高效降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及特性研究

麻菊美[1,2]，赵伟睿[2,3]，胡 升[2]，王 康[1,2]，
黄俊[4]，郑晓冬[3]，金志华[2]，梅乐和[*1,2]

（1. 浙江大学 化学工程与生物工程学院，浙江 杭州 310027；2. 浙江大学宁波理工学院 生物与化学工程学院，浙江 宁波 315100；3. 浙江大学 生物系统工程与食品科学学院，浙江 杭州 310058；4. 浙江科技学院 生物与化学工程学院，浙江 杭州 310023）

摘要：采用乳酸菌对高尿酸血症及其相关病症进行辅助治疗，可以减轻严格饮食限制（传统治疗方法）对患者生活质量的影响。本研究以市售泡菜为材料，用 HPLC 法测定乳酸菌对肌苷和鸟苷的降解率，筛选出具有高效降解嘌呤核苷能力的乳酸菌。在筛选菌株中，菌株 5-1 的降解能力最强，对肌苷和鸟苷的降解率分别为 89.37%和 93.20%。该菌株经生理生化和 16S rDNA 测序鉴定为弯曲乳杆菌（*Lactobacillus curvatus*）。在 pH 3 或胆盐浓度 0.3% 的条件下处理 4 h 后，*Lb. curvatus* 5-1 活菌数保持在 10^7 cfu/mL 以上。另外，该菌株在人工胃肠液中展现出良好的耐受性，在肠液中的核苷降解能力与在缓冲液中的相当。因此，*Lb. curvatus* 5-1 是开发高尿酸血症预防及辅助治疗的微生态菌剂的优良菌株，具有良好的应用前景。

关键词：泡菜；乳酸菌；嘌呤核苷降解；高尿酸血症

中图分类号：TQ 464；Q 939　**文章编号**：1673-1689(2019)04-0008-07　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.002

Isolation of a Lactic Acid Bacterium With High Ability of Purine Nucleoside-Decomposing and Evaluation of Its Probiotic Properties

MA Jumei[1,2]，*ZHAO Weirui*[1,3]，*HU Sheng*[2]，*WANG Kang*[1,2]，*HUANG Jun*[4]，
ZHENG Xiaodong[3]，*JIN Zhihua*[2]，*MEI Lehe*[*1,2]

（1. Department of Chemical and Biological Engineering，Zhejiang University，Hangzhou 310027，China；2. School of Biotechnology and Chemical Engineering，Ningbo Institute of Technology，Zhejiang University，Ningbo 315100，China；3. College of Biosystems Engineering and Food Science，Zhejiang University，Hangzhou 310058，China；4. School of Biological and Chemical Engineering，Zhejiang University of Science and Technology，Hangzhou 310023，China）

Abstract：Lactic acid bacteria （LAB） can be used for prevention and auxiliary treatment of hyperuricemia and its complications. By using such way，the detrimental effect of people's living quality caused by maintaining strict dietary restriction（the conventional treatment of hyperuricemia）

收稿日期：2016-08-31

基金项目：国家自然科学基金项目（21176220，31470793，31670804）；中国博士后科学基金项目（2016M592003）；浙江省自然科学基金重点项目（LZ13B060002）；浙江省自然科学基金项目（LZ13B060002、LY16B060008）；浙江省教育厅一般科研项目（Y201432760）。

* **通信作者**：梅乐和（1964—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事与酶工程、发酵工程及生物分离工程相关的工业生物技术研究。E-mail：meilh@zju.edu.cn

引用本文：麻菊美，赵伟睿，胡升，等. 高效降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及特性研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(04)：8-14.

