



大豆异黄酮微生物转化研究进展

赵晓佳, 李易聪, 王秀伶*

河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071001

摘要: 大豆异黄酮是大豆在其生长过程中形成的一类次生代谢产物, 具有抗氧化、抗癌、减少骨质流失、降低心脑血管发病率等多种生理功能。目前已知, 被摄入机体的大豆异黄酮将被肠道微生物菌群转化为具有更高、更广生物学活性的不同产物。因此, 大豆异黄酮对人体的有益调节作用强弱并不简单取决于摄入机体的净含量的多少, 更在于被摄入机体的大豆异黄酮将如何被肠道菌群转化。本文从大豆异黄酮的组成与功能、大豆异黄酮体内吸收、代谢及微生物转化、转化产物的活性以及高效合成等方面进行了系统综述, 对大豆异黄酮微生物转化研究现状和存在问题进行分析总结, 并对今后发展趋势进行展望, 旨在推动高活性大豆异黄酮微生物转化产物的研究与开发。

关键词: 大豆异黄酮, 微生物转化, 生物活性, 生物合成

大豆除富含大豆蛋白等营养成分外, 还含有异黄酮、大豆皂苷等功能性物质。大量研究结果表明, 膳食摄入大豆异黄酮与保持人体健康关系密切。20世纪90年代, 研究结果首次证实人肠道菌群能将摄入体内的大豆异黄酮转化为不同产物^[1-2]。自2000年以来, 研究人员已从不同动物肠道菌群中分离得到系列对大豆异黄酮具有不同转化功能的细菌菌株, 大量研究结果证实, 大豆异黄酮转化产物具有比大豆异黄酮更高、更广的生物学活性。目前, 人们关注的热点已从过去的大豆异黄酮逐渐转移到大豆异黄酮的微生物转化

方面, 尤其是大豆异黄酮微生物转化产物的活性、合成与利用领域。本文对大豆异黄酮的组成与功能、体内吸收与代谢以及微生物转化菌株的分离筛选、转化产物的活性与合成等方面进行了系统综述, 指出目前存在问题, 旨在加速对高活性大豆异黄酮微生物转化产物的研究与开发。

1 大豆异黄酮及其生理功能

1.1 大豆异黄酮的组成与分布

自1931年Walz等^[3]首次从大豆中分离出大豆

基金项目: 国家自然科学基金(30570035, 30770047, 31170058, 31670057); 河北省百名优秀创新人才支持计划(CPRC027); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(16962504D)

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

收稿日期: 2019-04-22; 修回日期: 2019-07-14; 网络出版日期: 2019-09-05

异黄酮以来,目前,已得到分离和结构鉴定的大豆异黄酮有 12 种,包括 3 种游离型苷元和 9 种结合型糖苷,其中游离型苷元包括黄豆苷原(又称大豆苷元、大豆素, daidzein)、染料木素(又称金雀异黄素、染料木黄酮, genistein)和黄豆黄素(glycitein);结合型糖苷包括大豆黄素苷(daidzin)、染料木素苷(genistin)、黄豆黄素苷(glycitin)、乙酰大豆黄素苷(acetyldaidzin)、乙酰染料木素苷(acetylgenistin)、乙酰黄豆黄素苷(acetylglycitin)、丙二酰大豆黄素苷(malonyldaidzin)、丙二酰染料木素苷(malonylgenistin)和丙二酰黄豆黄素苷(malonylglycitin)。染料木素、黄豆苷原以及各自的糖苷占大豆异黄酮总量的 95%以上,是大豆异黄酮的主要组成成分^[4]。大豆异黄酮主要分布于大豆种子的子叶和胚轴中,以子叶中的含量最高^[5]。

1.2 大豆异黄酮的生理功能

大豆异黄酮具有与哺乳动物雌激素相似的化学结构,尤其表现为 4'-OH 与 7-OH 间极为相近的空间距离(11.5 Å),因而,大豆异黄酮可通过与雌激素受体结合发挥类似雌激素或抗雌激素的双重作用。当体内雌激素水平较低时,大豆异黄酮与雌激素受体结合可发挥类雌激素作用,补充机体内雌激素水平的不足;相反,当体内雌激素水平较高时,大豆异黄酮会与体内雌激素竞争受体,由于大豆异黄酮的类雌激素作用远弱于体内的雌激素,因此,此时大豆异黄酮与雌激素受体结合则表现出抗雌激素作用。大量流行病学研究结果表明,东方人乳腺癌和前列腺癌的发病率远低于西方人,其原因之一是与东方人经常食用大豆制品有关,特别是与大豆中含有的异黄酮有关。1986 年美国科学家首次发现大豆中的异黄酮具有抑制癌细胞生长的作用。除抗癌活性外,大豆异黄酮

还具有抗氧化^[6]、预防骨质疏松^[7]以及降低心脑血管发病率^[8]等功效。

除有关大豆异黄酮的活性报道外,有学者还对大豆异黄酮的主要组分染料木素和黄豆苷原的活性分别进行研究。大豆异黄酮染料木素和黄豆苷原在化学结构上非常相似,染料木素只是在 A 环的第 5 位碳上比黄豆苷原多一个羟基。与黄豆苷原相比,染料木素的活性报道更多些,主要包括抗氧化^[9]、抗病毒^[10]以及抗癌活性^[11]等。值得注意的是,染料木素不仅具有抗癌活性,也能促进癌细胞的增殖。Wei 等^[12]2015 年的研究结果表明,生理浓度下的染料木素(5 μmol/L)可通过诱导细胞色素 P450 1B1(CYP 1B1)基因表达,刺激人乳腺癌细胞 MCF-7 产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),并促进乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖。另外,需指出的是,染料木素具有较强的细胞毒性,容易对正常细胞造成伤害。2008 年王海涛等^[13]对染料木素的抑菌活性及抑菌机制进行研究,结果发现染料木素是通过破坏细菌细胞壁及细胞膜的完整性、抑制细菌的呼吸作用以及蛋白质合成来发挥其抑菌作用,而染料木素的这些抑菌机制是否具有细胞选择性目前尚不清楚。环境雌激素双酚 A (bisphenol A)具有与雌激素雌二醇相似的结构,可与雌激素受体结合,进而影响机体的生理功能。2013 年 Kong 等^[14]研究发现,双酚 A 单独存在时不会对人体发育或生殖产生副作用;然而,当双酚 A 与染料木素同时存在时,二者即使在低浓度下也会产生协同效应,影响胚胎正常发育,进而导致婴儿先天缺陷或影响个体的日后行为。此外,Patel 等^[15]的研究结果表明,成龄小鼠孕前长期自由进食饮食水平的染料木素,会影响母鼠的孕周期、分娩时间、产仔数以及仔鼠体

重和存活率等。Schroeter 等^[16]2019 年的研究结果表明, 在不同位置上对染料木素进行羟基化会表现出不同的毒力, 与染料木素相比, 3'-羟基-染料木素的毒性会增强, 而 6-羟基-染料木素毒性会降低。因此, 今后应加大对染料木素体内吸收、转运、代谢、半衰期以及有效血药浓度等的研究, 降低染料木素因细胞毒性而产生的副作用。Ono 等^[17]的研究发现, 尽管染料木素对雌激素受体 ER 阳性乳腺癌细胞 MCF-7、HER2 阳性乳腺癌细胞 SKBR3 以及三阴性(ER 阴性、孕激素受体 PR 阴性、原癌基因 HER2 阴性)乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的细胞毒无显著差异, 但染料木素与 50 $\mu\text{mol/L}$ 的雌马酚联用后, 染料木素对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒会显著增强, 引起细胞凋亡, 而对乳腺癌细胞 SKBR3 和 MDA-MB-468 的毒性则无明显改变。因此, 除关注染料木素本身的毒性外, 还要注意染料木素与其他化合物的协同毒性。

