干酪乳杆菌 LCR6013 中 NiR 和电子供体的分离纯化及其协同降解亚硝酸盐

陈浩，陈思敏，刘冬梅，黄娟，陈舒然，吴晖，黄智斌，韩欣

（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

摘要：干酪乳杆菌 LCR 6013 经 10.00 mg/L 的亚硝酸钠诱导和溶菌酶破壁，粗酶溶液分别经过 30%和 60%饱和硫酸铵溶液分级沉淀，沉淀被溶解和透析后分别得蛋白液Ⅰ和蛋白液Ⅱ，通过阴离子 DEAE Sepharose Fast Flow 和葡聚糖凝胶 G-100 层析柱分离纯化。蛋白液Ⅱ纯化得亚硝酸盐还原酶蛋白（NiR），在加入细胞色素 C 才能降解亚硝酸盐，LCR6013 的每升发酵液得到 0.54 mg 活性酶蛋白，其 NiR 比酶活为 1851.20 U/mg，得率为 2.08%，纯化后其 NiR 比活力提高 16 倍，经 SDS-PAGE 电泳确定 LCR6013 NiR 的单体分子质量约为 45 ku。同时，由蛋白液Ⅰ纯化的蛋白加入 LCR6013 的 NiR 中，表现降解亚硝酸盐的活力，经鉴定为电子供体蛋白(ElD)，经 SDS-PAGE 电泳确定 LCR6013 中 ElD 的单体分子质量约为 13 ku，与细胞色素 C 的单体分子质量相同。LCR6013 的 ElD、细胞色素 C、$FeSO_4$ 和 Na_2SO_3 分别协同 NiR 能在 48 h 内将 75.00 mg/L 的亚硝酸钠完全降解，而 LCR6013 的 ElD 和细胞色素 C 降解效果最好。

关键词：干酪乳杆菌；亚硝酸盐还原酶；分离纯化；电子供体

文章篇号：1673-9078(2017)1-125-131 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.020

Isolation and Purification of Nitrite Reductase and Electron Donor from *Lactobacillus casei* LCR 6013 and Their Synergetic Degradation of Nitrites

CHEN Hao, CHEN Si-min, LIU Dong-mei, HUANG Juan, CHEN Shu-ran, WU Hui, HUANG Zhi-bin, HAN Xin

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: After *Lactobacillus casei* LCR 6013 was induced with sodium nitrite solution (10.00 mg/L) and treated with lysozyme, the crude enzyme solution was precipitated using 30% and 60% saturated ammonium sulfate solution, respectively. The precipitates were dissolved and dialyzed to obtain protein solution *I* and protein solution *II*, respectively, which were purified by anion DEAE Sepharose Fast Flow column chromatography and SephadexG-100 gel filtration. The nitrite reductase (NiR) purified from protein solution *II* could degrade nitrite only after adding cytochrome C. A total of 0.54 mg of active enzyme protein, with an activity of 1851.20 U/mg, was obtained from 1.00 L of LCR 6013 fermentation liquid, and the specific NiR activity of the purified enzyme increased by 16-fold with an yield of 2.08%. The monomer molecular weight of NiR was about 45.00 ku based on SDS-PAGE patterns. Moreover, when the protein purified from protein solution *I* was added to NiR from LCR 6013, it showed the ability to degrade nitrites. The protein was identified as an electron donor protein (ElD). The monomer molecular weight of the ElD, as confirmed using SDS-PAGE, was about 13.00 ku, which is the same as that of cytochrome C. It was also found that when combined with NiR from LCR 6013, the ElD from LCR 6013, cytochrome C, ferrous sulfate, and sodium sulfite could degrade 75.00 mg/L of sodium nitrite completely within 48 h, but ElD from LCR 6013 and cytochrome C were the most effective for nitrite degradation.

Key words: *Lactobacillus casei*; nitrite reductase; protein purification; electron donor

收稿日期：2016-01-15

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31101254）；广东省自然科学基金（S2011010005679）；中央高校业务经费专项基金（D2116760）；广东省省级科技计划项目（2014A020208019）

