

doi:10.11920/xnmdzk.2025.03.003

传统发酵牦牛酸乳源高效降解嘌呤核苷 乳酸菌的筛选及特性研究

宛祎豪¹,王翔宇²,张诗琦¹,王樱洁¹,李静¹,陈炼红¹

(1.西南民族大学药学与食品学院,四川成都610041;2.四川省食品检验研究院,四川成都611731)

摘要:以川西高原地区牦牛酸乳中分离鉴定的295株乳酸菌为研究对象,通过高效液相色谱法(HPLC)筛选出具有高效降解嘌呤核苷能力的菌株。结果显示,发酵乳杆菌211、屎肠球菌244、乳酸乳球菌256、副干酪乳杆菌259、干酪乳杆菌264对嘌呤核苷(肌苷、鸟苷)的降解能力明显,分别为90.65%和93.81%,86.33%和90.95%,85.15%和89.25%,99.59%和99.78%,85.80%和89.79%;体外益生特性实验显示,菌株259和菌株264表现出较好的耐酸性、耐人工胃肠液和耐胆盐能力,菌株259还表现出较高的自凝集能力、表面疏水性;在安全性评价中,菌株259对万古霉素、诺氟沙星和链霉素不敏感,溶血试验结果为不具有溶血活性的 γ 溶血;吲哚试验、氨基酸脱羧酶试验和明胶液化试验结果均为阴性,证明其代谢过程不产生有害代谢产物。结果表明,副干酪乳杆菌259有较好的嘌呤核苷降解能力和胃肠道耐受性,为开发针对高尿酸血症的微生态治疗制剂提供参考,同时对乳酸菌资源开发具有一定借鉴意义。

关键词:牦牛酸乳;乳酸菌;嘌呤核苷降解;益生特性;安全性

中图分类号:TS201.3;R589.7

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)03-0253-09

Screening and characterization of lactic acid bacteria with efficient degradation of purine nucleosides from traditional fermented yak yogurt

WAN Yihao¹, WANG Xiangyu², ZHANG Shiqi¹, WANG Yingjie¹, LI Jing¹, CHEN Lianhong¹

(1. School of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Sichuan Institute of Food Inspection, Chengdu 611731, China)

Abstract: 295 strains of lactic acid bacteria isolated and identified from yak yogurt in the western Sichuan plateau region were screened by high performance liquid chromatography (HPLC) for their ability to efficiently degrade purine nucleosides. The results showed that *Lactobacillus fermentum* 211, *Enterococcus faecalis* 244, *Lactococcus lactis* 256, *Lactobacillus paracasei* 259, and *Lactobacillus casei* 264 showed significant degradation of purine nucleosides (inosine and guanosine), with 90.65% and 93.81%, 86.33% and 90.95%, 85.15% and 89.25%, 99.59% and 99.78%, 85.80% and 89.79%, respectively. In vitro probiotic experiments showed that strains 259 and 264 showed good acid resistance, tolerance to artificial gastrointestinal fluid and bile salt tolerance; and strain 259 also showed high self-agglutination ability and surface hydrophobicity. In the safety evaluation, strain 259 was insensitive to vancomycin, norfloxacin and streptomycin. The results of hemolytic activity, indole test, amino acid decarboxylase test and gelatin liquefaction test were negative, indicating that its metabolism process did not produce harmful metabolites. The results showed that *L. paracasei* 259 had good purine nucleoside degradation ability and gastrointestinal tolerance, which provided a certain reference value for the development of microecological therapeutic agents for hyperuricemia, and had a certain reference significance for the development of lactic acid bacteria resources.

Keywords: yak yogurt; lactic acid bacteria; purine nucleoside degradation; prebiotics characteristics; safety

收稿日期:2024-06-12

通信作者:陈炼红(1967-),女,教授,研究方向:民族食品资源开发.E-mail:lianhong_chen@163.com

基金项目:国家重点研发计划(2021YFD1600205)

高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA),是一类由嘌呤代谢功能紊乱所引发的代谢异常综合征.正常嘌呤饮食情况下,非同日 2 次血尿酸水平超过 $420 \mu\text{mol/L}$ (7 mg/dL),即可判定为高尿酸血症^[1-2].当人体摄入过多的动物内脏、海鲜、啤酒等高嘌呤食物或者嘌呤代谢异常时会引起人体内尿酸生成增加^[3].随着经济、生活方式、饮食习惯的改变,HUA 在中国的发病率已从上世纪 80 年代的 1.0%增长到目前的 13.3%,成为第二大代谢性疾病,已逐渐成为威胁我国人民健康的重要公共卫生问题^[4].对于高尿酸血症的治疗而言,传统药物治疗疗程长、价格贵^[5].即使是生活干预,也很难精确控制嘌呤的每日摄入量,而且需要长期坚持,患者的依从性差.因此,开发基于微生态制剂的治疗手段,成为当前研究的迫切需求.

近年来,乳酸菌的益生作用得到充分开发、利用,有学者研究发现传统发酵牦牛酸乳中乳酸菌具有降胆固醇^[6]、抗氧化^[7]、降亚硝酸盐^[8]、产胞外多糖^[9]等功能,随着乳酸菌的益生功能研究得越来越深入,有研究人员提出了高尿酸血症微生态防治的概念^[10].高尿酸血症微生态防治是指摄入特定功能的益生菌,通过定向补充具有尿酸分解代谢功能的益生菌群,在无须严格限制嘌呤摄入的情况下,减轻饮食限制对患者生活质量的影响^[11].其主要机理是:一、通过益生菌、益生元等调节肠道菌群辅助治疗高尿酸血症^[12];二、让乳酸菌在人体肠道内定殖,与肠黏膜细胞竞争嘌呤核苷等最终代谢产物为尿酸的物质,降低机体吸收量,达到血尿酸下降的效果^[13].用乳酸菌治疗高尿酸血症具有饮食不受限制、无药物副作用、患者依从度强等多处优点^[14].

