

降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及益生特性探索

任宇杰^{1,2}, 单成俊¹, 王英¹, 张会¹, 刘浩男¹, 刘小莉^{1,2}, 周剑忠^{*1,2}

1 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014

2 南京农业大学食品科学与技术学院, 江苏 南京 210095

任宇杰, 单成俊, 王英, 张会, 刘浩男, 刘小莉, 周剑忠. 降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及益生特性探索[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 541-552.

REN Yujie, SHAN Chengjun, WANG Ying, ZHANG Hui, LIU Haonan, LIU Xiaoli, ZHOU Jianzhong. Screening of purine nucleoside-degrading lactic acid bacteria and exploration of its probiotic properties[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 541-552.

摘要:【背景】高尿酸血症是人体内嘌呤代谢紊乱导致的一种慢性代谢疾病, 利用乳酸菌降解嘌呤类物质是辅助治疗高尿酸血症的新方法。【目的】筛选高效降解嘌呤核苷的乳酸菌并对其益生特性进行研究。【方法】利用 HPLC 法评价乳酸菌对肌苷、鸟苷的降解效果。通过药敏性试验、体外耐受性试验及细胞黏附试验研究目标菌株的益生特性。【结果】筛选出一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) SR2-6, 对肌苷和鸟苷的降解率分别为 99.26%和 98.85%。该菌株对青霉素、氯霉素等 5 种常见抗生素不具备耐药性, 在 pH 2.0 环境下处理 4 h 后菌株的存活率为 76.51%, 在饱腹状态下的人工肠液模拟消化 4 h 后活菌数仍能达到 6.85 lg (CFU/mL), 对 Caco-2 细胞的黏附数为 (52.29±15.14) CFU/cell。【结论】发酵乳杆菌 SR2-6 能够高效降解肌苷和鸟苷且具有优良的益生特性, 是预防和治疗高尿酸血症的潜在优势菌株, 可作为优势菌种资源应用于相关功能产品的开发。

关键词: 乳酸菌; 肌苷; 鸟苷; 益生特性

资助项目: 江苏省重点研发计划(BE2020380); 江苏省科技支撑项目(BE2019307)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2020380) and the Science and Technology Support Project of Jiangsu Province (BE2019307).

*Corresponding author. E-mail: zjzluck@126.com

Received: 2022-04-30; Accepted: 2022-06-17; Published online: 2022-08-05

Screening of purine nucleoside-degrading lactic acid bacteria and exploration of its probiotic properties

REN Yujie^{1,2}, SHAN Chengjun¹, WANG Ying¹, ZHANG Hui¹, LIU Haonan¹, LIU Xiaoli^{1,2}, ZHOU Jianzhong^{*1,2}

1 Institute of Agri-Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China
2 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Hyperuricemia is a chronic metabolic disease caused by the disorder of purine metabolism and lactic acid bacteria can degrade purines. [Objective] To screen lactic acid bacteria that efficiently degrade purine nucleoside and analyze the probiotic properties. [Methods] High performance liquid chromatography was used to determine the strain with the strongest ability to degrade inosine and guanosine. What's more, probiotic properties of the target strain were studied by drug sensitivity test, *in vitro* tolerance tests, and cell adhesion test. [Results] *Lactobacillus fermentum* SR2-6 was screened out, which had the highest degradation rates of inosine and guanosine (99.26% and 98.85%, respectively). This strain showed no resistance to five common antibiotics such as penicillin and chloramphenicol. The survival rate of the strain was 76.51% after treatment under pH 2.0 for 4 h. The count of the viable bacteria was up to 6.85 lg (CFU/mL) after 4 h treatment in artificial satiety intestinal juice. The number bacteria adhered to Caco-2 cells was (52.29±15.14) CFU/cell. [Conclusion] SR2-6 can efficiently degrade inosine and guanosine, with excellent probiotic properties. It is a potential superior strain for the prevention and adjuvant treatment of hyperuricemia and can be applied into the development of related functional products.

Keywords: lactic acid bacteria; inosine; guanosine; probiotic characteristics

高尿酸血症是由于人体内嘌呤代谢紊乱引起的代谢性疾病^[1], 极易发展为肾结石、痛风及心血管疾病。高嘌呤食物的过量摄入是引发高尿酸血症的重要原因之一, 患者需要进行严格的饮食控制, 但长此以往可能会引起营养不均衡, 影响患者的日常生活^[2]。目前对于此类疾病的治疗主要从促进尿酸排泄和控制尿酸生成两方面进行, 但已知的药物如别嘌呤醇和苯溴马隆^[3]的长期使用会对人体产生副作用。因此, 寻求一种高效、精准且无副作用的治疗方法是患者的迫切需求。

有研究表明, 乳酸菌可通过在肠道定殖, 减少小肠上皮细胞对尿酸的前体物质即嘌呤核苷

的吸收, 进而降低尿酸生成量, 缓解高尿酸血症^[4]。杨殿斌^[5]发现乳杆菌 DM9128 通过降解肌苷和鸟苷降低小鼠血清中尿酸水平。金方^[6]发现干酪乳杆菌 ZM15 能够高效降解核苷类物质, 同时可能是通过与肠道上皮细胞竞争吸收相应核苷酸与核苷, 从而使高尿酸血症大鼠的尿酸水平显著降低。目前, 我国关于天然乳酸菌治疗高尿酸血症的研究还较少, 菌株的益生特性也有待研究。

本研究运用 HPLC 方法筛选高效降解肌苷和鸟苷的乳酸菌。采用药敏性、耐酸、耐胆盐、耐体外模拟胃肠道消化环境及细胞黏附试验研究菌株的益生特性, 为高尿酸血症的预防和辅助治疗提供新型菌种资源, 应用价值广阔。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种来源