2 大豆异黄酮的体内吸收与代谢

2.1 大豆异黄酮的体内吸收与转运

大豆异黄酮在机体内的吸收主要有两种途径, 脂溶性的游离型异黄酮苷元可通过小肠直接吸收, 水溶性的结合型糖苷一般不能被小肠直接吸收, 而是首先被葡萄糖苷酶水解为游离型苷元, 生成的游离型异黄酮苷元一部分被小肠吸收, 另一部分则被肠道菌群转化为不同产物。为了解大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素在人体内的转运与浓度变化, King 等^[18]让健康男性志愿者分两次服用含有大豆粉的膳食, 之后每隔一段时间采集志愿者的血样并收集总尿液, 用 HPLC 检测黄豆苷原和染料木素的含量。结果发现, 异黄酮浓度缓慢上升, 其中血浆中的黄豆苷原在停止服用大豆

粉膳食后 7 h 左右达到最大值(3.14 \pm 0.36) mmol/L, 染料木素在停止服用后 8 h 左右达到最大值(4.09 \pm 0.94) mmol/L, 大豆异黄酮血浆浓度的缓慢增加与结合型糖苷的水解速度相一致。Sfakianos 等^[19]在检测成年雌性大鼠体内用 ¹⁴C 标记的染料木素的肠道吸收与胆汁排泄时发现, 染料木素输注十二指肠后迅速从肠道吸收入肝脏, 被肝脏吸收后转化为结合物并排泄到胆汁中, 4 h 内胆汁中染料木素累积量可达原剂量的 70%–75%。当染料木素被输注到门静脉时, 也能被肝脏有效吸收, 与葡萄糖醛酸结合后转运到胆汁中。

2.2 大豆异黄酮的体内代谢

2.2.1 黄豆苷原的体内代谢: 1932 年 Marrian 和 Haslewood^[20]从怀孕雌马的尿液中分离羟雌酮时首次发现了雌马酚(equol), 这也是人类发现的第一个大豆异黄酮的代谢产物。除雌马酚外, 20 世纪 50 年代末和 70 年代初, 研究人员分别从羊、牛、鸡以及黑猩猩等的尿液中检测到去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-desmethylangolensin, 简称 *O*-Dma) 和二氢黄豆苷原(dihydrodaidzein, 简称 DHD)等黄豆苷原的体内代谢产物^[2,21]。1995 年澳大利亚学者 Joannou 等^[22]从人体尿液中又检测到包括四氢黄豆苷原(tetrahydrodaidzein, 简称 THD)在内的黄豆苷原体内代谢产物, 通过分析黄豆苷原体内代谢产物的化学结构, 对黄豆苷原在人体内的代谢途径首次进行了推测, 这也是目前普遍受到公认的大豆异黄酮的代谢途径(图 1)。需指出的是, 图 1 中虚线所指的中间代谢产物 3,4-不饱和雌马酚是 Joannou 等根据底物和终产物的化学结构假想出来的化合物, 迄今 3,4-不饱和雌马酚尚未从任何动物的任何组织或体液中被检出。1984 年美国著名营养学家 Setchell 等^[23]研究发现, 雌马酚是一种

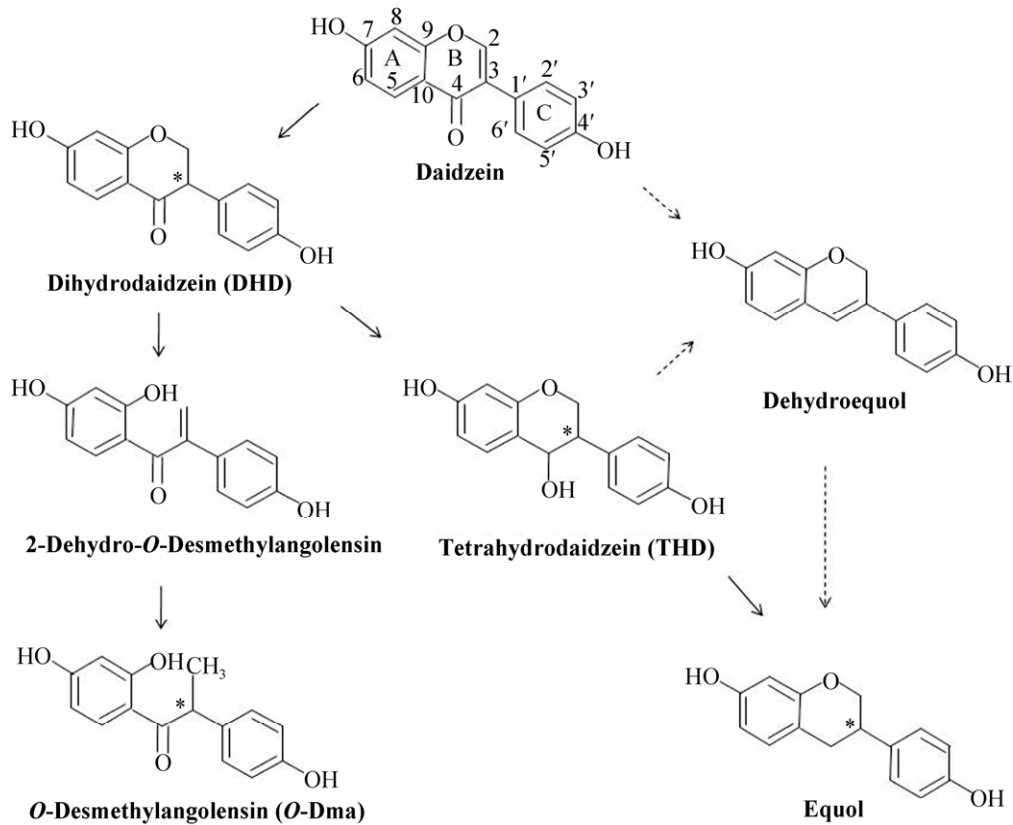


图 1. 大豆异黄酮黄豆苷原在人体内的代谢途径

Figure 1. Proposed metabolic pathway of isoflavone daidzein in human beings.

对人体非常有益的化合物，而那些肠道内具有雌马酚产生菌的个体在食入大豆或豆制品后受益更大，并首次提出了“雌马酚产生者”的概念。目前认为，当人体尿液中雌马酚与黄豆苷原比值不低于 0.018 时，被称为雌马酚产生者^[24]。然而，流行病学研究表明，西方人群中仅 30%左右的个体能将摄入体内的黄豆苷原转化为雌马酚^[25]。

2.2.2 染料木素的体内代谢：与黄豆苷原相比，染料木素的体内代谢研究目前还非常有限。1999 年英国学者 Coldham 等^[26]分别检测了大鼠体内和体外用 ¹⁴C 标记的染料木素的代谢产物种类，在大鼠尿液中共检测到 5 种代谢产物，包括染料木素的加氢还原产物二氢染料木素(dihydrogenistein, DHG)、染料木素葡萄糖醛酸(genistein glucuronide)、