同时也有学者从不同来源中发现了具有降血尿酸能力的菌株,如李干杰等人^[15]从泡菜中筛选能够高效降解核苷的乳酸菌并分析其特性.Zhao 等^[16]从婴幼儿粪便和发酵蔬菜中筛选出对肌苷和鸟苷的具有高效降解能力的乳酸菌.但对于从川西传统发酵牦牛酸乳中分离筛选具有降尿酸能力乳酸菌的研究,目前尚未得到全面深入的探索.

本试验利用乳酸菌降解尿酸的前体物质-嘌呤核苷(肌苷、鸟苷)的特性,以川西传统牦牛酸乳中分离、鉴定出的 295 株乳酸菌为研究对象,通过对传统发酵牦牛乳中乳酸菌降解嘌呤核苷效果及其益生性和安全

性的研究,促进川西高原地区传统发酵牦牛酸乳中乳酸菌资源的开发、保存和利用,为乳酸菌辅助治疗高尿酸血症提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验菌株为来自川西地区传统发酵牦牛酸乳中分离出的 295 株乳酸菌;MRS 肉汤、琼脂培养基、MH 琼脂培养基、哥伦比亚血琼脂基础、氨基酸脱羧酶肉汤、明胶培养基购自青岛海博生物技术有限公司;甲醇、磷酸二氢钾均为色谱纯,磷酸钾、磷酸、二甲苯、乙醚、巯基乙酸钠、对二甲氨基苯甲醛均为分析纯购自成都康迪生物技术有限公司;胃蛋白酶(酶活力 1:3000)、胰蛋白酶(酶活力 1:250)购自上海如吉科技发展有限公司;肌苷(98%)、鸟苷(99%)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;药物敏感纸片购自杭州微生物试剂有限公司;Agilent1260 高效液相色谱仪购自安捷伦科技(中国)有限公司;ZWY-210H 型恒温培养振荡器购自上海智城分析仪器制造有限公司;UV-3100 分光光度计购自上海美普达公司.

1.2 实验方法

1.2.1 利用高效液相色谱仪筛选具有高效降解嘌呤核苷能力的乳酸菌株

(1) 嘌呤核苷(肌苷、鸟苷)标准曲线绘制

通过 HPLC 系统检测肌苷和鸟苷.分别称取 0.0843 g 肌苷和 0.0895 g 鸟苷,配制成 1.26 mmol/L 的肌苷-鸟苷-磷酸钾混合溶液.利用高效液相色谱仪测定不同浓度标准溶液的峰面积,以肌苷(鸟苷)的质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线.

色谱条件:安捷伦 1260 高效液相色谱仪, Poroshell120, EC-C18 色谱柱($2.7 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$);流动相: KH_2PO_4 (0.01 mol/L)溶液:甲醇=95:5(v/v),流速为 1 mL/min ,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,测定波长为 260 nm ,洗脱时间 10 min .

(2) 降解嘌呤核苷(肌苷、鸟苷)能力的乳酸菌株筛选

吸取 0.2 mL 菌液接种于 5 mL MRS 液体培养基中活化, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后重复上述操作培养 1 次,即传代 2 次.取 2 mL 培养液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 4000 r/min 离心

8 min,用无菌 NaCl 溶液洗涤并离心,重复操作 2 次后将菌体沉淀重悬于 1.0 mL 肌苷-鸟苷-磷酸钾溶液 (1.26 mmol/L) 中,于恒温混匀仪中反应 1 h (37 °C 和 120 r/min). 培养结束后于 100 °C 沸水中 5 min 以结束反应,离心收集上清液^[11]. 上清液经孔径 0.22 μm 的水相无菌过滤器后进入高效液相色谱仪. 根据 HPLC 色谱图与标准曲线,计算不同乳酸菌对肌苷与鸟苷的降解率. 根据公式(1)计算肌苷和鸟苷的降解率. 选择对肌苷与鸟苷降解率高的乳酸菌进行后续试验.

$$\text{降解率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中: C_0 为反应液处理前的质量浓度 (g/L); C_1 为反应液处理后的质量浓度 (g/L).

1.2.2 高效降解嘌呤核苷乳酸菌益生性研究

(1) 耐酸试验

用 1 mol/L 盐酸分别调整生理盐水的 pH 值为 2.0、3.0、4.0,灭菌备用. 取活化后的菌悬液 1 mL 接种到不同 pH 的生理盐水中,置 37 °C 培养,于 0 h、3 h 采用平板划线法计数,根据公式(2)计算存活率:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中: N_0 为 0 h 测定的活菌数, CFU/mL; N_1 为 3 h 测定的活菌数, CFU/mL.

(2) 耐人工肠胃液试验

菌株活化培养后吸取 1 mL,于 4 °C,4 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,并用无菌生理盐水洗涤附着在离心管内壁的菌体沉淀,重复 2 次. 采用连续培养模拟人体消化过程,乳酸菌于人工胃液中 37 °C 恒温培养 3 h,分别于 0 h 和 3 h 取样进行活菌计数,取 1 mL 培养液离心后再转入人工肠液中培养 4 h^[17],在 37 °C 下继续培养 4 h. 分别于 0 h 和 4 h 取样进行活菌数测定. 根据公式(3)计算菌株存活率.

$$\text{菌株存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中: N_0 为人工胃液 (人工肠液) 处理前的乳酸菌活菌数, CFU/mL; N_1 为人工胃液 (人工肠液) 处理后的乳酸菌活菌数, CFU/mL.