研究所用 56 株乳酸菌分离自不同发酵食品, 包括贵州酸肉、贵州酸汤、新疆酸马奶、骆驼奶、酸菜、开菲尔、藏灵菇和发酵剂。样品来源及每种样品分离的菌株如表 1 所示。实验所用菌株均保存在江苏省农科院农产品加工研究所食品生物工程创新团队实验室。

1.1.2 培养基和主要试剂、仪器

MRS 肉汤培养基(g/L)^[7]: 蛋白胨 10.00, 牛肉粉 5.00, 葡萄糖 20.00, 酵母粉 4.00, 乙酸钠 5.00, 磷酸氢二钾 2.00, 硫酸镁 0.20, 柠檬酸三铵 2.00, 硫酸锰 0.05, 吐温-80 1.00 mL。肌苷、鸟苷标准品、别嘌呤醇, 上海阿拉丁试剂有限公司; 抗菌药物药敏纸片, 上海舜申生物科技有限公司; 胰蛋白酶、胃蛋白酶, 北京索莱宝科技有限公司; 胆盐, 默克生命科学有限公司; DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液和 0.25%胰酶-EDTA 溶液, Gibco 生物科技公司; 无菌 DPBS, 上海白鲨生物科技有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 南京森贝伽生

物科技有限公司。

高效液相色谱仪, Agilent 公司; 冷冻离心机, Sigma 公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 恒温振荡摇床, 天津欧诺仪器股份有限公司; 细胞培养箱, Thermo Fisher 科技公司; 显微镜, Nikon 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌种活化

将冻存在甘油管中的菌液以 4% (体积分数)接种于 MRS 肉汤培养基, 37 °C 静置培养 24 h 后进行平板划线并挑取单菌落, 并以 4%接种量在相同条件下二次活化, 得到菌体培养液。

1.2.2 高效降解肌苷、鸟苷乳酸菌的筛选

将菌体培养液以 5% (体积分数)接种于 MRS 肉汤培养基中, 37 °C 静置培养 24 h 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 用 0.85% 生理盐水将菌体浓度调整为 1×10^8 CFU/mL^[8]。取 2 mL 菌悬液离心后重悬于 750 μ L 500 mg/L 肌苷-鸟苷-磷酸盐缓冲液(pH 6.8), 于 37 °C、120 r/min 振荡反应 1 h, 离心后收集 720 μ L 上清液, 加入 80 μ L 反应终止剂(0.1 mol/L HClO₄)^[9]。样品经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后取

表 1 分离菌株及对应样品来源

Table 1 Isolated strains and corresponding sample sources

Sample	Source	Isolated strains	Number of strains
Sour pork	Dong farmers in Guizhou	SR2-6, SR2-3, SR2-6-1, SR3-2, SR4-5	5
Sour soup	Dong farmers in Guizhou	SS3-1, SS3-2	2
Horse yogurt	Xinjiang farmers	G-C-1, G-C-2, 1-1, 1-3, 5-5, L9-1, Y11-4, Y9-3	8
Camel yogurt	Xinjiang farmers	AL07, MM5, 3-5, L1, L2, L4, L5, L7, L8, L13, L15, L16, L20, L21, L22, L23, L31, M9-4, M-M2, M-M8, M10-3, M407	22
Sauerkraut	Natural fermentation	GS7, B ₁ L ₄ , 9sh, K ₁ M, ArnC1, MX-1, B1L2	7
Kefir	Jiangxi sampling	Gd4, Axn-1, FL6, JX5	4
Tibetan spirit mushroom	Ordinary Tibetan families	AM-2, Y401, LX	3
Starter culture	Commercial product	d2, d3, LGG, LGGd, AL3	5

10 μL 用于 HPLC 检测。色谱条件^[10]: 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 保留时间 15 min, 测定波长 260 nm, 流动相组成为甲醇:0.2%醋酸水体积比 5:95。肌苷和鸟苷降解率及降解速率计算公式:

$$\alpha\% = (0.9C_{\text{母液}} - C_{\text{残留}}) / 0.9C_{\text{母液}} \quad (1)$$

$$v = (0.9C_{\text{母液}} - C_{\text{残留}}) / 60 \quad (2)$$

式中: C 为浓度 (mg/L); v 为降解速率 [mg/(L·min)]。

1.2.3 乳酸菌生理生化鉴定

对筛选所得的菌株进行过氧化氢酶、精氨酸双水解、淀粉水解、明胶液化、V-P 试验、吲哚、硝酸盐还原试验、硫化氢、接触酶、七叶苷试验及糖醇物质发酵试验, 观察试剂颜色变化及产气现象, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11]初步鉴定其种属。

1.2.4 乳酸菌分子生物学鉴定

使用 Omega 微生物 DNA 提取试剂盒提取 1.2.2 中确定的高效降解肌苷、鸟苷的乳酸菌基因组, 并用 PCR 仪扩增其 16S rRNA 基因片段。PCR 反应体系参考 Moreno 等^[12]的方法并加以适当改进。菌株的测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析, 确定其种属。

1.2.5 药敏性试验

在 MRS 固体平板上涂布 200 μL SR2-6 菌液, 每个平板上均匀放置 3 片同一种抗生素药敏纸片, 包括青霉素、氯霉素、复方新诺明、克林霉素、环丙沙星、红霉素、四环素、庆大霉素、头孢曲松和氨苄西林共 10 种抗生素。将上述平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。以 NCCLS 药敏性标准^[13]对结果进行判读。

1.2.6 耐酸性试验

将 SR2-6 培养液以 5% 浓度分别接种于 pH 6.2、4.0、3.0、2.0 的 MRS 肉汤培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$