二氢染料木素葡萄糖醛酸(dihydrogenistein glucuronide)、染料木素硫酸酯(genistein sulphate)和羟基苯丙酸[2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, 简称 2-HPPA]; 在体外，Coldham 等在厌氧环境下将大鼠盲肠内容物与染料木素共培养，除检测到大鼠尿液中出现的 5 种染料木素的代谢产物外，还检测到 6'-羟基-去氧甲基安哥拉紫檀素(6'-hydroxy-O-desmethylangolensin)。值得一提的是，Coldham 等并未检测到染料木素的微生物转化产物 5-羟基-雌马酚(5-hydroxy-equol, 5-OH-EQ)。另外，1999 年 Heinonen 等^[27]从 6 名志愿者的尿液中仅检测到 2 种染料木素的代谢产物，即 DHG 和 6'-羟基-去氧甲基安哥拉紫檀素;2006 年 Sepehr 等^[28]从大鼠血浆中检测到染料木素代谢产物 4-乙

基苯酚 (4-P-ethylphenol)。2002 年德国学者 Schoefer 等^[29]从人粪样菌群中分离得到一株能将底物染料木素转化为 2-HPPA 的真细菌属菌株。此外, 本文通讯作者 2004 年曾报道一株分自人类样菌群的严格厌氧真细菌属菌株 *Eubacterium ramulus* Julong601, 该菌株在厌氧条件下能将染料木素和黄豆苷原分别开环转化为 2-HPPA 和 *O*-Dma。通过转化动态研究发现, 菌株 Julong601 与底物黄豆苷原在厌氧工作站内共培养后, 前 20 h 转化速度较快, 之后转化趋于平缓, 转化浓度为 0.5 mmol/L 的底物黄豆苷原大约需要一周。令人吃惊的是, 菌株 Julong601 对底物染料木素的转化速度极快, 仅 6 h 即可将浓度为 0.5 mmol/L 的底物染料木素全部转化为 2-HPPA^[30]。值得一提的是, 在化学

结构上染料木素的 C-5 比黄豆苷原多一个羟基(图 2), 尽管黄豆苷原的代谢产物雌马酚已从包括人在内的多种动物的尿液中被检出, 然而, 迄今尚未从任何动物的任何组织、尿液或血液样品中检测到染料木素的代谢产物 5-OH-EQ。笔者推测, 由于染料木素的加氢还原产物 DHG 是合成 2-HPPA 和 5-OH-EQ 的共同前体物质, 2-HPPA 和 5-OH-EQ 在体内合成时必定存在底物竞争, 由于 2-HPPA 的合成速度快, 即使肠道菌群中存在一定数量的能将底物染料木素转化为 5-OH-EQ 的细菌菌株, 但由于该类菌株转化速度相对较慢(一般需 3 d 左右), 5-OH-EQ 产生菌在竞争前体物质 DHG 上占劣势, 因此, 当 2-HPPA 产生菌大量存在时, 5-OH-EQ 产生菌会因竞争不到前体物质 DHG 而不能合成 5-OH-EQ。

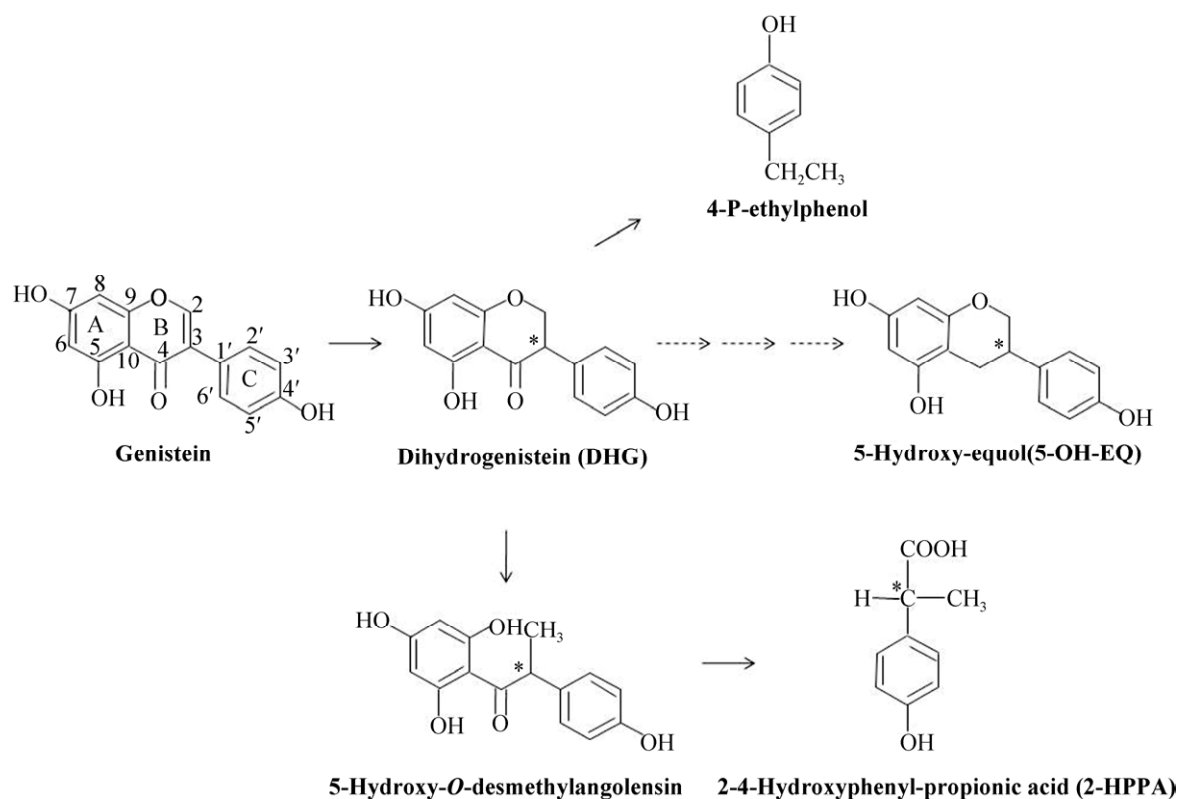


图 2. 大豆异黄酮染料木素在动物体内的代谢途径

Figure 2. Proposed metabolic pathway of isoflavone genistein in animals.

3 大豆异黄酮微生物转化菌株分离筛选研究现状

3.1 大豆异黄酮微生物转化菌株的分离筛选

1995 年以前,人们已从人或其他动物的尿液或血液样品中检测到各种大豆异黄酮的代谢产物,但这些代谢产物的产生机制并不清楚。1995 年 Xu 等^[1]和 Chang 等^[2]研究结果首次证实人肠道菌群能将摄入体内的大豆异黄酮代谢为不同产物,确定了肠道菌群对大豆异黄酮的转化地位,从此国内外学者掀起了筛选大豆异黄酮转化菌株的热潮。自 2000 年以来,已从不同动物粪样菌群中分离筛选了大量对大豆异黄酮具有特定转化功能的细菌菌株,根据所分离菌株的转化功能将其分为三类。第 I 类:仅具有加氢还原功能,该类菌株能在厌氧条件下将底物黄豆苷原和染料木素分别还原为 DHD 和 DHG;第 II 类:同时具有加氢还原和去酮基转化功能,该类菌株能在厌氧条件下将底物黄豆苷原和染料木素分别转化为雌马酚和 5-OH-EQ;第 III 类:具有开环转化功能,该类菌株能在厌氧条件下将底物黄豆苷原和染料木素分别开环转化为 *O*-Dma 和 2-HPPA。由于 2000 年以前,有关雌马酚的生物活性已有大量报道,因此,研究人员分离大豆异黄酮转化菌株时,更多是为了分离得到雌马酚产生菌。2005 年报道的世界首株雌马酚产生菌是本文通讯作者从人粪样菌群中分离得到的严格厌氧爱格氏菌属菌株 *Eggerthella* sp. SNU-Julong732,该菌株能将底物 DHD 转化为 100% 左旋 -S-雌马酚,但菌株 Julong732 对 DHD 的前体黄豆苷原不具有转化功能^[31],之后其他学者又陆续从大鼠、小鼠、猪、鸡的粪样菌群中分离得到不同的雌马酚产生菌,

