

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(4) 0479-0484; 4 April 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷原的开环转化

于飞, 王世英, 李佳, 张琪, 李朝东, 王秀伶*

(河北农业大学生命科技学院, 保定 071001)

摘要 【目的】从褐马鸡粪样中分离对大豆异黄酮黄豆苷原具有转化作用的功能微生物菌株。【方法】在厌氧工作站内对褐马鸡新鲜粪样进行梯度稀释后涂板, 从板上挑取单菌落与底物黄豆苷原厌氧混合培养, 用高效液相色谱检测底物被转化情况。【结果】分离出一株对黄豆苷原具开环转化作用的革兰氏阳性兼性好氧菌株 AUH-HM195(EU919863) 经 BLAST 比对, 该菌株的 16S rDNA 基因全序与肠球菌属菌株 *Enterococcus hirae* (DSM20160) 的相似性为 100%。根据保留时间、代谢产物最大紫外吸图谱以及核磁共振氢谱和碳谱等分析结果, 将菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 降解黄豆苷原的代谢产物确定为去氧甲基安哥拉紫檀素。纯化后的代谢产物在手性柱上出现两个物质峰, 其对映体过量率为 66.9%。【结论】细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 为国内外首次报道的对黄豆苷原具有开环转化作用的肠球菌属菌株, 同时也是第一个报道的对大豆异黄酮具有转化作用的兼性微生物菌株。

关键词: 大豆异黄酮; 黄豆苷原; 生物转化; 去氧甲基安哥拉紫檀素; 筛选

中图分类号 Q935 **文献标识码**: A **文章编号** 0001-6209(2009)04-0479-06

大豆异黄酮因其抗氧化、降低心脑血管发病率、减少骨质疏松和抗肿瘤活性日益受到人们关注^[1-3], 目前研究最多的是以苷元形式存在的染料木素(genistein)和黄豆苷原(daidzein)。人群中大约 30%~50% 的个体, 其肠道微生物能将摄入体内的黄豆苷原转化为雌马酚(equol), 而 80%~90% 的个体能将摄入体内的黄豆苷原转化为去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-desmethylangolensin, 简称 *O*-Dma)^[4-5]。不管是雌马酚还是 *O*-Dma 都具有比其前体黄豆苷原更高更广的生物学活性。体外试验表明, *O*-Dma 不仅与人体雌激素受体 ER_α 和 ER_β 的亲合力高于其前体黄豆苷原^[6-7], 与 ER_β 结合后, 在诱导基因转录上 *O*-Dma 也强于黄豆苷原^[6]。此外, 当浓度高于 10 μmol/L, *O*-Dma 能够明显抑制人乳腺癌细胞 MCF-7

的生长^[8]。2008 年日本学者比较了 *O*-Dma 与雌马酚在体内外对切除子宫小鼠的骨密度及脂类代谢的影响, 发现 *O*-Dma 与雌马酚一样, 均能促进脂类物质的正常代谢, 但在体外破骨细胞生长方面, *O*-Dma 则只表现轻微抑制作用^[9]。

自 20 世纪 90 年代中期人们开始分离对黄酮类化合物具有转化作用的功能微生物菌株, 根据已分离的功能微生物菌株的转化作用, 可将其分为还原^[10-11]、去酮基^[12-13]和开环^[14-15]3 类。目前报道的对大豆异黄酮 C-环具有开环转化作用的菌株仅涉及梭菌属和真杆菌属 2 个属。Hur 等从人粪样中分离的革兰氏阳性梭菌属菌株 HGH136 能将大豆异黄酮黄豆苷原的 C-环进行裂解, 形成开环代谢产物 *O*-DMA^[16]。Blaut^[15]及 Wang 等^[17]分别报道了一株对

基金项目 国家自然科学基金(30570035)

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

作者简介: 于飞(1983-)男, 河北辛集人, 硕士研究生, 主要从事微生物转化研究。

收稿日期: 2008-11-18; 修回日期: 2009-01-08

大豆异黄酮具有开环转化作用的人肠道真杆菌属菌株,该菌株能将黄豆苷原和染料木素分别转化为 *O*-DMA 与 2-HPPA。

本文首次从褐马鸡粪样中筛选出一株革兰氏阳性兼性好氧肠球菌属菌株,这完全不同于以往报道的对大豆异黄酮具有开环转化作用的梭菌属和真杆菌属菌株。此外,这是目前国内首次报道的一株对大豆异黄酮具有转化作用的兼性微生物菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基:脑心浸液(BHI)培养基(美国 Bacto 公司)。