(3) 耐胆盐试验

采用梯度胆盐胁迫法构建体外筛选体系,在含 0.2% 硫基乙酸钠的 MRS 液体培养基中,分别添加

0.1%、0.2%、0.3% (w/v) 梯度浓度的胆酸盐制备选择培养基. 取第三代活化的对数期菌体悬液 1 mL 分别转移至各浓度培养基,同时设置未接种菌体的空白对照组. 所有处理组于恒温培养箱中 37 °C 培养 4 h 后,测定上述不同培养基的 OD_{600} 值. 按照公式(4)计算菌株在胆盐中的生长效率^[18].

$$\text{生长效率}(\%) = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中: A_0 为乳酸菌在空白培养基中的 OD_{600} 值; A_1 为乳酸菌在胆盐培养基中的 OD_{600} 值.

(4) 凝集特性试验

取活化后的 1 mL 菌液,离心后弃上清液后收集菌体. PBS 洗涤 2 次后将其重悬于 2 mL PBS 中,再离心收集菌体沉淀. 生理盐水重悬,调整 $OD_{600} = 0.50 \pm 0.02$. 以 PBS 缓冲液为空白对照. 吸取 2 mL 上述菌液于灭菌离心管中,常温静置 4 h 后吸取上层溶液测 600 nm 吸光度值^[19],按照公式(5)计算自凝集率.

$$\text{自凝集率}(A\%) = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中: A_0 为混合液在 0 h 的 OD_{600} 值; A_1 为混合液在 4 h 的 OD_{600} 值.

(5) 表面疏水性试验

取活化后的菌液 1 mL,4 000 r/min 离心 10 min 后用等体积的 PBS 缓冲液洗涤 2 次,重悬于 PBS 缓冲液中. 将菌悬液的吸光度值调整为 $OD_{600} = 0.5 \pm 0.02$,而后取 3 mL 菌悬液与 1 mL 二甲苯涡旋混合 30 s,停顿 10 s 再振荡 30 s,室温下静置 10 min 分层^[20]. 取下层水相, PBS 缓冲液作为空白对照,测定 OD_{600} 值,按照公式(6)计算表面疏水率.

$$\text{表面疏水率}(A\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_1} \times 100\%, \quad (6)$$

式中: A_0 为与二甲苯混匀前菌液的 OD_{600} 值; A_1 为与二甲苯混匀后菌液的 OD_{600} 值.

1.2.3 乳酸菌安全性评价

(1) 药敏试验

根据纸片扩散法 (Kirby-Bauer 法),来测定筛选出来的菌株对抗生素的抑菌圈直径,根据结果判断其耐药性.

(2) 吡啶试验

以 10% 的接种量将经过活化培养的菌悬液接入

培养基中,并在 37 °C 下培养 48 h.加入 2 mL 乙醚并振荡混匀,静置至乙醚与培养基分层.滴入 1 mL 吡啶试剂,并观察两层液体交界处的颜色变化.若呈现玫瑰色,表明吡啶试验结果为阳性反应;未出现该颜色则判定为阴性反应.

(3) 溶血试验

在无菌环境下,用灭菌的接种环挑取活化后的菌悬液在哥伦比亚血琼脂平板上画线,37 °C 倒置培养 48 h 后,观察并记录现象.若在菌株菌落周围的琼脂显示绿色,为 α -溶血;在菌落周围出现透明圈,为 β -溶血;否则为 γ -溶血(用金黄色葡萄球菌作为阳性对照组进行比较)^[21-22].

(4) 氨基酸脱羧酶试验

参考王梦姣等^[23]的实验方法.用灭菌接种环挑取培养基上生长良好的单菌落接种到氨基酸脱羧酶培养基(精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸)及对照培养基中,37 °C 培养 48 h 左右,观察并记录现象.

(5) 明胶液化试验

用灭菌接种环挑取活化后的菌悬液穿刺接种到固体状的明胶培养基试管中,空白对照组用无菌生理盐水代替,37 °C 培养 48 h 后取出放入 4 °C 冰箱,静置 2 h 后拿出观察并记录实验现象.若出现明胶融化、有轻微流动则为阳性反应,否则为阴性反应.

1.3 数据处理

每组试验重复 3 次,数据均以平均值 \pm 标准差表示.试验图表运用 Excel 2019 和 SPSS 22.0 进行绘制分析.

2 结果与分析

2.1 高效降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选

2.1.1 标准曲线的建立

如图 1,肌苷和鸟苷的保留时间分别为 3.367 和 3.670 min.以肌苷(鸟苷)的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,如下图 2 和图 3.肌苷的标准曲线方程为: $y = 42\ 663x + 57.265$,相关系数 R^2 为 0.999 9;鸟苷的标准曲线方程为: $y = 52\ 503x + 0.875$,相关系数 R^2 为 0.999 9.该色谱条件可以用于肌苷和鸟苷的测定.

