

植物乳杆菌 DMDL 9010 降解亚硝酸盐特性及其相关基因挖掘

黄燕燕, 刘冬梅*, 邝嘉华, 周钦育, 陈宇瀚, 高璇, 塔尼亚, 周杨
(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 笔者前期对植物乳杆菌 DMDL 9010 (*Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010, LP9010) 已进行全基因组测序, 其 NCBI 登录号为 CP063986-CP063988。该文通过研究 LP9010 在不同培养条件和培养基成分下的理化指标变化, 结合全基因组序列初步分析 LP9010 降解亚硝酸盐的特性。结果表明, LP9010 具有高效降解亚硝酸盐的能力, 其亚硝酸盐降解率随着 pH 的降低而升高; 温度为 37 °C 有利于 LP9010 降解亚硝酸盐; LP9010 在营养充分的条件下降解亚硝酸盐的效果最佳, 且氧环境和生长因子对其无显著影响 ($p>0.05$)。相应地, 在 LP9010 全基因组中发现了酸耐受 (*nhaC*, *gadA*, *argG* 和 *glnR*)、冷热耐受 (*cfa*, *cspA*, *hrcA*, *hlpX*, *cplC*, *clpE*, *clpP*, *clpX* 和 *clpL*)、氧耐受 (*catB*, *trxB*, *trxA*, *gor*, *msrC*, *msrA* 和 *msrB*) 以及糖转运 (*pstI*, *Crr*, *NagE*, *ScrA*, *MtlA*, *ManX*, *ManY*, *ManZ*, *GatA*, *GatB*, *GatC*, *FruA* 和 *FruB*) 相关的基因, 尤其是发现了亚硝酸盐还原酶基因 (*lmrB* 和 *pgl*)。总之, LP9010 具有高效降解亚硝酸盐的能力和降解亚硝酸盐相关的基因。此结果为植物乳杆菌降解亚硝酸盐的机理提供了新的思路。

关键词: 植物乳杆菌 DMDL 9010; 亚硝酸盐; 全基因组; 亚硝酸盐还原酶

文章编号: 1673-9078(2021)11-14-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0683

Characterization of Nitrite Degradation and Mining Related Genes of

Lactiplantibacillus plantarum DMDL 9010

HUANG Yanyan, LIU Dongmei*, KUANG Jiahua, ZHOU Qinyu, CHEN Yuhan, GAO Xuan, TA Niya,
ZHOU Yang

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

Abstract: Whole-genome sequencing of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 (LP9010) was first performed, and its corresponding NCBI accession number is CP063986-CP063988. The nitrite degradation performance of LP9010 was preliminarily investigated based on the changes in the physicochemical indicators under different cultivation conditions and medium compositions, which was followed by the whole-genome sequencing analysis. The results revealed that LP9010 can effectively degrade nitrite. The nitrite degradation rate of LP9010 increased with a decrease in the pH. The temperature of 37 °C was conducive for nitrite degradation by LP9010. The optimal nitrite degradation performance of LP9010 can be achieved when there is sufficient nutrition, but oxygen and growth factors do not exert significant effects on nitrite degradation ($p>0.05$). Furthermore, acid tolerance-related genes (*nhaC*, *gadA*, *argG*, and *glnR*), cold- and heat-tolerance-related genes (*cfa*, *cspA*, *hrcA*, *hlpX*, *cplC*, *clpE*, *clpP*, *clpX*, and *clpL*), oxygen tolerance-related genes (*catB*, *trxB*, *trxA*, *gor*, *msrC*, *msrA*, and *msrB*), and sugar transport-related genes (*pstI*, *Crr*, *NagE*, *ScrA*, *MtlA*, *ManX*, *ManY*, *ManZ*, *GatA*, *GatB*, *GatC*, *FruA*, and *FruB*) were found in the whole genome sequencing of LP9010. Besides, the nitrite reductase genes (*lmrB* and *pgl*) were discovered. Conclusively, LP9010 can degrade nitrite efficiently and it possesses the genes related to nitrite degradation. This article provides a new direction to better understand and elucidate

引文格式:

黄燕燕,刘冬梅,邝嘉华,等.植物乳杆菌 DMDL 9010 降解亚硝酸盐特性及其相关基因挖掘[J].现代食品科技,2021,37(11):14-24,+184

HUANG Yanyan, LIU Dongmei, KUANG Jiahua, et al. Characterization of nitrite degradation and mining related genes of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 14-24, +184

收稿日期: 2021-07-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771908); 广州市科技计划项目 (201903010015); 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515012451)

作者简介: 黄燕燕 (1992-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品微生物利用与控制, E-mail: 1085249857@qq.com

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制, E-mail: liudm@scut.edu.cn

the nitrite degradation mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum*.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010; nitrite; whole genome; nitrite reductase

亚硝酸盐 (Nitrite, NIT) 是一种在氮循环中起重要作用的化合物^[1], 作为护色剂和防腐剂被广泛用于食品行业, 同时它可与酯或其他药用盐等组合, 形成药制剂^[2]。然而, 过量摄入亚硝酸盐会引起急性中毒等症状。目前国家已经规定了亚硝酸盐在食品中的最大使用量, 但由于亚硝酸盐的不当使用、环境污染以及污染物残留等原因, 导致食品中残留的亚硝酸盐偏高^[1], 严重危害人们的身体健康。

现今发现, 生物法降解亚硝酸盐已成为国内外研究的热点^[3-5]。例如, 乳酸菌和少数芽孢杆菌等微生物已被证明具有降解亚硝酸盐的作用, 其中, 乳酸菌是目前降解亚硝酸盐最常见的微生物, 包括 *Levilactobacillus brevis*、*Lactiplantibacillus plantarum* 等^[6]。乳酸菌降解亚硝酸盐的机理主要包括酸降解、酶降解和抑制有害菌生长, 从而减少亚硝酸盐的产生^[7-11]。杨晶等^[7]研究了 *Lactiplantibacillus plantarum* 5-7-3 在发酵过程中产生的各种有机酸含量与亚硝酸盐含量进行相关性分析, 发现不同有机酸对亚硝酸盐的降解效果不同, 效果最好的是苹果酸和乳酸, 效果最不明显的是柠檬酸。乳酸菌在发酵过程中除了可以产生有机酸之外, 还能产生亚硝酸盐还原酶 (Nitrite reductase, NiR) 来高效降解亚硝酸盐^[8]。卢海强等^[9]在从东北传统发酵酸菜中筛选出的多株乳酸菌中分离出了高活力的 NiR, 推测亚硝酸盐诱导乳酸菌产生 NiR^[10], 但不同乳酸菌分离出的 NiR 的活性不同。此外, 乳酸菌可产生一种叫做细菌素的蛋白质, 能够抑制多种有害菌生长^[11], 进而抑制硝酸盐转化为亚硝酸盐, 故细菌素的存在能够抑制亚硝酸盐的产生, 也能防止食品腐败。

本课题组前期研究发现植物乳杆菌 DMDL 9010 (*Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010, LP9010) 具有高效降解亚硝酸盐的能力, 但其具体机理尚未明确, 尤其是从基因层面挖掘其高效降解亚硝酸盐的基因。本文将通过研究不同培养条件和培养基成分对 LP9010 在不同培养条件和培养基成分下理化指标 (pH、酸度、活菌数和亚硝酸盐降解率) 的变化, 结合全基因组分析 LP9010 降解亚硝酸盐的相关基因, 为植物乳杆菌降解亚硝酸盐的机理提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 DMDL 9010, 由华南理工大学食品科学与工程学院食品质量与安全系筛选分离并保存^[12,13]。

