

研究报告

降解尿酸乳酸菌复合菌系的筛选与菌株组合提升降解效果

徐红敏^{1,3}, 王敬红^{1,3}, 刘欢^{1,3}, 申贵男^{1,3}, 张正海⁴, 梅雪松⁴, 孙宇峰⁴,
董艳⁴, 魏丹^{*5}, 王伟东^{*1,2,3}

- 1 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319
- 2 台州学院生命科学院, 浙江 台州 318000
- 3 粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江 大庆 163319
- 4 黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江 大庆 163319
- 5 北京农林科学院植物营养与资源环境研究所, 北京 100097

徐红敏, 王敬红, 刘欢, 申贵男, 张正海, 梅雪松, 孙宇峰, 董艳, 魏丹, 王伟东. 降解尿酸乳酸菌复合菌系的筛选与菌株组合提升降解效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2545-2555.

XU Hongmin, WANG Jinghong, LIU Huan, SHEN Guinan, ZHANG Zhenghai, MEI Xuesong, SUN Yufeng, DONG Yan, WEI Dan, WANG Weidong. Screening of uric acid-degrading lactic acid bacteria consortium and strain combination for enhancing degradation[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2545-2555.

摘要: 【背景】高尿酸血症由血液中尿酸含量明显升高而导致, 利用乳酸菌对人体的益生作用缓解高尿酸血症越来越受到关注。【目的】获得具有降解尿酸能力的乳酸菌复合菌系与纯培养菌株。【方法】以泡菜为样品来源, 以尿酸为底物, 采用 MRS 培养基筛选降解尿酸的乳酸菌复合菌系, 通过高效液相色谱法测定复合菌系对尿酸的降解能力。【结果】得到一组乳酸菌复合菌系, 当培养温度为 37 °C、pH 值为 6.20、静置培养 72 h 后复合菌系对尿酸的降解率为 12.08%; 通过优化培养条件, 当该菌系在以牛肉膏为单一氮源、初始 pH 值为 5.00、温度为 35 °C 的条件下培养 72 h, 尿酸降解率上升至 17.19%, 降解率比优化前提高了 42.3%; 从该菌系中分离出两株具有尿酸降解能力的菌株 UA-1 与 UA-2, 它们的尿酸降解率分别为 10.85% 和 8.65%; 通过形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析, 经鉴定两株菌均为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)。将两株单菌组合降解尿酸试验发现, UA-1 与 UA-2 比例为 2:1 的尿酸降解率为 20.2%, 比原复合菌系的降解能力提高了

资助项目: 国家自然科学基金(32170132); 黑龙江八一农垦大学“三纵”科研支持计划(ZDZX202105); 黑龙江八一农垦大学科技创新团队项目(TDJH201809)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170132), the Heilongjiang Bayi Agricultural University “Three Verticals” Scientific Research Support Program (ZDZX202105), and the Project of Heilongjiang Bayi Agricultural University Science and Technology Innovation Team (TDJH201809).

*Corresponding authors. E-mail: WEI Dan, wd2087@163.com; WANG Weidong, wwdcyy@126.com

Received: 2022-08-30; Accepted: 2022-11-06; Published online: 2023-01-04

67.22%。【结论】研究证明了乳酸菌复合菌系对尿酸的降解能力优于单个菌株，为后续利用乳酸菌复合菌系应用提供了数据支持。

关键词：乳酸菌；尿酸；复合菌系；生物降解；布氏乳杆菌

Screening of uric acid-degrading lactic acid bacteria consortium and strain combination for enhancing degradation

XU Hongmin^{1,3}, WANG Jinghong^{1,3}, LIU Huan^{1,3}, SHEN Guinan^{1,3}, ZHANG Zhenghai⁴, MEI Xuesong⁴, SUN Yufeng⁴, DONG Yan⁴, WEI Dan^{*5}, WANG Weidong^{*1,2,3}

1 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Taizhou University School of Life Sciences, Taizhou 318000, Zhejiang, China

3 Engineering Research Center of Processing and Utilization of Grain By-products, Ministry of Education, Daqing 163319, Heilongjiang, China

4 Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, Heilongjiang, China

5 Institute of Plant Nutrition, Resources and Environment, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: [Background] Hyperuricemia is caused by a significant increase the content of uric acid in the blood, and using probiotic lactic acid bacteria to relieve hyperuricemia has attracted more and more attention. **[Objective]** To obtain the lactic acid bacteria consortium and pure culture strains with the ability to degrade uric acid. **[Methods]** We used the MRS medium with uric acid as the substrate to isolate the consortium of lactic acid bacteria degrading uric acid from kimchi. Further, we determined the uric acid degradation ability of the consortium by high performance liquid chromatography. **[Results]** A consortium of lactic acid bacteria was obtained. After being cultured at 37 °C and pH 6.20 for 72 h, the consortium showed the degradation rate of 12.08% for uric acid. Moreover, after optimization of degradation conditions, the degradation rate was increased to 17.19% after inoculation 72 h under the conditions of beef extract as the single nitrogen source, initial pH 5.00, and 35 °C, and the degradation rate increased by 42.3% compared with that before optimization. Two strains UA-1 and UA-2 with uric acid degradation ability were isolated from the consortium, and their uric acid degradation rates were 10.85% and 8.65%, respectively. The two strains were identified as *Lactobacillus buchneri* based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence. The combination of UA-1 and UA-2 at a ratio of 2:1 showed the uric acid degradation rate of 20.2%, which was 67.22% higher than that of the consortium. **[Conclusion]** This study proved that the combination of lactic acid bacteria had better degradation effect on uric acid than single strains, which provided data support for the subsequent application use of lactic acid bacteria consortium.