作者简介：陈浩（1989-），女，硕士研究生，主要从事食品质量与安全的研究

通讯作者：刘冬梅（1972-），女，博士，副教授，主要从事食品微生物的利用和控制研究

研究降解食品中的亚硝酸盐是食物安全的研究重点之一。食品添加剂 GB 2760-2011 中对添加亚硝酸盐的范围和用量有严格的规定，但是超标的亚硝酸盐残留有极大的危害，众所周知，亚硝酸盐是亚硝胺的前体物质，而亚硝胺是一种强致癌物，可以诱发消化系统中的多种癌变，如胃癌、肝癌和肠癌。然而肉制品、发酵蔬菜以及水产养殖水体中可能含有超标的亚硝酸盐，可能导致潜在的食品安全问题。因此，研究降解亚硝酸盐的理论和方法非常重要。降低食品中亚硝酸盐含量主要有微生物法和化学法，微生物方法中用于食品中亚硝酸盐降解的微生物主要有植物乳杆菌（*Lactobacillus plantrum*）[1]、短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）[2]、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）[3]。但是由于乳酸菌会产生乳酸使环境的 pH 降低，此法对 pH 中性的食品不太合适，况且多数研究集中在菌种筛选和降解的影响条件研究，没有涉及到亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase，缩写为 NiR)及其电子供体（Electron Donor，缩写为 ElD）；化学法主要利用葡萄糖、烟酰胺和 Vc 等进行辅助降解亚硝酸盐，但其降解的数量有限。

本研究组前期研究表明，乳酸菌 LCR6013 能有效降解亚硝酸盐，是源于细胞内 NiR 的作用，并最可能经由 $NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ 的途径而非铵化作用降解[2]。前期研究还表明，在乳酸菌 LCR6013 中能同时提取到亚硝酸盐还原酶及其电子供体[4,5]，食用级的亚硝酸盐还原酶及电子供体的提取和性质研究尚未见报道，本研究为在中性食品环境降解亚硝酸盐提供了一种新思路，例如为肉制品、养殖水体以及其它的 pH 中性环境的亚硝酸盐的降解，为安全可靠降解亚硝酸盐提供借鉴。本文利用硫酸铵分级沉淀、阴离子和葡聚糖凝胶层析柱等，从乳酸菌 LCR 6013 中分离纯化 NiR 及其 ElD，利用 SDS-PAGE 电泳初步确定 NiR 及其 ElD 的分子量，还探索了可食用的乳酸菌 LCR 6013 来源的 NiR 的电子供体最适种类和浓度。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种

干酪乳杆菌鼠李糖亚种 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus 6013*（简称 LCR6013），由华南理工大学轻工与食品学院食品安全与检测中心保存。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白酶抑制剂，生化试剂，从广州齐云有限公司购买；细胞色素 C，生化试剂，为 Biosharp 品牌，从广州齐云有限公司购买；溶菌酶，生化试剂，从北京天恩泽生物公司购买；二硫苏糖醇 DTT，生化试剂，从上海 Sigma 公司购买；MRS 培养基，生化试剂，从广东环凯微生物科技有限公司购买；亚硝酸钠，分析纯，从天津市福晨化学试剂厂购买；NaCl，分析纯，从天津市福晨化学试剂厂购买；牛血清蛋白，生化试剂，从广州齐云有限公司购买；DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子层析柱，从 GE 购买；Sephadex G-100 葡聚糖凝胶，从广州齐云有限公司购买；其它试剂均为分析纯，市售。

1.1.3 培养基和 HEPES 缓冲液配制

（1）基础培养基：牛肉膏 10.00 g，葡萄糖 20.00 g，蛋白脉 10.00 g，酵母膏 5.00 g，柠檬酸三铵 2.00 g，无水乙酸钠 5.00 g，磷酸氢二钾 2.00 g，硫酸锰 0.25 g，硫酸镁 0.58 g，吐温 801 g，去离子水 1000 mL，调节 pH 值 6.80，121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。诱导培养基：在基础培养基中加入亚硝酸钠使其终浓度达到 10.00 mg/L。

（2）HEPES 缓冲液：50 mM 的 HEPES 缓冲液（pH 7.8）中加入 0.5 mL 的 1 mol/L 的 DTT，使其终浓度为 5 mmol/L，并在其中加入 0.1 mL 的 20 mg/mL 胰蛋白酶抑制剂，使其终浓度为 2 mg/L。

1.1.4 主要仪器

Spectrum-lab752s 紫外可见光分光光度计，由上海棱光技术有限公司生产；5804R 台式冷冻离心机，由 Eppendorf 公司生产；01J2003-04 立式压力蒸汽灭菌锅，由上海博迅实业有限公司生产；PHS3-CpH 计，由上海精密科学仪器有限公司生产；蛋白质自动部分收集仪，由上海泸西分析仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 亚硝酸盐的检测

参考国标 GB/T 5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐的含量，稍有修改，为不经过沉淀蛋白质的步骤，直接加 2 mL 对氨基苯磺酸溶液，混匀，静置 5 min 后各加入 1 mL 盐酸萘乙二胺溶液（2 g/L），加水至刻度，摇匀，静置 15 min，在 538 nm 处测定反应液的吸光度，利用标准曲线方程 Y=16.67X+0.73（式中 Y 为吸光值×1000，X 为亚硝酸钠含量，回归系数为 R^2=0.9999），计算出亚硝酸盐的含量，单位为 g/L；各做三个平行。