MRS 肉汤, 技术琼脂粉, 酵母提取粉, 购于广东环凯微生物科有限公司; 无水葡萄糖, 蔗糖, 亚硝酸钠, 购于天津市大茂化学试剂厂; 对氨基苯磺酸, 盐酸萘乙二胺, 浓盐酸 (37%, *m/V*), 硝酸铵, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钾, 磷酸, 氢氧化钠, 购于广州化学试剂厂; 玉米淀粉, 大豆蛋白, 苹果, 番茄, 胡萝卜, 均为食品级, 购于广州西亚兴安超市。其他试剂均为分析纯。

超净工作台 (MK3 型), 上海日岛科学仪器有限公司; 生化培养箱 (LRH-250A-II), 韶关市泰宏医疗器械有限公司; 高速冷冻离心机 (JW-3021HR), 安徽嘉文仪器装备有限公司; 多功能酶标仪 (680 型), 美国 Bio-Rad 公司; pH 计 (FiveEasy Plus 型), 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 电热恒温干燥箱 (DHG-9194A 型), 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

将甘油管中保存的 LP9010 菌液接种于 MRS 液体培养基中 (接种量 4%, *V/V*), 于 37 °C 下活化 12 h。

1.2.2 LP9010 文库构建、测序与组装

LP9010 基因组 DNA 由深圳华大基因研究所提取, 使用华大基因公司的 BGISEQ 平台和 PacBio 平台进行全基因组测序。BGISEQ 实验流程包括用 Covaris 仪超声波打断 DNA 样品, 获得符合长度要求的短 DNA 片段。使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 500 assays 试剂盒检测纯化 DNA 样品后, 进行 PCR 获得最终文库并进行测序。PacBio 平台实验流程包括用 g-TUBE 将 DNA 处理成大小适当的片段, 使 DNA 片段形成哑铃结构的 SMRTbell, 与聚合酶混合后进行测序。对原始测序数据进行过滤处理, 保证信息分析结果可靠性, 以得到更精确的组装结果。

1.2.3 不同培养条件对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

1.2.3.1 不同培养 pH 对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

用缓冲溶液 (2 mol/L 磷酸二氢钠、2 mol/L 磷酸氢二钾、50% 磷酸) 将 MRS 液体培养基的 pH 分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0, 设置自然 pH 组 (pH=5.8) 为空白对照, 灭菌。用无菌 100 g/L NaNO₂ 溶液调培养基的 NaNO₂ 浓度至 0.2 mg/mL (下同), 接菌 (按 4%

的接种量接种一次活化后的 LP9010, 下同) 后于 37 °C 下培养 12 h, 于 0、4、8、12 h 取样测定活菌数以及 NaNO₂ 降解率。

1.2.3.2 不同培养温度对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

接菌后设置 20、30、37、40 和 50 °C 下培养 12 h, 于 0、4、8、12 h 取样测定 pH 值、酸度、活菌数以及 NaNO₂ 降解率 (见 1.2.4)。

1.2.3.3 氧气对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

接菌后分别装于带封瓶膜的锥形瓶 (有氧培养: 220 r/min 培养) 以及带旋盖的试剂瓶 (无氧培养: 静置培养) 中, 37 °C 下培养 12 h, 于 0、4、8、12 h 取样测定 pH 值、酸度、活菌数以及 NaNO₂ 降解率。

1.2.4 不同培养基成分对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

按表 1 配方配制培养基, 其中玉米淀粉组配制方法为: 称取一定量玉米淀粉 (5%, *m/V*) 和酵母提取粉 (3%, *m/V*) 溶于蒸馏水中, 85 °C 搅拌 30 min。生长因子组配制方法为: 果蔬洗净去皮后榨成渣 (不加水), 纱布包住果蔬渣挤出汁液, 巴氏杀菌 (85 °C, 15 min)。其他步骤相同如下, 在蒸馏水中加入碳源、氮源和生长因子配成培养基, 灭菌 (121 °C, 15 min) 冷却后, 再加入 0.2 mg/mL NaNO₂, 接菌后于 37 °C 下培养 48 h, 于 0、6、12、24、36、48 h 取样测定菌液的 pH 值、酸度、活菌数以及 NaNO₂ 降解率。

表 1 简单培养基配方

Table 1 Simple medium formulations

项目	组别	碳源(% , <i>m/V</i>)	氮源(% , <i>m/V</i>)	生长因子(% , <i>m/V</i>)
	空白组	-		
碳源	葡萄糖组	5%无水葡萄糖	3%酵母提取粉	
	蔗糖组	5%蔗糖		
	玉米淀粉组	5%糊化玉米淀粉 ^a		
氮源	硝酸铵组		3%硝酸铵	
	酵母提取粉组	5%无水葡萄糖	3%酵母提取粉	
	大豆蛋白组		3%大豆蛋白	
生长因子	苹果汁组			5%苹果汁
	番茄汁组	5%无水葡萄糖	3%酵母提取粉	5%番茄汁
	胡萝卜汁组			5%胡萝卜汁

1.2.5 理化指标的测定

1.2.5.1 pH 的测定

用电子 pH 计测量。

1.2.5.2 酸度的测定

参考 Huang 等^[14]方法, 取 1 mL 菌液于锥形瓶中, 加入两滴酚酞试剂, 用 0.10 mol/L NaOH 滴定。

$$\text{酸度}(\text{°T}) = V_1 \times \frac{c}{0.1} \times \frac{100}{V_2}$$

式中:

V_1 —NaOH 消耗的体积;

V_2 —样品量;

c —NaOH 浓度, 0.10 mol/L。

1.2.5.3 活菌数的测定

乳酸菌存活计数参考 Huang 等^[14]人的研究并作稍微调整。将每个样品 (100 μ L) 在无菌生理盐水 (0.9%) 中进行梯度稀释。将稀释的 100 μ L 细菌溶液在 MRS 琼脂平板中于 37 °C 孵育 24 h 并计算乳酸菌菌落数 lg(CFU/mL)。

1.2.5.4 亚硝酸盐降解率的测定

取样加 2 mL 对氨基苯磺酸溶液混匀, 静置 5 min 后加入 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 $Y=0.0023X-6 \times 10^{-5}$ (Y 为吸光度, X 为亚硝酸钠含量, 回归系数 $R^2=0.9971$) 计算出亚硝酸盐的含量 (g/L)。

$$\text{亚硝酸盐降解率}/\% = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

式中:

A —试样原始亚硝酸盐含量, g/L;

B —反应后亚硝酸盐含量, g/L。

1.2.6 数据处理与分析

每个实验重复 3 次, SPSS 16.0 软件分析数据, Origin 9.1 软件绘图。数据表示为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 LP9010 基因组测序分析