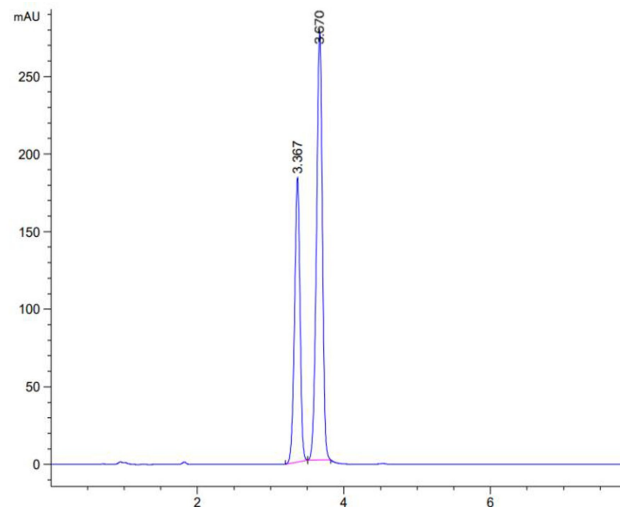


图 1 肌苷、鸟苷的液相色谱保留时间

Fig. 1 Retention time of inosine and guanosine by liquid chromatography

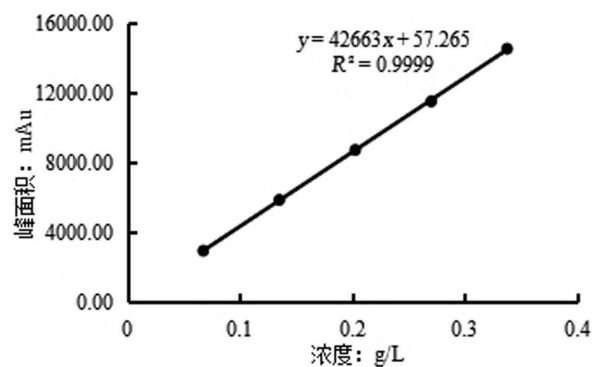


图 2 肌苷标准曲线

Fig. 2 inosine standard curve

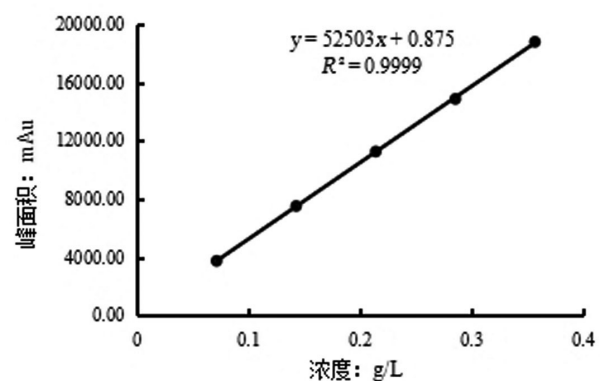


图 3 鸟苷标准曲线

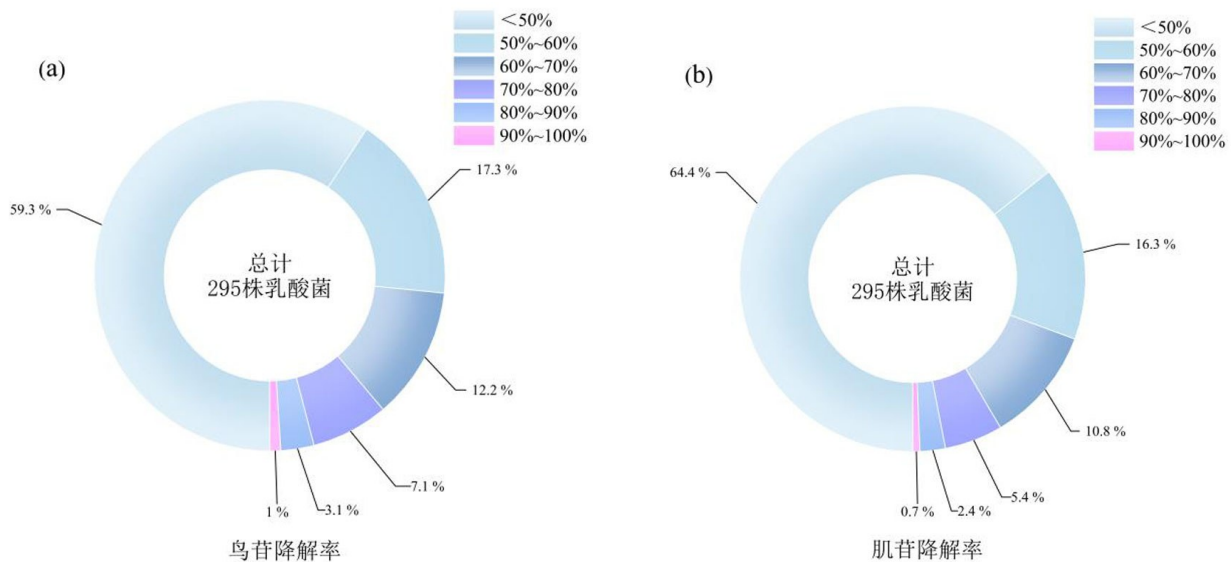
Fig. 3 Guanosine standard curve

2.1.2 降解率测定结果

如图 4 所示,通过对 295 株乳酸菌的嘌呤核苷(鸟苷、肌苷)降解率进行统计,不同菌株对肌苷、鸟苷有着不同的降解能力.对鸟苷降解率在 80%~100%的

菌株数量占比仅为 4.1%,对肌苷降解率在 80%~100%的菌株数量占比仅为 3.1%。其中,菌株 211、244、256、259、264 对嘌呤核苷(肌苷、鸟苷)的降解能力较明显,分别为 90.65% 和 93.81%, 86.33% 和

90.95%, 85.15% 和 89.25%, 99.59% 和 99.78%, 85.80% 和 89.79%, 因此本研究选择经过鉴定的发酵乳杆菌 211、屎肠球菌 244、乳酸乳球菌 256、副干酪乳杆菌 259、干酪乳杆菌 264 进行后续实验。