1.2.2 酶蛋白质含量测定

采用紫外分光光度法测定 NiR 酶蛋白质的含量，以牛血清蛋白为标准蛋白，测定不同浓度牛血清蛋白在 280 nm 处的吸光值，利用曲线方程 Y=0.618X-2.133

（式中 Y 为吸光值×1000；X 为蛋白浓度，回归系数为 R^2=0.9996），可计算出酶蛋白的含量，单位为 μg/mL；各做三个平行。

1.2.3 NiR 酶活测定

NiR 酶活测定的反应体系：在 1.5 mL 离心管中加入 100 mL 酶液，加入 100 μL 的 1000.00 mg/L $NaNO_2$ 溶液，使其终浓度为 100.00 mg/L；还加入 0.25 mg/mL 细胞色素 C，使其终浓度为 0.025 mg/mL，用 HEPES 缓冲液定容为 1 mL，于 37 ℃下静置反应 20 h。然后按照 1.2.1 的方法检测亚硝酸盐的含量，各做三个平行；1 个 NiR 酶活单位（1U）定义：在上述反应体系中，每 1 mg 酶蛋白在 1 min 所降解的亚硝酸钠量（ng）；比酶活=总酶活/总蛋白，单位为 U/mg；以粗酶的回收率和纯化倍数分别为 100%和 1.00，各纯化部分的总酶活回收率=总酶活/粗酶总酶活×100%，单位为%；纯化倍数=各纯化比酶活/粗酶酶活。

1.2.4 亚硝酸盐还原酶和电子供体的分离纯化

（1）NiR 粗酶液的制备：将干酪乳杆菌鼠李糖亚种的冻干粉置于 MRS 培养基中，于 37 ℃静止培养 24 h 后，制成种子液；以 5%的体积百分比，将 LCR6013 种子液接种至诱导培养基中，于 37 ℃静止诱导培养 24 h，得诱导工作发酵剂；以 5%的体积百分比，将诱导工作发酵剂接种至诱导培养基中，于 37 ℃静止诱导培养 24 h，得含 NiR 的培养液；将含 NiR 的培养液进行离心，用生理盐水清洗 2 次后离心，得含 NiR 的 LCR6013 菌体，在其中加入 HEPES 缓冲液，使 LCR6013 菌体浓度为 200 mg/mL，加入浓度为 20 mg/mL 溶菌酶，使其终浓度为 2 mg/mL，混匀于 30 ℃破壁 3 h，破壁后溶液经离心（10 min、8000 r/min、4 ℃）后的上清液为 NiR 粗酶液。

（2）$(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀：根据 NiR 粗酶液的体积，缓慢加入硫酸铵至饱和度为 30%，并不断搅拌后，于 4 ℃冰箱放置 2 h，离心（20 min、9000 r/min、4 ℃）后的沉淀溶解于 pH 7.8 HEPES 缓冲液中，然后用截留分子量为 14 ku 的透析袋于 4 ℃下透析，透析液于 4 ℃存放以用于电子供体的纯化。离心后的上清液中继续加入硫酸铵细粉至饱和度 60%，缓慢搅拌充分混和，4 ℃冰箱放置 2 h，离心（20 min、9000 r/min、4 ℃）后的沉淀溶解于 pH 7.8 的 HEPES 缓冲液中，用截留分子量为 14 ku 的透析袋于 4 ℃下透析，透析液于 4 ℃存放以用于 NiR 的纯化。

（3）DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子柱层析纯化：利用 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱可以纯化蛋白，是因为在适当的盐浓度和 pH 值下，目的蛋白质可以被阴离子交换剂所吸附，由于各种蛋白质所带的电荷不同，它们与交换剂的结合程度也不同，但由于蛋白质和无机盐离子(如 NaCl)都具有交换吸附的能力，而且无机盐浓度越强，可交换蛋白越强。因此可以利用不同强度的无机盐离子(如 NaCl)梯度洗脱蛋白，从而可把不同的蛋白质逐个分离开来[6]。用 pH 7.8 HEPES 缓冲液进行预平衡 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱（2.6 cm×20 cm），将 60% $(NH_4)SO_4$ 饱和度的酶液沉淀，经过透析后的酶液 30 mL 上样，用 0 mol/L~1 mol/L 的 NaCl 溶液进行连续线形梯度洗脱，洗脱流速为 1 mL/min，用自动部分收集器收集洗脱液，每 3 mL 收集一管，检测每管洗脱液的蛋白含量及酶活力，收集具有 NiR 酶活的组分，进行透析，用聚乙二醇 PEG 20000 浓缩后于 4 ℃保存备用。经过 30% $(NH_4)SO_4$ 饱和度的蛋白液，也用上述方法进行阴离子柱层析纯化。