由图 1a 可知琼脂糖凝胶电泳得到了一个 1500 bp

左右的条带清晰单一的电泳带，与课题组前期鉴定结果相一致^[12]。采用深圳华大基因研究所的 Illumina 平台和 PacBio RS II 平台进行测序，由于原始测序数据可能包含低质量序列、接头序列等，通过过滤杂质，从而得到高质量 Clean Data。根据平台测序结果进行 GC-Depth 分析，展现样品的 GC 含量及深度分布，可以判断样品是否有污染以及测序过程的随机性等。图 1b 可知样品的 GC 含量与样品 Depth 分析统计图符合泊松分布，表明样品 GC 含量没有偏向性，测序随机性良好。最后，LP9010 的基因组序列提交 NCBI，登录号为 CP063986-CP063988^[13]。

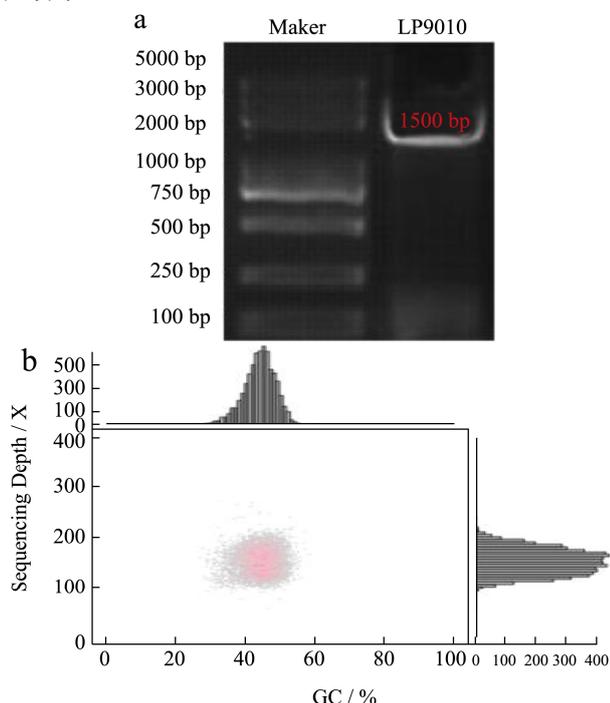


图 1 LP9010 基因组测序分析

Fig.1 The sequencing analysis of LP9010 genome

注：a：琼脂糖凝胶电泳；b：GC-Depth分析统计图。

2.2 不同培养pH对LP9010降解亚硝酸盐的影响

根据图 2，各组 pH（由低至高）在 12 h 时的亚硝酸盐降解率分别为 100.00、100.00、91.39 和 82.18%（图 2c）。在 4 h 时自然 pH 组的 pH 为 5.68（图 2a），其亚硝酸盐降解率（16.18%）低于 pH 5.0 组（47.11%）（图 2c）；12 h 时自然 pH 组的 pH 降为 4.02（图 2a），其亚硝酸盐降解率（90.08%）高于 pH 5.0 组（82.13%）（图 2c）。这说明 pH 越低时亚硝酸盐降解率越高（pH≥4.00），具有明显的规律性。在 4 h 时，pH 2.0 和 pH 3.0 组的活菌数均为 0.00 CFU/mL（图 2b），亚硝酸盐降解率均达到 100.00%（图 2c）。当 pH<4.00

时 LP9010 无法生存（图 2b），此时亚硝酸盐主要为酸降解^[8]。

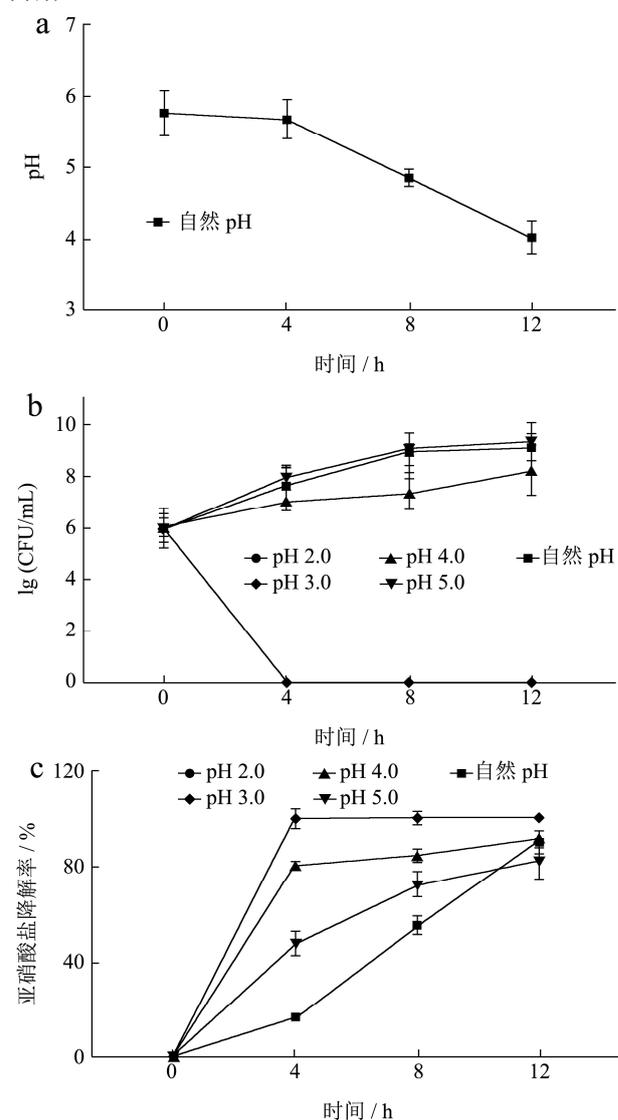


图 2 不同培养 pH 对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.2 Impact of different culture pH on the nitrite degradation by LP9010

注：a、b、c 分别为自然 pH 组（pH=5.8）pH 值、活菌数、亚硝酸盐降解率随时间的变化。

通过查找 LP9010 全基因组序列（表 2）中影响菌株耐酸性相关的基因，发现 LP9010 中具有编码完整的质子泵 F₀F₁-ATPase 系统的基因以及 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的基因，能够通过消耗细胞内的 ATP 将 H⁺ 泵出细胞外。此外，谷氨酰胺脱羧酶（GAD）系统和苹果酸发酵脱羧过程也与菌株的耐酸性密切相关^[15]，在 LP9010 中也发现了谷氨酰胺脱羧酶和精氨酸琥珀酸合酶 ASS1。有研究表明基因 *glnR* 缺失的菌株在酸性条件下存活率明显高于正常菌株^[16]，在基因组中也找到了与之相关的基因 AGL001420。但是结合上述菌株酸耐受性实验分析，LP9010 的酸耐受性并不强，在弱酸

条件下能够良好生长,强酸条件下生长受到明显抑制,从而影响LP9010对亚硝酸盐的降解。

表 2 LP9010 中基因列表

Table 2 The lists of Genes in LP9010

基因 ID	基因名	注释
AGL002101	ATPF1E, <i>atpC</i>	
AGL002102	ATPF1B, <i>atpD</i>	
AGL002103	ATPF1G, <i>atpG</i>	
AGL002104	ATPF1A, <i>atpA</i>	FOF1-ATP synthase
AGL002105	ATPF1D, <i>atpH</i>	
AGL002106	ATPF0B, <i>atpF</i>	
AGL002107	ATPF0C, <i>atpE</i>	
AGL002108	ATPF0A, <i>atpB</i>	
AGL000183	<i>nhaC</i>	Na ⁺ :H ⁺ antiporter
AGL002976	<i>nhaC</i>	
AGL003031	<i>gadB</i> , <i>gadA</i>	glutamate decarboxylase
AGL000624	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase
AGL001420	<i>glnR</i>	glutamine synthetase repressor