静置培养 4 h, 分别在 0、1、2、4 h 取样进行活菌计数。

1.2.7 耐胆盐试验

将 SR2-6 培养液以 5% 浓度分别接种于无胆盐、含 0.3% 胆盐的 MRS 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 5 h, 分别在 0、1、3、5 h 取样进行活菌计数^[14]。

1.2.8 人工胃肠液体外模拟消化试验

体外模拟消化试验在空腹和饱腹 2 种状态下进行^[10,15]。空腹、饱腹状态下的人工胃液分别为 pH 2.0、3.0 的胃蛋白酶溶液。取 3 mL 菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 用 0.85% 生理盐水清洗 2 次后重悬于 3 mL 人工胃液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡反应 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将菌体沉淀重悬于 2 mL 人工肠液中, 振荡反应 4 h。在此过程中, 分别在 0、2、4、6 h 进行活菌计数, 以不加样品的人工胃液或肠液为空白对照。

1.2.9 黏附 Caco-2 细胞能力测定

参考朱艳等^[16]的方法, 将传代 3 次后的 Caco-2 细胞密度调整为 1×10^5 cells/mL, 以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中, 待细胞生长为致密单层状态时待用。进行黏附试验前 24 h, 需要提前更换为含血清无双抗 DMEM 培养基。细胞培养好后第一孔用胰酶消化, 采用血球计数板对细胞数目进行计数。取 2 mL 培养至 10^9 CFU/mL 的菌液, 用 DMEM 培养基将菌体重悬后分别加入到其余 5 个孔中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 1 h, 用 DPBS 溶液清洗细胞表面未黏附的乳酸菌, 加入 250 μL 的 0.25% 胰酶-EDTA 消化 5 min, 后用 250 μL DMEM 培养液 (含 10% FBS) 终止消化。对每孔中黏附在细胞上的乳酸菌进行活菌计数, 以未进行黏附试验的原始乳酸菌作为对照。黏附数及黏附率按照计算公式: 乳酸菌黏附数 (CFU/cell) = 每孔内黏附的乳酸菌

总数/每孔的细胞总数 (3)

乳酸菌黏附率=(lg CFU_{黏附后乳酸菌}/lg CFU_{黏附前乳酸菌})×100% (4)

1.2.10 乳酸菌活菌计数

乳酸菌活菌计数参考文献[17]进行。取 1 mL 菌体培养液或重悬液加入 9 mL 0.85%生理盐水进行梯度稀释, 分别取 3 个合适稀释度(10⁴–10⁸)的 1 mL 稀释液加入到无菌平皿后, 倒入无菌 MRS 培养基混匀, 待其凝固后将平皿倒置, 于 37 °C 培养箱培养 48 h 后进行菌落计数。

1.2.11 数据处理与统计分析

所有实验数据均平行测定 3 次, 数据以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较不同处理之间的显著性差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌降解肌苷、鸟苷能力比较

由图 1A 可知, 鸟苷在本色谱条件下的保留时间为 11.33 min, 肌苷的保留时间为 12.39 min。标准曲线方程分别为: $A_{\text{鸟苷}}=18.960\ 87x-5.745\ 27$,

$R^2=0.999\ 97$; $A_{\text{肌苷}}=28.119\ 02x-6.631\ 61$, $R^2=0.999\ 98$, A : 峰面积; x : 浓度(mg/L)。由图 1B 可知, 样品与标品的保留时间基本一致, 该色谱条件可用于肌苷和鸟苷的测定。

本研究选择 56 株乳酸菌株作为初筛菌株, 结果显示, 不同菌株间降解肌苷和鸟苷的能力差别很大, 有 35 株菌对肌苷和鸟苷的降解率在 20%以下, 有 7 株菌对肌苷和鸟苷的降解率为 20%–50%。由表 2 可知, 对肌苷和鸟苷降解率高于 50%的菌株有 14 株, 其中菌株 SR2-6、d2、AL07、SS3-2、LGGd 的降解率达到 95%以上。降解能力最强的菌株 SR2-6 对鸟苷的降解率为(98.85±1.14)%, 降解速率为(6.20±0.11) mg/(L·min); 对肌苷的降解率为(99.26±0.04)%, 降解速率为(5.90±0.11) mg/(L·min)。该菌株相较于麻菊美^[8]筛选出的弯曲乳杆菌 5-1 及肖源勋等^[18]筛选出的 *Lactobacillus casei*-S12, 对肌苷、鸟苷的降解率分别高出 11.15%、6.06%和 65.43%、97.70%。实验表明, 对肌苷降解作用强的乳酸菌同样对鸟苷也显示出较强的降解作用。这可能是由于乳酸菌胞内可

