

耐胆汁型牛黄转化菌的分离、鉴定及其牛黄转化活力研究

王厚伟¹, 窦彦玲^{2*}, 赵金龙¹, 孙燕¹

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学智能与信息工程院, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 分离和鉴定能够耐受牛胆汁的牛黄转化细菌, 并应用到体外培育牛黄的制备。**方法** 从形成牛黄的牛胆囊胆汁中分离到可在牛胆汁中长期存活且具有较强牛黄转化能力的菌株(NDZNM-01), 观测其外部形态、理化性状、分类学地位、牛胆汁耐受力, 以及牛黄转化活力。**结果** 根据对 NDZNM-01 菌株外部形态与生理生化特征的检测结果, 判断为柠檬酸杆菌属细菌。进一步根据其 16S rDNA 序列的聚类分析结果, 显示该菌株与其他 3 种柠檬酸杆菌属的细菌聚在一个分支上, 但形成单系, 属于新发现的菌株。应用菌株 NDZNM-01 发酵新鲜牛胆汁, 其中的胆红素含量增加了 2.35 倍, 胆酸含量增加了 2.13 倍。**结论** 综合对 NDZNM-01 菌株的形态观察、生理生化鉴定, 以及分子鉴定结果, NDZNM-01 属于一种能够耐受牛胆汁的柠檬酸杆菌属的肠道细菌, 具有高效转化牛胆汁为牛黄的活力。该牛黄转化细菌最终命名为 *Citrobacter bovis* NDZNM-01 Wang Houwei, 菌种收藏编号为 CGMCC24893。

关键词: 牛黄转化菌; 柠檬酸杆菌属; 牛胆汁; 体外培育牛黄; 分子鉴定

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5742-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.027

Isolation and identification of a bile-tolerant *Bovis Calculus* transforming bacteria and its transformation activity

WANG Hou-wei¹, DOU Yan-ling², ZHAO Jin-long¹, SUN Yan¹

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 China

2. School of Intelligence and Information Engineering, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To isolate and identify a Niu Huang (*Bovis Calculus*) transformed bacterium that can tolerate bovine bile, and apply it to the transformation of *Bovis Calculus* cultivated *in vitro*. **Methods** The strain (NDZNM-01) that could survive in bovine bile for a long time with high *Bovis Calculus* transformation ability was screened and isolated from bovine bile, which external morphology, physicochemical properties, taxonomic status, ability to tolerate bovine bile, and transformation activity of *Bovis Calculus* were observed and determined. **Results** According to the detection results of the external morphology and physiological and biochemical characteristics of NDZNM-01, it was preliminarily determined to be a bacterium of the genus *Citrobacter*. According to the results of cluster analysis of 16S rDNA sequence, it was shown that NDZNM-01 and the other three *Citrobacter* bacteria clustered into one branch, but formed a single line, belonging to a newly discovered strain. Using strain NDZNM-01 to ferment fresh bovine bile, the content of bilirubin increased by 2.35 times and the content of bile acid increased by 2.13 times. **Conclusion** Based on results of the morphological observation, physiological and biochemical identification, and molecular identification, it can be judged that strain NDZNM-01 belongs to an intestinal bacterium of the genus *Citrobacter* that can tolerate bovine bile, and has the activity of efficiently converting bovine bile into *Bovis Calculus*. The *Bovis Calculus* transformed bacterium was finally named *Citrobacter bovis* NDZNM-01 Wang Houwei, and the collection number was CGMCC24893.

Key words: *Bovis Calculus* transforming bacteria; *Citrobacter*; bovine bile; *Bovis Calculus* sativus cultivated *in vitro*; molecular identification

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013HM035); 济南科技发展计划资助项目(201102021); 山东省高校科技计划资助项目(J111LF29)