目前分离报道的雌马酚产生菌共涉及 *Eggerthella*、*Asaccharobacter*、*Lactobacillus*、*Adlercreutzia*、*Enterohabdus*、*Eubacterium*、*Acinetobacter*、*Slackia* 和 *Proteus* 9 个属(表 1)。

3.2 大豆异黄酮微生物转化菌株的分类地位

特别值得一提的是,目前报道的大豆异黄酮转化菌株绝大多数为严格厌氧细菌,仅 3 株为兼性厌氧细菌,其中一株兼性厌氧细菌是日本学者 Uchiyama 等^[37]从人粪样菌群中分离得到的乳酸乳球菌 *Lactobacillus* sp. 20-92,但发现菌株 20-92 只能在严格厌氧条件下才具有转化活性;另一株兼性厌氧细菌是笔者实验室从褐马鸡粪样菌群中分离得到的海氏肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195,尽管菌株 AUH-HM195 在普通生化培养箱内(有空气氧条件)能够正常生长,但该菌株只能在厌氧工作站内才能将底物黄豆苷原开环转化为 *O*-Dma^[53];第 3 株已报道的兼性厌氧细菌是华侨大学肖美添教授实验室从大鼠肠道中分离得到的变形杆菌 *Proteus mirabilis* LH-52,但发现菌株 LH-52 在有氧条件下转化合成雌马酚的能力并不稳定^[47]。为了解具有不同转化功能的大豆异黄酮转化菌株的分类地位,根据能查找到的转化菌株的 16S rRNA 基因序列构建了系统发育树(图 3)。

由图 3 可以看出,聚在第一大类的 11 株细菌中,除菌株 *Slackia* sp. JLR41 外,其余 10 株细菌均能在厌氧条件下将底物黄豆苷原或 DHD 转化为雌马酚。另外,聚在第一大类的 10 株雌马酚产生菌分属 *Asaccharobacter*、*Adlercreutzia*、*Eggerthella*、*Enterohabdus* 和 *Slackia* 5 个属,而这 5 个属均属红蝽菌科(*Coriobacteriaceae*),这表明具有相同转化功能的菌株具有相近的分类地位。另外,从整个系统发育树来看,雌马酚产生菌分

布范围较广,除上述归属红蝽菌科的 10 株转化菌外,分离得到的 *Eubacterium*、*Lactobacillus*、*Proteus* 和 *Acinetobacter* 则分别归属丙酸杆菌科、乳杆菌科、肠杆菌科和莫拉菌科,表明大豆异黄

酮转化菌株的分类地位并非完全取决于菌株的转化功能。今后随着筛选用菌源的不同或者菌株分离方法的不同,一些具有新分类地位的雌马酚产生菌将陆续被分离报道。

表 1. 已分离的对大豆异黄酮黄豆苷原和染料木素具有转化功能的肠道细菌菌株

Table 1. The isolated bacterial strains capable of bioconverting isoflavones daidzein and genistein

Substrate	Product	Bacterial strains	Sources	First author	Publish year	Ref No.		
Group I Daidzein	DHD	Strain HGH6	Human	Hur HG	2000	[32]		
		<i>Lactobacillus</i> sp.	Bovine	Wang XL	2005	[33]		
		<i>Coprobacillus</i> sp.	Human	Tamura M	2007	[34]		
		<i>Slackia equolifaciens</i>	Rabbit	Zhou B	2014	[35]		
Group II DHD Daidzein	EQ	<i>Eggerthella</i> sp.	Human	Wang XL	2005	[31]		
		<i>Asaccharobacter celatus</i>	Rat	Minamida K	2006	[36]		
	EQ	<i>Lactobacillus</i> sp.	Human	Uchiyama S	2007	[37]		
		<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Human	Maruo T	2008	[38]		
		<i>Asaccharobacter celatus</i>	Rat	Minamida K	2008	[39]		
		<i>Enterohabdus</i> sp.	Mouse	Matthies A	2008	[40]		
		<i>Eggerthella</i> sp.	Human	Yokoyama S	2008	[41]		
		<i>Eubacterium</i> sp.	Pig	Yu ZT	2010	[42]		
		<i>Acinetobacter</i> sp. (Patent)	Mouse	Wang XL	2008	[43]		
		<i>Slackia equolifaciens</i>	Human	Jin JS	2010	[44]		
		<i>Lactobacillus collinoides</i>	Mouse	Tamura M	2009	[45]		
		<i>Slackia</i> sp.	Human	Tsuji H	2010	[46]		
		<i>Proteus mirabilis</i>	Rat	GuoYY	2012	[47]		
		<i>Eggerthella</i> sp.	Human	LI H	2013	[48]		
		Genistein	5-OH-EQ	Strain DZE	Human	Jin JS	2008	[49]
				<i>Enterohabdus</i> sp.	Mouse	Matthies A	2008	[40]
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	Human			Matthies A	2009	[50]		
<i>Slackia</i> sp. (Patent)	Chicken			Wang XL	2013	[51]		
Group III Daidzein	O-Dma	<i>Clostridium</i> sp.	Human	Hur HG	2002	[52]		
		<i>Eubacterium ramulus</i>	Human	Schoefer L	2002	[29]		
		<i>Enterococcus hirae</i>	Brown pheasant	Yu F	2009	[53]		
		<i>Clostridium</i> sp.	Chicken	Li M	2015	[54]		
Genistein	2-HPPA	<i>Eubacterium ramulus</i>	Human	Wang XL	2004	[30]		

DHD: Dihydrodaidzein; DHG: Dihydrogenistein; EQ: Equol; 5-OH-EQ: 5-Hydroxy-equol; O-DMA: O-Desmethylangolensin; 2-HPPA: 2-(4-Hydroxyphenyl)-propionic acid.