1.1.2 试剂与药品:去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Dma)标准品由本实验室制备保存。黄豆苷原(美国 Indofine 公司)。甲醇、乙酸乙酯和乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司)。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,2487 UV 检测器,C18-ODS 分析柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm),C18-ODS 制备柱(5 μm, 250 mm × 10 mm),Sumi Chiral OA-7000 手性分析柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm)DK-VC010-IR 真空离心浓缩仪(韩国 DAIKI)。

1.2 菌株的分离筛选

用灭菌镊子取褐马鸡新鲜粪样,放到事先备好的覆盖 2~3 mm 矿物油 BHI 液体培养基中,取样后立即将新鲜粪样带回实验室,在 37℃ 厌氧工作站内进行系列梯度稀释(10⁻¹ ~ 10⁻⁸),并涂布于 BHI 琼脂板上。

1.3 高效液相检测

经梯度稀释后的菌落在 BHI 平板上长出后,挑取单菌落到 1 mL BHI 液体培养基中,加入 0.1 mmol/L 黄豆苷原作为底物,培养 3~5 d 后用 HPLC 检测底物被转化情况,检测波长为 270 nm,流动相为乙腈和水,具体方法见 Wang^[17]的报道。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 菌体及菌落形态观察:在厌氧工作站内,将具有转化活性的单菌株纯化后分别接种在 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^[18]对转化菌株进行革兰氏染色,将分离的具有转化活性的单菌株同时等量接种,分置 37℃ 普通培养箱和厌

氧工作站内进行培养,观察其生长情况。

1.4.3 常规生理生化鉴定:对有转化活性的菌株进行糖发酵及产气(乳糖、蔗糖、葡萄糖)、触酶、吲哚试验及 V.P. 试验等常规生理生化测定,参照细菌鉴定手册^[19]对转化菌株进行初步菌种鉴定。

1.4.4 16S rDNA 序列分析:采用通用 27F/1492R 引物(正向引物:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3';反向引物:5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增^[20]。PCR 扩增条件:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 29 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经纯化后,送上海生物工程有限公司测序,序列上交美国 NCBI 核苷酸序列库,并通过 BLAST 比对,对转化菌株进行系统分类。

1.5 代谢产物的分离纯化与结构鉴定

1.5.1 代谢产物的分离纯化:将转化菌株的菌液 1 mL 接种于三角瓶中(装有 100 mL 新鲜 BHI 培养基)培养,菌长起后加入 40 mmol/L 底物黄豆苷原 1 mL,在厌氧工作站内培养 6~7 d,高效液相检测底物转化情况。待底物最大程度被转化后,用等量乙酸乙酯萃取发酵液 3 次,蒸干后用甲醇溶解,并过 0.45 μm 有机膜,用 HPLC 进行分离纯化。

1.5.2 代谢产物的鉴定:相同 HPLC 检测条件下与标准品比较保留时间和物质峰的最大紫外吸收图谱,将分离纯化后的代谢产物进行核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)测定(Bruker AVANCE 400 型超导核磁共振波谱仪),溶剂采用丙酮-d₆。

1.6 手性代谢产物的手征性测定

将分离纯化后的代谢产物注入 Sumi chiral OA-7000 手性分析柱中,通过峰面积计算对映体过量率。

1.7 转化菌株对黄豆苷原的转化动态研究

在厌氧工作站内将具有转化作用的菌株培养液 100 μL 接种到盛有 2 mL BHI 液体培养基的带盖试管中,菌开始进入指数增长后期后加入 40 mmol/L 底物黄豆苷原 20 μL 共同培养,加入底物后每两天取出 100 μL 加入底物的菌株培养液,用 1 mL 乙酸乙酯进行萃取,离心浓缩仪蒸干后加入 100 μL 甲醇,用 HPLC 检测底物被转化情况,样品一直取到第 8 天。