作者简介: 王厚伟, 研究生导师, 副教授, 研究方向为中药大健康生物技术与名贵特色中药研发。

Tel: 13791138419 E-mail: houweiw@163.com

*通信作者: 窦彦玲, 副教授, 从事计算机科学与技术研究。Tel: 15864533191 E-mail: yanlingdou@163.com

牛黄 *Bovis Calculus* 是牛科动物牛 *Bostaurus domestlcus* Gmel 在病理状况下于其胆囊或胆管内形成的结石的干燥品,属于名贵中药之一,具有清心、开窍、镇惊、清热、解毒等多种临床功效^[1],中医历代本草学家均认为:牛黄性凉,味苦而甘,入手少阴心经与足厥阴肝经^[2]。牛黄在中医临床上有广泛应用,约有 650 种中药成方制剂含有牛黄,包括安宫牛黄丸、犀黄丸、片仔癀等名贵中成药^[3]。然而,牛黄的自然产量十分稀少,自古皆有“药中之贵,莫复过此”之说^[4]。为解决供需矛盾,20 世纪 90 年代蔡红娇教授首先研制出体外培育牛黄,并收录于《中国药典》2000 年版^[5]。体外培育牛黄是模拟病理条件下牛胆结石形成过程,应用牛胆汁与微生物共培养转化而成,其化学成分与临床功效与天然牛黄相近,多数情况可等同于天然牛黄入药和临床应用^[6]。菌种的牛黄转化效率是体外培育牛黄及其生产成本的关键。但由于牛胆汁具有广谱性抑菌作用,使多数胆囊细菌不能较长时间耐受胆汁而存活,特别是一些高效牛黄转化菌在牛胆汁中的存活时间很难超过 48 h,严重影响体外培育牛黄的转化效率、生产成本和市场价格。本实验从形成牛黄的牛胆囊胆汁中分离鉴定出一种耐受胆汁的柠檬酸杆菌,对该菌株理化性状、分类学地位、牛胆汁耐受力,以及牛黄转化活力作了研究。

1 材料与仪器

1.1 材料

新鲜的含牛黄牛胆囊购自山东省滨州市阳信县肉牛屠宰与加工基地,经山东中医药大学中药鉴定教研室徐凌川教授鉴定为牛 *B. domestlcus* Gmel 的胆囊,用于从中分离耐受牛胆汁的牛黄转化菌。

1.2 仪器

HY-45A 型控温摇床(上海一恒有限公司),SJ-CJ-2F 型超净工作台(苏州苏信有限公司),GL-21M 型离心机(力康生物医疗科技有限公司),TF-FD-18S 型冷冻干燥机(上海舜制有限公司),MJX-250B 型生化培养箱(上海一恒有限公司),PCR-THG 型 PCR 仪(赛默飞有限公司),DYY-8C 型核酸电泳仪(北京六一有限公司)。

2 方法

2.1 耐牛胆汁型牛黄转化菌株的分离

2.1.1 固体培养基的制备 用于筛选耐胆汁牛黄转化细菌的培养基配方:胰蛋白胨 1.00 g,牛肉膏 0.30 g,氯化钠 0.50 g,加去离子水定容 100 mL,

加温溶解,冷却后调 pH 为 7.2,再煮沸 10 min,冷却后滤过分装,高压灭菌 30 min。配制固体培养基时加入 1.5 g 琼脂粉;配制半固体培养基时加入 0.3 g 琼脂粉。

2.1.2 牛黄转化菌的制备 取牛胆囊中的牛胆汁,在固体培养基上划线培养,于 37 °C 恒温培养 24 h 后,挑取分离度良好的单个菌落,分别接种于“2.1.1”项培养基中,做好编号,培养 24 h 后,各取 100 μ L 菌液加入至 50 mL 灭菌牛胆汁中,培养 96 h 后,再各取 10 μ L 涂布于固体培养基上,培养 72 h 后,计数菌落数量,将菌落数量大于 1000 的菌落指定为牛胆汁耐受菌株。根据《中国药典》2020 年版^[1]方法检测各培养耐受菌株的牛胆汁中胆红素与胆酸含量,将发酵牛胆汁中胆红素与胆酸含量超过天然牛胆汁 2 倍以上的菌落指定为牛黄转化菌。

2.2 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的形态学观察与生理生化鉴定

按照“2.1”项方法分离得到 46 个单菌落,用含 70%牛胆汁的液体培养基进行培养,每隔 1 d 取培养液进行菌体计数与胆红素和胆酸含量检测,选取一株胆红素和胆酸综合转化率高的耐胆汁菌株命名为 NDZNM-01,将菌株接种于“2.1.1”项固体培养基上,37 °C 培养 24 h 后,记录其菌落形态特征,进行革兰氏染色,进行形态学观察。取纯化的 NDZNM-01 菌种接种于“2.1.1”项所述液体培养基,37 °C,160 r/min 振荡培养 24 h,取 10 μ L 菌液接种细菌微量生化反应管,37 °C 培养 24~48 h,参照《伯杰细菌鉴定手册》进行生理生化鉴定实验^[7],包括革兰染色、葡萄糖和蔗糖发酵实验、柠檬酸盐和硝酸盐利用实验、乙酰甲基甲醇实验(V.P 实验)、淀粉水解实验、甲基红实验(M.R 实验),并根据参考文献方法^[8]进行胞外酶活性检测(接触酶、氧化酶、赖氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶)。