Keywords: lactic acid bacteria; uric acid; bacteria consortium; biodegradation; *Lactobacillus buchneri*

尿酸(uric acid, UA)是嘌呤氧化代谢的最终产物,其分子式为 $C_5H_4N_4O_3$ ^[1]。人体如果外源摄入富含嘌呤的食物、缺乏嘌呤代谢酶或内源嘌呤合成过多,血液中尿酸的含量明显升高而导致高尿酸症^[2]。由于黄嘌呤、次黄嘌呤(鸟嘌呤)、肌苷(鸟苷)、核苷酸等均为尿酸的前体物质,所以最终血液中尿酸的含量可能均与它们有关^[3]。尿酸代谢是三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)降解为二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、ADP再降解为一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)、AMP又转化为一磷酸肌苷(inosine monophosphate, IMP)、IMP再转化为肌苷(inosine, IN)、IN最后转化为次黄嘌呤(hypoxanthine, HX)的过程^[4]。研究发现尿酸患者与健康人群相比肠道微生物群落显著不同,表明微生物群落可以对肠道内尿酸水平有一定的调节作用^[5]。

随着乳酸菌对人体的益生作用越来越受到关注,有关具有高效嘌呤核苷分解能力乳酸菌的筛选也受到了广泛的关注。2004年,日本东京大冢制药株式会社获得了多株具有较高嘌呤核苷降解能力的菌株,并通过动物实验验证了其降解能力,并已申请专利应用于商业^[6]。Lee等^[7]从发酵食品中分离筛选出副干酪乳杆菌MJM60396,在动物研究中,口服MJM60396 3周后,血清尿酸显著降低至正常水平,催化尿酸形成的黄嘌呤氧化酶的数量减少了81%。目前微生物降解尿酸研究主要集中在嘌呤代谢方面,直接对尿酸降解的研究较少,而且利用乳酸菌混合菌群对尿酸降解的研究还不充分。本研究旨在从朝鲜族特色食品“泡菜”中筛选具有高效尿酸降解能力的复合菌系,从复合菌系中筛选具有高效降解尿酸能力的纯培养菌株,再进行纯培养菌株组合培养提高尿酸的降解能力,以期开发相关具有保健功能的食品种类奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

微生物分离样品来源:2种泡菜为大庆生产商品泡菜,分别为白菜泡菜、芥菜泡菜,购自大庆市北京华联超市;另一种为家庭自制泡菜。

1.1.2 培养基

MRS培养基参照文献[8]配制;尿酸培养基参照文献[9]配制;明胶液化培养基、硫化氢培养基、硫化氢培养基参照文献[10]配制;改良的MRS培养基:将MRS培养基中的蛋白胨10.00 g、酵母提取物5.00 g去除,将pH值调至5.00。

1.1.3 主要试剂和仪器

蔗糖,天津市福晨化学试剂厂;蛋白胨、牛肉膏、酵母提取物,北京奥博星生物技术有限责任公司;乙酸钠、 K_2HPO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,沈阳市华东试剂厂;柠檬酸氢二铵,天津市瑞金特化学品有限公司;葡萄糖,天津市化学试剂供销公司;琼脂,石狮市环球琼脂胶有限公司;柠檬酸铁,天津市光复精细化工研究所; KH_2PO_4 ,辽宁泉瑞试剂有限公司; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、NaCl,天津市鼎盛鑫化工有限公司; $CaCl_2$,天津市改远化学试剂有限公司;Tween-80,天津市博迪化工有限公司;尿酸,上海麦克林生化科技有限公司;明胶,天津市化学试剂厂。

紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;高效液相色谱仪,Agilent公司;微型pH计,Horiba公司;Omega Soil DNA Kit, Omega公司;NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪,赛默飞世尔科技公司。

1.2 降解尿酸乳酸菌复合菌系的筛选与驯化

配制MRS液体培养基,分装至50 mL的离心管中,每支离心管装入30 mL培养基,121 °C灭菌20 min。在无菌条件下,分别称取3种泡菜

汁液 3 g, 设置摇床振荡培养(150 r/min)和静置培养两种方式, 均在 37 °C 培养 72 h, 观察复合菌系的生长情况。每隔 12 h 检测菌系 pH, 观测菌体的产酸情况, 观察不同培养方式对复合菌系生长的影响。将菌液按照 10% 的接种量接入 MRS 液体培养基, 每隔 72 h 传代一次, 连续传代 5 次以上, 获得稳定的复合菌系。将菌系保藏于 4 °C 冰箱内。

在 MRS 液体培养基中加入尿酸, 设置尿酸浓度为 250 mg/L, 按照 10% 的接种量接入获得的稳定菌系, 37 °C 静置培养 72 h, 以不加菌体作为空白对照, 观察菌体的生长情况。连续传代 10 次以上, 使用 30% 的甘油, 与菌体体积 1:1 的比例放入 2 mL 的甘油管中于 -80 °C 冰箱中保存菌种备用。

1.3 降解尿酸乳酸菌复合菌系指标检测

1.3.1 降解尿酸乳酸菌复合菌系生长曲线测定

采用比浊法^[11], 通过紫外分光光度计测定 600 nm 波长的吸光值, 判断微生物的生长状况。将获得的复合菌系按照 10% 的接种量转移到 MRS 液体培养基, 在 37 °C 静置培养, 每 12 h 测定一次吸光值, 利用未接种的 MRS 液体培养基作为空白对照并进行校零, 选用 600 nm 波长依次测定各个培养时间的吸光值, 绘制尿酸降解微生物的生长曲线。