(a) 295 株乳酸菌对鸟苷降解率测定结果

(b) 295 株乳酸菌对肌苷降解率测定结果

图 4 295 株乳酸菌对嘌呤核苷(鸟苷、肌苷)降解率测定结果

Fig. 4 Determination of purine nucleoside (guanosine and inosine) degradation rate of 295 strains of lactic acid bacteria

2.2 体外益生性结果

2.2.1 耐酸试验结果

从表 1 可以看出,5 株菌在 pH 3.0 的酸性环境中耐受性最好,pH 升高或降低各菌株的耐受性变差。在 pH 2.0 条件下,菌株 211 和 244 不能存活,264 和 259 存活率分别为 92.81% 和 94.52%,显著高于菌株 256 的 65.61% ($P < 0.05$)。在 pH 3.0 条件下,5 株菌的存活率四者之间差异不显著 ($P > 0.05$)。在 pH 4.0 条件下,5 株菌的存活率均在 70% 以上。菌株 256、264、259、211、244 的存活率逐渐下降,菌株 256 的存活率最高为 96.82%,菌株 244 存活率为 59.06%,显著低于其他四株菌 ($P < 0.05$)。由此可见,不同菌株对不同 pH 环境的耐受程度不同,由于不同菌株的最适生长 pH 不一样。研究显示,乳酸菌发挥益生作用的最低活菌数目为 10^6 CFU/mL^[24],菌株 256、259 和 264 活菌数均在 10^8 CFU/mL 以上且存活率较高,表明该 3 株菌能在低酸性环境中发挥益生性,因此选择该 3 株菌进行后续实验。

2.2.2 耐人工肠胃液试验结果

益生菌要想在人体肠道发挥益生功效就必须耐受人体的胃肠道内的不良环境。胃液呈酸性,pH 在 1.5~5.0 波动,主要含有胃蛋白酶等消化酶;肠液呈弱碱性,主要的消化酶有胰蛋白酶、淀粉酶等。

试验结果如表 2 所示,3 株菌在人工胃液存活率均在 50% 以上,耐受性较好。其中菌株 256 对人工胃液的耐受性显著低于其他 2 株菌 ($P < 0.05$),为 57.04%,菌株 259 和 264 分别为 84.13% 和 87.54%,相比于其在 pH 2.0 的酸性条件下的存活率都降低了 10% 左右,说明菌株对胃蛋白酶的耐受能力较好。3 株菌在人工肠液中的存活率均高于 80%,菌株 259 的存活率高于 264,并且显著高于 256 ($P < 0.05$),说明肠液中的胰蛋白酶对这 3 株菌的存活率影响较小。这与张丽等^[25]、于志会^[26] 研究发现乳酸菌对人工胃肠液中的耐受性较好结论一致。因此选择菌株 259 和 264 进行后续试验。

表 1 5 株菌株在不同 pH 条件下的存活情况

Table 1 Survival of five strains of bacteria under different pH conditions

菌株编号	pH 值	0 h 活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	3 h 活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	存活率(%)
211	2.0	2.00 \pm 0.17	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00 ^c
	3.0	2.23 \pm 0.23	2.13 \pm 0.15	95.75 \pm 0.04 ^a
	4.0	2.30 \pm 0.26	1.80 \pm 0.20	78.33 \pm 0.03 ^b
244	2.0	2.47 \pm 0.23	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00 ^c
	3.0	2.57 \pm 0.12	2.10 \pm 0.26	81.73 \pm 0.09 ^b
	4.0	2.37 \pm 0.06	1.40 \pm 0.20	59.06 \pm 0.07 ^c
256	2.0	2.13 \pm 0.12	1.40 \pm 0.10	65.61 \pm 0.02 ^b
	3.0	2.30 \pm 0.17	2.23 \pm 0.21	97.02 \pm 0.03 ^a
	4.0	2.10 \pm 0.10	2.03 \pm 0.12	96.82 \pm 0.03 ^a
259	2.0	2.17 \pm 0.21	2.03 \pm 0.06	94.52 \pm 0.06 ^a
	3.0	2.03 \pm 0.15	1.83 \pm 0.21	90.04 \pm 0.05 ^{ab}
	4.0	2.37 \pm 0.12	2.03 \pm 0.25	85.74 \pm 0.07 ^{ab}
264	2.0	2.33 \pm 0.25	2.17 \pm 0.25	92.81 \pm 0.03 ^a
	3.0	1.90 \pm 0.17	1.80 \pm 0.17	94.71 \pm 0.00 ^a
	4.0	2.00 \pm 0.30	1.70 \pm 0.00	86.30 \pm 0.13 ^{ab}

注:不同字母表示不同菌株在相同条件下差异显著($P < 0.05$),下同

表 2 3 株菌在人工胃液(肠液)中的存活情况

Table 2 Survival of three strains of bacteria in artificial gastric juice (intestinal juice)

菌株编号	存活率(%)	
	3 h 人工胃液	4 h 人工肠液
256	57.04 \pm 0.04 ^b	81.87 \pm 0.03 ^b
259	84.13 \pm 0.02 ^a	91.01 \pm 0.01 ^a
264	87.54 \pm 0.03 ^a	87.92 \pm 0.02 ^a