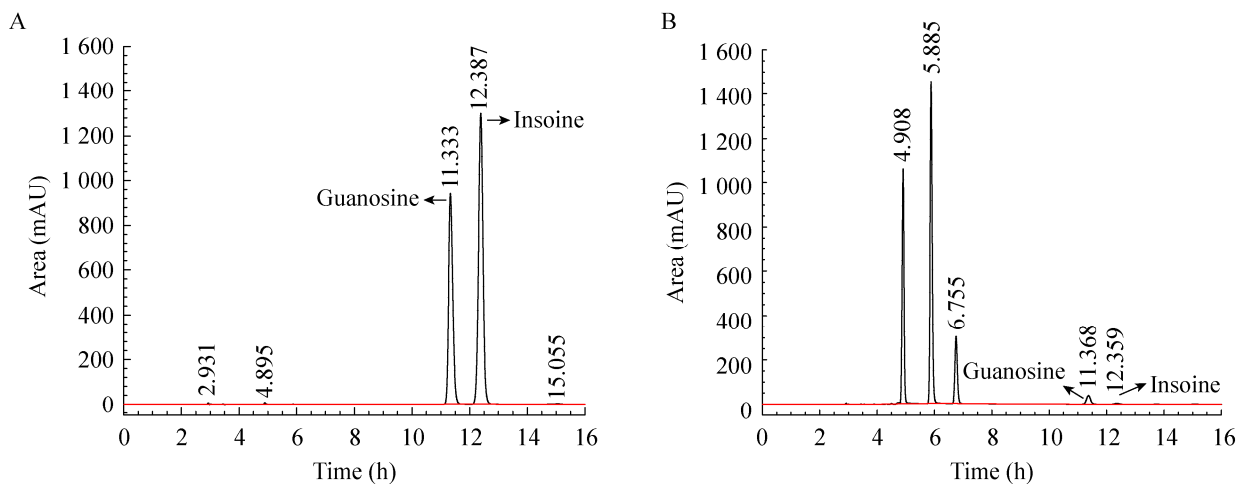


图 1 鸟苷和肌苷色谱图 A: 鸟苷和肌苷标准品色谱图; B: 经菌株 SR2-6 降解后的鸟苷肌苷色谱图
Figure 1 Chromatogram of guanosine and inosine. A: Chromatogram of guanosine and inosine. B: Chromatogram of guanosine and inosine degraded by strain SR2-6.

表 2 降解肌苷、鸟苷 50% 以上的乳酸菌

Table 2 Lactic acid bacteria that degrade inosine and guanosine more than 50%

Strain	Guanosine		Inosine	
	Degrading rate (%)	Degrading velocity (mg/(L·min))	Degrading rate (%)	Degrading velocity (mg/(L·min))
SR2-6	98.85±1.14	6.20±0.11	99.26±0.04	5.90±0.11
d2	98.07±2.05	6.20±0.14	99.03±1.49	5.87±0.08
AL07	98.11±1.41	6.23±0.11	99.04±1.44	5.90±0.08
SS3-2	97.59±2.84	6.12±0.20	98.42±2.26	5.85±0.13
LGGd	98.68±1.64	6.20±0.11	98.62±2.75	5.85±0.16
GS7	91.46±5.48	5.75±0.34	84.59±9.79	5.31±0.62
G-C-1	89.13±3.38	5.61±0.20	80.17±6.70	5.04±0.43
d3	86.78±8.10	5.44±0.51	77.80±3.59	4.88±0.86
1-3	81.94±5.49	5.15±0.34	69.72±6.89	4.37±0.43
Gd4	72.28±5.30	4.53±0.65	59.63±1.86	3.73±0.75
SS3-1	71.81±9.16	4.50±0.57	58.80±7.99	3.70±0.51
AM-2	70.35±8.46	4.42±0.51	57.30±7.61	3.59±0.48
JX5	68.18±4.82	4.28±0.31	54.59±4.25	3.43±0.27
B1L4	55.53±3.14	3.48±0.20	47.69±3.03	3.00±0.19

能存在能够降解这类嘌呤核苷物质的核苷水解酶^[19]。对降解效果进行比较后,选择降解率最高的菌株 SR2-6 进行下一阶段的试验。

2.2 菌株 SR2-6 生理生化反应鉴定结果

菌株 SR2-6 生理生化实验结果如表 3 所示,该菌株能够发酵葡萄糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、棉籽糖并产酸产气,而且能够利用山梨醇,但不能利用甘露醇和淀粉且其他生化实验的反应结果均为阴性。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11]可初步判断菌株 SR2-6 为乳酸杆菌属。

2.3 菌株 SR2-6 的 16S rRNA 基因测序结果

在 NCBI 网站上经 BLAST 分析比对序列,菌株 SR2-6 与发酵乳杆菌 HBUAS62195 的相似性高达 99.86%。采用 MEGA-X 软件构建的系统发育树如图 2 所示,由此可推断菌株 SR2-6 属于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)。

2.4 抗生素耐受能力评价

联合国粮农组织^[20]要求益生菌不应具有可转移的耐药性。因此,提前了解乳酸菌的抗生素敏感性有助于开发安全健康的乳酸菌制剂。

表 3 菌株 SR2-6 生理生化反应结果

Table 3 Physiological and biochemical reaction results of strain SR2-6

Item	Result
Glucose	+
Galactose	+
Fructose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Xylose	+
Arabic candy	±
Sorbitol	+
Mannitol	-
Cottonseed sugar	+
Catalase	+
Double hydrolysis of arginine	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin liquefaction	-
V-P test	-
Indole test	-
Nitrate reduction	-
Hydrogen sulfide	-
Esculin	-

+: 阳性反应; -: 阴性反应; ±: 弱阳性反应

+: Positive reaction; -: Negative reaction; ±: Weak positive reaction.

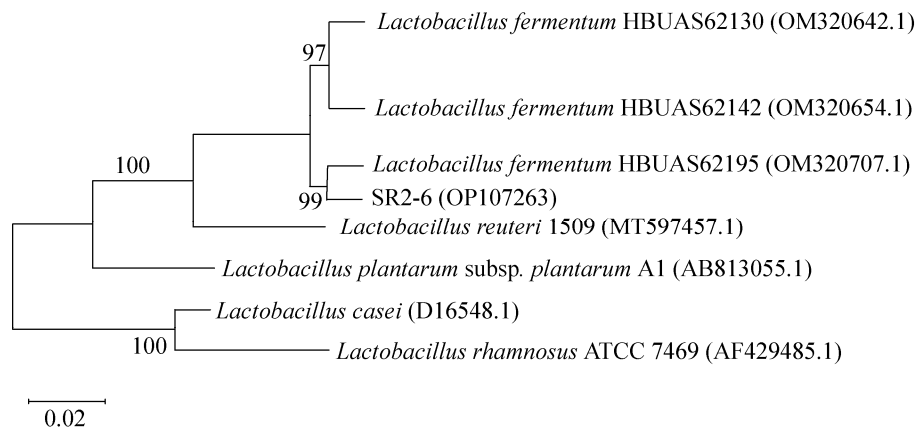


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 菌株名称后括号中的序号代表该菌株在 NCBI 网站上的 GenBank 登录号; 进化树分支点上的数字为该分支的 bootstrap 值, 值越大表示该分支的置信度越高; 进化树标尺 0.02 表示该长度的分支代表基因组的遗传变异度为 0.02 (%)