2.3 不同培养温度对LP9010降解亚硝酸盐的影响

响

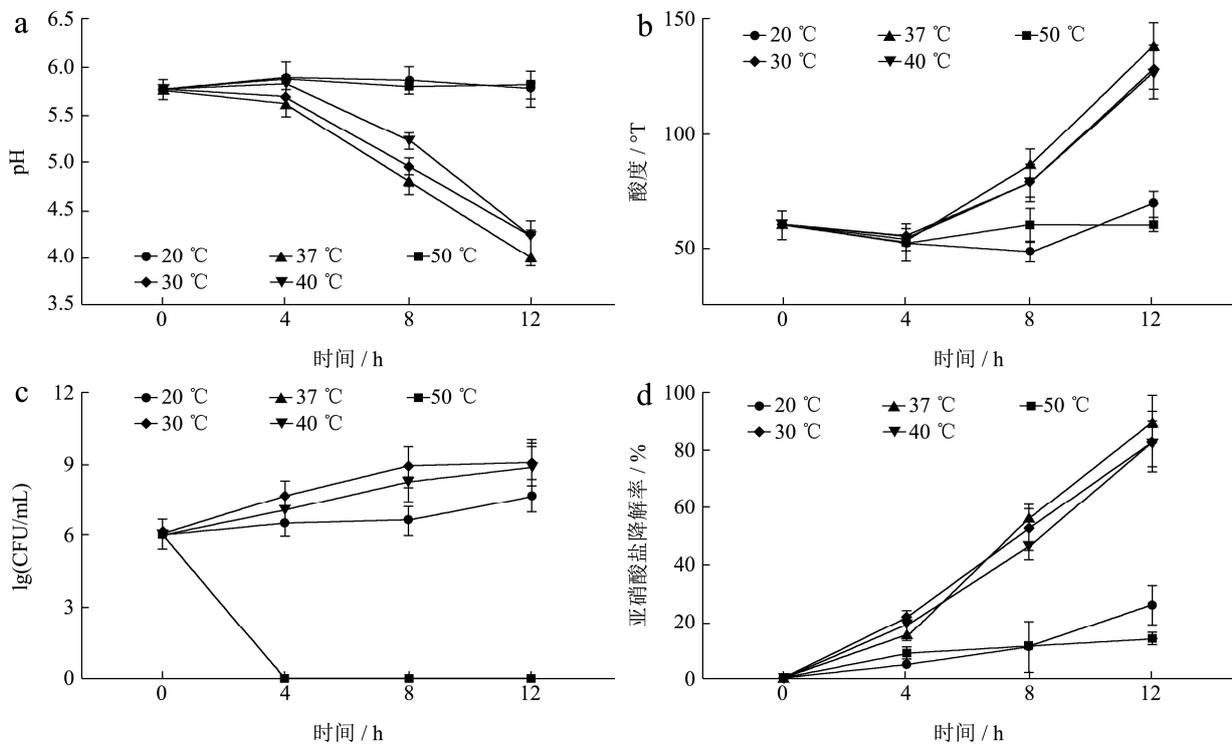


图 3 不同培养温度对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.3 Impact of different culture temperatures on the nitrite degradation by LP9010

注: 图 a、b、c、d 分别为 pH、酸度、活菌数、亚硝酸盐降解率随时间的变化。下图同。

根据图 3, 相比于其他温度, 37 °C 最适合 LP9010 生长繁殖、产酸以及降解亚硝酸盐, 此温度下在培养 12 h 时 pH 最低 (4.01) (图 3a)、酸度最高 (138.44 °T) (图 3b)、活菌数最大 (1.23×10⁹ CFU/mL) (图 3c) 以及亚硝酸盐降解率最高 (90.01%) (图 3d)。LP9010 正常生长时产生的酸可以降解亚硝酸盐^[11], 但低温和高温均会抑制 LP9010 的生长和产酸 (图 3), 从而抑制亚硝酸盐的降解。20、30、37、40 °C 组的酸度变化均为先下降后上升, 这是因为酸会通过下述反应降解亚硝酸盐^[17]: H⁺+NO₂⁻→HNO₂ (对热不稳定) →N₂O₃ (对热不稳定) →NO+NO₂。在生长前期 LP9010 生长繁殖缓慢, 分泌有机酸的速率低于其被消耗的速率, 酸度下降; 后期 LP9010 繁殖速度加快, 有机酸分泌速率高于其被消耗的速率, 酸度上升。

此外, 在 LP9010 中还发现一些与冷热耐受性相关的基因 (表 3), 例如与耐热相关的 *clp* 蛋白酶亚单位基因 *clpC*、*clpE*、*clpP*、*clpX* 和 *clpL* 等, 编码冷应激蛋白 *cspA* (AGL000029、AGL000821 和 AGL000956) 的基因等。结合上述实验菌株冷热耐受性分析, 推测在 20 °C 和 40 °C 条件下培养 8 h 后菌株生长速度加快与菌株冷热应激蛋白的表达有关, 在低温和高温的刺激下, 应激蛋白的表达提高了菌株对极端温度的耐受性。

表 3 LP9010 中基因列表

Table 3 The lists of Genes in LP9010

基因 ID	基因名	注释
AGL001527	<i>cfa</i>	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
AGL000838	<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
AGL001077	<i>clpE</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpE
AGL000633	<i>clpP</i>	
AGL000988	<i>clpP</i>	
AGL001182	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease, protease subunit
AGL001241	<i>clpP</i>	
AGL002884	<i>clpP</i>	
AGL001881	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
AGL003167	<i>clpL</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL
AGL000440	<i>htpX</i>	heat shock protein HtpX
AGL001797	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcriptional repressor
AGL000029	<i>cspA</i>	
AGL000821	<i>cspA</i>	cold shock protein
AGL000956	<i>cspA</i>	

表 4 LP9010 中基因列表

Table 4 The lists of Genes in LP9010

基因 ID	基因名	注释
AGL003162	<i>katE, catB, srpA</i>	Catalase
AGL001327	\	SOD (superoxide dismutase)
AGL000611	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase
AGL002295	<i>trxB</i>	
AGL000220	<i>trxA</i>	
AGL002017	<i>trxA</i>	thioredoxin 1
AGL002333	<i>trxA</i>	
AGL000339	GSR, <i>gor</i>	
AGL001061	GSR, <i>gor</i>	
AGL001641	GSR, <i>gor</i>	glutathione reductase
AGL002920	GSR, <i>gor</i>	
AGL002068	<i>msrC</i>	L-methionine (R)-S-oxide reductase
AGL001131	<i>msrA</i>	
AGL001649	<i>msrA</i>	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase
AGL001772	<i>msrA</i>	
AGL001650	<i>msrB</i>	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase

2.4 氧气对LP9010降解亚硝酸盐的影响

由图 4, 12 h 时有氧组和无氧组的 pH 分别为 4.01 和 3.99 (图 4a), 酸度分别为 138.44 °T 和 144.95 °T (图 4b), 活菌数分别为 1.28×10^9 CFU/mL 和 7.40×10^8 CFU/mL (图 4c), 亚硝酸盐降解率分别为 90.12% 和 92.87% (图 4d)。可看出各项指标无明显差异 ($p > 0.05$), 这是因为乳酸菌的代谢类型为兼性厌氧,