1.3.2 乳酸菌复合菌系降解尿酸过程中 pH 变化

将获得的复合菌系按照 10% 的接种量转移到 MRS 液体培养基, 以未接种菌液纯培养基作为对照, 均在 37 °C 培养, 每培养 12 h, 通过 pH 计直接测定 pH, 直至培养结束。绘制尿酸降解微生物的生长过程中 pH 变化曲线。

1.3.3 尿酸的高效液相色谱(HPLC)检测方法

采用高效液相色谱方法^[12]检测培养液中的尿酸浓度。根据 HPLC 结果中的尿酸峰面积与尿酸浓度(mg/L)绘制标准曲线, 绘制尿酸的线性回归方程, 将待测样品中尿酸峰面积数值代入公式得出待测样品的尿酸浓度, 计算降解率。

1.3.4 乳酸菌复合菌系细菌组成多样性分析

将复合菌系接种在 MRS 培养基中, 取尿酸降解初期(12 h)、高峰期(36 h)、末期(72 h)这 3 个时期样品采用 Omega Soil DNA Kit 提取总 DNA, 利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 用 NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪分析抽提 DNA 浓度和纯度。提取基因组 DNA 后, 采用标准细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增, 并对其产物进行纯化、定量。PCR 反应体系与 PCR 反应条件均参照文献[13]进行。测序工作均由上海派森诺基因科技有限公司采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端(paired-end)测序, 分析不同时期复合菌系多样性变化情况^[14], 使用派森诺云平台和 Origin 2022 软件进行结果图片绘制。本研究获得的 16S rRNA 基因序列已提交国家微生物科学数据中心。

1.4 乳酸菌复合菌系的培养条件优化

选择温度(30、35、40、45、50 °C)^[15]、pH (5.00、5.50、6.00、6.50、7.00)^[16]和单一氮源(牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、亚硝酸钠、硝酸铵)^[17]为优化条件。按照 10% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 不接种菌液为对照, 每个处理设置 3 个重复, 在 37 °C 静置培养 72 h, 测定尿酸的降解速率, 确定复合菌系的最佳培养条件。

1.5 纯培养菌株的分离

将初筛得到的具有降解尿酸能力的乳酸菌复合菌系使用涂布法转移到以尿酸(Uric acid, UA)为唯一碳源和氮源的固体培养基(尿酸培养基)中, 37 °C 培养 72 h。选取形态不同的菌落进一步在新的 UA 固体培养基(尿酸培养基)上划线, 培养获得单个菌落, 观察菌落形态并进行生理生化鉴定及 16S rRNA 基因测序分析, 将所得序列上传至国家微生物科学数据中心并获得正式编号。将纯化的单克隆菌落挑至 MRS 液体培养基

中, 37 °C 静置培养 72 h。

1.6 纯培养菌株组合培养

将分离获得的纯培养菌株 UA-1 与 UA-2 分别调整 OD_{600} 为 1.2 后, 在 40 mL 体系中按照 10% 接种量将纯培养菌株以 1:1、1:2、2:1 这 3 种不同比例进行组合, 接种于 MRS 培养基中, 以未接种菌液的培养基作为空白对照, 37 °C 培养 72 h。以未接种菌液作为对照, 通过 pH 变化及对尿酸的降解效果确定最佳的组合比例。

2 结果与分析

2.1 降解尿酸乳酸菌复合菌系的筛选与驯化结果

从 3 种不同来源的泡菜中分离出 3 种复合菌系, 分别编号为复合菌系 1 号、2 号和 3 号。将 3 种复合菌系接种至 50 mL 的离心管中生长后(管中装有 30 mL MRS 液体培养基), 菌液上层培养液澄清, 离心管底有絮状沉淀物沉淀, 摇匀后培养液呈浑浊。在培养 72 h 后, pH 值由 6.20 降低至 3.50 并保持稳定。在选取培养方式试验中, 振荡培养的菌体的生长情况与 pH 的变化情况相较静置培养均缓慢, 因此采用静置培养的方式培养菌系。在尿酸浓度 250 mg/L 时, 分离的 3 种复合菌系的菌体在 MRS 液体培养基中的生长速率无明显变化, 说明 3 个复合菌系能适应含有 250 mg/L 尿酸的生长环境, 已经筛选出耐受尿酸的复合菌系。挑选 1 号复合菌系进行后续实验, 并编号为 RSJ-1, 将菌系连续传代 10 代以后, 菌体的生长速度稳定, 每隔 72 h 进行传代一次。

将 RSJ-1 接种在 MRS 液体培养基后, 37 °C 培养每 12 h 取样测定, 如图 1 所示。RSJ-1 在 37 °C 培养 36 h 时菌体的生长最旺盛; 根据 1.3.3 试验方法, 绘制的尿酸标准曲线为尿酸的线性回归方程为: $y=0.015\ 2x+0.133\ 8$ ($R^2=0.999$), 测定 RSJ-1 在 36 h 时尿酸降解率为 9.03%, 在 72 h 时尿酸降解率为 12.08%。

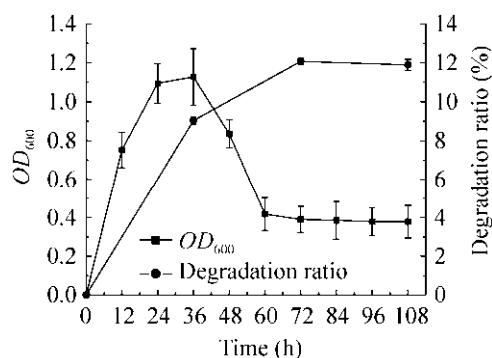


图 1 RSJ-1 培养 72 h 内生长情况变化与尿酸降解情况

Figure 1 RSJ-1 72 h growth and uric acid degradation.