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of isolate and sequences of relating species. The serial number in brackets suffixed with the strain name represents the GenBank accession number on the NCBI website of the strain; The number on the branch point of the evolutionary tree is the bootstrap value of the branch, the larger the value, the higher the confidence of the branch; The phylogenetic tree scale of 0.02 indicates that the branch of this length represents the genetic variability of the genome is 0.02 (%).

由表 4 分析可知, 菌株 SR2-6 对青霉素、氯霉素、林可霉素、红霉素、头孢曲松敏感, 对庆大霉素中等程度敏感, 对复方新诺明、环丙沙星、四环素、氨苄西林不敏感。其中, 发酵乳

杆菌 SR2-6 对青霉素的敏感性最强, 抑菌圈直径为(3.07±0.09) cm, 对氨苄西林的敏感性最弱, 抑菌圈直径为 0 cm。

2.5 发酵乳杆菌 SR2-6 耐酸能力

乳酸菌要发挥益生功能, 首先要具备抵御人体胃酸低 pH 值的能力。胃部的 pH 值一般在 2.0–4.0 范围变化, 本实验设置了 pH 2.0、3.0、4.0 这 3 个梯度考察菌株 SR2-6 的耐酸能力。由图 3 可知, 随着处理时间的增加, 对照组和 pH 4.0 组的乳酸菌活菌数均呈上升趋势, pH 3.0 与 pH 2.0 处理组的活菌数略有降低。由于菌株 SR2-6 培养 24 h 后的发酵液 pH 值为 3.83, 因此 pH 4.0 环境对该株乳酸菌的正常存活并不会造成干扰。与之类似的是, 麻菊美筛选出的 *L. curvatus* 8 在 pH 4.0 条件下其活菌数也有 0.3 lg (CFU/mL) 的小幅上升^[8]。菌株 SR2-6 在 pH 3.0 环境中处理 4 h 后的存活率为 97.05%。在 pH 2.0 的强酸性环境下, 菌株 SR2-6 的活菌数有所下降, 4 h 后

表 4 不同抗生素抑菌圈结果

Table 4 Results of inhibition zone of different antibiotics

Antibiotics	Diameter of inhibition zone (cm)	Sensitivity level
Penicillin	3.07±0.09	S
Chloramphenicol	2.50±0.04	S
Cotrimoxazole	0.61±0.01	R
Clindamycin	2.45±0.06	S
Ciprofloxacin	0.63±0.00	R
Erythromycin	2.48±0.16	S
Tetracycline	1.11±0.06	R
Gentamicin	1.22±0.03	I
Ceftriaxone	2.61±0.19	S
Ampicillin	0.00±0.00	R

S: 敏感; I: 介于敏感与不敏感之间; R: 不敏感^[13]

S: Sensitive; I: Between sensitive and insensitive; R: Insensitive^[13].

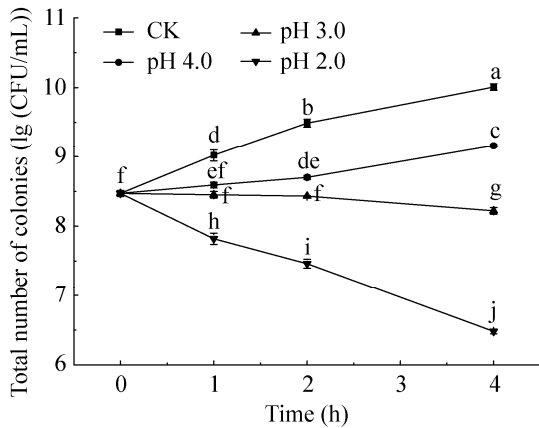


图3 发酵乳杆菌SR2-6耐酸能力 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 3 Tolerability of *Lactobacillus fermentum* SR2-6 to acid. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

仍能达到 6.48 lg (CFU/mL), 存活率为 76.51%, 说明 *Lactobacillus fermentum* SR2-6 具备抵抗人体大多数情况下胃部酸性环境的能力。

2.6 发酵乳杆菌 SR2-6 耐胆盐能力

人体肠道内的胆盐浓度一般为 0.3–3.0 g/L, 能在此浓度范围内正常存活的乳酸菌被认为具有开发成生态制剂的特性。由图 4 可知,

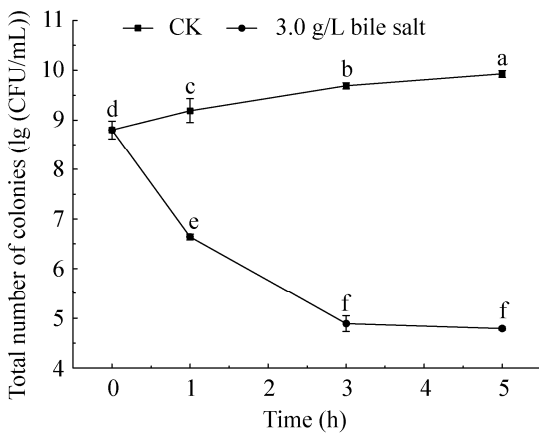


图4 发酵乳杆菌SR2-6耐胆盐能力 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Tolerability of *Lactobacillus fermentum* SR2-6 to bile salt. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