有无氧气下均可正常生长繁殖^[18]。但氧气的存在可能会影响其代谢过程, 故两组的产酸以及亚硝酸盐降解率均有细微差别。在 LP9010 全基因组 (表 4) 中, 发现了与过氧化氢还原酶表达相关的基因 AGL003162 和与超氧化物歧化酶表达相关的基因 AGL001327。在硫化物代谢过程中发现了由 AGL000611 和 AGL002295 编码的硫氧还蛋白还原酶 *trxB*, 由 AGL000220、AGL002017、AGL002333、AGL003045

和 AGL003275 编码的硫氧还蛋白 *trxA*, *trxB* 和 *trxA* 在抵抗氧化应激中产生重要作用^[19]。在谷胱甘肽代谢途径中发现了编码谷胱甘肽还原酶 *gor* 的基因, 该酶能够将谷胱甘肽二硫化物还原为谷胱甘肽 (GSH), GSH 通过转录调控清除自由基以提升氧耐受性。此外, 基因 AGL002068 编码的 L-甲硫氨酸 (R)-S-氧化物还原酶 *msrC*、基因 AGL001131、AGL001649 和 AGL001772 编码的肽-甲硫氨酸 (S)-S-氧化物还原酶 *msrA* 和基因 AGL001650 编码的肽-甲硫氨酸 (R)-S-氧化物还原酶 *msrB* 能够有效降低过氧化氢对菌株的损伤。结合氧气对实验菌株生长情况影响的分析, 推测 LP9010 的氧气耐受性可能与上述超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等酶类的表达有关, 接下来仍需进一步验证。

2.5 不同碳源对LP9010降解亚硝酸盐的影响

在乳酸菌降解亚硝酸盐的代谢过程中, 糖类物质除了发挥提高肉制品的风味和色泽的作用外, 还是乳酸菌代谢过程中所需的碳源, 因此它直接影响着乳酸菌对亚硝酸盐的降解。从图 5 可看出空白组、葡萄糖组、蔗糖组和玉米淀粉组的 pH 变化无明显差异 ($p>0.05$), 均为先下降后稍有回升 (图 5a); 酸度较低, 均在 6.00 °T 以下 (图 5b); 四组的活菌数先上升, 在 6 h 时升至最高值 (3.19×10^7 CFU/mL) 后快速下降, 其中玉米淀粉组的活菌数在 24 h 时降为 0.00

CFU/mL, 而其他三组的活菌数在 12 h 时降为 0.00 CFU/mL (图 5c)。在 48 h 时空白组、葡萄糖组和蔗糖组的亚硝酸盐降解率在 25.00% 以下, 玉米淀粉组的亚硝酸盐降解率为 50.59% (图 5d)。由于糊化玉米淀粉易吸收, 且含有脂肪、蛋白质、生长因子等营养物质^[20], 故玉米淀粉组中 LP9010 存活时间较长。在培养前期 (0~12 h) LP9010 利用糖份快速生长产酸, 导致 pH 快速下降 (图 5a); 但 12 h 之后活菌数开始下降, 产酸减少, 而酸被消耗用于降解亚硝酸盐, 故 pH 略有上升^[20]。空白组、葡萄糖和蔗糖组 LP9010 存活时间较短 (12 h) (图 5c), 导致亚硝酸盐降解率较低; 相比于其他组, 玉米淀粉组中 LP9010 能更好地生长繁殖, 因此亚硝酸盐降解率在 48 h 时明显高于其他组 ($p<0.05$) (图 5d)。LP9010 基因序列 (表 5) 中 *pstI* (PTS system enzyme I) 由基因 AGL001080 编码, 未发现编码 HPr 的相关基因。糖转运相关基因中, 葡萄糖家族由 EII A 的 *Crr* 和 EII B 的 *NagE* 等转运, 蔗糖由 EII BCA 的 *ScrA* 转运, 甘露糖由 EII A 的 *MtlA* 和 *ManX*、EII B 的 *ManY* 和 EII D 的 *ManZ* 转运, 半乳糖由 EII A 的 *GatA*、EII B 的 *GatB* 和 EII C 的 *GatC* 转运, 果糖由 EII B 的 *FruA* 和 EII A 的 *FruB* 转运。葡萄糖和蔗糖组降亚硝酸盐率无明显差异 ($p>0.05$, 图 5), 在整个 LP9010 的 PTS 系统中, 只有蔗糖、甘露糖、半乳糖胺、半乳糖和果糖具有完整的代谢通路, 这与表型 (葡萄糖、蔗糖组) 结果相一致。

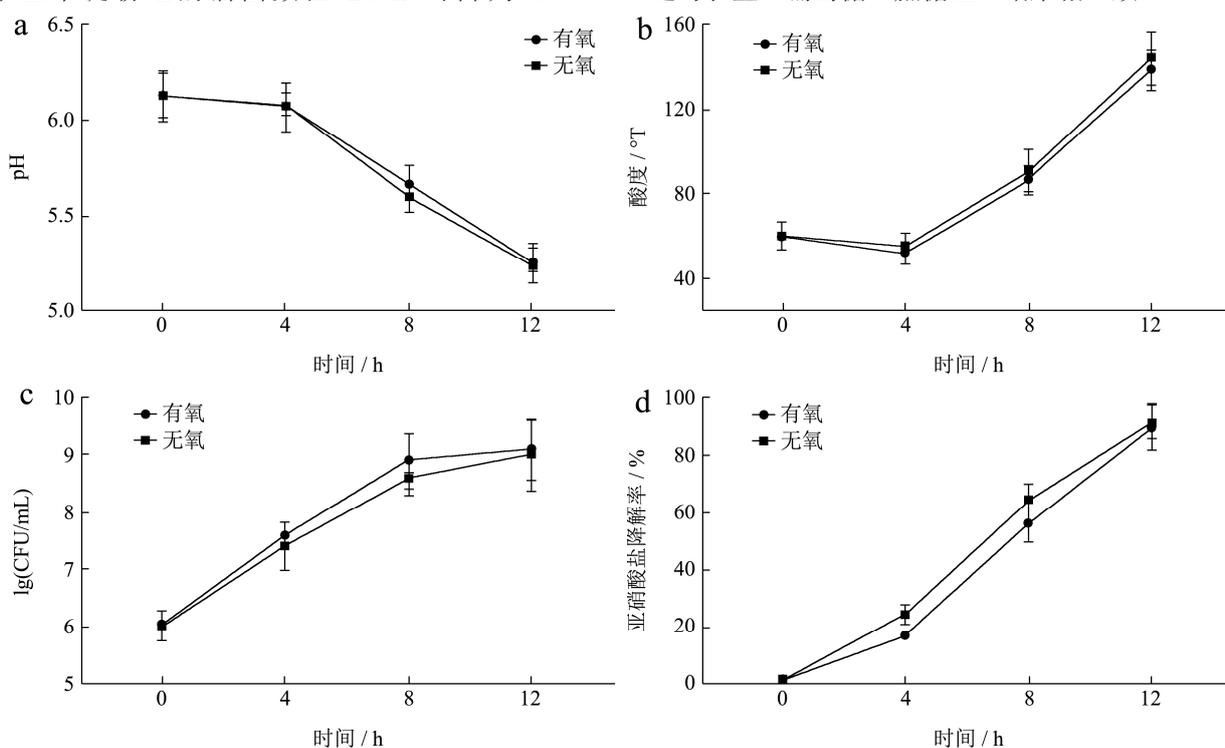


图 4 氧气对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.4 Impact of oxygen on the nitrite degradation by LP9010