2.3 牛黄转化菌 NDZNM-01 的生长曲线测定

菌株 NDZNM-01 分别用“2.1.1”项所述液体培养基、含 60%牛胆汁的“2.1.1”项液体培养基、过滤除菌的牛胆汁进行培养,pH 为 7.2,培养温度为 37 °C,振荡培养(160 r/min),每隔 12 h 测定培养液吸光度(A_{560}),以对应的不接种菌株的培养液为对照,制作时间-吸光度曲线。

2.4 牛黄转化菌 NDZNM-01 的分子鉴定

采用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒

(DP302) 按试剂盒说明书提取菌株 NDZNM-01 的基因组 DNA。应用 BLASTn 程序对 GenBank 的 nr 数据库中收录的肠杆菌 16S rDNA 序列做多重比对, 根据比对结果选择保守的共有序列作为 PCR 扩增引物。正向 F 引物 (16 bp): 5'-CGCAAGCC-TGATGCAG-3'; 反向 R 引物 (16 bp): 5'-CTTCGCGTTGCATCGA-3'。PCR 反应体系 (25 μ L) 包含: DNA 模板 1.0 μ L, 5 $\times$ Buffer 3.0 μ L, F 引物 (10 μ mol/L) 和 R 引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, dNTP (2.50 mmol/L) 1 μ L, ddH₂O 定容至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 30 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 12 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 应用 TIANGEN (DP209) 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收, 委托上海生工生物工程公司完成测序。应用 BLASTn 程序检索 GenBank 的 nr 数据库, 对测得的 16S rDNA 序列做同源性比对。采用 Fast Minimum Evolution 法构建系统发育树, 建树 Max Seq Difference 值设为 0.1。应用 DNASTar 的 EditSeq 子程序进行序列统计分析。

2.5 发酵条件对 NDZNM-01 牛黄转化能力影响

根据《中国药典》2020 年版, 将菌株 NDZNM-01 分别接种到新鲜的牛胆汁中, 37 $^{\circ}$ C 连续震荡培养 (120 r/min) 14 d, 设置不接种菌种的同一批次牛胆汁作为空白对照, 每隔 1 天检测培养物 560 nm 光吸收值 (A), 根据上述《中国药典》2020 年版方法检测发酵牛胆汁中胆红素与胆酸的含量, 表示菌种 NDZNM-01 的牛黄转化能力^[1]。

2.5.1 发酵液 pH 值对菌株 NDZNM-01 牛黄转化能力影响 将菌株 NDZNM-01 接种到含 60% 牛胆汁的“2.1.1”项液体培养基中, 培养 3 d, 用柠檬酸和氢氧化钠溶液调节牛胆汁 pH 值, 取菌种培养液 5.0 mL 分别接种到 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 95.0 mL 牛胆汁中, 37 $^{\circ}$ C 条件下振荡培养 (120 r/min), 培养 7 d 后, 分别检测 560 nm A 值, 根据上述《中国药典》2020 年版检测牛胆汁中的胆红素和胆酸的含量。

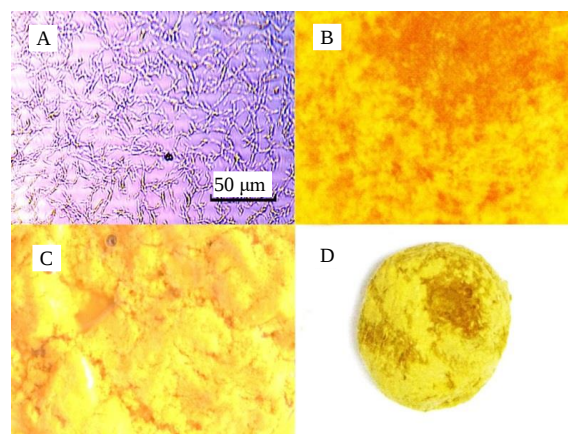
2.5.2 发酵温度对菌株 NDZNM-01 牛黄转化能力影响 取用含 60% 胆汁的“2.1”项培养基培养的菌株 NDZNM-01 培养液 5.0 mL 接种到 95.0 mL 新鲜牛胆汁中, 分别在 10、15、20、25、30、35 和 40 $^{\circ}$ C 条件下振荡 (120 r/min) 培养 16 d, 于 560 nm 检测菌体浓度, 根据上述《中国药典》2020 年版方法检