2.2.3 耐胆盐试验结果

胆盐会影响细胞膜的通透性,破坏细胞膜的完整性而导致细胞死亡^[27].食物通过小肠需要 1~4 h,因此本试验选取 0.1%、0.2%和 0.3%的胆盐浓度对在酸性环境下存活率达到 50%以上的菌株进行 4 h 培养,计算其生长效率,结果如表 3 所示.3 株菌的生长率随胆盐浓度升高而降低,这是因为高胆盐浓度导致细胞渗透压变高而使菌体受到影响,耐受力下降.0.10%胆盐条件下,菌株 256 的生长效率为 25.88%,显著低于菌株 259 的 60.71%和菌株 264 的 61.50% ($P < 0.05$),但菌株 259 和 264 差异不显著 ($P > 0.05$);在 0.20%胆盐条件下,菌株 264 生长效率为 55.82%,显著高于菌株 259 的 54.49%,并显著高于菌株 256 的 15.28% ($P < 0.05$);0.30%胆盐浓度下,

菌株 256 生长率仅为 7.93%,显著低于菌株 264 的 41.50%,菌株 259 生长效率为 45.42%显著高于菌株 264 ($P < 0.05$).综上所述,菌株 259 和 264 对胆盐的耐受性较好.因此选择菌株 259 和 264 进行后续试验.

表 3 3 株菌在不同胆盐浓度条件下的生长效率

Table 3 Growth efficiency of three strains of bacteria under different bile salt concentrations

菌株编号	胆盐浓度		
	0.10%	0.20%	0.30%
256	25.88 \pm 0.12 ^b	15.28 \pm 0.18 ^c	7.93 \pm 0.27 ^c
259	60.71 \pm 0.33 ^a	54.49 \pm 0.26 ^b	45.42 \pm 0.54 ^a
264	61.50 \pm 0.56 ^a	55.82 \pm 0.36 ^a	41.50 \pm 0.49 ^b

2.2.4 自凝集率与疏水性试验结果

益生菌凭借自凝集作用聚集到一定程度后才粘附稳固,以达到发挥益生作用所需数量^[28].乳酸菌的自凝集作用不仅可以形成生物膜屏障,还可以阻止致病菌的侵入和感染^[29].细菌粘附在粘膜表明是肠道定植和提供健康益处所必需的,因此,粘附能力是益生菌的重要筛选标准.研究表明乳酸菌的自凝聚能力和表面疏水性与其对宿主肠道细胞的黏附能力是呈正相关的,如图 5 所示,菌株 259 的自凝集率为 19.48%,264 为 18.24%,差异不显著 ($P < 0.05$).

益生菌疏水性的大小与其对肠道上皮细胞的粘附能力有一定相关性^[30].参照吴雨晗等人的标准:疏水率>50%为高疏水性,20%~50%为中度疏水,<20%为非疏水^[31].

如图5所示,菌株259疏水率显著高于菌株264($P<0.05$),菌株259对二甲苯的疏水率为55.04%,表现为高疏水性.自凝集性和疏水性与细菌的黏附能力相关,但不代表自聚集性和疏水性高黏附性就一定高,还需通过细菌黏附试验进一步验证^[32].

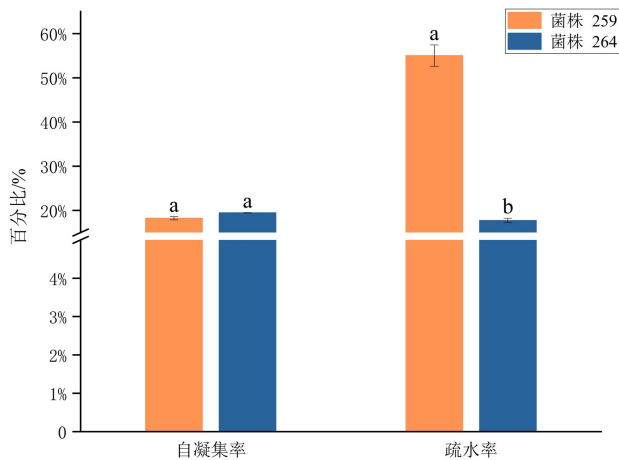


图5 菌株259和菌株264的疏水率和自凝集率

Fig. 5 Hydrophobicity and self-aggregation rate of strain 259 and strain 264

注:不同小写字母表示同一指标不同菌株差异显著($P<0.05$)

2.3 安全性评价结果

2.3.1 药敏试验结果

乳酸菌的耐药性质具有双面性,其正面效应在于,当个体摄入抗生素时,具备一定耐药性的益生菌群体能够得以保留,这有助于维持宿主肠道微生态的平衡和益生菌的功能性.其负面效应在于特定的耐药基因或耐药性可能通过水平基因转移机制,从乳酸菌传递给其他微生物,从而增加了其他微生物对抗生素的耐药潜力^[34].

试验菌株耐药结果如表4所示:菌株259对万古霉素、链霉素和诺氟沙星不敏感,卡那霉素中度敏感,对阿奇霉素、四环素、青霉素、红霉素敏感.这与田原等^[32]研究发现的結果相似.研究表明,乳酸菌对卡那霉素、万古霉素等抗革兰阴性菌的抗生素具有耐药性为先天固有,且不易与致病菌互相传播^[35].此菌株是否携带耐药基因及其他可能存在的耐药因素还需通

过进一步试验研究.

2.3.2 吲哚试验结果

通过吲哚试验可检测出菌株是否会产生色氨酸酶,分解人体必需的色氨酸,生成有害物质吲哚,并影响色氨酸的吸收利用.

如图6所示,接菌培养基颜色浑浊且乙醚层无色,空白对照也未出现颜色反应,表明该菌株在生长繁殖过程中为阴性反应,不产生有害代谢产物吲哚.这与田原等^[32]和王英等^[36]对副干酪乳杆菌吲哚试验的检测結果一致.