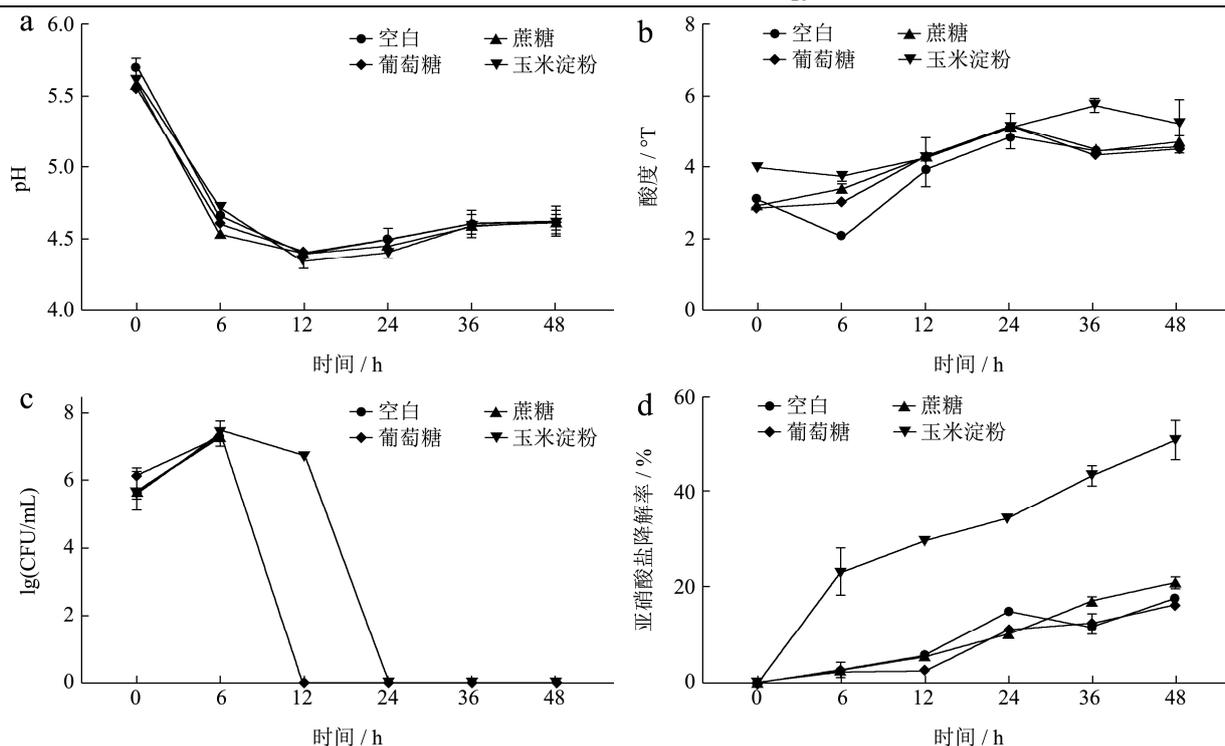


图5 不同碳源对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.5 Impact of different carbon sources on the nitrite degradation by LP9010

表5 LP9010 中基因列表

Table 5 The lists of Genes in LP9010

基因 ID	基因名	注释
AGL001080	<i>pslI</i>	Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component in bacteria)
AGL000719	<i>Crr</i>	Phosphotransferase system IIA component
AGL002653	<i>Crr</i>	
AGL002255	<i>NagE</i>	Phosphotransferase system IIC components, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific
AGL002621	<i>NagE</i>	
AGL000178	<i>ScrA</i>	Phosphotransferase system IIB components
AGL002830	<i>ScrA</i>	
AGL000217	<i>MtlA</i>	Mannitol/fructose-specific phosphotransferase system, IIA domain
AGL000501	<i>ManX</i>	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA
AGL000506	<i>ManX</i>	
AGL002075	<i>ManX</i>	
AGL000502	<i>ManY</i>	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC
AGL002077	<i>ManY</i>	
AGL000503	<i>ManZ</i>	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IID
AGL002076	<i>ManZ</i>	
AGL003135	<i>GatA/GatB</i>	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)
AGL003133	<i>GatC</i>	Phosphotransferase system, galactitol-specific IIC component
AGL000507	<i>FruA</i>	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB
AGL001862	<i>FruA</i>	
AGL001862	<i>FruB</i>	
AGL002844	<i>FruB</i>	Phosphotransferase system fructose-specific component IIB

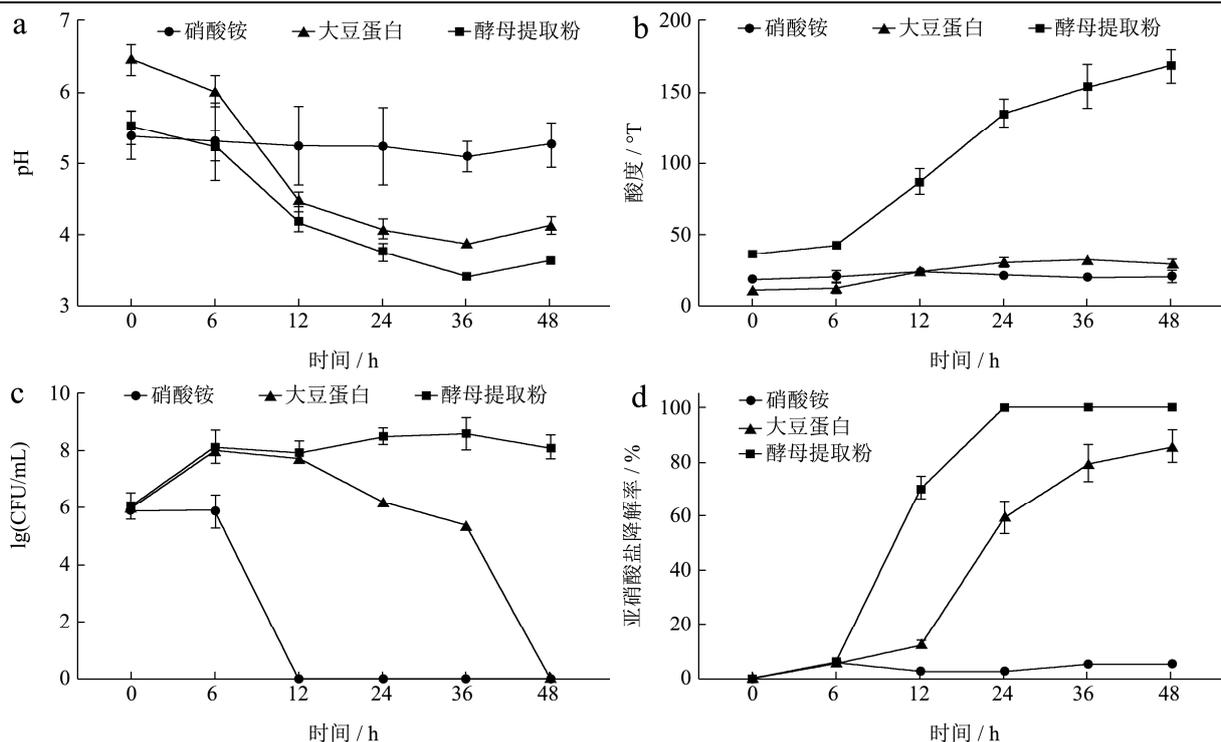


图6 不同氮源对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.6 Impact of different nitrogen sources on the nitrite degradation by LP9010