测牛胆汁中的胆红素和胆酸的含量。

3 结果与分析

3.1 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的形态观察和牛黄转化能力检测

按照“2.1.1”项方法, 分离到 46 个菌株能够耐受牛胆汁且具有牛黄转化能力。其中菌株 NDZNM-01 的牛黄转化能力较强, 在“2.1.1”项固体培养基上形成湿润低凸、表面光滑、边缘整齐、半透明的灰色圆形菌落, 革兰染色阴性, 光镜下呈短杆状, 两边钝圆, 周鞭毛, 无菌毛, 估算菌体大小约 2.5 μ m $\times$ 3.5 μ m (图 1)。



A-菌株 NDZNM-01 的形态特征 B-NDZNM-01 发酵牛胆汁形成牛黄颗粒浑浊液 C-NDZNM-01 发酵牛胆汁引发牛黄颗粒聚合成石过程 D-NDZNM-01 发酵牛胆汁引发牛黄颗粒聚合成型
A-morphological characteristics of strain NDZNM-01 B-NDZNM-01 fermented bovine bile to form *Bovis Calculus* granule turbid liquid C- polymerization of *Bovis Calculus* particles into lithogenesis by NDZNM-01 fermentation of bovine bile D- polymerization of *Bovis Calculus* granules by NDZNM-01 fermentation of bovine bile

图 1 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的形态观察及其牛黄转化能力

Fig. 1 Morphological observation and *Bovis Calculus* transformation ability of bovine bile-resistant bezoar transforming bacteria NDZNM-01

3.2 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的生理生化特征

菌株 NDZNM-01 的革兰氏染色、V. P 实验、淀粉水解、蔗糖发酵实验等显阴性, 葡萄糖、柠檬酸盐和硝酸盐利用实验、M. R 实验、接触酶检测等显阳性, 氧化酶、赖氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶活性检测等显阴性 (表 1)。将检测结果与《伯杰细菌鉴定手册》进行对比, 初步判定菌株 NDZNM-01 为柠檬酸杆菌属细菌。

表 1 菌株 NDZ-1 的生理生化性质

Table 1 Physio-chemical properties of strain NDZ-1

鉴定指标	菌株 NDZ-1	鉴定指标	菌株 NDZ-1
革兰染色	—	M.R 试验	+
葡萄糖	+	硝酸盐	+
柠檬酸盐	+	赖氨酸脱羧酶	—
接触酶	+	苯丙氨酸脱氨酶	—
氧化酶	—	蔗糖	—
V.P 试验	—	淀粉水解	—

“+”：阳性或有反应；“—”：阴性或没反应

“+”：positive；“—”：negative or no reaction

CGCAAGCCTG	ATGCAGCCAT	GCCGCGTGTA	TGAAGAAGGC	CTTCGGGTG	50
TAAAGTACTT	TCAGCGAGGA	GGAAGGTGTT	GTGGTTAATA	ACRCAGCAA	100
TTGACGTTAC	TCGCAGAAGA	AGCACCGGCT	AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	150
GGTAATACGG	AGGGTGCAAG	CGTTAATCGG	AATTACTGGG	CGTAAAGCGC	200
ACGCAGGCGG	TCTGTCAAGT	CGGATGTGAA	ATCCCCGGGC	TCAACCTGGG	250
AACTGCATCC	GAAAATGGCA	GGCTCGAGTG	TAGTAGAGGG	GGGTAGAATT	300
CCAGGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGAGATC	TGGAGGAATA	CCGGTGGCGA	350
AGGCGGCCCC	CTGGACAAAG	ACTGACGCTC	AGGTGCGAAA	GCGTGGGGAG	400
CAACACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGTCGACTT	450
GGAGGTTGTG	CCCTTGAGGC	GTGGCTTCCG	GAGCTAACGC	GTTAAGTCGA	500
CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTTAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG	550
GCCCCGACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAG	598

