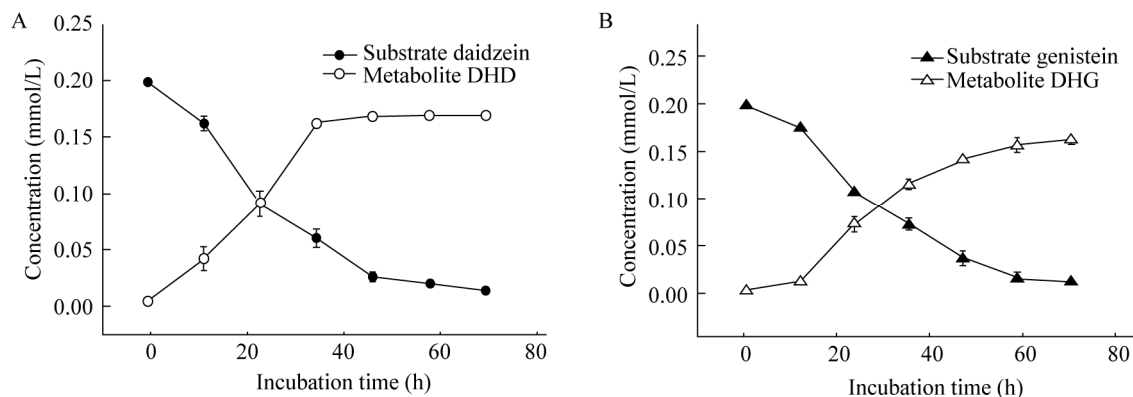


图 5 细菌菌株 AUH-JLR41 对底物黄豆苷原(A)和染料木素(B)的转化动态

Figure 5 Biotransforming kinetics of the metabolites of daidzein (A) and genistein (B) by bacterium strain AUH-JLR41
注: 底物黄豆苷原和染料木素的初始浓度均为 0.2 mmol/L; DHD: 二氢黄豆苷原; DHG: 二氢染料木素。

Note: Initial concentration of the substrate daidzein and the substrate genistein was 0.2 mmol/L; DHD: Dihydrodaidzein; DHG: Dihydrogenistein.

速度稍慢, 菌株可在底物加入后 72 h 将底物染料木素全部转化为产物 DHD (图 5B)。

2.6 菌株 AUH-JLR41 对底物黄豆苷原和染料木素的转化能力

结果表明, 当底物黄豆苷原浓度不超过 0.6 mmol/L 时, 菌株 AUH-JLR41 几乎能将底物全部转化为产物 DHD; 当底物黄豆苷原浓度上升至 0.8 mmol/L 时, 菌株 AUH-JLR41 对底物的转化能力迅速下降, 平均转化率仅为 51.5% (图 6A)。当底物染料木素浓度不超过 0.4 mmol/L 时, 菌株 AUH-JLR41 几乎能将底物染料木素全部转化为产物 DHG; 当底物染料木素浓度上升至 0.6 mmol/L 时, 菌株 AUH-JLR41 对底物转化能力有所降低, 平均转化率为 82.6%; 当底物染料木素浓度上升至 0.8 mmol/L 时, 菌株 AUH-JLR41 对底物平均转化率仅为 5.7% (图 6B)。

3 讨论

通过本研究首次从兔新鲜粪样中分离得到一株能将大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素分别还原为 DHD 和 DHG 的斯奈克氏菌属菌株 *Slackia* sp. AUH-JLR41。目前已报道的 DHD 或 DHG 产生菌仅 3 株, 国内外首株 DHD 和 DHG 产生菌是由韩国学者 Hur 等于 2000 年从人粪样中分离的梭菌属

菌株 *Clostridium* sp. HGH6^[12]。其次是我们于 2005 年从牛瘤胃胃液中分离的细菌菌株 Niu-O16 (AY263505), 该菌株的 16S rRNA 基因序列在 2005 年 BLAST 比对时与已知菌 *Lactobacillus vitulinus* 和 *Lactobacillus catenaformis* 相似性最高, 但相似性仅为 91.5% 和 91.4%^[15]。目前牛瘤胃细菌菌株 Niu-O16 的 16S rRNA 基因序列与 2008 年新命名的 *Sharpea* 属^[22]菌株 *Sharpea azabuensis* strain JCM 14210、*Sharpea azabuensis* strain HM250 以及 *Sharpea azabuensis* strain HM244 的相似性均为 99%, 因而将牛瘤胃细菌菌株 Niu-O16 重新归为 *Sharpea* 属菌株。此外, 日本学者 Tamura 等^[23]于 2007 年从人粪样中分离了一株能将黄豆苷原和染料木素还原为 DHD 和 DHG 的梭菌属菌株 *Clostridium* sp. TM-40 (AB249652)。