（4）Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析纯化：所得到的目的蛋白 NiR 和电子供体分别进行 SephadexG-100 层析柱分离纯化，因为 Sephadex G-100 葡聚糖起到分子筛作用，较小的分子会进入葡聚糖凝胶分子内，而较大的分子会从凝胶的孔隙流下来，因此分子大的会先流下来，分子小的后流下来，从而达到纯化目的蛋白[6]。用 pH 7.8 HEPES 缓冲液预平衡 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱（1.6 cm×50 cm）。将经过离子交换层析、透析和浓缩后的酶液和电子供体液上样，用 pH 7.8 HEPES 缓冲液预平衡并进行洗脱，流速为 0.5 mL/min，收集洗脱液，每 1.5 mL 收集一管，检测每管洗脱液的蛋白含量和 NiR 酶活，集中具有 NiR 酶活的组分，于 4 ℃保存。经阴离子柱所收集的含有电子供体液也用上述方法进行 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析纯化。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳

将粗酶液，过阴离子交换层析柱后的酶液、过 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶后的酶液以及相应各步得到的电子供体溶液分别进行 SDS-PAGE 电泳分析，以鉴定 NiR 和其电子供体的分子量大小。分离胶为 12%，浓缩胶为 5%，电极缓冲液为 Tris-甘酸，电压先 80 V，后 120 V，电泳完成后，进行考马斯亮蓝染色，再脱色后拍照。

1.2.6 NiR 最适电子供体的种类和浓度确定

前期研究发现[4,5]，纯化后 NiR 还需添加电子供体，才可以降解亚硝酸盐。降解 $NaNO_2$ 的反应体系为，在已灭菌 1.5 mL 离心管中，加入 75 μL 的 1000.00 mg/L 的 $NaNO_2$，按表 1 的分组分别加入 Na_2SO_3、$FeSO_4$、细胞色素 C 和乳酸菌 LCR6013 的电子供体等，最后加 HEPES 缓冲液至 1 mL，在 37 ℃反应 48 h，

分别在 24 h 和 48 h 按照 1.21 的方法检测反应体系在 538 nm 处的 OD 值。

表 1 乳酸菌 LCR 6013 来源的 NiR 所需的电子供体和浓度

Table 1 Species and concentration of electron donors required by NiR from LCR 6013

编号	电子供体	是否有 NiR
CK1	不添加电子供体	无 NiR
CK2		NiR 100 μL
A1	3 mg/mL Na_2SO_3，100 μL	无 NiR
A2		NiR 100 μL
B1	3 mg/mL $FeSO_4$，100 μL	无 NiR
B2		NiR 100 μL
C1	3 mg/mL L-谷胱甘肽溶液 100 μL	无 NiR
C2		NiR 100 μL
D1	3 mg/mL 细胞色素 C 100 μL	无 NiR
D2		NiR 100 μL
E1	LCR 6013 电子供体蛋白 100 μL	无 NiR
E2		NiR 100 μL

1.2.7 数据统计分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行显著性分析，采用 Excel 2007 和 Origin 7.5 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 LCR6013 中 NiR 与电子供体的分离纯化

将在$(NH_4)_2SO_4$饱和度分别为 0~30%和 30~60%时有酶活的蛋白沉淀回收，在$(NH_4)_2SO_4$饱和度为 30~60%时蛋白沉淀被溶解和透析后得到蛋白液Ⅱ，测定其含有 NiR 酶活，蛋白液Ⅱ经过 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱纯化，结果如图 1a，可看出，在整个洗脱阶段出现了 3 个大小不一的蛋白峰，检测各管 NiR 酶活，发现图 1a 中箭头所指的峰的组分，在加入细胞色素 C 后，有 NiR 活性，因此称为 LCR6013 的 NiR（以下同）。同理，在$(NH_4)_2SO_4$饱和度为 0~30%时蛋白沉淀被溶解和透析后得到蛋白液Ⅰ，再经过 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱纯化，结果如图 1b，可看出，在整个洗脱阶段也出现了 3 个大小不一的蛋白峰，其中箭头所指的峰的组分与纯化的 NiR 协同可降解亚硝酸盐，从而确定图 2 中箭头所指的峰为电子供体溶液，称为 LCR6013 的 EID（以下同）溶液。

将经过离子交换层析后的 NiR 和 EID 溶液经过透析和浓缩后，上样于 SephadexG-100 葡聚糖凝胶层析柱，用 pH 7.8 HEPES 缓冲液预平衡洗脱 2 个柱体积，结果如图 2a 和图 2b，按照 1.2.3 的方法测定图 2a 中箭头所指的峰有 NiR 酶活。图 2b 中箭头所指的部分为可以替代细胞色素 C 的作用，与 NiR 酶液一起可协同降解亚硝酸盐。