2 结果和分析

2.1 菌株 AUH-HM195 的菌体及菌落形态特征

通过 HPLC 检测,从褐马鸡新鲜粪便中分离到一株对底物黄豆苷原具有转化作用的细菌菌株,将其命名为 AUH-HM195。该细菌菌株在厌氧工作站内培养 24 h 后,在光学显微镜下呈球形或椭圆形,

大部分单独存在, 少部分两三个菌体连在一起。该菌株菌落为圆形, BHI 培养基培养 48 h 后菌落大小为 1.0~1.2 mm, 边缘透明且整齐, 中央呈乳白色凸起, 随培养时间延长, 菌落逐渐转为淡黄色。

2.2 转化菌株革兰氏染色与耐氧特性

菌株 AUH-HM195 经革兰氏染色为阳性, 在厌氧工作站内及普通培养箱内培养均能正常生长, 且在

普通培养箱内生长速度更快些。因此, 将菌株 AUH-HM195 确定为革兰氏阳性兼性好氧球菌。

2.3 菌株 AUH-HM195 的生理生化特征

革兰氏阳性兼性好氧菌株 AUH-HM195 的生理生化特征见表 1, 与常见细菌系统鉴定手册(第一版)对照, 菌株 AUH-HM195 与肠球菌属 (*Enterococcus*) 特征一致。

表 1 细菌菌株 AUH-HM195 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strain AUH-HM195

Identification	AUH-HM195	Identification	AUH-HM195	Identification	AUH-HM195
6.5% NaCl	+	Lactose	+ (no gas)	Motivation	-
10°C	+	Glucose	+ (no gas)	Indole	-
45°C	+	Sucrose	+ (no gas)	Amylolysis	-
pH9.6	+	Catalase	-	V.P.	-

" + " means positive; " - " means negative.

2.4 菌株 AUH-HM195 16S rDNA 的序列分析

以细菌菌株 AUH-HM195 基因组 DNA 为模板, 以通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。菌株 AUH-HM195 的 16S rDNA 序列递交美国 NCBI 基因库, 注册号为 EU919863。通过 BLAST 比对, 菌株

AUH-HM195 的 16S rDNA 基因全序(1487 bp)与菌株 *Enterococcus hirae* (序列号 Y17302, 菌种号 DSM 20160) 的相似性为 100%。菌株 AUH-HM195 的系统发育学地位见图 1。



图 1 细菌菌株 AUH-HM195 与其近缘菌株 16S rDNA 亲缘关系图

Fig. 1 16S rDNA based dendrogram showing the phylogenetic relationship of bacterial strain AUH-HM195 and its relatives. Nucleotide sequence database accession numbers are shown in the brackets. The percentage number at the nodes indicate the levels of bootstrap support for the branch point based on 1000 resamplings. The scale bar at the bottom represents 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position.

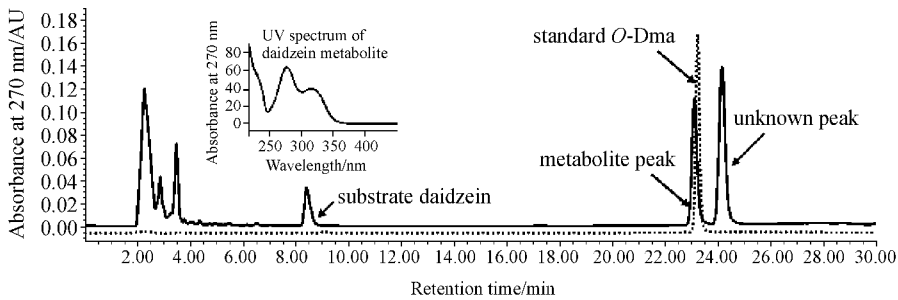
此外, 对菌株 AUH-HM195 进行了甘露醇 (-)、山梨醇 (-)、丙酮酸盐利用实验 (-) 以及精氨酸双水解实验 (+), 实验结果与文献中报道的^[21]海氏肠球菌的生理生化特性完全一致。根据革兰氏染色、耐氧及其它耐性实验、生理生化特性以及菌株 16S rDNA 的序