目前, 国外学者分离报道的雌马酚或 5-羟基-雌马酚产生菌中有 2 株属于斯奈克氏菌属菌株, 即 Jin 等^[24]于 2008 年分离报道的能将黄豆苷原转化为雌马酚的人肠道细菌菌株 Human intestinal bacterium DZE (EU377663) 以及 Matthies 等^[25]于 2009 年分离报道的能分别将黄豆苷原和染料木素转化为雌马酚和 5-羟基-雌马酚的人肠道细菌菌株 *Slackia isoflavoniconvertens* strain HE8。其中人肠道细菌

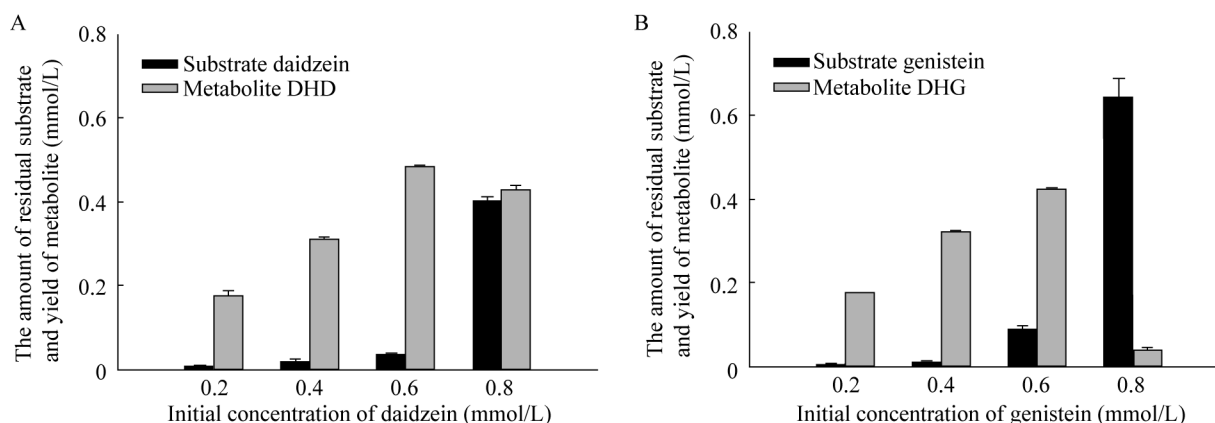


图 6 细菌菌株 AUH-JLR41 对不同浓度黄豆苷原(A)和染料木素(B)的转化能力测定

Figure 6 Bioconversion capacity of the strain AUH-JLR41 to different concentration of daidzein (A) and genistein (B)
Note: DHD: Dihydrodaidzein; DHG: Dihydrogenistein.

菌株 Human intestinal bacterium DZE (EU377663) 于 2010 年被重新归类为 *Slackia* 属的新种菌株, 即 *Slackia equolifaciens* DZE。菌株 AUH-JLR41 与菌株 *Slackia equolifaciens* DZE 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.6%。经多重比对发现, 通过本研究分离的兔肠道细菌菌株 AUH-JLR41 与人肠道细菌菌株 *Slackia equolifaciens* DZE 的 16S rRNA 基因序列仅在 4 个碱基位点存在不同, 即 T186G、T1349A、T1394A 和 C1407G。此外, 我们从鸡肠道微生物菌群中分离得到一株能将染料木素转化为 5-羟基-雌马酚的史雷克氏菌(斯奈克氏菌)属菌株 *Slackia* sp. AUH-JLC159 (KC523277)^[26], 该菌株也能将底物黄豆苷原转化为雌马酚。经多重比较发现, 菌株 AUH-JLR41 与鸡肠道细菌菌株 *Slackia* sp. AUH-JLC159 的 16S rRNA 基因序列在 9 个碱基位点存在不同, 其中 29、341、1 356 和 1 357 bp 为鸟嘌呤 G 有无的差异, 另外 5 个碱基位点的不同为 A84T、A1350T、A1354C、G1397T 和 G1410C。尽管兔肠道分离菌株 AUH-JLR41 与雌马酚产生菌 *Slackia equolifaciens* DZE 和 *Slackia* sp. AUH-JLC159 相似性较高, 但菌株 AUH-JLR41 仅能将底物黄豆苷原和染料木素分别还原为 DHD 和 DHG, 而不能将 DHD 和 DHG 进一步转化为雌马酚和 5-羟基-雌马酚。笔者以往的研究证实, 兔肠道优势需氧菌明显不同于猪、鼠和鸡^[19], 兔肠道分离的斯奈克氏菌属菌株 AUH-JLR41 不具有将大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素转化为雌马酚和 5-羟基-雌马酚特性很可能与兔肠道内不同于其它动物的特殊微环境相关。