表 6 LP9010 中基因列表

Table 6 The lists of Genes in LP9010

基因 ID	基因名	注释
AGL001722	<i>lmrB</i>	Nitrate/nitrite transporter NarK
AGL001967	<i>pgl</i>	Cytochrome cd1-nitrite reductase-like, haem d1 domain

2.6 不同氮源对LP9010降解亚硝酸盐的影响

由图 6, 硝酸铵组中 LP9010 无法繁殖和产酸, pH 保持在 5.07~5.41 内 (图 6a)、酸度在 18.89~24.89 °T 间 (图 6b)、活菌在 0~6 h 维持在 6.50×10^5 CFU/mL 左右 (图 6c), 在 12 h 时下降至 0.00 CFU/mL (图 6c), 可见 LP9010 不能以硝酸铵为氮源, 且对 LP9010 产生毒害作用^[20]。其原因可能是高浓度无机盐使溶液渗透压变大, 细胞失水营养物质流失, 致使细胞皱缩, 阻碍其生长过程。故此时 LP9010 无法生长和产酸, 亚硝酸盐几乎不降解。在葡萄糖的基础上添加酵母提取粉能提升 LP9010 的生长繁殖和产酸, 故亚硝酸盐降解率高; 大豆蛋白组虽产酸少, 但亚硝酸盐降解率在 48 h 时可达 85.62% (图 6d), 可能是因为 LP9010 能产生其他能降解亚硝酸盐的物质 (如 NiR 等)。另外, 本实验也从侧面证实了乳酸菌不能利用亚硝酸盐作为提供其细胞生长所需的氮源或无机盐。有趣的是, 笔者在 LP9010 中发现了推定的亚硝酸盐还原酶基因, 例如 *lmrB* 和 *pgl* (表 6)。此外, 植物乳杆菌 WCFS1 在 KEGG 途径和 NCBI 中发现的谷氨酸和谷氨酰胺代

谢中显示关键酶。本课题组前期研究表明, LP9010 通过电子传输链降解了低浓度的亚硝酸盐 (0.276 g/L), 部分亚硝酸盐被还原为 NH_3 ^[21], 但是亚硝酸盐还原酶能否在降解过程中起主导作用仍需进一步研究。

2.7 不同生长因子对LP9010降解亚硝酸盐的影响

由图 7, 不同生长因子对 LP9010 的产酸以及亚硝酸盐降解率无明显影响 ($p > 0.05$) (图 7a 和 d)。三组 pH (图 7a) 和酸度 (图 7b) 的变化无明显差异, 亚硝酸盐降解率趋势相近, 在 24 h 时均达到 100.00% (图 7d)。而添加番茄汁 12 h 后活菌数 (3.95×10^9 CFU/mL) 会明显高于苹果汁组 (5.10×10^8 CFU/mL) 和胡萝卜汁组 (8.70×10^8 CFU/mL), 但 24 h 时番茄汁组的活菌数会下降到与其他两组相同的水平 (7.23×10^8 CFU/mL) (图 7c), 这与杜磊^[22]人的研究结果一致, 说明不同生长因子下 LP9010 产酸无明显差别, 亚硝酸盐降解率也相近。在 LP9010 的全基因组序列中未发现维生素消化和吸收的相关编码基因 (KEGG 代谢通路为 ko04977)。

沙吉坦·克依斯尔等人从来自传统发酵酸乳中筛选出短乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*) M3-3, 探究不同促生长因子 (番茄汁、胡萝卜汁、玉米浆) 对 *Levilactobacillus brevis* M3-3 生长的影响, 发现玉米浆

对 *Levilactobacillus brevis* M3-3 的促生长效果最好^[23], 与本研究结果不同, 可能是菌株的差异性所导致的。然而不同乳杆菌是否含有维生素消化和吸收的相关编码基因会影响乳杆菌的生长, 仍需进一步的研究。