方框内突出显示的碱基为 NDZNM-01 的特征性碱基位点

The bases highlighted in □ are the characteristic base sites of NDZNM-01

图 2 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的 16S rRNA 基因扩增片段测序结果

Fig. 2 Sequencing results of 16S rRNA gene fragment of bovine bile-resistant *Bovis Calculus* transforming bacteria NDZNM-01

581-A。应用 Fast Minimum Evolution 法构建系统发育树,菌株 NDZNM-01 与其他 3 种柠檬酸杆菌属的细菌聚在一个分支上,形成单系(图 3)。

综合以上对菌株 NDZNM-01 的形态观察、生理生化鉴定,以及分子鉴定结果,可以判断菌株 NDZNM-01 属于一种柠檬酸杆菌属的肠道细菌,初步命名为 *Citrobacter bovis* NDZNM-01。

3.4 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的生长曲线

将 NDZNM-01 单菌落接种于 5 mL 方法“2.1.1”项所述液体培养基中,37 °C 震荡培养 6 h 后,再取其中 1 mL 菌液接种于含 100 mL 液体培养基中进行振荡培养,每隔 1 d 测量菌体密度(OD_{560}),以 OD_{560} 值为纵坐标,以培养时间为横坐标制作生长曲线。由图 4 可见,菌株 NDZNM-01 的停滞期在 48 h 以内,此后便进入了到菌体密度快速增长的对数增长期,培养至 96 h 时菌体密度最大,此后继续培养 4 d,菌体密度开始缓慢下降。

3.3 耐牛胆汁型牛黄转化菌 NDZNM-01 的分子鉴定与系统分类

菌株 NDZNM-01 的 16S rRNA 的基因片段的测序结果如图 2 所示。序列总长度为 598 bp, (C+G) 含量为 55.69%。

应用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 提供的 BLASTn 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索 rRNA/ITS databases 数据库,结果显示,菌株 NDZNM-01 的 16S rRNA 基因扩增片段与柠檬酸杆菌属对应序列的相似度大于 98%,特征性碱基位点包括 265-A、275-C、280-G、282-A、537-A、

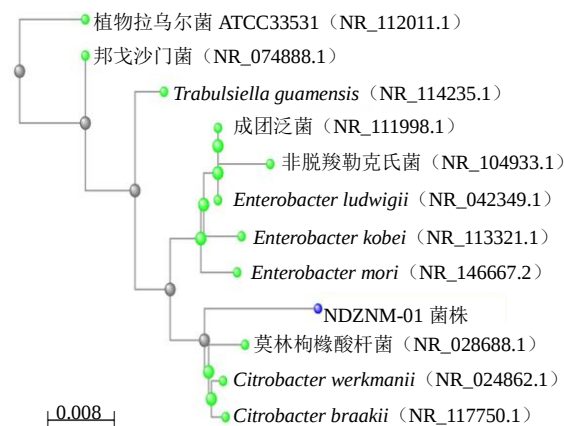


图 3 基于 Fast Minimum Evolution 法构建的菌株 NDZNM-01 及其近缘菌株 16S rRNA 基因片段序列的无根系统发育树

Fig. 3 Rootless phylogenetic tree of 16S rRNA gene fragment sequence of strain NDZNM-01 and its related strains based on the Fast Minimum Evolution method

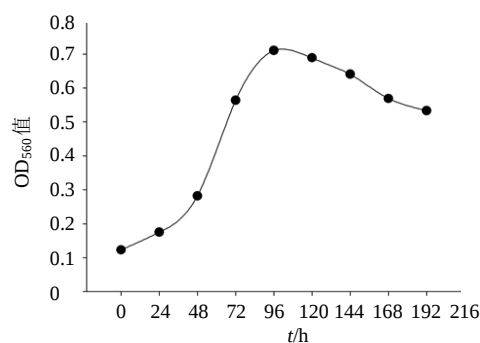


图4 NDZNM-01的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain NDZNM-01

3.5 发酵 pH 值对 NDZNM-01 的牛黄转化能力的影响

按照“2.5.1”项方法,取 5.0 mL 的 NDZNM-01 菌液 ($OD_{560}=0.505$) 接种到 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 95.0 mL 牛胆汁进行振荡培养,测定牛胆汁中的胆红素和胆酸的含量,作出 pH-胆红素、胆酸转化率曲线。由图 5 可见,菌株 NDZNM-01 在 pH 7.5 时发酵牛胆汁中胆红素含量最高,为 16.75%,在 pH 6.5 时胆酸含量最高,为 5.16%,而未发酵牛胆汁中胆红素含量仅为 7.14%,胆酸含量为 2.42%。由此可见,经菌株 NDZNM-01 发酵的牛胆汁中胆酸和胆红素含量极显著提高,其中胆红素含量增加了 2.35 倍,胆酸含量增加了 2.13 倍。