列分析, 最后将对黄豆苷原具有转化作用的褐马鸡肠道分离菌株 AUH-HM195 确定为海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*) 即 *Enterococcus hirae* AUH-HM195。

2.5 黄豆苷原代谢产物的结构鉴定

2.5.1 代谢产物的高效液相色谱分析: 以大豆异黄

酮黄豆苷原为底物,以褐马鸡肠道分离菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 为生物酶源,采用高效液相方法对底物黄豆苷原代谢产物进行检测。在保留时间 8.5 min 处出现的物质峰为底物黄豆苷原。保留时间 23.2 min 和 24.3 min 处出现两个物质峰,其中在保留时间 23.2 min 处的物质峰随底物黄豆苷原的减少逐渐增加,确定为底物的代谢产物峰。该峰在 279 nm 和 319 nm 分别有两个最大紫外吸收峰,这与标准品去氧甲基安哥拉紫檀素 (*O*-Dma) 的保留时间和最大紫外吸收相吻合(图 2);在不加底物黄豆苷原的菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 的



2 细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢底物黄豆苷原的高效液相图谱

Fig. 2 HPLC elution profiles for the metabolism of daidzein by bacterial strain *Enterococcus hirae* AUH-HM195. The insert shows the UV spectrum of daidzein metabolite.

2.5.2 代谢产物的核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$):为准确鉴定褐马鸡肠道细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢黄豆苷原后产生的代谢产物的化学结构,将分离纯化后的代谢产物分别进行了核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)分析,结果如下:

$^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), 400 MHz): 7.84(1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'), 7.18(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'' β '), 6.7(2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'' δ '), 6.3(1H, dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz, H-5'), 6.2(1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3'), 4.73(1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.3(3H, d, $J = 7.0$ Hz, $\beta\text{-CH}_3$).

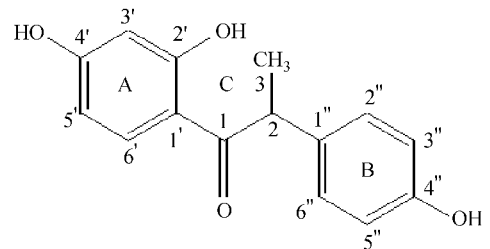
$^{13}\text{C-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), 100 MHz): 165.3(C-4'), 164.8(C-2'), 156.6(C-4''), 133.5(C-1''), 133.2(C-6'), 128.7(C-2'' δ '), 115.9(C-3'' δ '), 112.5(C-1'), 108.1(C-5'), 103(C-3'), 45.7(C-2), 19(C-3).

该结果与 Wang 等^[17]报道的 *O*-Dma 的核磁共振氢谱和碳谱相吻合。根据代谢产物的保留时间、最大紫外吸收、核磁共振氢谱和碳谱,将菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢底物黄豆苷原产生的代谢产物峰鉴定为手性开环代谢产物 *O*-Dma, 结构如图 3 所示。

2.6 代谢产物的对映体过量率(e.e.%)

分离纯化的 *O*-Dma 经手性柱 Sumi Chiral OA-7000 分离后,分别在保留时间 25.5 min 和 29.8 min

发酵液提取物在保留时间 24.5 min 处出现了一菌株代谢产物峰(图略),且该峰分别在 271 nm 和 267 nm 有两个最大紫外吸收峰,这与上述保留时间 24.3 min 处的物质峰的最大紫外吸收完全一致。此外,在加入底物黄豆苷原的菌株发酵液中,保留时间 24.3 min 处的物质峰的增加与底物减少并不同步进行,因而将上述保留时间 24.3 min 处的峰确定为菌株本身代谢产生的未知峰(图 2)。通过比较相同条件下代谢产物与 *O*-Dma 标准品的保留时间和最大紫外吸收,将菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢黄豆苷原产生的代谢产物初步确认为 *O*-Dma。