Lactobacillus fermentum SR2-6 在 3.0 g/L 胆盐浓度的 MRS 肉汤中培养 1 h 活菌数下降 2.16 lg (CFU/mL)。随着时间延长, 活菌数继续呈下降趋势, 在 3–5 h 内趋于平稳, 处理 5 h 后活菌数下降至 4.79 lg (CFU/mL), 活菌存活率为 54.43%。

2.7 发酵乳杆菌 SR2-6 人工胃肠液耐受能力

为考察菌株 SR2-6 能否顺利到达肠道并保持一定水平的活菌数, 分别在体外模拟饱腹和空腹 2 种状态测定其存活率。由图 5 可知, 经过相同时间的处理, 饱腹状态下的活菌数始终高于空腹状态。在模拟饱腹胃环境消化 2 h 后 SR2-6 活菌数无减少, 继续在模拟肠道环境消化 4 h 后其存活率为 77.75%, 活菌数为 6.85 lg (CFU/mL), 符合微生态制剂活菌数的要求^[21]。反观空腹条件下, 体外模拟消化 2 h 后发酵乳杆菌 SR2-6 的活菌数为 7.3 lg (CFU/mL), 能达到微生态制剂的活菌数要求, 然而继续在肠道环境消化 4 h 后其活菌数仅存 3.58 lg (CFU/mL), 与同时间饱腹条件下的活菌数相比减少 47.74%。

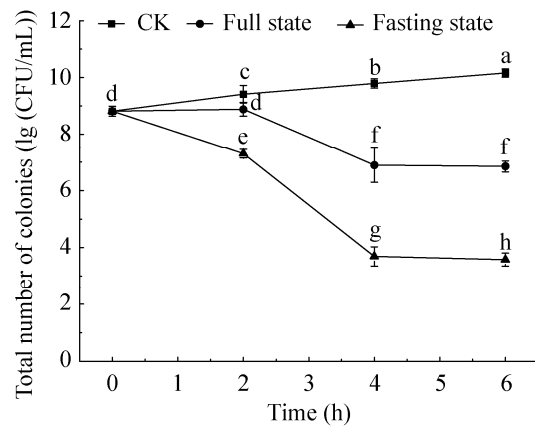


图5 发酵乳杆菌SR2-6人工胃肠液耐受能力 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Tolerability of *Lactobacillus fermentum* SR2-6 to artificial gastrointestinal fluid. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.8 发酵乳杆菌 SR2-6 黏附 Caco-2 细胞能力

乳酸菌要发挥生理功能除了需要具有一定的胃肠道耐受能力外, 还需要具有在定殖位点黏附增殖的能力。如图 6 所示, 经革兰氏染色后, 在显微镜下可观察到 Caco-2 细胞膜表面有明显附着的乳酸菌菌体。进行黏附试验前, 菌株 SR2-6 的活菌数为 $(1.21 \pm 0.24) \times 10^9$ CFU/mL。菌体与 Caco-2 细胞共同孵育结束后, 黏附在细胞上的活菌数为 $(6.28 \pm 0.13) \times 10^6$ CFU/mL。乳酸菌黏附数为 (52.29 ± 15.14) CFU/cell, 黏附率为 $(74.52 \pm 1.45)\%$, 与占萌等^[22]筛选出的嗜酸乳杆菌 KLDS1.0901 的黏附率 (12.73%) 和周艳等^[23]筛选出的富硒长双歧杆菌菌株 DD98 的细胞黏附数 (581.17 ± 62.79) CFU/100 cells 相比, 发酵乳杆菌 SR2-6 的细胞黏附率及黏附数更高, 黏附能力更好。

3 讨论与结论

高尿酸血症患者与常人相比, 其肠道微生物群落中乳杆菌的含量偏低且微生物群落组成有所差别。有报道指出利用乳酸菌来干预调控肠道菌群可预防治疗高尿酸血症, 而且具有无副作用、不干扰膳食营养平衡的优势。日本发

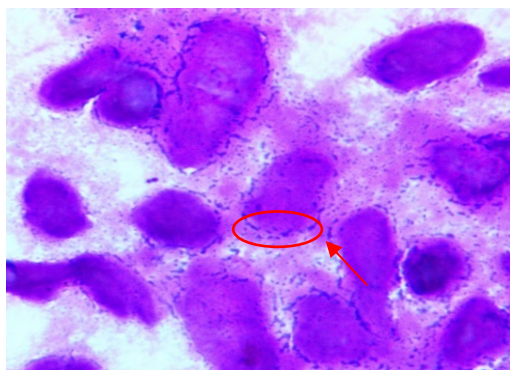


图 6 发酵乳杆菌 SR2-6 黏附 Caco-2 细胞图
Figure 6 *Lactobacillus fermentum* SR2-6 that colonize and adhere to Caco-2 cells.

现的一株乳酸菌 PA-3 能将嘌呤核苷降解为肠道较难吸收的嘌呤碱基, 减少尿酸生成量^[24]; Ni 等^[25]从泡菜中分离出了对肌苷和鸟苷降解效率在 40%以上的 4 株乳酸菌。我国目前对于具有降尿酸潜力乳酸菌的研究还相对较少, 产业化更为空白, 因此, 丰富具有该功能且益生特性良好的乳酸菌菌种资源十分必要。