由图 5 可见,牛胆汁的 pH 值对菌株 NDZNM-01 的胆酸与胆红素的转化率影响不一致,胆红素在偏碱性条件下转化率高,而胆酸则在偏酸性环境下转化率高。其中胆酸含量远超过中国药典标准,因此发酵牛胆汁的 pH 值以优先满足胆红素的转化为原

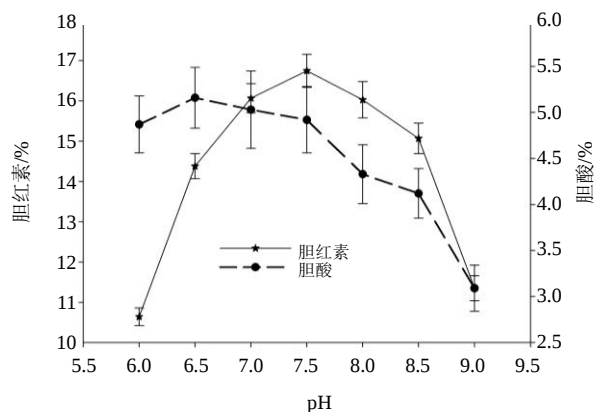


图5 牛胆汁 pH 值对 NDZNM-01 牛黄转化率的影响

Fig. 5 Effect of pH value of bovine bile on *Bovis Calculus* conversion rate of NDZNM-01

则。综合 2 方面因素,菌株 NDZNM-01 的牛黄转化效率以发酵胆汁的 pH 值为 7.2 为佳, pH 过高和过低都不利于牛黄转化。

3.6 发酵温度对菌株 NDZNM-01 牛黄转化能力的影响

按照“2.5.2”项方法,接种 5.0 mL 的 NDZNM-01 培养液 ($OD_{560}=0.505$) 于 95.0 mL 新鲜牛胆汁中,分别在 10、15、20、25、30、35、40 °C 条件下振荡 (120 r/min) 培养 16 d,按照“2.1.2”项方法检测牛胆汁中的胆红素和胆酸的含量。从图 6 可见,菌株 NDZNM-01 在 30 °C 培养时,发酵至 16 d 胆酸含量最高,达到 6.42%;在 25 °C 和 30 °C 培养时,发酵至 14 d 胆酸转化率进入缓慢增长期;在 35 °C 和 40 °C 培养时,发酵至 12 d 胆酸转化率进入缓慢增长期;在胆汁的发酵温度为 10、15、20 °C 时,胆酸含量与发酵时间正相关,未出现缓慢增长期。

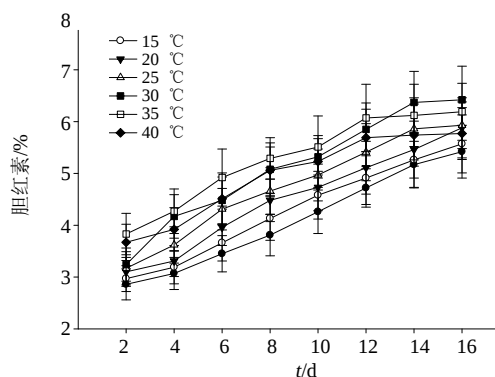


图6 发酵温度对 NDZNM-01 胆酸转化能力的影响

Fig. 6 Effect of culture temperature on bile acid conversion ability of strain NDZNM-01

从图 7 可见,菌株 NDZNM-01 在牛胆汁中的发酵温度为 30 °C 培养时,发酵至 16 d 胆红素含量最高,达到 2.01%,在发酵至 14 d 时胆红素转化率进入缓慢增长期;发酵温度为 35、40 °C 时,发酵至 12 d 胆红素转化率进入缓慢增长期;在发酵温度为 10、15、20、25 °C 时,胆红素含量与发酵时间正相关,未出现缓慢增长期。