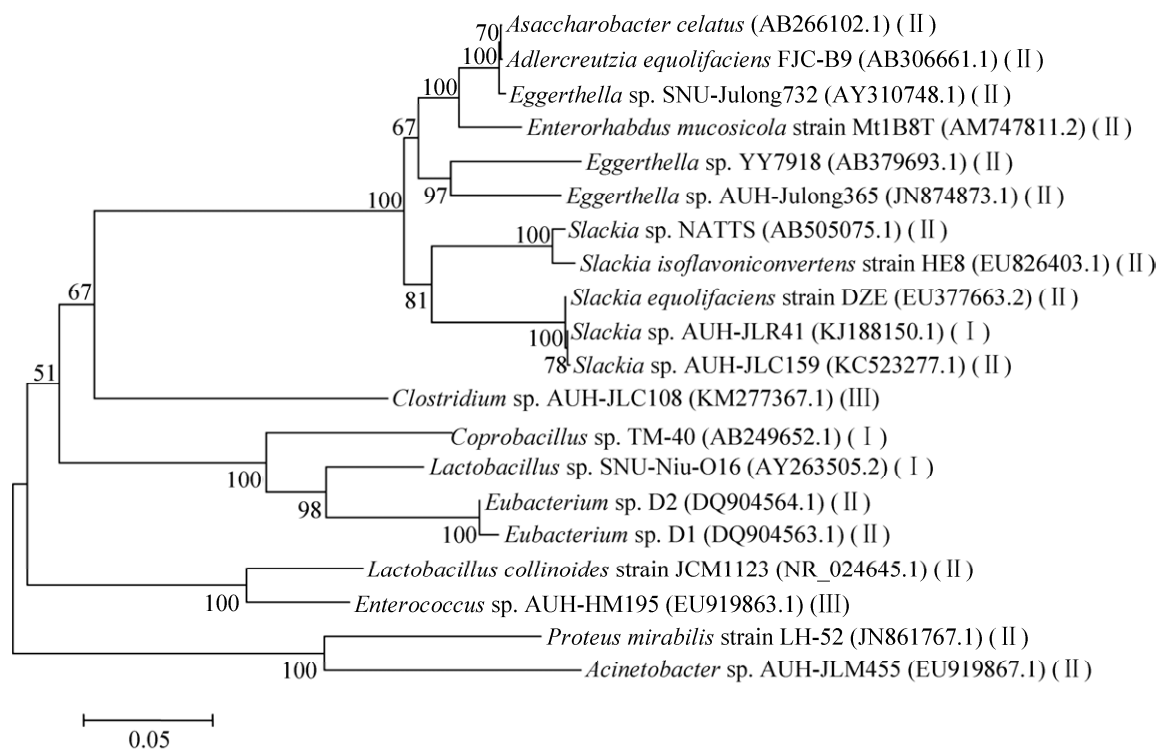


图 3. 基于 16S rRNA 基因序列的大豆异黄酮转化菌株系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of isolated isoflavone bioconverting bacteria strains on the basis of the 16S rRNA gene sequences. The number at each node indicates the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. The scale bar “0.05” represents sequence divergence. The numbers in the brackets after each bacterial strain are accession numbers of nucleotide sequences in GenBank. The number in the brackets mapped to Roman numeral represents to the group that each bacterial strain in the dendrogram belongs to on the bases of the bioconversion function.

4 大豆异黄酮微生物转化产物的生物学活性

4.1 雌马酚和 5-羟基-雌马酚的生物学活性

目前, 在所有大豆异黄酮的微生物转化产物中, 雌马酚活性研究报道最多。在已报道的雌马酚的活性中, 最为突出的是其抗氧化和抗癌活性。现有研究表明, 雌马酚的体外抗氧化活性是其亲本化合物黄豆苷原的 100 倍^[55]。笔者实验室进行自由基体外清除能力测定时发现, 与大豆异

黄酮黄豆苷原、染料木素以及它们各自的微生物转化产物 DHD、*O*-Dma 和 DHG 相比, 相同浓度的雌马酚对超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基的清除能力最强^[56]。此外, 雌马酚还具有抗癌^[57]、抗阿尔茨海默症^[58]以及预防和治疗雄激素性脱发^[59]等功效。由于目前对 5-羟基-雌马酚尚不能进行人工化学合成, 导致 5-OH-EQ 资源匮乏, 有关 5-OH-EQ 的活性报道目前还非常有限。现有研究结果仅证实, 单一对映体左旋-5-OH-EQ 能显著延长野生型秀丽隐杆线虫平均寿命并提高其抗热和抗氧化能力^[60]。另外, 单一对映体左旋-5-OH-EQ

能显著抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的生长、侵袭与迁移^[61], 今后应加大对 5-OH-EQ 的生物活性和体内代谢研究。

4.2 其他大豆异黄酮微生物转化产物的生物学活性

DHD 是保持血管活性的成分之一, 由于它与 17 β -雌二醇的结构相似, 从而能有效地抑制血管收缩, 防止内皮组织受损伤^[62]。此外, Chin-Dusting 等^[63]、Jiang 等^[64]分别分析比较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, 供试化合物作用强弱为: 雌马酚>四氢黄豆苷原(THD)>二氢黄豆苷原(DHD)>黄豆苷原。人群中大约 80%–90% 的个体的肠道菌群能将摄入体内的黄豆苷原转化为 *O*-Dma, 近年来, 有关 *O*-Dma 的活性研究受到更多学者的关注。现有研究结果表明, *O*-Dma 具有抑制癌细胞生长^[65]、减少骨质流失^[66]、预防肥胖及肥胖引起的相关疾病等^[67]。

5 大豆异黄酮微生物转化产物的合成现状与存在问题

5.1 大豆异黄酮微生物转化产物的人工化学合成

具有较强抗氧化和抗癌活性的雌马酚属非天然产物, 在雌马酚产生菌成功分离以前, 只能通过化学氢转移法对雌马酚进行人工化学合成, 美国 Indofine 公司和 LC Labs 是较早销售化学合成雌马酚的公司, 后来, 加拿大 Toronto 公司开始销售外消旋体雌马酚(7.5 US \$/mg)、*S*-雌马酚(45 US \$/mg)、外消旋体 DHD (7.5 US \$/mg)和外消旋体 *O*-Dma (0.8 US \$/mg)。由于大豆异黄酮代谢产物在人工化学合成中需要价格昂贵的化学催化剂, 加之反应过程中副产物较多, 分离纯化困

难, 导致化学合成的雌马酚的售价较高。目前, 化学合成的雌马酚、DHD 和 *O*-Dma 较多应用于研究大豆异黄酮代谢产物的性质和性能上。

5.2 以野生型大豆异黄酮转化菌株为生物酶源的微生物生物合成

5.2.1 以野生型严格厌氧大豆异黄酮转化菌株为生物酶源的厌氧微生物合成: 自 2000 年以来, 已有近 30 余株大豆异黄酮转化菌株被分离报道。在已报道的大豆异黄酮转化菌株中, 仅 3 株为兼性厌氧细菌, 其中 2 株兼性厌氧细菌在有氧条件下并不具有转化功能^[37,53]; 另外 1 株兼性厌氧细菌在有氧条件下能表现转化活性, 但转化活性并不稳定^[47]。因此, 大豆异黄酮转化菌株必须在严格厌氧环境下才能稳定发挥其转化功能, 而长期维持严格厌氧环境成本极高。根据现有研究结果, 目前报道的野生型大豆异黄酮转化菌株在厌氧条件下能高效转化底物黄豆苷原和染料木素的浓度为 0.6–0.8 mmol/L^[30,33]。另外, 由于大豆异黄酮转化菌株所催化的生化反应中至少有一步为还原反应(图 1), 这使得反应过程对氧气十分敏感, 一点点氧气的渗入都会显著影响菌株的转化活性, 严重时甚至会导致菌株完全不转化而造成“绝产”。因此, 大豆异黄酮转化菌株的严格厌氧特性已成为该类菌株开发利用的“瓶颈”。

5.2.2 以野生型严格厌氧大豆异黄酮转化菌株耐氧突变株为生物酶源的有氧微生物合成: 为解决大豆异黄酮转化菌株的氧敏感问题, 笔者实验室自 2009 年起开始对分离得到的严格厌氧大豆异黄酮转化菌株进行耐氧驯化尝试, 并于 2011 年报道了世界首株耐氧突变株 *Aeroto-Niu-O16*, 该耐氧突变株不仅能在有空气氧条件下正常生长, 同时还还将底物黄豆苷原和染料木素分别还原为 DHD

和 DHG。由于耐氧突变株 Aeroto-Niu-O16 在有氧条件下生长时, 会在其菌体外壁形成一层以多糖为主要成分的抗氧化“保护膜”结构, 后经 HPLC 检测发现, 这层抗氧化“保护膜”结构中的多糖主要由近似等量的葡萄糖和半乳糖组成^[68]。由于抗氧化“保护膜”严重阻碍了底物进入以及菌体细胞内产物的外排, 最终导致耐氧突变株 Aeroto-Niu-O16 在有氧条件下对底物黄豆苷原和染料木素的转化效率明显低于驯化前野生菌在厌氧条件下的转化效率^[69], 因此, 耐氧突变株 Aeroto-Niu-O16 并不具有实际应用价值。