could be reduced or eliminated. In this study the purine nucleoside-decomposing ability of LABs were isolated from Chinese sauerkraut bought from local supermarket by HPLC method through the determination of their insosine and guanosine degradation abilities. Among which strain 5-1 showed the best probiotic potential with degradation rate of insosine and guanosine are 89.37% and 93.20% respectively. Based on physiological, biochemical tests and 16S rDNA classification, strain 5-1 was identified as *Lactobacillus curvatus*. After 4 h treatment under the circumstance of pH 3 or 0.3% bile salt, strain 5-1 could keep a survival level of 10^7 cfu/mL. Furthermore the great tolerance capacity was shown in the artificial gastrointestinal fluid with food suspension and excellent purine nucleoside-decomposing ability in artificial intestinal juice with food suspension. Therefore, *Lb. curvatus* 5-1 has a great potential for applications in the development of microbial agents that help to prevent and auxiliarily treat hyperuricemia.

Keywords: Chinese sauerkraut, lactic acid bacteria, purine nucleoside-decomposing, hyperuricemia

尿酸是人体内嘌呤核苷酸的代谢终产物,高尿酸血症是由于人体内嘌呤代谢紊乱,继而导致血液中尿酸含量超出正常水平的代谢性疾病。增高的血尿酸会结晶沉积在关节、肾盂、输尿管、肾间质等处,引起痛风、尿酸盐肾病、尿酸性尿路结石等疾病的发生,严重时可导致关节致残和肾功能不全[1-5]。此外,高尿酸血症也是多种疾病的危险因素,常与心血管疾病、慢性肾脏病及代谢综合征(糖尿病、胰岛素抵抗和肥胖)等并发[1-5]。近年来,随着人们物质生活的丰富,饮食结构发生了巨大的变化,高尿酸血症及其相关病症发病率在我国快速增加,已成为现代人的高发疾病之一[2]。高尿酸血症的治疗与预防除了使用药物外,一般还需要对饮食进行控制,尽量降低嘌呤核苷的摄入量[3,6]。然而高嘌呤食物种类众多,如红肉、海鲜类、肝脏类、禽类、啤酒等,因此,控制饮食将会很难维持食物提供的营养素平衡[7]。此外,限制嘌呤核苷的摄入还需要限制鸡精(其主要鲜味物质为鸟苷酸二钠和肌苷酸二钠等嘌呤核苷)等鲜味剂的摄取,严重影响患者的生活质量。

随着乳酸菌对人体的益生作用越来越受到关注与重视,人们也开始采用乳酸菌对高尿酸血症进行辅助治疗和预防[8-10]。通过口服可有效分解嘌呤核苷的乳酸菌,让其在肠道内分解食物中的嘌呤核苷,降低肠道对嘌呤核苷的吸收量,继而降低血尿酸的水平[8-10]。因此,用乳酸菌对高尿酸血症进行辅助治疗和预防可以避免或减轻严格饮食限制对患者生活质量的影响。目前,日本科学家已筛选得到几株具有较高嘌呤核苷降解能力的菌株,并通过动物实验证明了这些菌株具有辅助降低血尿酸的作用[8-10]。而目前,我国在这方面的研究还鲜有报道。本研究从市售泡菜中分离出一株具有高效降解嘌呤核苷能力的乳酸菌,并通过药敏谱、耐酸、耐胆盐和人工胃肠液耐受性等实验来研究其特性,以期为开发具有自主知识产权的高尿酸血症辅助治疗微生态菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和主要试剂

市售泡菜;MRS 肉汤、抗菌药物药敏纸片、O-F 生化管(肠杆菌科),杭州微生物试剂有限公司产品;胃蛋白酶(Pepsin 1:3 000 from Porcine Stomach)、胰蛋白酶(Trypsin 1:250 from Porcine pancreas)、牛胆粉、L-半胱氨酸、肌苷、鸟苷,生工生物工程(上海)股份有限公司产品;乳酸菌微量生化鉴定条,青岛海博生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 高效降解嘌呤核苷菌株的筛选 将市售泡菜充分混匀后,吸取泡菜汁,用 0.9 g/dL NaCl 无菌水溶液稀释合适的倍数后,涂布在 MRS 固体平板上,30 ℃静置培养 48 h,获得单菌落。降解嘌呤核苷菌株的筛选按 Tsuboi 等[9]的方法进行:从平板上挑取单菌落,接种于 MRS 培养基中,于 30 ℃静置培养 24 h。以体积分数 1%的接种量传代 2 次活化菌种,作为种子培养基。将种子培养基以体积分数 1%的接种量接种到 MRS 培养基中,静置培养 48 h 后,取 2 mL 培养液,于4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min