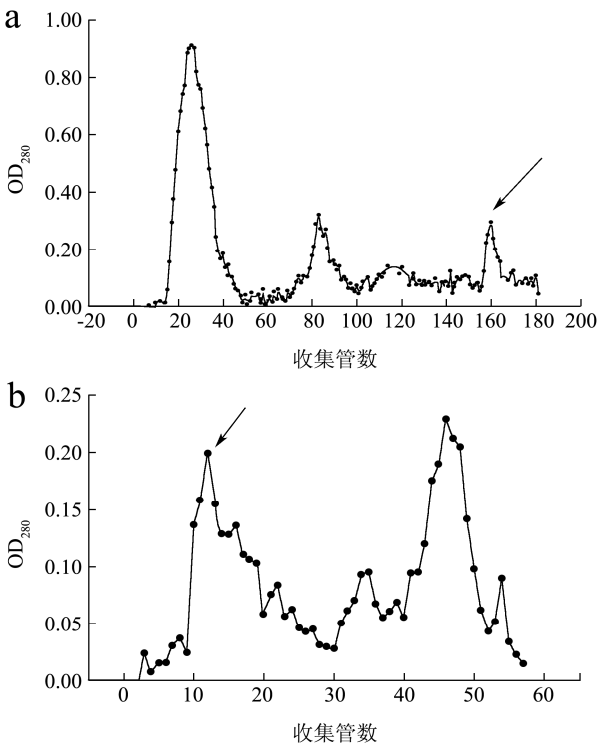

图 1 LCR6013 中 NiR 和电子供体的 DEAE-纤维素柱层析图

Fig.1 Chromatography profile of NiR and electron donor from LCR 6013 on a DEAE-Sepharose fast flow column

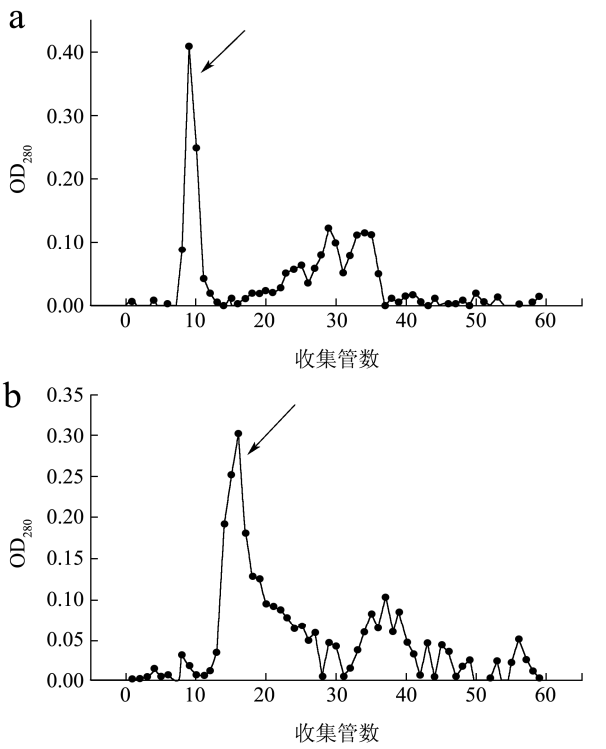

图 2 LCR 6013 中 NiR 和电子供体的 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析图

Fig.2 Chromatography profile of NiR and electron donor from LCR 6013 on a Sephadex G-100 column

2.2 LCR6013 中各个纯化部分的 NiR 酶活及电子供体回收

乳酸菌 LCR6013 中粗酶、硫酸铵沉淀、经阴离子柱层析液和经葡聚糖凝胶 G-100 的层析液的 NiR 总酶活、比酶活、回收率和纯化倍数如表 2，最终 NiR 的回收率为 2.08%，比活力为 1851.2 U/mg，纯度倍数达到 16 倍。将纯化后 LCR6013 的 NiR 酶与几种常见的反硝化细菌的 NiR 酶进行比较，如表 3，*Spirillum*5175 是一个微需氧的脱硫单胞菌属，含有细胞色素 cd1 型 NiR[7]，*Alcaligenes xylosoxidans* 含有 Cu 中心的 NiR[8]，*Haloferax mediterranei* 中含有同化型的 NiR[9]，而来自 *Clostridium perfringens* 的 NiR 都没有 Cu 中心和血红素[10]，是一种新型的 NiR。结果表明，LCR6013 中 NiR 比活力，除了比 *C. perfringens* 和 *H. mediterranei* 高之外，较另外两种反硝化菌都低，因反硝化菌的反硝化能力都较强，容易以亚硝态氮和硝态氮作氮源，从而将硝态氮转化为氮气[11]，而本研究的 NiR 来自乳酸菌 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013，菌株没经过诱变和改造，降解亚硝酸盐的最优反应条件还未优化而致。

表 2 先后经过阴离子和凝胶柱从 LCR6013 中纯化的 NiR 酶活力

Table 2 Enzyme activity of NiR purified by anion chromatography and gel column in succession