2.2 乳酸菌复合菌系降解尿酸的培养条件优化结果

由于 RSJ-1 的尿酸降解效果最好, 选取 RSJ-1 进行降解率单因素试验, 单因素试验结果表明, 在培养条件为 35 °C、初始 pH 值为 5.00、单一氮源为牛肉膏时尿酸降解效果最佳, 最终确定为最佳培养条件, 最终确定改良的 MRS 液体培养基。

将 RSJ-1 接种于改良的 MRS 液体培养基, 35 °C 培养 72 h, 测定接种 72 h 后尿酸含量与未接种液体培养基中的尿酸含量、生物量测定及 pH 动态变化。如图 2A 所示, 在培养条件优化后, 72 h 后 RSJ-1 的尿酸降解率上升至 17.19%, 相较未优化前提升了 5.11%; 与未优化前相比 RSJ-1 处于对数生长期和稳定生长期的时间相对延长, 菌体数量趋于稳定; 如图 2B 所示, pH 值由初始的 5.00 降为 3.33。

2.3 降解尿酸乳酸菌复合菌系组成多样性分析结果

将 RSJ-1 降解初期(A)、降解中期(B)和降解末期(C)这 3 个不同时期样品进行 16S rRNA 基因多样性测序分析, 在国家微生物科学数据中心提交测序数据, 获得的正式编号为 NMDC40026264。

2.3.1 复合菌系 α 多样性分析

用 QIIME 2 软件对样品 α 多样性指数进行评估, 其评估结果如表 1 所示。Shannon 和

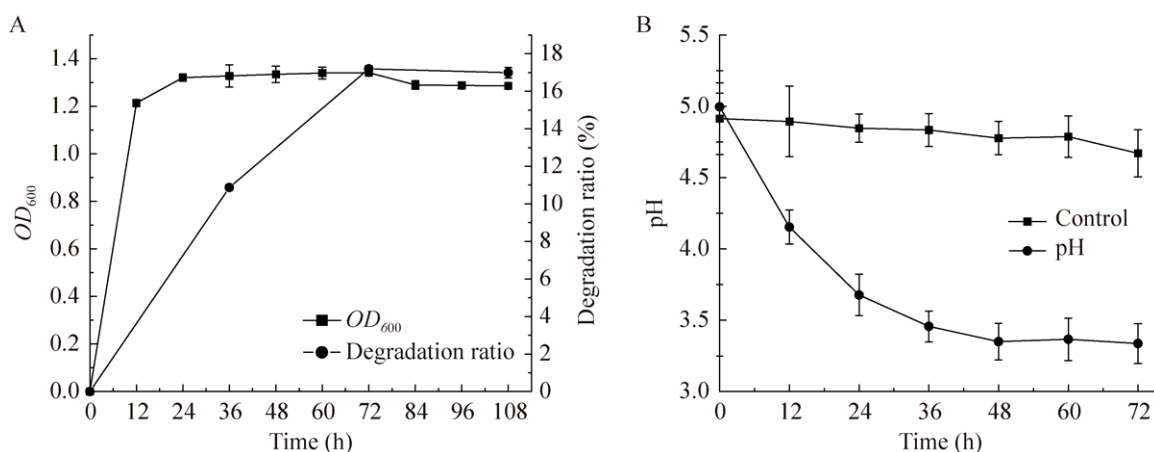


图2 优化后 RSJ-1 培养 72 h 内的各指标的变化情况 A: 生长曲线与尿酸降解率. B: 降解过程 pH 变化

Figure 2 The changes of each index of the optimized RSJ-1 within 72 h. A: OD_{600} and uric acid degradation rate. B: pH changes during degradation.

表1 RSJ-1 的 α 多样性指数

Table 1 Alpha diversity index of RSJ-1

Sample	Shannon	Simpson	Chao1	Coverage
12 h	2.764±0.010	0.761±0.001	99.867±6.260	0.999±0.000
36 h	3.718±0.023	0.867±0.002	77.849±1.880	0.999±0.000
72 h	3.673±0.008	0.860±0.001	104.091±13.890	0.999±0.000

Simpson 指数用于衡量物种的多样性, Shannon 指数和 Simpson 指数值越大, 说明样品的物种多样性越高, 从表 1 中可以看出, 降解中期(B)物种多样性最高。覆盖率(coverage)的数值越高, 则样本中物种被测出的概率越高。Chao1 指数为物种丰富度分析, 从表 1 中可以看出, 在降解末期(C), RSJ-1 的物种数量最高。基于现有的数据分析结果是可靠的。

2.3.2 复合菌系的 β 多样性分析

将 RSJ-1 降解初期(A)、降解中期(B)和降解末期(C)这 3 个不同时期样品进行 16S rRNA 基因多样性测序分析, 对测序结果中的 β 多样性进行分析, 样本差异主要用 PCoA (principal co-ordinates analysis)距离矩阵分析, 如图 3 所示。其中横坐标解释了 99.4%的群落差异, 纵坐标解释了 0.2%的群落差异。结果发现, 不同培养时期距离较远, 其中, 降解中期(B)和降解末期(C)与降解初期(A)