收集菌体。用无菌的0.9 g/dL NaCl 溶液清洗菌体 2 次。向清洗后的菌体中加入 750 mL 的反应液(含有 12.6 mmol/L 肌苷和 12.6 mmol/L 鸟苷的 0.1 mol/L、pH 7.0 K_3PO_4 溶液),重悬菌体后置于恒温混匀仪中(37 ℃、800 r/min)反应 1 h。反应后迅速将反应液置于沸水浴中 5 min,终止反应。10 000 r/min 离心 2 min,除去菌体,收集上清液。测定上清液中肌苷和鸟苷的浓度。按如下公式计算肌苷和鸟苷的降解率:

$$降解率=((C_{母液}-C_{残留})/C_{母液})\times100\% \quad (1)$$

式中:C 为质量浓度(g/L)。

1.2.2 肌苷和鸟苷含量的测定 采用 HPLC 法测定反应液中肌苷和鸟苷的含量[11]。色谱条件:Hitachi(日立)LC2000 高效液相色谱;反相色谱柱为 Hypersil ODS2 C18(4.6 mm×250 mm);流动相为 0.01 mol/L KH_2PO_4 溶液:甲醇=5:95(体积比),流速为 1 mL/min,柱温为 30 ℃,测定波长为 260 nm。

1.2.3 乳酸菌的鉴定 O-F 反应和糖类利用能力试验分别按相关试剂盒说明书进行。16S rDNA 同源比较鉴定:将纯化好的菌株接种于 MRS 液体培养基中,培养 24 h。用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 试剂盒提取菌体基因组,并用 PCR 扩增其 16S rDNA 的基因片段。扩增引物序列为,16sF:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG,16sR:GGCTACCTTGTTACGACTT。将扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析[12]。

1.2.4 菌株生长曲线的测定 将活化好的菌株,以体积分数 1%的接种量接种到 MRS 培养基中 30 ℃静置培养。测定不同生长时间的菌体 OD_{600} 值和培养液的 pH 值,以时间为横坐标,OD_{600} 和 pH 为纵坐标建立坐标系。

1.2.5 药敏性试验 将 200 μL 菌体培养液均匀涂布到 MRS 固体平板上,在每个平板上放置 3 片药物敏感纸片,30 ℃培养 48 h 后,用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.6 耐酸试验 将活化好的菌株分别置于 pH 为 6.2(对照组)、2、3 和 4 的 MRS 培养基中,30 ℃下处理 1、2、3 h 和 4 h 后进行平板活菌计数。

1.2.7 耐胆盐试验 将活化好的菌株分别置于牛胆粉质量浓度分别为 0(对照组)、0.1、0.2、0.3、0.6 g/dL 和 0.9 g/dL 的 MRS 培养基中,30 ℃下处理 1、2、3 h 和 4 h 后进行平板活菌计数。