本研究采用 HPLC 方法筛选出一株降解肌苷、鸟苷能力高达 99.26%和 99.85%的发酵乳杆菌 SR2-6, 与一株对肌苷和鸟苷降解率为 59%和 51%的发酵乳杆菌 TSF331^[26]相比降解效果显著。该菌株对常见的五大类抗生素即青霉素、氯霉素、林可霉素、红霉素、头孢曲松不耐受, 可作为安全益生菌使用。该菌株对人体胃酸环境、胆盐环境、模拟饱腹胃肠道环境具有良好的耐受性, 经 pH 2.0 强酸环境处理后该菌株的存活率为 76.51%, 显著高于一株对肌苷降解能力达 99.32%的罗伊氏乳杆菌 NL02 在相同 pH 条件下处理 3 h 后的 54.41%存活率^[27]。该菌株在饱腹胃肠道环境下处理 6 h 后的活菌数为 6.85 lg (CFU/mL), 存活率为 77.75%, 比呼静等^[27]筛选出的一株对肌苷鸟苷降解率在 90%以上的乳酸菌 NL37 在胃肠道环境中的存活率高 1.41 倍。该菌株在 Caco-2 细胞上的黏附数为 (52.29 ± 15.14) CFU/cell, 比报道的一株乳酸菌 C174^[28]的黏附数 7.4 CFU/cell 高 4-8 倍, 黏附能力很强, 满足益生菌生理功能正常发挥的要求。

目前关于乳酸菌调节尿酸水平机制的研究尚不全面, 其中最主要的机制是乳酸菌对嘌呤类化合物吸收及分解代谢作用。杨殿斌^[5]推测乳酸菌 DM9218 与小肠上皮细胞竞争吸收食物中的核苷, 从而降低小鼠的血尿酸水平。明治株式会社^[24]发现益生菌 PA-3 可以减少肠道对腺苷、腺苷酸的吸收, 以达到降低血尿酸的功

效。人体内尿酸水平过高的原因之一，是当高嘌呤食物中的嘌呤核酸分解为嘌呤核苷后，小肠上皮细胞以主动运输或被动扩散的方式将核苷吸收并将其代谢为嘌呤碱基，嘌呤碱基经小肠细胞分泌的黄嘌呤氧化酶的催化后生成过量尿酸^[29]。因此，基于上述乳酸菌降尿酸机制及尿酸生成通路，本研究筛选所得的发酵乳杆菌 SR2-6 可以通过与肠道上皮细胞竞争最易被人体吸收的尿酸底物即肌苷、鸟苷，减少其摄入量，从而降低尿酸水平。虽然菌株 SR2-6 在降解肌苷、鸟苷的过程中产生少量嘌呤可能被人体吸收生成尿酸，但这个量相对很少，更多生成的其他中间产物参与到其他代谢途径中。

本研究首次筛选到一株对肌苷和鸟苷降解能力显著的发酵乳杆菌 SR2-6，其益生特性优良，符合益生菌的基本要求，可作为具有降尿酸潜力的乳酸菌菌种资源应用到高尿酸血症的辅助治疗中，市场前景广阔。

致谢

感谢江苏省农业科学院中心实验室汪佳蕾老师在液相色谱图解读方面提供的支持和帮助。

REFERENCES

- [1] 吴芑, 王亮, 李海涛, 乔攀爽, 张奥, 周虹. 高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1283-1294.
WU P, WANG L, LI HT, QIAO PS, ZHANG A, ZHOU H. Progress in hyperuricemia model establishment and uric acid-lowering drugs[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2021, 37(7): 1283-1294 (in Chinese).
- [2] VILLEGAS R, XIANG YB, ELASY T, XU WH, CAI H, CAI Q, LINTON MF, FAZIO S, ZHENG W, SHU XO. Purine-rich foods, protein intake, and the prevalence of hyperuricemia: The Shanghai Men's Health Study[J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2012, 22(5): 409-416.
- [3] 洪岩, 张越. 非布司他、苯溴马隆、别嘌呤醇治疗高尿酸血症的安全性和有效性比较[J]. 四川解剖学杂志, 2020, 28(1): 96-98.
HONG Y, ZHANG Y. Comparison of safety and efficacy of febuxostat, benzbromarone and allopurinol in the treatment of hyperuricemia [J]. Sichuan Journal of Anatomy, 2020, 28(1): 96-98 (in Chinese).
- [4] WANG HN, MEI L, DENG Y, LIU YH, WEI XQ, LIU M, ZHOU JR, MA H, ZHENG PY, YUAN JL, LI M. *Lactobacillus brevis* DM9218 ameliorates fructose-induced hyperuricemia through inosine degradation and manipulation of intestinal dysbiosis[J]. Nutrition, 2019, 62: 63-73.
- [5] 杨殿斌. 降尿酸乳酸菌筛选及乳酸菌对高尿酸血症大鼠作用的研究[D]. 大连: 大连医科大学硕士学位论文, 2013.
YANG DB. The screening of *Lactobacillus* reduced blood uric acid and *Lactobacillus*' effect in hyperuricemia rat model[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Medical University, 2013 (in Chinese).
- [6] 金方. 降尿酸益生菌株的筛选和对高尿酸血症模型大鼠作用机理的探索[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2018.
JIN F. Isolation of hypouricemic probiotics and exploration the mechanism of hyperuricemic effects on model rats[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2018 (in Chinese).
- [7] 王垚. 具有潜在降尿酸能力乳酸菌的筛选及应用研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2021.
WANG Y. Screening and application of lactic acid bacteria with potential uric acid-lowering ability[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2021 (in Chinese).
- [8] 麻菊美. 降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及生物学特性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2017.
MA JM. Isolation of lactic acid bacteria with high ability of purine nucleoside-decomposing and evaluation of their biological properties[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2017 (in Chinese).
- [9] 牛春华, 肖茹雪, 赵子健, 高磊, 崔伟东, 梁铁, 林丽, 李盛钰. 植物乳杆菌 UA149 的降尿酸作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 1-6, 217.
NIU CH, XIAO RX, ZHAO ZJ, GAO L, CUI WD, LIANG T, LIN L, LI SY. Serum uric acid lowering effect of *Lactobacillus plantarum* UA149 on hyperuricemic rats[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 1-6,