4 结论

本研究首次从兔新鲜粪样中分离得到一株革兰氏阳性严格厌氧斯奈克氏菌属菌株 *Slackia* sp. AUH-JLR41, 该菌株在厌氧条件下能将大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素分别还原为 DHD 和 DHG; 手性柱分析结果表明, 产物 DHD 和 DHG 的对映体过量率均为 0; 菌株 AUH-JLR41 在 2-3 d 可将

加入到培养基中的 0.2 mmol/L 的底物完全转化, 该菌株对底物黄豆苷原和染料木素进行高效转化的最大浓度均为 0.6 mmol/L。

参考文献

- [1] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean food[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1994, 42(8): 1666-1673.
- [2] Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998, 356(2): 133-141.
- [3] Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, et al. Genistein induced upregulation of p21 WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells[J]. Nutrition and Cancer, 1998, 32(3): 123-131.
- [4] Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. Journal of Nutrition, 1996, 126(1): 161-167.
- [5] Kirk E, Sutherland P, Wang S, et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor deficient mice[J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(6): 954-959.
- [6] Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, et al. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 54(3/4): 167-184.
- [7] Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria[J]. Journal of Natural Product, 1995, 58(12): 1892-1896.
- [8] Coldham NG, Darby C, Hows M, et al. Comparative metabolism of genistein by human and rat gut microflora: detection and identification of end products of metabolism[J]. Xenobiotica, 2002, 32(1): 45-62.
- [9] Chin-Dusting JP, Fisher LJ, Lewis TV, et al. The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role[J]. British Journal of Pharmacology, 2001, 133(4): 595-605.
- [10] Jiang F, Jones GT, Husband AJ, et al. Cardiovascular protective effects of synthetic isoflavone derivatives in apolipoprotein e-deficient mice[J]. Journal of Vascular Research, 2003, 40(3): 276-284.
- [11] 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.
- [12] Hur HG, Lay JJ, Rafii F, et al. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin[J]. Archives of Microbiology, 2000, 174(6): 422-428.
- [13] Schoefer L, Mohan R, Braune A, et al. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(2):

- 197-202.
- [14] Wang XL, Hur HG, Lee JH, et al. Enantioselective synthesis of *S*-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 214-219.
- [15] Wang XL, Shin KH, Hur HG, et al. Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(3): 261-269.
- [16] Minamida K, Tanaka M, Abe A. Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(3): 247-250.
- [17] Yu ZT, Yao W, Zhu WY. Isolation and identification of equol-producing bacterial strains from cultures of pig faeces[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 282(1): 73-80.
- [18] 于飞, 王世英, 李佳, 等. 兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195对黄豆苷原的开环转化[J]. *微生物学报*, 2009, 49(4): 479-484.
- [19] 罗景龙, 王秀伶, 樊进茹, 等. 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[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1042-1051.
- [20] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验*[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 28-30.
- [21] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*[M]. New York: John Wiley and Sons, 1991: 125-175.
- [22] Morita H, Shiratori C, Murakami M, et al. *Sharpea azabuensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, strictly anaerobic bacterium isolated from the faeces of thoroughbred horses[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(12): 2682-2686.
- [23] Tamura M, Tsushida T, Shinohara K. Isolation of an isoflavone-metabolizing, Clostridium-like bacterium, strain TM-40, from human faeces[J]. *Anaerobe*, 2007, 13(1): 32-35.
- [24] Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, et al. Biotransformation of C-glucosyl isoflavone puerarin to estrogenic (3*S*)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(8): 1621-1625.
- [25] Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1740-1744.
- [26] 王秀伶, 刘子光, 邵子强, 等. 史雷克氏菌 AUH-JLC159及其转化制备(-)-5-OH-雌马酚的方法: 中国, ZL201310043107.X[P]. 2014-08-20.



稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介,并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现,同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。