1.2.8 乳酸菌对人工消化液的耐受性测定 分别考察乳酸菌在空腹和饱腹状态下对人工消化液的耐受性,按 KHALIL 等[13]的方法进行,配置相关人工消化液。

营养液:阿拉伯半乳糖、胶质、木聚糖、土豆淀粉、葡萄糖、酵母粉、蛋白胨、粘蛋白、L-半胱氨酸,分别为 1、2、1、3、0.4、3、1、4、0.5 g/L。

人工胃液:3.33 g/dL 胃蛋白酶,pH 为 2 或 3。

人工肠液(g/L):$NaHCO_3$ 为 12.5,胆盐为 6.0,胰酶为 0.9,pH 为 6.8。

空腹状态:不加营养液的人工胃液(pH 2)和人工肠液。

饱腹状态:加有营养液成分的人工胃液(pH 3)和人工肠液。

人工消化液(空腹和饱腹两个状态)耐受性的测定:取 30 ℃静置培养 30 h 的菌液 1 mL,4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,将菌体悬浮于1 mL 的人工胃液中处理 2 h(37 ℃,800 r/min);离心菌体,弃上清液,将菌体悬浮在 1 mL 人工肠液中处理 2 h(37 ℃,800 r/min)后,进行菌落计数,原菌液作对照。

1.2.9 乳酸菌在饱腹的人工肠液中嘌呤核苷降解能力的测定 离心收集 2 mL 菌体培养液,用灭菌生理盐水洗涤 2 次,将菌体悬浮于 750 mL 肌苷和鸟苷浓度都为 12.6 mmol/L 的饱腹人工肠液和缓冲液中反应(37 ℃,800 r/min),于 1 h 后测定肌苷和鸟苷的降解率。对照组不加菌体。

2 结果与分析

2.1 高效降解嘌呤类核苷乳酸菌的筛选

从泡菜样品中分离出 80 株菌,对它们的嘌呤核苷降解能力测定后发现,所挑选的菌株均具有一定的嘌呤核苷降解能力,但不同菌株之间的降解能力存在明显的差异,表 1 列出降解能力较强的菌株,其中菌株 5-1 具有最高的肌苷和鸟苷降解率,分别达到 89.37%和 93.20%,略低于 YAMADA 等[8-10]所报道菌株的降解能力。此外,从表 1 的结果也可以看出这些菌株对肌苷和鸟苷的降解效果成正相关,这与 YAMADA 等[8-10]的研究结果相一致。

2.2 菌株 5-1 的菌种鉴定

2.2.1 菌株 5-1 的 O-F 反应和糖类利用能力测定结果 从糖类利用特性来看,菌株 5-1 与《伯杰氏

表 1　不同菌株对肌苷和鸟苷的降解率

Table 1　Determination of insosine and guanosine decomposition results of different strains

菌株序号	肌苷降解率/%	鸟苷降解率/%	菌株序号	肌苷降解率/%	鸟苷降解率/%
5–1	89.37	93.20	54	35.67	41.41
9	24.70	28.81	66	43.19	44.80
48	21.13	28.21	79	47.52	50.26

细菌手册（第八版）》中描述的弯曲乳杆菌（*Lactobacillus curvatus*）基本相同，因此，菌株 5–1 初步鉴定为弯曲乳杆菌。

表 2　菌株 5–1 的 O–F 反应和糖类利用特性结果

Table 2　O–F reaction and carbohydrate utilization capacity of strain 5–1

糖类	反应结果	糖类	反应结果
O–F	发酵型	七叶苷	±
麦芽糖	+	纤维二糖	–
甘露醇	–	水杨苷	–
山梨醇	–	蔗糖	+
棉子糖	–	菊糖	+
乳糖	–	1%马尿酸钠	–

注:“+”代表阳性,“–”代表阴性,“±”代表可疑

2.2.2　菌株 5–1 的 16S rDNA 测序结果　菌株 5–1 的 16S rDNA 测序结果如图 1 所示，将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 分析,发现菌株 5–1 的 16S rDNA 与 *Lactobacillus curvatus* strain JMC1096 的同源性高达 99%，从数据库中获得 9 种不同菌株的 16S rDNA 基因序列,与菌株 5–1 的 16S rDNA 序列一起，用 Clustalx+ PHYLIP + NJplot 软件进行比对和系统发育分析，从系统发育树可知菌株 5–1 与 *Lb. curvatus* 位于同一个簇群(图 2),结合上面的糖类利用实验可以判断菌株 5–1 属于 *Lb. curvatus*。