2013 年笔者实验室又成功得到耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLD21, 该耐氧突变株在有空气氧条件下能将底物黄豆苷原和染料木素分别高效还原为 DHD 和 DHG。与耐氧突变株 Aeroto-Niu-O16 相比, 耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLD21 对底物黄豆苷原和染料木素的有氧转化效率成倍提高。在普通生化培养箱内(有空气氧条件), 耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLD21 对浓度为 2.0 mmol/L 的底物黄豆苷原和染料木素的平均转化率分别为 81.15% 和 78.92%^[70]。之后, 笔者实验室成功得到一株大豆异黄酮开环转化菌株的耐氧突变株 Aeroto-AUH-JLC108, 该耐氧突变株在普通生化培养箱内, 能将底物黄豆苷原高效转化为 *O*-Dma, 该耐氧突变株对浓度为 2.0 mmol/L 的底物黄豆苷原的平均转化率为 82.53%, 该转化能力是其原出发菌株 AUH-JLC108 在厌氧工作站中转化能力的近 3 倍^[54]。除笔者实验室报道的大豆异黄酮转化菌株的耐氧突变株外, 目前尚未见国内外其他学者的类似报道。从现有研究结果看, 以耐氧突变株为生物酶源, 在有空气氧条件下生物合成大豆异黄酮转化产物既高效又稳定。然而, 需指出的是, 尽管笔者实验室目前已得到雌马酚产生菌的耐氧

突变株, 但该耐氧突变株在有氧条件下生长缓慢, 并且只有在厌氧条件下才能将底物黄豆苷原转化为雌马酚(尚未发表)。今后还应不断探索新的雌马酚产生菌的耐氧驯化方法, 最终得到既能在有氧条件下生长又能高效转化黄豆苷原为雌马酚的耐氧突变株。

5.3 以基因工程大肠杆菌为生物酶源的有氧转化合成

2010 年日本学者 Shimada 等^[71]率先从分自人粪样的雌马酚产生菌 *Lactococcus* strain 20-92 中克隆了依赖于 NADP(H)的黄豆苷原还原酶基因 *l-dznr*, 该团队于 2012 年又报道了参与雌马酚生物合成的另外两个基因, 即 DHD 还原酶基因 *l-dhdr* 和 THD 还原酶基因 *l-thdr*^[72]。2013 年德国学者 Schröder 等^[73]从分自人粪样菌群的雌马酚产生菌 *Slackia isoflavoniconvertens* 中克隆了黄豆苷原还原酶、DHD 还原酶以及 THD 还原酶基因。尽管日本学者和德国学者先后克隆了雌马酚产生菌的转化酶基因, 但均只在体外酶反应体系中, 对所克隆的转化酶基因进行了活性检测, 并未对基因共表达大肠杆菌全细胞有氧转化进行研究。2016 年笔者实验室从分自鸡粪样菌群的严格厌氧雌马酚产生菌 *Slackia* sp. AUH-JLC159 中克隆了 DHD 还原酶基因, 构建的大肠杆菌重组子全细胞在有氧条件下能高效转化底物黄豆苷原和染料木素的最高浓度均为 1.4 mmol/L, 平均转化率分别为 84.41% 和 85.55%^[74]。之后, 笔者实验室又从分自鸡粪样菌群的严格厌氧雌马酚产生菌 *Eggerthella* sp. HAU-JLC44 中分别克隆了黄豆苷原还原酶基因 *dgr*、DHD 还原酶基因 *dhdr* 以及 THD 还原酶基因 *thdr*, 通过基因共表达构建了大肠杆菌重组子, 并对基因共表达重组子的全细胞有氧转化进

行尝试, 但该重组子全细胞在有氧条件下能高效合成 *S*-雌马酚的最大浓度仅为 0.4 mmol/L, 且产物还包括雌马酚合成的前体 DHD^[75]。2016 年韩国学者 Lee 等^[76]从菌株 *Slackia isoflavoniconvertens* DSM22006 中克隆了相关转化酶基因, 分别构建了重组载体 pRSFDuet-1(*dzr/ifcA*) 和 pCDFDuet-1(*ddr/tdr*), 将重组质粒分别导入大肠杆菌 BL21 中获得阳性重组子 tDDDT-WT。阳性重组子 tDDDT-WT 于 37 °C 培养至 OD 为 0.6–0.8 时加 IPTG 诱导, 并于 18 °C 低温生长 12 h 后离心收集菌体, 菌体用磷酸盐缓冲液清洗后制成 10 倍静息细胞转化体系, 转化体系添加 2% 葡萄糖后在 100 r/min 的摇床中进行转化。在该转化条件下, 当所加底物黄豆苷原浓度为 1.0 mmol/L 时, 10 倍静息细胞体系能将底物黄豆苷原高效转化为雌马酚的浓度为 0.85 mmol/L。2017 年 Lee 等^[77]又将上述 tDD 和 tDT 的 10 倍静息细胞转化体系用于底物染料木素的转化, 当所加底物浓度为 1.0 mmol/L 时发现该体系能高效转化为 5-OH-EQ 的最大浓度为 0.9 mmol/L。

6 展望

目前已知, 人体血液和尿液样品中检测到的雌马酚全部为 *S*-(-)-雌马酚, 检测到的 *O*-Dma 以 *R*-(-)-*O*-Dma 为主要构型^[78–79]。尽管目前已有大量有关雌马酚的活性报道, 但多数研究人员使用了人工化学合成的 *R*-雌马酚与 *S*-雌马酚等量存在的外消旋体雌马酚, 今后应加大对手性大豆异黄酮微生物转化产物单一对映异构体的活性研究, 全面了解不同对映异构体的活性差异及潜在毒性, 为今后手性大豆异黄酮微生物转化产物的开发利用提供参考。另外, 已报道的所有野生型大豆异

黄酮转化菌株必须在严格厌氧环境下才具有大豆异黄酮转化活性, 因而, 菌株转化过程必须在严格厌氧环境下进行, 而长期维持严格厌氧环境需要大量资金投入。尽管目前已报道了严格厌氧大豆异黄酮转化菌株耐氧突变株在有氧下的生长与转化^[54,69–70], 但有些大豆异黄酮转化菌株, 如雌马酚产生菌, 目前尚未驯化成功, 今后应进一步创新菌株驯化方法, 获得雌马酚产生菌的耐氧突变株, 为雌马酚的有氧合成提供新菌源; 另外, 还可通过优化基因共表达体系和有氧转化工艺, 进一步提高产物的合成效率, 尽早实现 *S*-雌马酚的高效有氧合成。只有解决了大豆异黄酮微生物转化产物资源匮乏问题, 才能加速对大豆异黄酮微生物转化产物活性研究, 推动高活性大豆异黄酮转化产物的开发与利用。

参考文献

- [1] Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *The Journal of Nutrition*, 1995, 125(9): 2307–2315.
- [2] Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(12): 1892–1896.
- [3] Walz E. Isoflavon- und Saponin-Glucoside in *Soja hispida*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1931, 489(1): 118–155.
- [4] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(8): 1666–1673.
- [5] Eldridge AC, Kwolek WF. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31(2): 394–396.
- [6] Deng H, Liu JY, Wang LS, Yin Q. Research on the antioxidative activity and mechanism of soybean isoflavones. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2012, 39(2): 32–34. (in Chinese)
邓卉, 刘进远, 汪林书, 殷勤. 大豆异黄酮发挥抗氧化作