项目	比酶活/(U/mg)	总蛋白含量/mg	总酶活/U	回收率/%	纯化倍数
粗酶	115.70	400.00±2.50	46280.00	100.00	1.00
硫酸铵沉淀	231.48	120.00±2.45	27777.60	60.02	2.00
DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析液	1388.89	10.00±0.25	13888.90	30.01	12.00
葡聚糖 SephadexG-100 柱层析液	1851.20	0.52±0.05	962.62	2.08	16.00

表 3 LCR6013 NiR 与其他报道的 NiR 的酶对比情况

Table 3 Comparison of purified NiR from LCR 6013 and NiR reported from other bacteria

菌株	总蛋白含量/mg	比活力/(U/mg)	产量/%	参考文献
Spirillum 5175	2.10	10476.74	33.41	[7]
A. xylosoxidans	0.10	3535.72	43.00	[8]
H. mediterranei	0.22	228.81	4.00	[9]
C. perfringens	1.80	81.15	0.90	[10]
LCR 6013	0.52	1851.20	2.08	本研究

2.3 SDS-PAGE 电泳

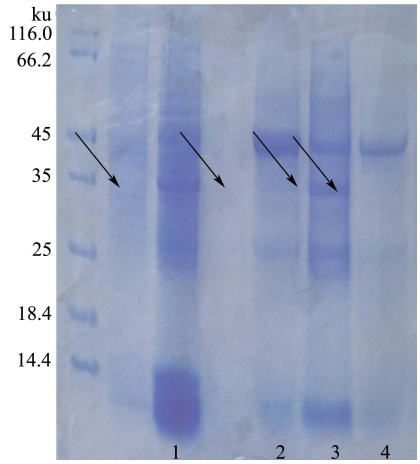

图 3 从 LCR6013 中纯化 NiR 的 SDS-PAGE 电泳

Fig.3 SDS-PAGE patterns of NiR purified from LCR 6013

注：左边条带为蛋白质分子量标准；1，$(NH_4)_2SO_4$ 饱和度为 30%~60%的酶液；2，3 为经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析后组分；4 葡聚糖 SephadexG-100 凝胶层析后组分。

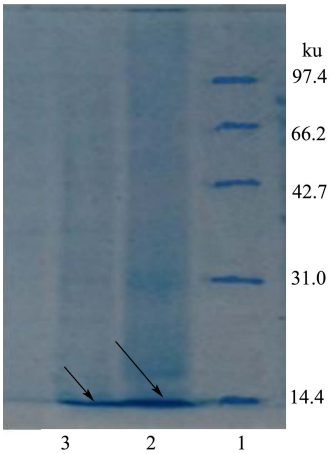

图 4 从 LCR6013 中纯化电子供体 SDS-PAGE 电泳

Fig.4 SDS-PAGE patterns of electron donor purified from LCR 6013

注：1、2 和 3 分别为蛋白质分子量标准、细胞色素 C 和纯化的电子供体。

利用 SDS-PAGE 电泳，对从乳酸菌 LCR 6013 中纯化得到的 NiR 和电子供体进行分析，结果分别如图 3 和 4，从图 3 中可看出，其中的第 4 条带为单一条带，表明酶液纯度已经达到电泳纯，对照标准蛋白分子量，目标 NiR 蛋白的亚基相对分子质量为 45 ku，与 *Achromobacter cyclolacles*[12] 和 *Pseudomonas chlororaphis* 的铜型 NiR（简写为 CuNiR）的分子量 36 ku 和 40 ku 接近，而细胞色素 cd1 型亚硝酸还原酶由 2 个相同的 60 ku 亚基组成[12,13]。从图 4 中可看出，对照细胞色素 C 的条带 2 和蛋白质 Maker 条带 1，经

过纯化后的电子供体的单一条带 3 与细胞色素 C 一致，因而推断从 LCR 6013 中提取出来的电子供体可能与细胞色素 C 类似，细胞色素 C 是生物氧化的一个非常重要的电子供体，分子质量为 13 ku 左右，在含铜型 NiR 的反硝化细菌的周质空间发现了小分子的氧化还原蛋白，其起到潜在的电子供体作用，将电子传递给 CuNiR 中的 T1 上的 Cu 中心，然后电子从 T1 传递到 T2 上的 Cu 中心，亚硝酸根离子在 T2 的铜中心被还原，这种关键的小分子蛋白包括细胞色素 C、假天青蛋白和天青蛋白等[14]。因此，本文所得到的电子供体在亚硝酸盐的还原过程起到非常关键的作用，不可或缺。

