

LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径及其亚硝酸盐还原酶的初步定位

张馨月¹, 刘冬梅¹, 许喜林¹, 李平², 李理¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 研究了在 DeMan, Rogosa and Sharpe medium (简称 MRS 培养基) 体系中 NaCl、Vc 对 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013 (简称 LCR 6013) 降解亚硝酸盐的影响。并利用电子捕获-气相色谱法和靛酚蓝染色法确定亚硝酸盐的降解途径。通过测定 LCR 6013 细胞中不同组分的酶活研究了亚硝酸盐还原酶 (Nitrite reductase, NiR) 的定位。在 MRS 体系中, NaCl、Vc 浓度分别为 0.75%、0.02% 时, LCR 6013 对亚硝酸盐的降解量最高分别为 9.29 $\mu\text{g/mL}$ 和 9.89 $\mu\text{g/mL}$, 与对照比, 此降解效果显著 ($p \leq 0.01$)。当 NaNO_2 初始量为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 降解产物中含有 28.81 $\times 10^{-6}$ 的 N_2O 气体, 没有 NH_4^+ 。当 NaNO_2 初始量为 50.00 $\mu\text{g/mL}$, 在 16 h 时 LCR 6013 能够将 NaNO_2 完全降解, 14 h 时 N_2O 体积百分比含量最高为 96.61 $\times 10^{-6}$; 细胞周质间隙中 NiR 酶活是细胞质中的 2.5 倍。总之, 在 MRS 体系中, LCR 6013 能有效降解亚硝酸盐是源于细胞内亚硝酸盐还原酶 NiR 的作用; 最可能通过 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的途径进行降解, 而非铵化作用; 降解产物中含有 N_2O 气体。

关键词: 干酪乳杆菌鼠李糖亚种; 亚硝酸盐还原酶; 定位; 一氧化二氮; 反硝化

文章编号: 1673-9078(2013)11-2627-2632

The Degradation Pathway of Nitrite by LCR 6013 and the Primary Localization of Its Nitrite Reductase

ZHANG Xin-yue¹, LIU Dong-mei¹, XU Xi-lin¹, LI Ping², LI Li¹

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of Vc, NaCl on the nitrites degradation by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013 (LCR 6013) in the De Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS) were investigated. The degradation pathway was confirmed by electron capture gas-chromatography and indophenol blue colorimetric method. The nitrite reductase (NiR) localization was examined by measuring the enzyme activity of different cellular components from LCR 6013 cells. In MRS, the degraded nitrites concentration reached the highest to 9.29 $\mu\text{g/mL}$ and 9.89 $\mu\text{g/mL}$ when NaCl and Vc concentrations were 0.75% and 0.02%, respectively. To compare with the control, the degradation effect of treatment was significant ($p \leq 0.01$). When the initial concentration of nitrites was 10.00 $\mu\text{g/mL}$, the degradation products contained 28.81 $\times 10^{-6}$ N_2O . The strain LCR 6013 completely degraded the nitrites with initial concentration of 50.00 $\mu\text{g/mL}$ after 16 h incubation. And the volume fraction of N_2O reached 96.61 $\times 10^{-6}$ after 14 h. The enzyme activity of nitrites from the periplasm extraction was 2.5 fold higher than that from the cytoplasm extraction. In summary, the effective degradation of nitrites is due to the reaction of the nitrite reductase in the LCR 6013 cell. The most likely pathway of degradation was as follows: $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, rather than ammonification. The degradation products contain N_2O gas.

Key words: *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*; nitrite reductase; localization; nitrous oxide; denitrification

众所周知, 亚硝酸盐是一种潜在的强致癌物, 发酵蔬菜在加工过程中积累的亚硝酸盐给产品带来了潜
收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 国家自然科学基金 (31101254); 广东省自然科学基金 (S2011010005679); 中央高校基本科研业务费专项资金 (D2116760)

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事食品微生物利用与发酵的教学及研究工作

在的安全性问题。人体大量摄入亚硝酸盐导致的急性中毒作用是高铁血红蛋白症 (Methemoglobin) [1-2]; 亚硝酸盐在适宜的条件下, 可与食品中蛋白质的分解产物胺进行反应, 生成 N-亚硝基化合物, 目前已经合成该类化合物有 100 多种, 已经证实其中约 80% 对动物有强致癌性 [3]。但亚硝酸盐在肉制品工业中用于防止肉类食品中的梭状芽孢肉毒杆菌和起发色剂的双重

作用,因此,研究如何降解潜在致癌物亚硝酸盐的积累,成为当今食品安全的研究热点之一。Hashimoto等人发现通过接种乳酸菌可抑制泡菜中高浓度亚硝酸盐的积累^[4]。在泡菜和肉制品发酵过程中,已报道短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)^[5]、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[6]等十几种乳酸菌能降解生成的或人工添加的亚硝酸盐。笔者研究组的前期研究也发现,在泡菜发酵过程中接种干酪乳杆菌鼠李糖亚种 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013 (简称为 LCR 6013) 可以抑制亚硝酸盐的生成和积累^[7]。但是有关乳酸菌降解亚硝酸盐的途径及其关键酶的定位尚未见报道。本实验探讨了在 MRS 体系中接种 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响因素;为确定亚硝酸盐的降解途径,利用电子捕获气相色谱法测定反应体系中顶空气中一氧化二氮(N_2O)的含量,利用靛酚蓝染色法测定反应体系中的 NH_4^+ 离子浓度;通过测定 LCR 6013 细胞周质和细胞质中的亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase 简称为 NiR)的酶活,以确定 NiR 的在细胞中的初步定位,以期进一步确证 LCR 6013 降解亚硝酸盐的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