2.3　*Lb. curvatus* 5–1 的生长曲线测定结果

对 *Lb. curvatus* 5–1 的生长曲线进行测定,从图 3 可看出 *Lb. curvatus* 5–1 在 5~18 h 处于对数生长期,这时期菌体生长速度最快,乳酸大量生成(发酵液 pH 迅速降低)。18 h 后,菌体生长进入平台期,此时菌体生长速度减缓,趋于稳定,发酵液 pH 维持在 4 左右，说明菌株产酸能力在进入平台期后受到了抑制。此外,在 74 h 以内发酵液 OD_{600} 值都能维持比较稳定的状态,从侧面说明该菌株具有较强的生命力和耐酸能力。

2.4　药敏试验结果

了解乳酸菌的药敏谱,是益生菌安全使用的前提[14–15]。从表 3 结果可看出,*Lb. curvatus* 5–1 对不同的抗生素表现出了不同的敏感性，对苯唑西林、头

GCCCCTTGCGGGGTGCTAATAATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTAGATTGAAGAAGCTTGCTTCTGATTG
ATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACAT
TTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAGCACCGCATGGTGCAAGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTA
TCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATA
GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATC
GTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGG
AAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCC
TTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCA
GCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATC
ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGG
TTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
AGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGAGGTAACCTTCGGAGCCAGCCGTCTAAAGTGGACCAGTGGGG

图 1　*Lb. curvatus* 5–1 的 16S rDNA 测序结果

Fig. 1　16S rDNA sequencing results of *Lb. curvatus* 5–1

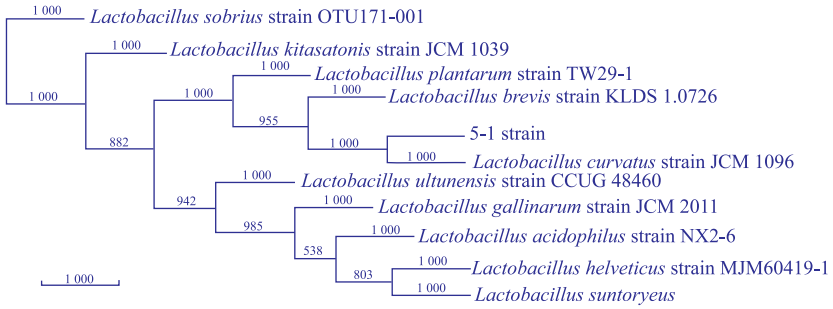


图 2　基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of isolate and sequences of relating species

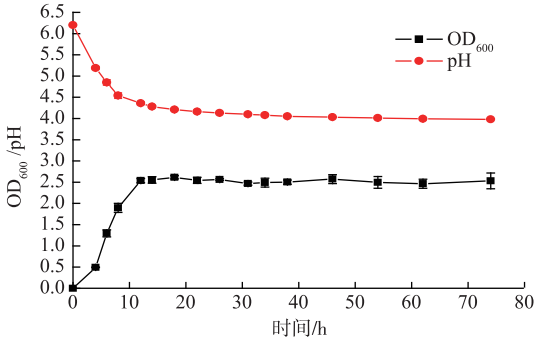


图 3　*Lb. curvatus* 5-1 在 MRS 培养基中的菌体生长情况和 pH 变化情况

Fig. 3　*Lb. curvatus* 5-1's growth curve and the change of pH in MRS

孢氨苄、四环素类(米诺环素除外)、氨基糖苷类、碳青霉烯类、喹诺酮类、糖肽类、单环内酰胺类、氯霉素和利福平比较不敏感,抑菌圈直径与药纸片直径((5.32±0.23) mm)一致,而对头孢类的头孢曲松、头孢哌酮、头孢呋辛和头孢唑林及青霉素类的氨苄西林、哌拉西林和羧苄西林则比较敏感,抑菌圈直径在 17 mm 以上。