表4 副干酪乳杆菌259的耐药性检测结果

Table 4 Drug resistance test results of lactobacillus paracasei 259

抗生素种类	抑菌圈直径(mm)	敏感性
万古霉素	0.00±0.00	L
链霉素	9.23±0.06	L
阿奇霉素	22.27±0.15	H
四环素	26.50±0.20	H
红霉素	30.73±0.15	H
青霉素	32.40±0.10	H
卡那霉素	11.63±0.23	I
诺氟沙星	0.00±0.00	L

注:抑菌圈直径:≥15 高度敏感(H);10-14 中度敏感(I);≤10 不敏感(L)^[33]

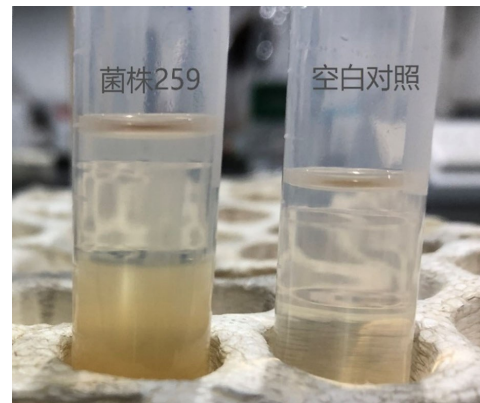


图6 菌株259吲哚试验

Fig. 6 Indole test of strain 259

2.3.3 溶血试验结果

溶血是指在溶血毒素及其他理化因素的作用下,红细胞破裂,血红蛋白逸出.菌株代谢产物有无溶血活性被认为是菌株安全性评价的重要指标^[37].如图7,菌株259在血平板上培养后生长良好且无草绿色溶血圈,对人体无毒性;金黄色葡萄球菌有草绿色溶血环为β-溶血.这与刘凯龙等^[38]研究发现副干酪乳杆菌PC-01不引起溶血现象呈阴性的结论相同.



A. 菌株 259 溶血试验结果



B. 金黄色葡萄球菌溶血试验结果(阳性对照)

图 7 菌株 259 溶血实验

Fig. 7 Hemolytic test of strain 259

2.3.4 氨基酸脱羧酶试验结果

微生物生长在低酸、营养贫瘠且含大量氨基酸底物的培养基中,氨基酸脱羧酶被诱导,将氨基酸脱羧成为相应的生物胺^[39].精氨酸、鸟氨酸和赖氨酸分别会生成精胺、腐胺和尸胺,这些生物胺过多时会引起人体头痛、恶心等副作用.生物胺呈碱性故可通过酸碱指示剂显色作用判定结果.

如图 8,试验组与对照组均为黄色,阴性结果.说明该菌株代谢过程中不会产生腐胺、尸胺和精胺,对人体无害.这与宋静颐^[39]研究发现副干酪乳杆菌 L9 不产生氨基酸脱羧酶和赵雯^[40]等发现副干酪乳杆菌 K56 不会产生组胺及腐胺结论一致.



图 8 菌株 259 氨基酸脱羧酶试验

Fig. 8 Amino acid decarboxylase test of strain 259

2.3.5 明胶液化试验结果

研究表明某些细菌会产生明胶酶,其会降解胶原蛋白等物质而产生毒性^[41].因此需进行明胶液化试验评价乳酸菌安全性.如图 9,试验菌株与空白-对照组培养基均未出现液化现象,表现为阴性,进一步证明了副干酪乳杆菌 259 的安全性.这与万倩等^[42]从传统发酵食品分离的 38 株乳酸菌明胶液化试验均为阴性的结论一致.

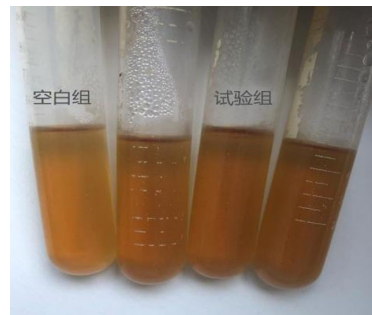


图 9 菌株 259 明胶液化试验

Fig. 9 Gelatin liquefaction test of strain 259

3 结论

本研究筛选获得一株具有高效嘌呤核苷降解能力的乳酸菌 259.该菌株表现出优良的体外益生特性,包括耐酸、耐胃肠液和耐胆盐能力,以及较优的自凝集性和疏水性.安全性结果表明其符合益生菌要求.综上,乳酸菌 259 具备作为新型益生菌候选菌株的开发价值.为乳酸菌在功能性食品和健康产品中的开发应用提供一定的理论依据.

参考文献

- [1] PEDLEY A M, BENKOVIC S J. A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2017, 42(2): 141-154.
- [2] DABBAGH F, GHOSHON M B, HEMMATI S, et al. Engineering human urate oxidase: Towards reactivating it as an important therapeutic enzyme[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 17(2): 141-146.
- [3] 谢丽玲, 贺盼攀, 秦献辉, 等. 高尿酸血症治疗的研究进展[J]. 生物医学转化, 2021, 2(4): 34-40.
- [4] LIU R, HAN C, WU D, et al. Prevalence of hyperuricemia and gout in China's mainland from 2000 to 2014: A systematic review and meta-analysis[J]. BioMed Research International, 2015, doi: 10.1155/2015/762820.
- [5] KIELSTEIN J T, PONTREMOLI R, BURNIER M. Management of hyperuricemia in patients with chronic kidney disease: A focus on renal pro-