- 用的途径及机理研究. 四川畜牧兽医, 2012, 39(2): 32–34.
- [7] Zheng X, Lee SK, Chun OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: a review with an emphasis on modulation of bone remodeling. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(1): 1–14.
- [8] Sathyapalan T, Aye M, Rigby AS, Thatcher NJ, Dargham SR, Kilpatrick ES, Atkin SL. Soy isoflavones improve cardiovascular disease risk markers in women during the early menopause. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2018, 28(7): 691–697.
- [9] Li WH. Study on antioxidation of genistein in mice. *Anti-infection Pharmacy*, 2014, 11(3): 200–202. (in Chinese) 李蔚辉. 染料木素对小鼠抗氧化作用的研究. *抗感染药理学*, 2014, 11(3): 200–202.
- [10] Andres A, Donovan SM, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS. Isoflavones at concentrations present in soy infant formula inhibit rotavirus infection *in vitro*. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(9): 2068–2073.
- [11] Aditya NP, Shim M, Lee I, Lee Y, Im MH, Ko S. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: *in vitro* digestion and antiproliferative activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(8): 1878–1883.
- [12] Wei YK, Gamra I, Davenport A, Lester R, Zhao LJ, Wei YD. Genistein induces cytochrome P450 1B1 gene expression and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2015, 34(2): 153–159.
- [13] Wang HT, Shi SS, Li YX, Li HQ, Xie MJ. Study on anti-microbial activity of genistein and its mechanism. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2008, 30(4): 403–406, 409. (in Chinese) 王海涛, 石姗姗, 李银霞, 李化强, 谢明杰. 染料木素的抑菌活性及其机制的研究. *营养学报*, 2008, 30(4): 403–406, 409.
- [14] Kong D, Xing LN, Liu R, Jiang JJ, Wang WY, Shang LQ, Wei XT, Hao WD. Individual and combined developmental toxicity assessment of bisphenol A and genistein using the embryonic stem cell test *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 60: 497–505.
- [15] Patel S, Hartman JA, Helferich WG, Flaws JA. Preconception exposure to dietary levels of genistein affects female reproductive outcomes. *Reproductive Toxicology*, 2017, 74: 174–180.
- [16] Schroeter A, Aichinger G, Stornig K, Marko D. Impact of oxidative metabolism on the cytotoxic and genotoxic potential of genistein in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(2): 1800635e.
- [17] Ono M, Ejima K, Higuchi T, Takeshima M, Wakimoto R, Nakano S. Equol enhances apoptosis-inducing activity of genistein by increasing Bax/Bcl-xL expression ratio in MCF-7 human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 2017, 69(8): 1300–1307.
- [18] King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 67(5): 867–872.
- [19] Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(7): 1260–1268.
- [20] Marrian GF, Haslewood GAD. Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochemical Journal*, 1932, 26(4): 1227–1232.
- [21] Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KD. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochemical Journal*, 1982, 201(2): 353–357.
- [22] Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens, the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 54(3/4): 167–184.
- [23] Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1984, 40(3): 569–578.
- [24] Franke AA, Lai JF, Halm BM. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 559: 24–28.
- [25] Rowland IR, Wiseman H, Sanders TAB, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer*, 2000, 36(1): 27–32.
- [26] Coldham NG, Howells LC, Santi A, Montesissa C, Langlais C, King LJ, Macpherson DD, Sauer MJ. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by

- product ion mass fragmentology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 70(4/6): 169–184.
- [27] Heinonen S, Wähälä K, Adlercreutz H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and *cis*-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Analytical Biochemistry*, 1999, 274(2): 211–219.
- [28] Sepehr E, Robertson P, Gilani GS, Cooke G, Lau BP. An accurate and reproducible method for the quantitative analysis of isoflavones and their metabolites in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry combined with photodiode array detection. *Journal of AOAC International*, 2006, 89(4): 1158–1167.
- [29] Schoefer L, Mohan R, Braune A, Birringer M, Blaut M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 208(2): 197–202.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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(6): 422–428.
- [33] 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(3): 261–269.
- [34] Tamura M, Tsushida T, Shinohara K. Isolation of an isoflavone-metabolizing, *Clostridium*-like bacterium, strain TM-40, from human faeces. *Anaerobe*, 2007, 13(1): 32–35.
- [35] Zhou B, Meng JQ, Wang XL. Isolation, identification and biotransforming property of an isoflavone reducing bacterium isolated from rabbit intestinal microflora. *Microbiology China*, 2014, 41(11): 2301–2309. (in Chinese) 周博, 孟建青, 王秀伶. 兔肠道大豆异黄酮还原菌株的分离鉴定及其转化特性. *微生物学通报*, 2014, 41(11): 2301–2309.
- [36] 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(3): 247–250.
- [37] Uchiyama S, Ueno T, Suzuki T. Identification of a newly isolated equol-producing lactic acid bacterium from the human feces. *Journal of Intestinal Microbiology*, 2007, 21(3): 217–220.
- [38] Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T, Benno Y. *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerthella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(5): 1221–1227.
- [39] Minamida K, Ota K, Nishimukai M, Tanaka M, Abe A, Sone T, Tomita F, Hara H, Asano K. *Asaccharobacter celatus* gen. nov., sp. nov., isolated from rat caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(5): 1238–1240.
- [40] Matthies A, Clavel T, Gütschow M, Engst W, Haller D, Blaut M, Braune A. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4847–4852.
- [41] Yokoyama S, Suzuki T. Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(10): 2660–2666.
- [42] Yu ZT, Yao W, Zhu WY. Isolation and identification of equol-producing bacterial strains from cultures of pig faeces. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 282(1): 73–80.
- [43] 王秀伶, 邵建柱, 王世英, 于飞, 张琪, 李朝东. 不动杆菌 AUH-JLM455 及其转化制备 *S*-雌马酚的方法. 中国: CN101338294A. 2009-01-07.
- [44] Jin JS, Kitahara M, Sakamoto M, Hattori M, Benno Y. *Slackia equolifaciens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of producing equol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(8):