2.5　*Lb. curvatus* 5-1 耐酸、耐胆盐及人工胃肠液耐受性结果

2.5.1　*Lb. curvatus* 5-1 耐酸和耐胆盐能力试验结果　乳酸菌要在人体内发挥良好的生理功能,关键是要能耐受不利于其生存的体内环境,尤其是胃酸和胆盐。胃酸的 pH 波动比较大,空腹或食用酸性食

表 3　*Lb. curvatus* 5-1 对不同种类的抗生素敏感性结果

Table 3　Results of sensitivity of *Lb. curvatus* 5-1 to different kinds of antibiotics

抗生素种类	抗生素名称	药品含量/(μg/纸片)	抑菌圈直径/mm	抗生素种类	抗生素名称	药品含量/(μg/纸片)	抑菌圈直径/mm
青霉素类	青霉素	10	14.15±1.65	头孢类	头孢曲松	30	17.61±0.54
	氨苄西林	10	19.51±0.49		头孢他啶	30	13.37±0.89
	哌拉西林	100	17.42±0.42		头孢哌酮	75	18.92±0.30
	羧苄西林	100	27.73±0.37		头孢拉定	30	14.69±0.81
	苯唑西林	1	5.64±0.12		头孢呋辛	30	18.97±1.03
四环素类	四环素	30	6.14±0.66		头孢唑林	30	20.81±0.33
	米诺环素	30	12.78±0.22		头孢氨苄	30	7.22±1.22
	多西环素	30	8.45±0.59	氨基糖苷类	庆大霉素	10	6.40±0.60
喹诺酮类	氧氟沙星	5	8.35±0.25		卡那霉素	30	5.63±0.10
	诺氟沙星	10	5.32±0.14		新霉素	30	8.06±0.20
单环内酰胺类	氨曲南	30	5.36±0.33		丁胺卡那	30	5.64±0.10
糖肽类	万古霉素	30	5.32±0.40	其他	氯霉素	30	8.67±0.63
碳青霉烯类	亚胺培南	10	5.33±0.10		利福平	5	5.33±0.24
大环内酯类	红霉素	15	11.29±0.31				

品时 pH 可达 1.5~2.0，食用碱性食物时 pH 可达 4.0~5.0,而通常 pH 为 3.0 [16-18]。*Lb. curvatus* 5-1 的耐酸能力如图 4 所示,虽然 pH 2.0 的酸性环境对其存活有较大影响,但在 pH 3.0 的条件下处理 4 h 该菌株能够保持 1×10^7 cfu/mL 以上的活菌数；而通常胃酸 pH 在 3.0 左右，食物通过胃的时间一般为 1~2 h[17],由此可说明,*Lb. curvatus* 5-1 具备了抵抗多数条件下人体酸性环境的能力。

乳酸菌对胆盐具有良好的耐受性是它能够在肠道中存活、生长和发挥功效的另一个重要特性。人体小肠中胆汁的质量浓度范围在 0.03~0.3 g/dL[17]。能在正常生理胆盐质量浓度中生长和进行代谢的乳酸菌被认为是能在肠道转运过程中存活[19]。由图 5 可知，在胆盐质量浓度≤0.3 g/dL 时,*Lb. curvatus* 5-1 的活菌数保持在 1×10^7 cfu/mL 以上，说明 *Lb. curvatus* 5-1 可以耐受人体正常胆汁质量浓度,具备在肠道中生存所需的胆盐耐受能力。