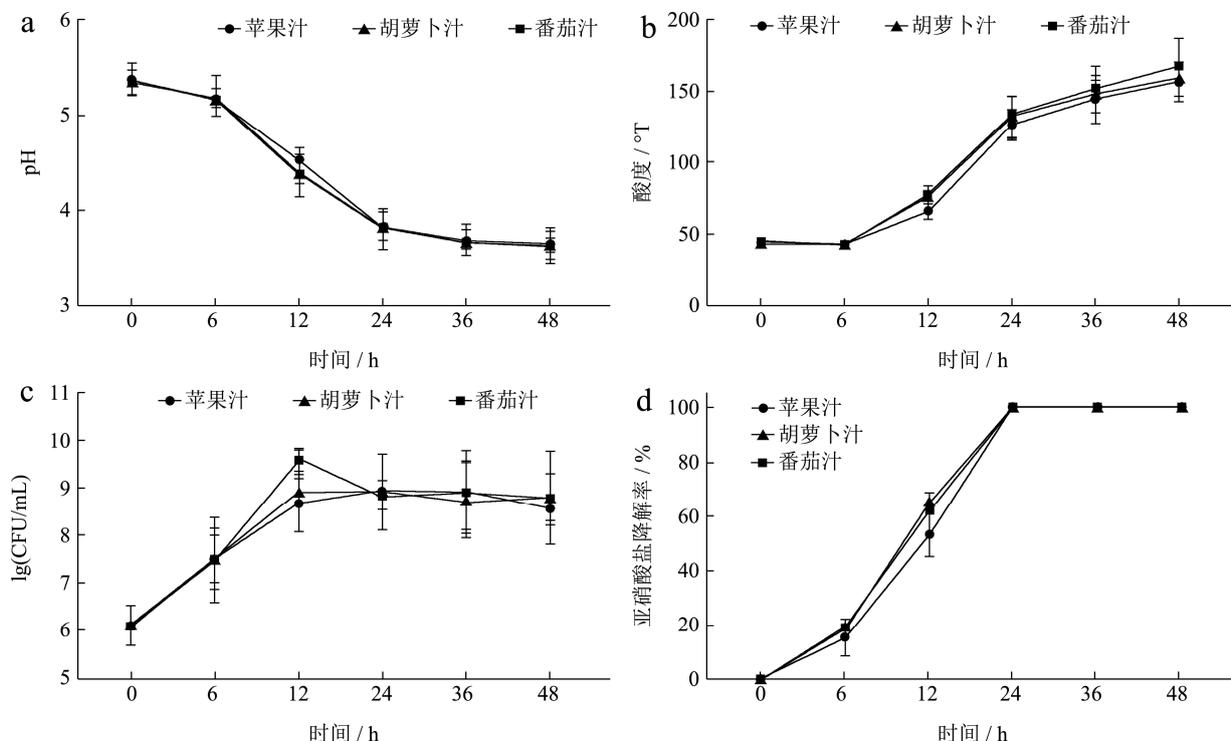


图7 不同生长因子对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响

Fig.7 Impact of different growth factors on the nitrite degradation by LP9010

3 结论

本文在不同培养条件和培养基成分条件下培养 LP9010, 通过研究和分析其 pH、酸度、活菌数和亚硝酸盐降解率的变化可知: pH 越低时亚硝酸盐降解率越高; 37 °C 最有利于 LP9010 生长繁殖和产酸, 从而更好地降解亚硝酸盐, 温度升高或者降低使得亚硝酸盐降解率下降; 不同培养基成分对 LP9010 降解亚硝酸盐的影响主要体现在增菌作用, 活菌数越高, 亚硝酸盐降解率越高。通过全基因组分析发现 LP9010 中有酸耐受, 冷热耐受, 氧耐受以及糖转运相关的基因, 尤其是发现了亚硝酸盐还原酶基因。然而 LP9010 降解亚硝酸盐深层次的机理仍有待进行转录组和代谢组联合分析验证相关基因与亚硝酸盐降解的相关性。

参考文献

[1] Huang Y, Liang M, Zhao S, et al. Isolation, expression, and biochemical characterization: nitrite reductase from *Bacillus cereus* LJ01 [J]. RSC Advances, 2020, 10(62): 37871-37882

[2] 克里斯托弗·凯维尔, 安东尼·焦尔达诺, 道格拉斯·R·弗拉纳根, 等. 亚硝酸盐/酯的药物制剂以及其应用 [P]. CN

201080056898, 2017

Christopher C, Anthony G, Douglas R F, et al. The pharmaceutical preparation of nitrite/ester and its application [P]. CN201080056898, 2017

[3] 陈思敏, 罗彤晖, 费永涛, 等. 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* LJ01 中亚硝酸盐还原酶的基因克隆、表达和纯化 [J]. 食品科学, 2018, 39(6): 69-74

CHEN Simin, LUO Tonghui, FEI Yongtao, et al. Cloning, expression and purification of the nitrite reductase gene from *Bacillus cereus* LJ01 [J]. Food Science, 2018, 39(6): 69-74

[4] 陈浩, 陈思敏, 刘冬梅, 等. 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 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(1): 125-131

CHEN Hao, CHEN Simin, LIU Dongmei, et al. Isolation and purification of nitrite reductase and electron donor from *Lactobacillus casei* LCR 6013 and their synergetic degradation of nitrites [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(1): 125-131

[5] 王盼, 费永涛, 刘冬梅, 等. 植物乳杆菌 DMDL 9010 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, FEI Yongtao, LIU Dongmei, et al. Cloning, expression, and purification of the nitrite reductase gene from *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(6): 150-155, 271
- [6] 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
- XIAO Qiuying, CHEN Lianhong, WANG Linlin, et al. Screening and tolerance of degrading nitrite-lactant bacteria in fermented yak milk of western Sichuan plateau [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 119-123, 130
- [7] 杨晶,黄玉军,姚瑶,等.植物乳杆菌 5-7-3 发酵产生的有机酸对亚硝酸盐的降解作用研究[J].中国调味品,2019,44(3):28-31
- YANG Jing, HUANG Yujun, YAO Yao, et al. Degradation of nitrite by organic acids produced by *Lactobacillus plantarum* 5-7-3 fermentation [J]. Chinese Condiment, 2019, 44(3): 28-31
- [8] 王一茜,荣金诚,王晓辉,等.常见乳酸菌降解亚硝酸盐机理探讨[J].食品与发酵工业,2019,45(8):50-56
- WANG Yiqian, RONG Jincheng, WANG Xiaohui, et al. Mechanisms of nitrite degradation by lactic acid bacteria commonly appeared in foods [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(8): 50-56
- [9] 卢海强,霍文敏,谷新晰,等.产亚硝酸盐还原酶低温乳酸菌的筛选鉴定及发酵特性[J].河北农业大学学报,2015,38(1): 87-91
- LU Haiqiang, HUO Wenmin, GU Xinxi, et al. Isolation and characterization of psychrotrophic lactic acid bacteria producing nitrite reductase [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2015, 38(1): 87-91
- [10] 应碧,昌晓宇,刘志文,等.亚硝酸盐胁迫下植物乳杆菌 WU14 亚硝酸盐还原酶的食品级高效诱导表达及其酶学性质研究[J].中国农业科学,2015,48(7):1415-1427
- YING Bi, CHANG Xiaoyu, LIU Zhiwen, et al. Food-grade induced expression and enzymatic properties of nitrite reductase from *Lactobacillus plantarum* WU14 under nitrite stress [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(7): 1415-1427
- [11] 柳念,陈佩,高冰,等.乳酸菌降解亚硝酸盐的研究进展[J].食品科学,2017,38(7):290-295
- LIU Nian, CHEN Pei, GAO Bing, et al. Progress in understanding degradation of nitrite by lactic acid bacteria [J]. Food Science, 2017 38(7): 290-295
- [12] 黄燕燕,郭均,黎恒希,等.降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J].食品科学,2018,6(39):95-101
- HUANG Yanyan, GUO Jun, LI Hengxi, et al. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering activity and the underlying mechanism [J]. Food Science, 2018, 6(39): 95-101
- [13] Huang Y Y, Liu D M, Jia X Z, et al. Whole genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 and its effect on growth phenotype under nitrite stress [J]. Lwt - Food Science and Technology, 2021, 149: 111778
- [14] Huang Y Y, Zhao S, Yao K, et al. Physicochemical, microbiological, rheological, and sensory properties of yoghurts with new polysaccharide extracts from *Lactarius volemus* Fr. using three probiotics [J]. International Journal of Dairy Technology, 2020, 73(1): 168-181
- [15] Zhou Z, Liu Y, Zanaroli G, et al. Enhancing bioremediation potential of *Pseudomonas putida* by developing its acid stress tolerance with glutamate decarboxylase dependent system and global regulator of extreme radiation resistance [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2033-2033
- [16] Zhao H, Liu L, Peng S, et al. Heterologous expression of argininosuccinate synthase from *Oenococcus oeni* enhances the acid resistance of *Lactobacillus plantarum* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1393-1393
- [17] 刘晓英.泡菜中有机酸对亚硝酸盐降解作用及机理的初步研究[D].泰安:山东农业大学,2013
- LIU Xiaoying. Research on nitrite degradation by organic acids in pickle fermentation [D]. Tai 'an: Shandong Agricultural University, 2013.
- [18] 田良玉.乳酸菌高密度规模发酵工艺优化[D].扬州:扬州大学,2018
- TIAN Liangyu. Optimization of high- density and large-scale fermentation for lactic acid bacteria [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018.
- [19] Serata M, Iino T, Yasuda E, et al. Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei* [J]. Microbiology, 2012, 158(4): 953-962
- [20] 陈中,林浩,林伟锋.植物乳杆菌在自制培养基中降解亚硝酸盐的研究[J].现代食品科技,2014,30(3):60-64
- CHEN Zhong, LIN Hao, LIN Weifeng. Effects of simplified defined medium on nitrite degradation by *Lactobacillus plantarum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 60-64

(下转第 184 页)