间距离较远, 差异较大。降解中期(B)和降解末期(C)组间距离较远, 说明组内存在一定的差异。结果表明不同时期的样本均存在差异。

在种水平分类级别上选择相对丰度超过 0.002%的细菌进行相对丰度柱状图的绘制, 如

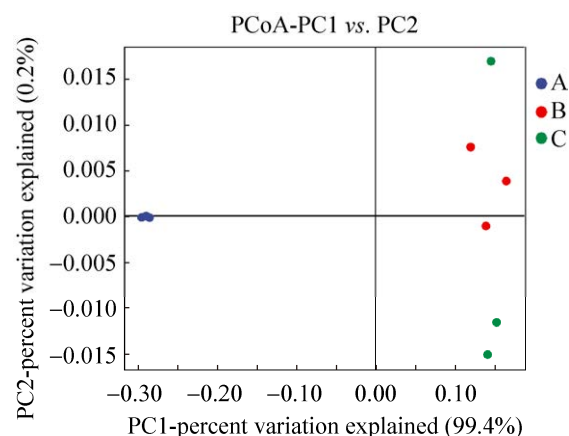


图3 尿酸降解不同时期的 PCoA 图

Figure 3 PCoA diagram of UA degradation at different stages.

图 4 所示。进一步对种水平分析, 3 个不同时期样本主要由布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、*Lactobacillus casei* 组成, 其中布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)在 3 个不同时期样本中的丰度最高, 分别为 92.21%、51.35%和 50.96%。

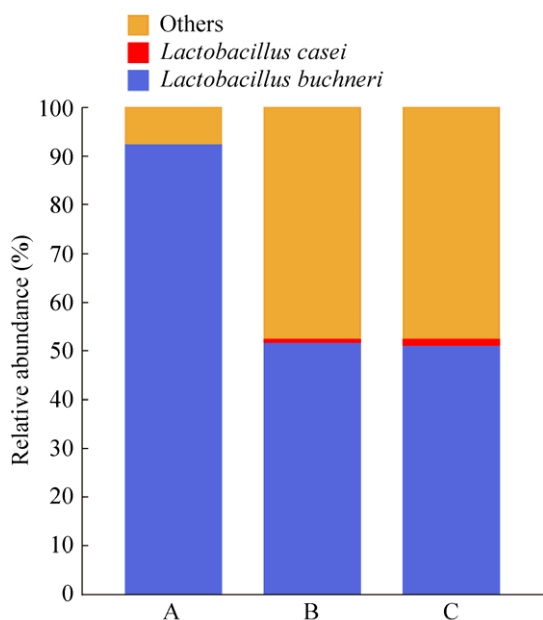


图 4 不同时期 RSJ-1 的种水平分类

Figure 4 Species level classification of RSJ-1 in different periods.

2.3.3 降解尿酸纯培养菌株的分离结果

从降解尿酸的 RSJ-1 中分离出两株单菌落, 分别编号为菌株 UA-1、UA-2, 菌落形态如图 5 所示。菌株 UA-1 的形态特征为针尖状、凸起、边缘完整、表面光滑、较透明、乳白色、质地均匀、易用接种环挑起菌落; 菌株 UA-2 的形态特征为菌落较小, 边缘呈不规则, 表面光滑中间有凸起, 乳白色, 质地均匀。将分离获得的菌株 UA-1 与 UA-2 进行革兰氏染色, 结果显示, 两株单菌均为革兰氏阳性细菌, 短杆状, 单生, 不生芽孢; 生理生化结果显示, 菌株 UA-1 与 UA-2 不液化明胶, 不产生硫化氢, 特异性地糖分解, 接触酶阴性。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[18]初步判定菌株 UA-1 和 UA-2 与乳杆菌科最为接近。

将菌株 UA-1 和 UA-2 的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库进行同源性比对。结果发现菌株 UA-1 和 UA-2 均与布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*) JCM 1115 相似度达 100%, 确定 UA-1 和 UA-2 为同一来源菌株。采用 MEGA 7 软件构建系统发育树(图 6), 通过形态学特征及分子生物学鉴定, 初步确定菌株 UA-1 和 UA-2 均为布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)。



图 5 菌株 UA-1 (A)和 UA-2 (B)菌落形态

Figure 5 The colony morphology of UA-1 and UA-2 strains. A: UA-1. B: UA-2.

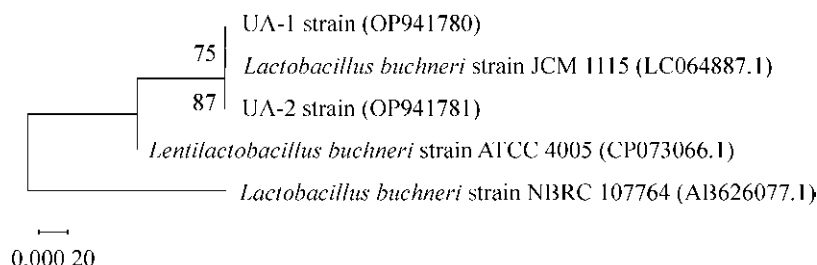


图6 菌株 UA-1 和 UA-2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内数字为 GenBank 登录号；节点处数字为自展值；标尺代表序列间差异数值的单位长度

Figure 6 Phylogenetic tree of strains UA-1 and UA-2 was constructed based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; The ruler represents the unit length of the difference value between the sequences.