2.4 LCR6013 的 NiR 的电子供体筛选

在亚硝酸盐的降解反应体系中加入 Na_2SO_3、$FeSO_4$、L-谷胱甘肽、细胞色素 C 和 LCR 6013 电子供体等 5 种电子供体，反应 24 h 和 48 h 后在 538 nm 处检测体系中的 OD 值，结果如表 4 所示，从表中可看出，从乳酸菌 LCR 6013 中纯化的 NiR 不能直接降解亚硝酸盐，加入电子供体 Na_2SO_3、$FeSO_4$、细胞色素 C 和 LCR 6013 电子供体反应 48 h 后都能很好地将体系中 75.00 mg/L 的亚硝酸盐降解完。而加入细胞色素 C 和 LCR 6013 电子供体的体系，反应 24 h 就能将亚硝酸钠全部降解完。L-谷胱甘肽不是有效的电子供体。从表中还可知，纯化后的 LCR6013 的 NiR 电子供体在单独存在时都不能降解亚硝酸钠，两者结合后才能有效降解亚硝酸钠。文献报道的电子供体蛋白有天青蛋白，假天青蛋白和细胞色素 C，电子供体蛋白在亚硝酸盐还原过程中起到非常重要的作用。本研究纯化得到的 NiR 仅在电子供体的参与下才具有降解活力，而此电子供体既可以是来自细胞内，也可以来自于外界的有机的（细胞色素 C）和无机的电子供体。对于铜型的亚硝酸盐还原酶进行亚硝酸盐降解的过程为：第 1 个铜中心（T1Cu）位点首先从电子供体（天青蛋白 Az，假天青蛋白 Paz 和细胞色素 C Cyt c)接受一个电子再将它传递给 NO_2^-，然后在第 2 个铜中心(T2Cu）位点进行还原，生成 NO[15,16]。笔者前期发现表明，LCR6013 能降解亚硝酸盐，并在降解亚硝酸盐的体系中检测到 N_2O 气体，因而最可能通过 $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ 的反硝化途径降解亚硝酸盐[2]。根据食品添加剂 GB 2760-2011 规定的使用范围，Na_2SO_3 和 $FeSO_4$ 是不能作为食品添加剂用于亚硝酸盐的降解，而通常外源性细胞色素 C 从很多蔬菜中都可以得到而认为是食用安全的，本研究提取到的电子供体组分，来源于可食用乳酸菌干酪乳杆菌鼠李糖亚种 LCR6013 也认为是食用安全，可用于食品中亚硝酸盐的降解。NiR 分布于细胞壁与细胞膜之间，根据其辅基的不同分为血红素 cd1 型亚硝酸还原酶（cd1NiR)和铜型亚硝酸还原酶（CuNiR)两种类型[17]，而 CuNiR 的电子供体是细胞色素这点与本研究的结果一致，从电子供体、降解产物和 NiR 的分子量等 3 方面推测从乳酸菌 LCR6013 中所得到的亚酸盐还原酶可能也为 CuNiR 类。

表 4 乳酸菌 LCR 6013 来源的 NiR 的最适电子供体和浓度

Table 4 Optimum species and concentration of electron donor required by NiR from strain LCR 6013

编号	电子供体	OD_{538nm}/24 h	OD_{538nm}/48 h
CK1	无电子供体	0.33±0.03	0.33±0.02
CK2		0.34±0.02	0.32±0.04
A1	Na_2SO_3	0.32±0.02	0.31±0.02
A2		0.20±0.03^{abc}	0.01±0.00^{a}
B1	$FeSO_4$	0.31±0.02	0.30±0.05
B2		0.18±0.03^{def}	0.01±0.00^{b}
C1	L-谷胱甘肽	0.33±0.02	0.32±0.04
C2		0.32±0.03^{adgh}	0.30±0.02^{abcd}
D1	细胞色素 C	0.32±0.03	0.33±0.05
D2		0.00±0.00^{beg}	0.00±0.00^{c}
E1	LCR 6013 电子供体	0.32±0.02	0.32±0.20
E2		0.01±0.00^{cfh}	0.00±0.00^{d}

注：小写字母（a~h）表示 A2、B2、C2、D2 和 E2 之间显著性差异（$p<0.05$）；差异显著性分析采用 SPSS Duncan's 法。

3 结论

干酪乳杆菌 LCR6013 经 10.00 mg/L 的亚硝酸钠诱导后，用 30%和 60%的饱和硫酸铵溶液分级沉淀，再通过阴离子 DEAE Sepharose Fast Flow 和葡聚糖凝胶 G-100 层析柱分离纯化，得到具有降解亚硝酸盐活性的 NiR 和协同降解的电子供体，经 SDS-PAGE 电泳后确定来自乳酸菌 LCR6013 的 NiR 和电子供体的单体分子量分别为 45 ku 和 13 ku。而 NiR 仅在添加电子供体后才具有降解活力，同时电子供体的筛选结果表明，来自于乳酸菌的 ElD 和细胞色素 C 降解效果最好，L-谷胱甘肽溶液不可以作为电子供体。利用原核生物将亚硝酸盐和硝酸盐还原成气态分子氮的反硝化过程，是氮循环中非常重要的生化过程，这个过程使土壤、水体和大气中的氮含量得到平衡。因此，下一步将深入研究：具有反硝化作用并可食用的乳酸菌 LCR6013 用于降解亚硝酸盐的深层的机理，例如 NiR 的分类、与电子供体的协同作用时电子传递的瞬态结构、NiR 降解亚硝酸盐的电子传递的关键氨基酸位点