- 217 (in Chinese).
- [10] 刘永红. 半夏块茎与细胞培养体系的建立及主要生物碱的代谢调控研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学博士学位论文, 2010.
- LIU YH. Protocorm-like body and cell suspension culture and the regulation of alkaloid metabolism by *Pinellia ternata* breit[D]. Xianyang: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2010 (in Chinese).
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Identification of Common Bacterial Systems Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [12] MORENO C, ROMERO J, ESPEJO RT. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF388386 (Vp23), AF388387 (Vp16), AF388388 (F44), AF388389 (Vp27), AF388390 (F6), AF388391 (3d2), AF388392 (3d4), AF388393 (3d7) and AF388394 (3d8) [J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [13] 李艳莉. 酸奶及发酵剂中分离乳酸菌药物敏感性研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2015.
- LI YL. Antimicrobial susceptibilities of lactic acid bacteria isolated from yogurts and starter culture[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [14] ARASU MV, KIM DH, KIM PI, JUNG MW, ILAVENIL S, JANE M, LEE KD, AL-DHABI NA, CHOI KC. In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(3): 1333-1346.
- [15] SHEHATA MG, EL SOHAIMY SA, EL-SAHN MA, YOUSSEF MM. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2016, 61(1): 65-75.
- [16] 朱艳, 尹曼, 魏颖. 果蔬发酵汁对肠道益生菌及大肠杆菌黏附能力的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(11): 9-15.
- ZHU Y, YIN M, WEI Y. Effect of fermented juices of fruits and vegetables on the adhesion of intestinal probiotics and *Escherichia coli*[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(11): 9-15 (in Chinese).
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.2—2016 食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 4789.2—2016 Determination of total bacterial count in food microbiological examination[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese).
- [18] 肖源勋, 张从新, 曾鲜丽, 袁志超. 益生菌对高尿酸血症肾功能损伤的疗效分析研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(11): 1376-1382, 1388.
- XIAO YX, ZHANG CX, ZENG XL, YUAN ZC. Analysis of therapeutic effects of probiotics on renal injury induced by hyperuricemia[J]. Chinese General Practice, 2020, 23(11): 1376-1382, 1388 (in Chinese).
- [19] TSUBOI H, KANEKO N, SATOU A, TSUCHIYA Y. Lactic acid bacteria having action of lowering blood uric acid level: U.S. Patent 8, 460, 918[P]. 2013-6-11.
- [20] GANGULY NK, BHATTACHARYA SK, SESIKERAN B, NAIR GB, RAMAKRISHNA BS, SACHDEV HPS, BATISH VK, KANAGASABAPATHY AS, MUTHUSWAMY V, KATHURIA SC, KATOCH VM, SATYANARAYANA K, TOTEJA GS, RAHI M, RAO S, BHAN MK, KAPUR R, HEMALATHA R. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food[J]. The Indian Journal of Medical Research, 2011, 134: 22-25.
- [21] 袁佩娜. 微生态制剂的质量控制要求[J]. 中国微生态学杂志, 2002, 14(4): 187-188.
- YUAN PN. Quality control requirements for probiotics[J]. Chinese Journal of Microecology, 2002, 14(4): 187-188 (in Chinese).
- [22] 占萌, 李柏良, 王成凤, 李慧臻, 李子叶, 霍贵成. 15株乳酸菌的表面性质及其黏附能力[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 122-127.
- ZHAN M, LI BL, WANG CF, LI HZ, LI ZY, HUO GC. Surface properties and adhesion ability of 15 lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 122-127 (in Chinese).
- [23] 周艳, 祁艳, 纪瑞, 谭俊, 陈代杰. 富硒长双歧杆菌 DD98 菌株的黏附特性及黏附机制初步研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 84-88.
- ZHOU Y, QI Y, JI R, TAN J, CHEN DJ. Adhesion ability of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 to caco-2 cell and preliminary study on its

- mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 84-88 (in Chinese).
- [24] YAMADA N, SAITO-IWAMOTO C, NAKAMURA M, SOEDA M, CHIBA Y, KANO H, ASAMI Y. *Lactobacillus gasser* PA-3 uses the purines IMP, inosine and hypoxanthine and reduces their absorption in rats[J]. Microorganisms, 2017, 5(1): 10.
- [25] NI CX, LI X, WANG LL, LI X, ZHAO JX, ZHANG H, WANG G, CHEN W. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism[J]. Food & Function, 2021, 12(15): 7054-7067.
- [26] KUO YW, HSIEH SH, CHEN JF, LIU CR, CHEN CW, HUANG YF, HO HH. *Lactobacillus reuteri* TSR332 and *Lactobacillus fermentum* TSF331 stabilize serum uric acid levels and prevent hyperuricemia in rats[J]. PeerJ, 2021, 9: e11209.
- [27] 呼静, 崔鹏月, 双全. 高效降尿酸乳酸菌的筛选及其益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029929.
- HU J, CUI PY, SHUANG Q. Screening of lactic acid bacteria with high ability of uric acid-lowering and evaluation of its probiotic properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029929 (in Chinese).
- [28] 张汝京, 胡亚凡, 海丹, 赵梦娜, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍, 张充, 别小妹. 具有抑制肠道致病菌和黏附 Caco-2 细胞作用的益生性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 133-139, 153.
- ZHANG RJ, HU YF, HAI D, ZHAO MN, LU ZX, LYU FX, ZHAO HZ, ZHANG C, BIE XM. Screening and identification of probiotic *Lactobacillus* strains inhibiting intestinal pathogens and adhering to caco-2 cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(20): 133-139, 153 (in Chinese).
- [29] FURUHASHI M. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: role of xanthine oxidoreductase activity[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2020, 319(5): E827-E834.