将分离获得的纯培养菌株 UA-1 和 UA-2 从分离平板接种至 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温培养并传代至稳定, 取稳定的菌株测定尿酸降解情况及 pH 动态变化情况。如图 7A 所示, 菌株 UA-1 在 72 h 时的尿酸降解率为 10.85%, 菌株 UA-2 的尿酸降解率为 8.65%, 菌株 UA-1 的尿酸降解能力较强。如图 7B 所示, UA-1 从初始 pH 6.30 经过 36 h 的培养后 pH 值降至 3.92 后并趋于稳定。UA-2 从初始 pH 6.30 经过 36 h 的培养后 pH 值降至 3.96 后并趋于稳定。

2.4 降解尿酸纯培养菌株组合的降解特性

将按照不同比例组合后的菌体接种至 MRS 液体培养基中测定尿酸降解情况及 pH 动态变化情况。如图 8A 所示, 菌株 UA-1:UA-2 比例为 2:1 在 72 h 时的尿酸降解情况最佳, 降解率为 20.2%, 比原复合菌系的降解能力提高了 8.18%。如图 8B 所示, 菌株 UA-1:UA-2 比例分别为 1:1、1:2、2:1 的 3 种组合从初始 pH 6.29 经过 24 h 后, 比例为 1:1 的 pH 值降为 3.56, 比例为 1:2 的 pH 值降为 3.67, 比例为 2:1 的 pH 值降为 3.68。

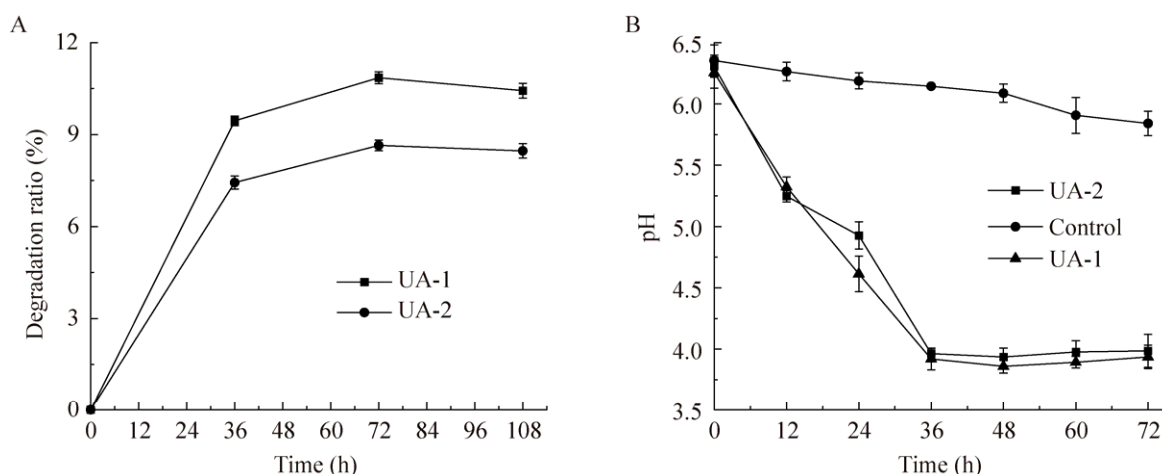


图7 菌株 UA-1 和 UA-2 培养 72 h 各指标测定结果 A: 尿酸降解率. B: 降解过程 pH 变化

Figure 7 Changes of each index of the UA-1 and UA-2 within 72 h. A: Uric acid degradation ration. B: pH changes during degradation.

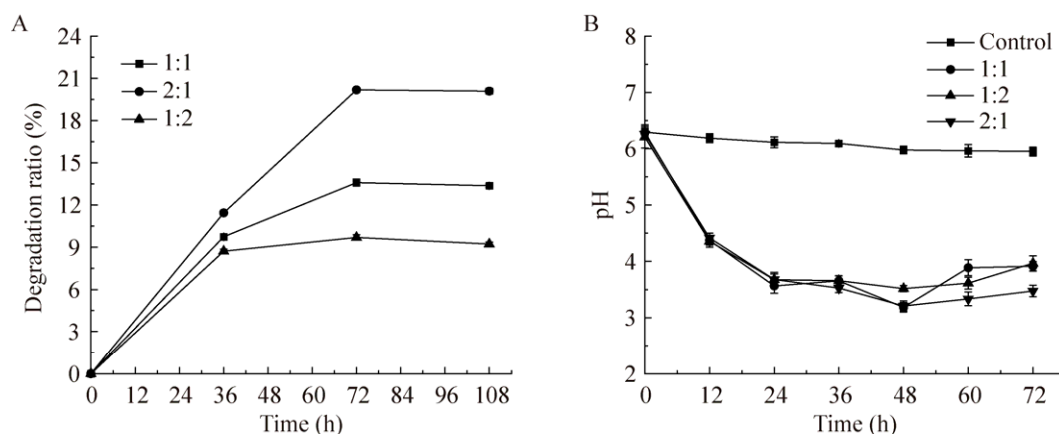


图8 菌株 UA-1 与 UA-2 不同比例下培养 72 h 各指标测定结果 A: 尿酸降解率. B: 降解过程 pH 变化

Figure 8 Measurement results of various indicators of strains UA-1 and UA-2 cultured in different ratio for 72 h. A: Uric acid degradation ration. B: pH changes during degradation.