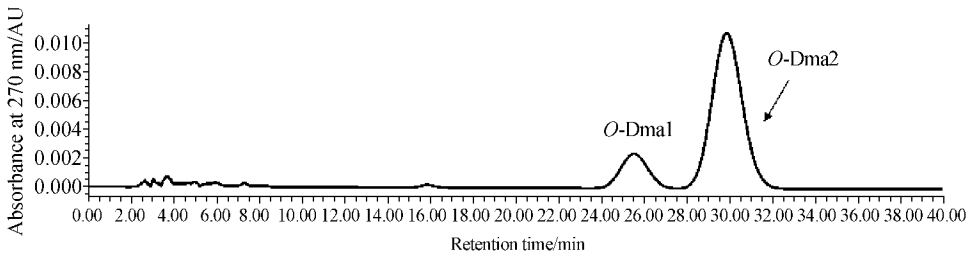
O-desmethylangolensin (*O*-Dma)

3 代谢产物去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Dma)的化学结构

Fig. 3 The chemical structure of the metabolite of *O*-desmethylangolensin (*O*-Dma).

各呈现一物质峰(图 4),根据峰面积计算 *O*-Dma 的对映体过量率为 66.9%。Wang 等^[17]2004 年报道了一株能将底物黄豆苷原代谢为 *O*-Dma 的真杆菌属菌株 *Eubacterium ramulus* Julong601,该菌株代谢黄豆苷原的手性代谢产物 *O*-Dma 的对映体过量率高达 90%。目前普遍认为动物体内的 *O*-Dma 来自黄豆苷原被微生物菌群还原后产生的二氢黄豆苷原(dihydrodaidzein,简称 DHD)^[22],而 DHD 因其 C-3 位的手性碳为手性化合物。由于来自不同动物体内能将黄豆苷原开环转化的菌株产生的 *O*-Dma 的对映体过量率相差悬殊,表明存在于不同动物体内能将底物黄豆苷原开环转化的菌株不仅具有属的多样

性,而且来自不同属的开环转化菌株分泌的相关酶类具有不同的对映体选择性。

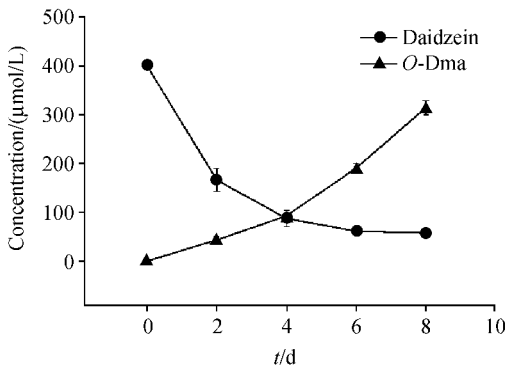


4 细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢黄豆苷原产物在手性柱上的高效液相图谱

Fig.4 HPLC elution profile on a Sumi Chiral OA-7000 column of the metabolite of daidzein by bacterial strain *Enterococcus hirae* AUH-HM195.

2.7 细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷原的代谢曲线

菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 生长开始进入指数增长期加入浓度为 $400 \mu\text{mol/L}$ 的底物黄豆苷原。底物黄豆苷原在与菌株共同培养后的前四天,随培养时间的延长底物浓度迅速降低,代谢产物 *O*-Dma 在底物与菌株共同培养的第二天即开始被合成,并随培养时间延长逐渐增加(图 5)。与人体肠道开环菌株 *Eubacterium ramulus* Julong601 相比,褐马鸡肠道分离菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 转化黄豆苷原的速度更快些。



5 细菌菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 代谢黄豆苷原的动态曲线

Fig.5 The dynamic curve of the metabolite of daidzein by bacterial strain *Enterococcus hirae* AUH-HM195.

3 结论和讨论

从褐马鸡粪样中分离的在厌氧条件下能将底物黄豆苷原转化为开环代谢产物去氧甲基安哥拉紫檀素的肠球菌属菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 为国内外首次报道。以往报道的对大豆异黄酮具有开环转化作用的肠道微生物菌株仅涉及两个属,即真杆菌属 *Eubacterium ramulus* 和梭菌属 *Clostridium* sp., 且报道的对大豆异黄酮具有转化作用的全部菌株均为严格厌氧菌株。通过本研究分离的对大豆异黄酮具有开环转化作用的菌株为兼性好氧菌株。然而,