- 1721–1724.
- [45] Tamura M, Hori S, Nakagawa H. *Lactobacillus collinoides* JCM1123^T: effects on mouse plasma cholesterol and isoflavonoids in the caecum. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 96(4): 621–626.
- [46] Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Miyanaga N, Akaza H. Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS. *Archives of Microbiology*, 2010, 192(4): 279–287.
- [47] Guo YY, Huang YY, Ye J, Zhang XQ, Xiao MT. Screening and identification of a bacterium capable of converting daidzein to S-equol. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 696–702. (in Chinese)
郭远洋, 黄雅燕, 叶静, 张学勤, 肖美添. 一株转化大豆苷元为 S-雌马酚菌株的筛选和鉴定. *微生物学报*, 2012, 52(6): 696–702.
- [48] Li H, Zhou B, Wang XL. Bioconversion of daidzein by an anaerobic bacterium *Eggerthella* sp. AUH-Julong365 isolated from human feces. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2013, 36(3): 61–65, 71. (in Chinese)
李慧, 周博, 王秀伶. 人肠道厌氧细菌菌株 *Eggerthella* sp. AUH-Julong365 对黄豆苷原的转化研究. *河北农业大学学报*, 2013, 36(3): 61–65, 71.
- [49] Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, Hattori M. Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(8): 1621–1625.
- [50] Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1740–1744.
- [51] 王秀伶, 刘子光, 邵子强, 梁晓琳, 张红蕾, 郭常亮. 史雷克氏菌 AUH-JLC159 及其转化制备(-)-5-OH-雌马酚的方法. 中国: CN103275884A. 2013-09-04.
- [52] Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay Jr 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(1): 8–12.
- [53] Yu F, Wang SY, Li J, Zhang Q, Li CD, Wang XL. 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 对黄豆苷原的开环转化. *微生物学报*, 2009, 49(4): 479–484.
- [54] Li M, Li H, Zhang C, Wang XL, Chen BH, Hao QH, Wang SY. Enhanced biosynthesis of O-desmethylangolensin from daidzein by a novel oxygen-tolerant cock intestinal bacterium in the presence of atmospheric oxygen. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(3): 619–628.
- [55] Sathyamoorthy N, Wang TTY. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *European Journal of Cancer*, 1997, 33(14): 2384–2389.
- [56] Liang XL, Wang XL, Li Z, Hao QH, Wang SY. Improved *in vitro* assays of superoxide anion and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(22): 11548–11552.
- [57] Liang XL, Li M, Li J, Wang XL. Equol induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 2014, 25(6): 633–640.
- [58] Wilkins HM, Mahnken JD, Welch P, Bothwell R, Koppel S, Jackson RL, Burns JM, Swerdlow RH. A mitochondrial biomarker-based study of S-equol in Alzheimer's disease subjects: results of a single-arm, pilot trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 59(1): 291–300.
- [59] Brotzu G, Fadda AM, Manca ML, Manca T, Marongiu F, Campisi M, Consolaro F. A liposome-based formulation containing equol, dihomo- γ -linolenic acid and propionyl-L-carnitine to prevent and treat hair loss: a prospective investigation. *Dermatologic Therapy*, 2019, 32(1): e12778.
- [60] Zhang CH, Wang XL, Liang XL, Zhang HL, Hao QH. Effects of (-)-5-hydroxy-equol on the lifespan and stress resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2014, 23(6): 378–384.
- [61] Gao L, Wang KX, Zhang NN, Li JQ, Qin XM, Wang XL. ¹H Nuclear Magnetic Resonance based metabolomics approach reveals the metabolic mechanism of (-)-5-hydroxy-equol against hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(5): 1833–1843.

- [62] Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 94(5): 499–518.
- [63] Chin-Dusting JPF, Fisher LJ, Lewis TV, Piekarska A, Nestel PJ, Husband A. The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *British Journal of Pharmacology*, 2001, 133(4): 595–605.
- [64] Jiang F, Jones GT, Husband AJ, Dusting GJ. Cardiovascular protective effects of synthetic isoflavone derivatives in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Vascular Research*, 2003, 40(3): 276–284.
- [65] Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 2004, 208(1): 35–41.
- [66] Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo JL, Adlercreutz H, Katsumata SI, Suzuki K, Takeda K, Masuyama R, Ishimi Y. Comparative activities of daidzein metabolites, equol and *O*-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures. *European Journal of Nutrition*, 2008, 47(5): 273–279.
- [67] Frankenfeld CL, Atkinson C, Wähälä K, Lampe JW. Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or *O*-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2014, 68(4): 526–530.
- [68] Jia Y, Zhao LJ, Zhao XJ, Jia F, Wang XL. Extraction and monosaccharide component analysis of the exopolysaccharide from the anti-oxidative protective coat of the oxygen-tolerant mutant strain Aeroto-Niu-O16. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2018, 41(3): 77–83. (in Chinese)
贾扬, 赵亮杰, 赵晓佳, 贾璠, 王秀伶. 耐氧突变株 Aeroto-Niu-O16 抗氧化保护膜成分提取与单糖组分分析. *河北农业大学学报*, 2018, 41(3): 77–83.
- [69] 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.
- [70] 王秀伶, 谢雁景, 杨露, 赵慧. 耐氧夏普氏菌及其在二氢大豆异黄酮有氧合成中的应用. 中国: CN104673722A. 2015-06-03.
- [71] Shimada Y, Yasuda S, Takahashi M, Hayashi T, Miyazawa N, Sato I, Abiru Y, Uchiyama S, Hishigaki H. Cloning and expression of a novel NADP(H)-dependent daidzein reductase, an enzyme involved in the metabolism of daidzein, from equol-producing *Lactococcus* strain 20-92. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5892–5901.
- [72] Shimada Y, Takahashi M, Miyazawa N, Ohtani T, Abiru Y, Uchiyama S, Hishigaki H. Identification of two novel reductases involved in equol biosynthesis in *Lactococcus* strain 20-92. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2012, 21(3/4): 160–172.
- [73] Schröder C, Matthies A, Engst W, Blaut M, Braune A. Identification and expression of genes involved in the conversion of daidzein and genistein by the equol-forming bacterium *Slackia isoflavoniconvertens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(11): 3494–3502.
- [74] Gao YN, Hao QH, Zhang HL, Zhou B, Yu XM, Wang XL. Reduction of soy isoflavones by use of *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing isoflavone reductase under aerobic conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, 63(2): 111–116.
- [75] 王秀伶, 高雅宁, 于秀梅, 张红蕾. 爱格氏菌、*S*-雌马酚产生工程菌及其构建方法和应用. 中国: CN105861363A. 2016-08-17.
- [76] Lee PG, Kim J, Kim EJ, Jung EO, Pandey BP, Kim BG. P212A Mutant of dihydrodaidzein reductase enhances (*S*)-equol production and enantioselectivity in a recombinant *Escherichia coli* whole-cell reaction system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(7): 1992–2002.
- [77] Lee PG, Kim J, Kim EJ, Lee SH, Choi KY, Kazlauskas RJ, Kim BG. Biosynthesis of (–)-5-hydroxy-equol and 5-hydroxy-dehydroequol from soy isoflavone, genistein using microbial whole cell bioconversion. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(11): 2883–2890.
- [78] Kim M, Han J. Chiroptical study and absolute configuration of (–)-*O*-DMA produced from daidzein metabolism. *Chirality*, 2014, 26(9): 434–437.
- [79] Gardana C, Canzi E, Simonetti P. *R*(–)-*O*-desmethylangolensin is the main enantiomeric form of daidzein metabolite produced by human *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Chromatography B*, 2014, 953-954: 30–37.

Progress in microbial conversion of soy isoflavones

Xiaojia Zhao, Yicong Li, Xiuling Wang*

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

Abstract: Soy isoflavones are a group of secondary metabolites produced during the growth of soya plants and have various physiological functions, including antioxidative activity, anticarcinogenic activity, prevention of bone loss, and decreasing the morbidity of cardiovascular disease. It is known that after being absorbed, soy isoflavones are metabolized by intestinal microflora to different metabolites with higher or wider bioactivities in comparison to soy isoflavones. Therefore, the beneficial effects of soy isoflavones depend mainly on how soy isoflavones are metabolized by intestinal microflora rather than the total amount of soy isoflavones absorbed by individuals. This paper reviews the microbial bioconversion of soy isoflavones from numerous aspects, including the function and component of soy isoflavones, the absorption, degradation and isolation of soy isoflavones, the bioactivity and enhanced biosynthesis of the microbial metabolites of soy isoflavones. The present research state and existing problems are addressed. The trends in future development are prospected. Our purpose is to accelerate the research and development of the microbial metabolites of soy isoflavones.

Keywords: soy isoflavones, microbial bioconversion, biological activity, biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570035, 30770047, 31170058, 31670057), by the Excellent Innovative Talents Promotion Plan (CPRC027) and by the Applied and Fundamental Research Plan in Hebei Province of China: Key Basic Research Project (16962504D)

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

Received: 22 April 2019; Revised: 14 July 2019; Published online: 5 September 2019