3 讨论

随着饮食习惯的改变,高尿酸血症和痛风的患病率不断升高。泡菜主要富含乳酸菌,具有维持肠道菌群平衡的作用,有助于食物在体内的消化吸收。随着对乳酸菌益生作用的关注,筛选能够对嘌呤、核苷、肌酐、尿酸具有高效降解能力微生物的研究日益深入^[19-22]。

以往研究主要针对从环境样品中直接进行纯培养菌株的筛选,本研究通过筛选具有降尿酸能力的1号复合菌系RSJ-1,并从中筛选具有降解尿酸能力的纯培养菌株UA-1和UA-2。Wu等^[23]研究的从中国发酵食品“浆水”中分离的发酵乳杆菌JL-3的尿酸降解率为31.3%,与本次试验相比存在很大差距。可能的原因是样品采集不同,微生物生存环境存在一定的差异,导致尿酸的降解能力存在差距。乳酸菌发酵过程产生大量乳酸,pH变化情况与菌体生长密切相关,产酸能力间接代表了菌体的繁殖能力。RSJ-1按照10%的接种量培养24 h,pH值下降为3.68。在王鑫宇^[24]分离的乳酸菌按照0.15%的接种量接种24 h后,pH值下降为4.11。由此可见,本实验分离的乳酸

菌复合菌系生长速度快、产酸能力强。从尿酸的降解率分析,与未接种菌液的空白对照相比,在RSJ-1作用下尿酸出现一定的分解,尿酸浓度明显降低,经过条件优化后RSJ-1比原复合菌系的降解能力提高了5.11%。将分离获得的纯培养菌株UA-1与UA-2按照不同比例进行组合后发现,比原复合菌系的降解能力提高了8.12%。

许多研究揭示了高尿酸血症患者和非高尿酸血症患者肠道菌群的差异,肠道和肠道微生物在调节血清尿酸浓度和体内尿酸分布方面发挥着重要作用。动物研究表明,高尿酸血症诱导肠道微生物组的变化,肠道菌群有效降低痛风患者和高尿酸血症小鼠的血清UA水平。因此肠道微生物可以作为治疗高尿酸血症的新方法^[25]。在乳酸菌的生长环境上,体外培养和肠道定殖相比,本实验缺乏菌系在肠道内的吸附和蠕动对尿酸分解的促进作用,后续可开展相关实验。

本实验主要是从泡菜中分离出乳酸菌复合菌系并获得纯培养菌株,将来可应用于泡菜食品行业的生产,后续可以研究食用泡菜后其在动物实验中的功效,以得到更直接、准确的调控尿酸能力,增加泡菜的食用价值。

4 结论

(1) 得到一组降解尿酸的乳酸菌复合菌系, 优化培养条件后尿酸降解率 17.19%; (2) 从该菌系中分离出两株具有尿酸降解能力的菌株 UA-1 和 UA-2, 将两株纯培养菌株组合培养后, UA-1 与 UA-2 比例为 2:1 的尿酸降解效果最佳, 降解率为 20.2%; (3) 研究证明了乳酸菌复合菌系对尿酸的降解作用优于单个菌株, 为后续利用乳酸菌复合菌系缓解高尿酸症提供了数据支持。

REFERENCES

- [1] HSU CL, HOU YH, WANG CS, LIN SW, JHOU BY, CHEN CC, CHEN YL. Antiobesity and uric acid-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 in high-fat-diet-induced obese rats[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2019, 38(7): 623-632.
- [2] 杨殿斌, 袁杰利. 降血尿酸乳酸菌筛选及其对高尿酸血症模型大鼠作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 125-128.
YANG DB, YUAN JL. Screening of serum uric acid-lowering lactic acid bacteria and its effect on hyperuricemia in rat models[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(2): 125-128 (in Chinese).
- [3] LEI D, LI LX, HUANG SH, LIU L, CAI PD, GU ZY, SHU K, LI SM, HONG T, LIU ZY. The subchronic toxic effects of *Mosla chinensis maxim* in normal rats[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 4521586.
- [4] XIAO YX, ZHANG CX, ZENG XL, YUAN ZC. Microecological treatment of hyperuricemia using *Lactobacillus* from pickles[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 195.
- [5] ANDRES-HERNANDO A, CICERCHI C, KUWABARA M, ORLICKY DJ, SANCHEZ-LOZADA LG, NAKAGAWA T, JOHNSON RJ, LANASPA MA. Umami-induced obesity and metabolic syndrome is mediated by nucleotide degradation and uric acid generation[J]. Nature Metabolism, 2021, 3(9): 1189-1201.
- [6] 久米村慧, 池永武, 冈松洋, 清水昌, 小川顺. 降低血清尿酸水平的组合物: CN, CN1812801 A[P]: 200480017815.5:1. 2004-06-23.
OKAMATSU H, OGAWA J, IKENAGA T, SHIMIZU S, KUMEMURA. Composition for lowering serum uric acid level: CN, CN1812801 A[P]: 200480017815.5:1. 2004-06-23 (in Chinese).
- [7] LEE YJ, WERLINGER P, SUH JW, CHENG JH. Potential probiotic *Lactocaseibacillus paracasei* MJM60396 prevents hyperuricemia in a multiple way by absorbing purine, suppressing xanthine oxidase and regulating urate excretion in mice[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 851.
- [8] 翟清燕, 郑世超, 李新玲, 霍胜楠. 乳酸菌的分类鉴定及在食品工业中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5260-5265.
ZHAI QY, ZHENG SC, LI XL, HUO SN. Classification and identification of lactic acid bacteria and application in food industry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(16): 5260-5265 (in Chinese).
- [9] de VUYST L, LEROY F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(4): 432-453.
- [10] 辛婷, 郭潇扬, 王钊, 苏楠. 发酵食品中产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 现代牧业, 2022, 6(2): 7-13.
XIN T, GUO XY, WANG Z, SU N. Screening and identification of bacitracin-producing lactic acid bacteria from fermented foods[J]. Modern Animal Husbandry, 2022, 6(2): 7-13 (in Chinese).
- [11] 张沙沙, 窦清泉, 邹积宏. 降尿酸乳酸菌的筛选及其对高尿酸血症小鼠的影响[J]. 生物技术, 2022, 32(1): 48-54, 28.
ZHANG SS, DOU QQ, ZOU JH. Screening of uric acid-lowering lactic acid bacteria and its effect on mice with hyperuricemia[J]. Biotechnology, 2022, 32(1): 48-54, 28 (in Chinese).
- [12] 郁颖佳, 郑晓伟, 黄滔敏, 段更利. 高效液相色谱法测定人体血浆中尿酸的浓度[J]. 复旦学报(医学版), 2006, 33(2): 273-275.
YU YJ, ZHENG XW, HUANG TM, DUAN GL. Determination of concentration of uric acid in human plasma by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2006, 33(2): 273-275 (in Chinese).
- [13] 田润敏, 赵铎, 洪艳华, 张洪奇, 申贵男, 晏磊, 邱化蛟, 王伟东. 龙凤湿地与玛奈湿地底泥细菌古菌多样性及其对环境因子的响应[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2500-2514.
TIAN RM, ZHAO D, HONG YH, ZHANG HQ, SHEN GN, YAN L, QIU HJ, WANG WD. Diversity of bacteria and archaea in sediments of Longfeng wetland and Dangnai wetland and its response to environmental factors[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2500-2514