- tection[J]. *Current Hypertension Reports*, 2020, 22(12):102.
- [6] 张娟. 青藏高原传统发酵牦牛酸奶中乳酸菌的降胆固醇及体外益生特性研究[D]. 兰州:兰州大学, 2017.
- [7] 高利娥. 青藏高原传统发酵牦牛乳中乳酸菌的多样性及抗氧化特性研究[D]. 兰州:兰州大学, 2020.
- [8] 肖秋颖, 陈炼红, 王琳琳, 等. 川西高原发酵牦牛乳中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选与耐受性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(9):119-123+130.
- [9] 王翔宇, 王琳琳, 陈炼红. 传统发酵牦牛乳中2株高产胞外多糖乳酸菌在模拟消化道中耐受力的研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(4):12-17.
- [10] 房其军. 基于HIF-1 α 介导的焦亡通路及肠道微生态探究黄蜀葵花总黄酮改善高尿酸性肾损伤的临床疗效和作用机制[D]. 南京:南京中医药大学, 2023.
- [11] 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, 2017.
- [12] SUN Y M, XU D M, ZHANG G M, et al. Wild-type *Escherichia coli* Nissle 1917 improves hyperuricemia by anaerobically degrading uric acid and maintaining gut microbiota profile of mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2024, 112:105935.
- [13] PREIDIS G A, VERSALOVIC J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: Gastroenterology enters the metagenomics era[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(6):2015-2031.
- [14] 杨殿斌. 降尿酸乳酸菌筛选及乳杆菌对高尿酸血症大鼠作用的研究[D]. 大连:大连医科大学, 2013.
- [15] 李干杰, 张鹏霞, 周健, 等. 传统泡菜中高效降解核苷乳酸菌的筛选及其特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(12):1-8.
- [16] ZHAO X T, PENG F, LIU Z G, et al. Lactic acid bacteria with anti-hyperuricemia ability: Screening in vitro and evaluating in mice[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52:102411.
- [17] 鄂梦洁, 卢海强, 李晨, 等. 一株益生特性优良的干酪乳杆菌的筛选[J]. *食品科技*, 2016, 41(8):8-13.
- [18] 赵欣, 骞宇. 牦牛酸乳分离发酵乳杆菌发酵豆浆的胃溃疡预防效果研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(17):236-240.
- [19] 加勒哈斯别克·塞力克, 孙昕, 阿曼古丽·杰木斯, 等. 新疆传统发酵乳品中益生菌的益生特性[J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(5):502-508.
- [20] 肖海蒂, 张莉力, 史东辉, 等. 鸡源丁酸梭状芽孢杆菌的分离筛选与鉴定及益生性的研究[J]. *现代畜牧兽医*, 2016(6):1-6.
- [21] SHEKH S L, DAVE J M, VYAS B R M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production[J]. *LWT*, 2016, 74:234-241.
- [22] YEO S, LEE S, PARK H, et al. Development of putative probiotics as feed additives: Validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23):10043-10054.
- [23] 王梦姣. 内蒙古牧区马奶及其制品中肠球菌属乳酸菌安全性评价[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2014.
- [24] ISHIBASHI N, SHIMAMURA S. Bifidobacteria: research and development in Japan[J]. *Food Technology*, 1993, 47(6):126-136.
- [25] 张丽. 传统发酵牦牛奶中益生乳杆菌筛选及其免疫调节功能研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2011.
- [26] 于志会. 益生性降胆固醇植物乳杆菌的筛选、发酵特性及体内功效研究[D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [27] 王祎然, 韦明明, 张涵, 等. 酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(16):121-126+139.
- [28] COLLADO M C, MERILUOTO J, SALMINEN S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 226(5):1065-1073.
- [29] 秦文飞, 宋馨, 夏永军, 等. 乳酸菌在肠道定植的影响因素及研究方法[J]. *食品科学*, 2021, 42(23):275-283.
- [30] BONATSOU S, KARAMOUZA M, ZOUMPOPOULOU G, et al. Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 271:48-59.
- [31] 吴雨晗, 吴婷, 涂健, 等. 一株安庆六白猪源乳酸菌的分离鉴定及生物特性研究[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(08):5415-5425.
- [32] 田原, 季子非, 郭浩南, 等. 副干酪乳杆菌 L1 的安全性及益生性评价[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12):120-127.
- [33] 顾旭峰, 艾连中, 宋馨, 等. 两株干酪乳杆菌的安全性评价[J]. *食品与发酵科技*, 2015, 51(2):63-65.
- [34] 任飞鸿, 赵婷婷, 黄小丹. 益生菌的抗生素耐药性特征研究进展[J]. *实用预防医学*, 2024, 31(7):887-892.
- [35] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 乳酸菌耐药性的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(5):478-480.
- [36] 王英, 范琳琳, 施亚萍, 等. 具有抗氧化功能的副干酪乳杆菌 FM-LP-4 和干酪乳杆菌 FM-M9-1 的安全性初步评价[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(11):4-7+13.
- [37] 郑柳青, 刘冬梅, 张馨月, 等. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的安全性评价及其益生特性初步研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11):111-116.
- [38] 刘凯龙, 康小红, 张哲, 等. 副干酪乳杆菌 PC-01 益生特性和安全性研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11):47-52.
- [39] 宋静颐, 张明, 刘松玲, 等. 副干酪乳杆菌 L9 安全性评价[J]. *中国奶牛*, 2015(21):27-31.
- [40] 赵雯, 刘伟贤, 孙婷, 等. 副干酪乳杆菌 K56 的安全性评价[C]. 第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集, 2020:162-163.
- [41] THURLOW L R, THOMAS V C, NARAYANAN S, et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(11):4936-4943.
- [42] 万倩, 李启明, 吴华星, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的安全性评估[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6):276-286.