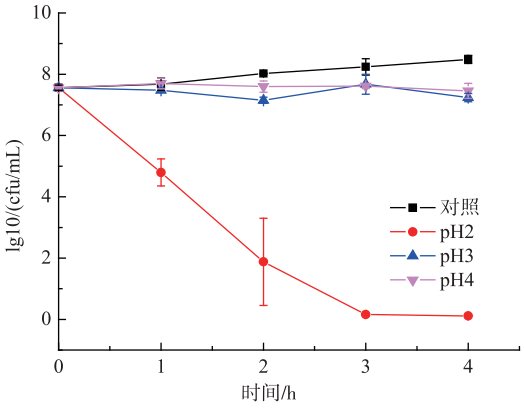


图 4　*Lb. curvatus* 5-1 对酸的耐受能力

Fig. 4　Acid tolerance of *Lb. curvatus* 5-1

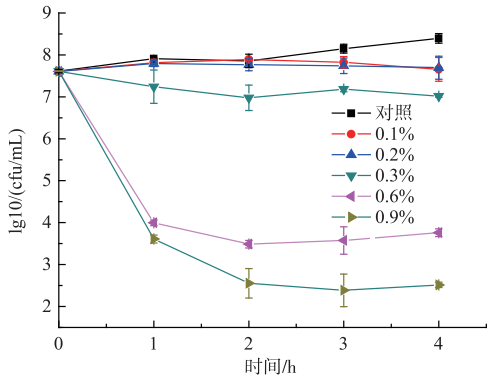


图 5　*Lb. curvatus* 5-1 对胆盐的耐受能力

Fig. 5　Bile salt tolerance of *Lb. curvatus* 5-1

2.5.2　人工胃肠液耐受性　乳酸菌能顺利到达肠道并在肠道中存活是其发挥益生功能的关键，从图 6 可以看出,虽然在空腹时 *Lb. curvatus* 5-1 存活能力不高,活菌数只有 1×10^3 cfu/mL 左右,但在饱腹状态下,*Lb. curvatus* 5-1 表现出比较强的存活能力,活菌数在 1×10^7 cfu/mL 以上，明显高于活性乳杆菌在肠道内发挥其益生作用所要求的菌体数(1×10^6 cfu/mL)[20]。说明 *Lb. curvatus* 5-1 适宜在饭后服用,以便使其能更好地发挥益生功能。

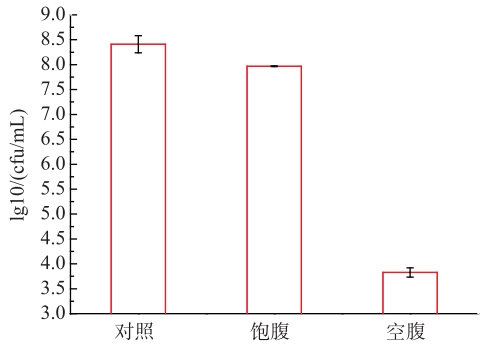


图 6　*Lb. curvatus* 5-1 在人工胃肠液处理后的活菌数

Fig. 6　Survival rate of *Lb. curvatus* 5-1 after treatment of artificial gastrointestinal tract

2.5.3　*Lb. curvatus* 5-1 在饱腹的人工肠液中嘌呤核苷的降解效果　小肠是乳酸菌降解嘌呤核苷的场所,因此本研究考查了 *Lb. curvatus* 5-1 在饱腹人工肠液中对嘌呤核苷的降解能力。从表 4 中可知,与在缓冲液中(表 1)一样,*Lb. curvatus* 5-1 在饱腹人工肠液中同样展现出了高效的肌苷和鸟苷降解能力。

表 4　肠道消化模拟条件下 *Lb. curvatus* 5-1 对肌苷和鸟苷的降解率

Table 4　Degradation rate of *Lb. curvatus* 5-1 to insosine and guanosine under the artificial intestinal tract with food suspension condition

模拟条件	肌苷降解率/%	鸟苷降解率/%
缓冲液	89.37±1.59	93.20±0.92
人工肠液	83.44±3.36	86.36±3.08

3　结　语

采用乳酸菌对高尿酸血症进行辅助治疗和预防,可以避免或者减轻饮食的严格限制,从而减轻严格饮食限制对患者生活质量的影响。本研究从市售泡菜中筛选出一株具有高效降解嘌呤核苷能力的乳酸菌 5-1，并通过生理生化和 16S rDNA 对其

进行鉴定,确定其属于 *Lactobacillus curvatus*。该菌不仅具有良好的耐酸和耐胆盐能力,能耐受饱腹的人工胃肠液,而且在饱腹的人工肠液中表现出了高效的嘌呤核苷降解能力。因此,*Lb. curvatus* 5-1 在辅助治疗和预防高尿酸血症及其相关疾病方面具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] GLIOZZI M,MALARA N,MUSCOLI S,et al. The treatment of hyperuricemia [J]. **International Journal of Cardiology**, 2016,213:23-27.