该菌株在有氧条件下虽能正常生长但并不表现转化黄豆苷原能力,推测可能与菌株在严格厌氧和有氧条件下选择不同代谢途径有关,这对今后相关酶和辅酶研究提供了理论基础。此外,从褐马鸡肠道微生物菌群中分离的对黄豆苷原具有开环转化作用的菌株 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 不同于以往报道的菌株,其自身在严格厌氧和有氧条件下均能代谢产生未知峰(图 2),而以往报道的具有相同功能的微生物菌株则未见此未知峰,该未知峰与菌株的转化及生长关系有待进一步研究。

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 H, Gorbach S, et al. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet*, 1992, 339: 1233.
- [4] Kelly, GE, Joannou GE, Reeder AY, et al. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proceedings of Society of Experimental Biological Medicine*, 1995, 208: 40–43.
- [5] Arai Y, Uehara M, Sato Y, et al. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *Journal of Epidemiology* 2000, 10: 127–135.
- [6] Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, et al. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004, 27: 185–188.
- [7] Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2001, 24: 351–356.
- [8] Schmitt E, Dekant W, Stopper H. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicology in Vitro* 2001, 15: 433–439.

- [9] Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo JL, et al. 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.
- [10] Schneider H, Simmering R, Blaut M, et al. Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89: 1027 – 1037.
- [11] Simmering R, Pforte H, Blaut M, et al. The growth of the flavonoid-degrading intestinal bacterium, *Eubacterium ramulus* is stimulated by dietary flavonoids in vivo. *FEMS Microbiology Ecology* 2002, 40: 243 – 248.
- [12] Minamide K, Tanaka M, Abe A. 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.
- [13] Wang XL, Hur HG, Kim Su IL, et al. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 214 – 219.
- [14] Hur HG, Beger RD, Rafii F, et al. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Archives of Microbiology*, 2002, 178: 8 – 12.
- [15] Schoefer L, Mohan R, Blaut M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiology Letters* 2002, 208: 197 – 202.
- [16] Hur HG, Lay JO Jr, Rafii F, et al. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Archives of Microbiology*, 2000, 174: 422 – 428.
- [17] Wang XL, Hur HG, Kim Su IL. 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.
- [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(第一版). 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] Lane, DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, 1991.
- [21] 李金钟. 肠球菌分类与鉴定新进展. 临床检验杂志(Chinese Journal of Clinical Laboratory Science), 2006, 24(3): 228 – 230.
- [22] Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, et al. A urinary profile study of dietary phytoestrogens, the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 54: 167 – 184.

C-ring cleavage of isoflavone daidzein by a newly-isolated facultative *Enterococcus hirae* AUH-HM195 from *Crossoptilon mantchuricum* feces

Fei Yu, Shiyang Wang, Jia Li, Qi Zhang, Chaodong Li, Xiuling Wang*
(College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract [**Objective**] To isolate specific bacteria capable of biotransforming isoflavone daidzein. [**Methods**] Fresh *crossoptilon mantchuricum* feces was diluted serially from 10^{-1} to 10^{-8} in Brain Heart Infusion (BHI) liquid medium in the anaerobic chamber at 37°C. Single colony was isolated and incubated in BHI liquid medium containing 0.1 mmol/L daidzein under anaerobic conditions. The culture medium was detected by HPLC method after being incubated for 3 days. [**Results**] A gram-positive facultative anaerobic bacterium designated strain AUH-HM195 capable of cleaving the C-ring of isoflavone daidzein was isolated. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search on the GenBank revealed that the full-length of 16S rDNA gene sequence for strain AUH-HM195 has 100% similarity to that of *Enterococcus hirae* (DSM20160). Based on HPLC retention time, UV spectrum, ^1H and ^{13}C NMR analysis, the metabolite of daidzein by strain *Enterococcus hirae* AUH-HM195 was identified as O-desmethylangolensin. Two peaks were observed when purified O-desmethylangolensin was eluted on a chiral column. The enantiomeric excess (% e.e.) of O-desmethylangolensin was 66.9%. [**Conclusion**] Bacterial strain *Enterococcus hirae* AUH-HM195 is the first reported *Enterococcus* bacterium with C-ring cleavage activity. It is also the first reported facultative bacterium capable of metabolizing isoflavones.

Keywords : isoflavones ; daidzein ; biotransformation ; O-desmethylangolensin ; isolation

(本文责编 张晓丽)