- (in Chinese).
- [14] KHOCHAMIT N, SIRIPORNADULSIL S, SUKON P, SIRIPORNADULSIL W. *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria improve the growth performance and blood parameters and reduce *Salmonella* infection in broilers[J]. Veterinary World, 2020, 13(12): 2663-2672.
- [15] 酃金龙, 师雨梦, 滕超, 朱运平, 李秀婷. 老面中乳酸菌产酸性能优化及对馒头品质的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 106-114.
- LI JL, SHI YM, TENG C, ZHU YP, LI XT. Improving acidic ability of lactic acid bacteria from sourdough and its effect on steamed bread quality[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 106-114 (in Chinese).
- [16] 刘珊珊, 王聪, 魏金艳, 朱龙岗, 张陈云. 酸菜汁中乳酸菌的筛选和产酸性能的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 112-116.
- LIU SN, WANG C, WEI JY, ZHU LG, ZHANG CY. Screening and acid production optimization of lactic acid bacteria from sauerkraut juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(3): 112-116 (in Chinese).
- [17] 黄胜男, 林志健, 张冰, 糜迪, 牛红娟, 朱春胜, 王雪洁, 孙博喻. 肠道菌群结构变化与高尿酸血症发生的关系[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(7): 452-456.
- HUANG SN, LIN ZJ, ZHANG B, GENG D, NIU HJ, ZHU CS, WANG XJ, SUN BY. Correlation between structural shifts of gut microbiota and hyperuricemia in quails[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 38(7): 452-456 (in Chinese).
- [18] 陈雨, 吉巧琳, 李智昊, 曹亚璞, 袁菰棋, 杜刚, 袁明龙, 李干鹏. 高产乳酸菌株的筛选、鉴定及发酵条件的研究[J/OL]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2023(2): 1-14.
- CHEN Y, JI QL, LI ZH, CAO YP, YUAN SQ, DU G, YUAN ML, LI GP. Screening identification and fermentation conditions of high yield lactic acid bacteria[J/OL]. Journal of Yunnan Minzu University (Natural Sciences Edition), 2023(2): 1-14 (in Chinese).
- [19] DORDEVIÄ D, JANÄÄKOVÄI, SIMONA, VÄTÄZOVÄI, MONIKA, KUSHKEVYCH I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes[J]. Journal of Advanced Research, 2021, 27: 55-69.
- [20] TUMOVA S, SHI Y, CARR IM., WILLIAMSON G. Effects of quercetin and metabolites on uric acid biosynthesis and consequences for gene expression in the endothelium[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 162: 191-201.
- [21] DALBETH N, ALLAN J, GAMBLE GD, HORNE A, WOODWARD OM, STAMP LK, MERRIMAN TR. Effect of body mass index on serum urate and renal uric acid handling responses to an oral inosine load: experimental intervention study in healthy volunteers[J]. Arthritis Research & Therapy, 2020, 22(1): 259.
- [22] LI M, YANG DB, MEI L, YUAN L, XIE A, YUAN JL. Screening and characterization of purine nucleoside degrading lactic acid bacteria isolated from Chinese sauerkraut and evaluation of the serum uric acid lowering effect in hyperuricemic rats[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105577.
- [23] WU Y, YE Z, FENG PY, LI R, CHEN X, TIAN XZ, HAN R, KAKADE A, LIU P, LI XK. *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolated from “Jiangshui” ameliorates hyperuricemia by degrading uric acid[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1897211.
- [24] 王鑫宇. 天然发酵酸菜中乳酸菌的分离及发酵特性的评价[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2019.
- WANG XY. Isolation of lactic acid bacteria from naturally fermented sauerkraut and evaluation of fermentation characteristics[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2019 (in Chinese).
- [25] NI CX, LI X, WANG L, LI X, ZHAO JX, X LI, ZHAO JX, ZHANG H, WANG G. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism[J]. Food & Function, 2021, 12: 7054-7056.