[2] YU S S,YANG H M,GUO X F,et al. Prevalence of hyperuricemia and its correlates in rural Northeast Chinese population:from lifestyle risk factors to metabolic comorbidities[J]. **Clinical Rheumatology**,2016,35(5):1207-1215.

[3] ZENG Xuejun. Interpretation of the Chinese guideline for the management of gout in 2010 [J]. **Chinese Journal of Practical Internal Medicine**,2012,32(6):438-441.(in Chinese)

[4] ZHANG Chen,LI Junling,TIAN Jiaxing,et al. Research progress of treating hyperuricemia by traditional Chinese medicine[J]. **Chinese Journal of New Drugs**,2013,22(6):670-673.(in Chinese)

[5] YAN D D,WANG J,JIANG F,et al. A causal relationship between uric acid and diabetic macrovascular disease in Chinese type 2 diabetes patients:A Mendelian randomization analysis[J]. **International Journal of Cardiology**,2016,214:194-199.

[6] HARRIS M D,SIEGEL L B,ALLOWAY J A. Gout and hyperuricemia[J]. **American Family Physician**,1999,59(4):925-934.

[7] VILLEGAS R,XIANG Y B,ELASY T,et al. 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.

[8] YAMADA N,IWAMOTO C,NAKAMURA M,et al. Reducing effect of *Lactobacillus gasseri* PA-3 on the absorption of food-derived purines[J]. **Milk Science**,2016,65(1):25-31.

[9] TSUBOI H,KANEKO N,SATOU A,et al. Lactic acid bacteria having action of lowering blood uric acid level: 美国, USO8460918[P]. 2013-06-11.

[10] TSUBOI H,KANEKO N,SATOU A,et al. Lactic acid bacterium having effect of lowering blood uric acid level: 欧洲, EP2221360A1[P]. 201-08-25.

[11] YANG Mingjun,FENG Huiqin,YANG Qingyao,et al. HPLC determination of nucleosides of *Hirsutella sinensis* mycelium[J]. **Food Research and Development**,2011,32(11):96-99.(in Chinese)

[12] BAO Qiuhua,LV Qiang,YU Jie,et al. Molecular identification of nine strains lactic acid bacteria isolatedfrom yak milk and triton in Sichuan[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(4):396-401.(in Chinese)

[13] KHALIL M A,EI-SHEEKH M M,EI-ADAWL H I,et al. Efficacy of microencapsulated lactic acid bacteria in *Helicobacter pylori* eradication therapy[J]. **Journal of Research in Medical Sciences**,2015,20(10):950-957.

[14] FENG Dawei,ZHOU Jiachun. Evaluation of agar disc diffusion method for determining antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria strains by a selected culture medium[J]. **Microbiology China**,2010,37(3):454-464.(in Chinese)

[15] CHANG L,ZHUO Y Z,KE D,et al. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs[J]. **Biomedical and Environmental Sciences**,2009,22(5):401-412.

[16] ERKKILA S,PETAJA E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use[J]. **Meat Science**,2000,55(3):297-300.

[17] CHOU L S,WEIMER B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. **Journal of Dairy Science**,1999,82(1):23-31.

[18] 郭兴华,凌代文,王安如,等. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京:科学出版社,2013:312-314.

[19] SANDERS M E,WALKER D C,WALKER K M,et al. Performance of commercial cultures in fluid milk applications [J]. **Journal of dairy science**,1996,79(6):943-955.

[20] GILLILAND S E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria [J]. **FEMS Microbiology Letters**,1990,87(1):175-188.