4 讨论

天然牛黄是牛病理性胆囊结石,微生物感染胆囊是胆囊胆汁形成牛黄结石的病理性条件之一^[8]。但牛胆汁本身具有广谱性抑菌作用,多数肠道细菌无法在牛胆汁中存活,更不具有牛黄转化能力^[9]。

因此,筛选既具有牛黄转化活性又能长时间存

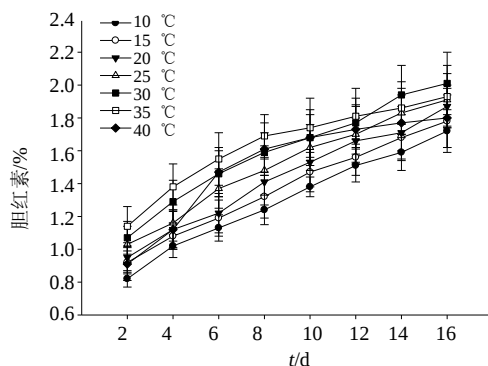


图 7 发酵温度对 NDZNM-01 胆红素转化能力的影响

Fig. 7 Effect of culture temperature on bilirubin transformation ability of strain NDZNM-01

活于牛胆汁中的微生物菌种是应用牛胆汁为底物发酵生产体外培育牛黄的关键。鉴于多数肠道细菌在牛胆汁中的存活时间难以超过 48 h，筛选耐受牛胆汁的高效牛黄转化菌，是提高体外培育牛黄生产效率，降低生产成本的关键。

本研究从形成牛黄的胆囊胆汁中分离得到 46 株细菌，鉴定出一种能够长时间耐受牛胆汁的菌株 (NDZNM-01)，该菌株具有较高的牛黄转化效率。根据对 NDZNM-01 生理生化鉴定结果，初步判定菌株 NDZNM-01 为柠檬酸杆菌属细菌。根据 NDZNM-01 的 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增、测序与聚类分析结果，菌株 NDZNM-01 与其他 3 种柠檬酸杆菌属的细菌聚在一个分支上，但形成单系，属于新发现的菌株。综合对菌株 NDZNM-01 的形态观察、生理生化鉴定，以及分子鉴定结果，可以判断菌株 NDZNM-01 属于一种柠檬酸杆菌属的肠道细菌。

应用菌株 NDZNM-01 发酵新鲜牛胆汁，其中的胆酸和胆红素含量极显著提高。在发酵温度为 30 °C 培养时，发酵 16 d 的胆红素与胆酸的含量分别达到 2.01% 和 6.42%，胆红素含量比天然牛胆汁增加了 2.35 倍，胆酸含量增加了 2.13 倍。最终，我们将该牛黄转化细菌命名为 *Citrobacter bovis*

NDZNM-01 Wang Houwei，并交由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏（编号：CGMCC24893，日期：2022.05.12），一并申请国家发明专利保护。本研究首次报道了一种柠檬酸杆菌属的牛黄转化菌株，这与以往应用大肠杆菌作为牛黄转化菌株不同，具有原始创新性。今后将进一步应用途径工程技术对该牛黄转化菌株进行遗传改造，提升其牛黄转化效率。本研究结果为实现体外培育牛黄生产的降本增效，实现牛黄的普惠众生和振兴中医药事业具有一定的影响和意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 181.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会, 中华本草 (第九册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社出版, 1999: 694.
- [3] 赵国平, 戴慎, 陈仁寿, 南京中医药大学编著. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 565.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 208.
- [5] 吴涛, 张程亮, 蔡红娇, 等. 牛黄及体外培育牛黄的药理作用研究进展 [J]. 中国药师, 2014, 17(8): 1396-1399.
- [6] 蔡红娇, 裘法祖, 刘仁则. 体外培育牛黄的药学研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 335-338.
- [7] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯, 等. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-759.
- [8] Levine M, Lohinai Z M. Resolving the contradictory functions of lysine decarboxylase and butyrate in periodontal and intestinal diseases [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(11): 2360.
- [9] Białucha A, Gospodarek-Komkowska E, Kwiecińska-Piróg J, et al. Influence of selected factors on biofilm formation by *Salmonella enterica* strains [J]. *Microorganisms*, 2020, 9(1): 43.
- [10] Willem M de Vos, Herbert T, Matthias V H, et al. Gut microbiome and health: Mechanistic insights [J]. *Gut*, 2022, 71(5): 1020-1032.

[责任编辑 时圣明]