等以及 LCR 6013 电子供体是否为细胞色素 C 等。

参考文献

[1] Paik H D, Lee J Y. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition [J]. Meat Science, 2014, 97(4): 609-614

[2] 王盼,刘冬梅,黄娟,等.植物乳杆菌 DMDL9010 中亚硝酸盐还原酶的基因克隆、表达和纯化[J].现代食品科技,2015, 31(6):150-155,271

WANG Pan, LIU Dong-mei, HUANG Juan, et al. Cloning, expression, and purification of the nitrite reductase gene from *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 [J]. Modern Food Sciences and Technology, 2015, 31(6): 150-155, 271

[3] 张馨月,刘冬梅,许喜林,等.LCR6013 降解亚硝酸盐的途径其亚硝酸盐还原酶的初步定位[J].现代食品科技,2013, 29(11):2627-2632,2662

ZHANG Xin-yue, LIU Dong-mei, XU Xi-lin, et al. The degradation pathway of nitrites by LCR 6013 and the primary localization of its nitrite reductase [J]. Modern Food Sciences and Technology, 2013, 29(11): 2627-2632, 2662

[4] 刘冬梅,陈浩,周劲松,等.一种干酪乳杆菌鼠李糖亚种的亚硝酸盐还原酶的制备方法:中国发明专利,201510472248.2 [P].2015-8-3

LIU Dong-mei, CHEN Hao, ZHOU Jin-song, et al. Preparation method of nitrite reductase from *Lactobacillus case* subsp. *rhamnosus* 6013: China, 201510472248.2 [P]. 2015-8-3

[5] 刘冬梅,陈浩,周劲松,等.一种干酪乳杆菌降解亚硝酸盐的电子供体蛋白及其制备方法和应用:中国发明专利, 201410437877.7[P]. 2014-8-29

LIU Dong-mei, CHEN Hao, ZHOU Jin-song, et al. Preparation method of electron donor protein for degrading nitrites by *Lactobacillus case* subsp. *rhamnosus* 6013: China, 201410437877.7 [P]. 2014-8-29

[6] Kajie S I, Anraku Y. Purification of a hexaheme cytochromee 55z from *Escherichia coli* K 12 and its properties as a nitrite reductase [J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 154: 457-463

[7] Schumacher W, Kroneck P M H. Dissimilatory hexaheme c nitrite reductase of "*Spirillum*" *strain* 5175: purification and properties [J]. Archives of Microbiology, 1991,156(1): 70-74

[8] Abraham Z H, Lowe D J, Smith B E. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (NCIMB 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres [J]. Journal of Food Biochemistry, 1993, 295(2): 587-593

[9] Martínez-Espinosa R M, Richardson D J, Bonete M J. Characterisation of chlorate reduction in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1850(4): 587-594

[10] Sekiguchi S, Seki S, Ishimoto M. Purification and some properties of nitrite reductase from *Clostridium perfringens* [J]. Journal of Food Biochemistry, 1983, 94(4): 1053-1059

[11] 姚秀清,刘秀梅.反硝化细菌降解养殖水体亚硝酸盐的研究[J].应用化工,2014,43(5):871- 873

YAO Xiu-qing, LIU Xiu-mei. Research on removal of nitrite by the immobilized denitrifying bacteria [J]. Applied Chemical Industry, 2014, 43(5): 871-873

[12] Libby E, Averill B A. Evidence that the type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter cycloclastes* nitrite reductase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992, 187(3): 1529-1535

[13] Hough M A, Ellis M J, Antonyuk S, et al. High resolution structural studies of mutants provide insights into catalysis and electron transfer processes in copper nitrite reductase [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 350(2): 300-309

[14] Jacobson F, Guo H, Olesen K, et al. Structures of the oxidized and reduced forms of nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 at high pH: changes in the interactions of the type 2 copper [J]. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography. 2005, 61(9): 1190-1198

[15] Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y. Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the nir gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 288(5): 1223-1230

[16] Han C, Wright G S, Fisher K, et al. Characterization of a novel copper heme c dissimilatory nitrite reductase from *Ralstonia pickett*ii [J]. Biochemical, 2012, 444(2): 219-26

[17] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616