干酪乳杆菌鼠李糖亚种 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013 (简称为 LCR 6013),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 主要试剂及材料

胰蛋白酶抑制剂,生化试剂,广州齐云有限公司;溶菌酶,生化试剂,北京天恩泽生物公司;亚硝酸钠,分析纯,天津市福晨化学试剂厂;MRS培养基,生化试剂,广东环凯微生物科技有限公司;Vc,生化试剂,天津市福晨化学试剂厂;NaCl,分析纯,天津市福晨化学试剂厂;二硫苏糖醇 DTT,生化试剂,上海 Sigma 公司;牛血清蛋白,生化试剂,广州齐云有限公司;其它试剂均为分析纯,市售。

1.1.3 试剂溶液及培养基的配制

(1) 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)的配制:称取 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g $NaHPO_4$, 0.24 g KH_2PO_4 溶解于 800 mL 蒸馏水中,用盐酸调 pH 至 7.4,用蒸馏水定容至 1000 mL;(2) NiR 酶提缓冲液的配制:在 100 mL 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)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 0.2 mL 的 2 μ g/mL 胰蛋白酶抑制剂,混合均匀后即为 NiR 酶提缓冲液;(3) 1000 mg/L 铵态氮(简称 TAN)贮存液的配制:将 3.8158 g 的 NH_4Cl 溶于 1000 mL 超纯水中,充分溶解后备用;

(4) 液体 MRS 培养基的配制:在 1000 mL 中的蒸馏水中,加入 MRS 培养基粉末 54 g,搅拌均匀,用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.8 后于 0.1 MPa 的条件下灭菌 20 min 后冷却备用;

1.2 仪器与设备

5804R 台式冷冻离心机(Eppendorf 公司);01J2003-04 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);PHS3-C pH 计(上海精密科学仪器有限公司);Spectrum-lab752s 紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司);7890-II 气相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司);Scientz-II D 超声波破碎仪(宁波新型科技有限公司);

1.3 实验方法

1.3.1 亚硝酸盐的检测

参考国标 GB/T5009.33-2010《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的方法进行测定,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 3~5 min 后各加入 1 mL 盐酸萘乙二胺溶液(2 g/L),加水至刻度,混匀,静置 15 min 测定反应液的吸光度。

1.3.2 LCR 6013 亚硝酸盐降解的影响因素

(1) NaCl 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响

按照体积百分比为 5% 将种子液接种至含有 NaCl 初始浓度(质量体积百分比浓度)分别为 0.00%、0.25%、0.50%、0.750%、0.100%、1.00%、1.25% 的液体 MRS 培养基中,加入 100.00 μ g/mL $NaNO_2$ 溶液,使其终浓度为 10.00 μ g/mL,于 37 $^{\circ}C$ 静止培养 24 h 后按照 1.3.1 的方法测定 $NaNO_2$ 含量,各做三个平行。

(2) Vc 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响

按照体积百分比为 5% 将种子液接种于含有 Vc 初始浓度(质量体积百分比浓度)分别为 0.00%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10% 的液体 MRS 培养基中,加入 100.00 μ g/mL $NaNO_2$ 溶液,使其终浓度为 10.00 μ g/mL,于 37 $^{\circ}C$ 静止培养 24 h 后按照 1.3.1 的方法测定 $NaNO_2$ 含量,各做三个平行。

1.3.3 LCR 6013 乳酸菌降解亚硝酸盐的途径

(1) 密闭反应体系降解亚硝酸盐的反应

在 25 mL 顶空进样瓶中,加入 10 mL 含有 10.00 μ g/mL 的 $NaNO_2$ 已灭菌的液体 MRS 培养基,其中含

有 NaCl、Vc 的质量体积百分比分别为 0.75%、0.02%，按体积百分比接入 5% 的种子液，于 37 °C 密闭状况下，静置培养 24 h 后，抽取该密闭反应体系中顶空气体，上样分析气体 N₂O 的含量，各做三个平行；在同等条件下不接种的反应体系为对照组 CK1；在同等条件下不添加 10.00 μg/mL 的 NaNO₂ 的反应体系为对照组 CK2。

(2) ECD-气相色谱法检测 LCR 6013 降解亚硝酸盐的产物 N₂O 的分析方法

① N₂O 标准气体的检测，采用外标法检测 N₂O 浓度，N₂O 标气浓度 99.999%，不同浓度的标准气体采用体积比配制，标准曲线方程为 $Y=(X+3500.4)/4135.6$ ，Y 为 N₂O 浓度，单位为体积百分比浓度；X 为峰面积，回归系数为 $R^2=0.9991$ ；② 分析仪器：ECD-气相色谱法，检测器为含 ⁶³Ni 的电子捕获检测器 (ECD)，Porapak Q 色谱柱；③ 分析条件：色谱柱温度 45 °C，进样温度为 130 °C，检测器温度为 280 °C；采用注射器进样，进样量为 1 mL；载气为高纯氮气，流速为 30 mL/min。

(3) 铵态氮 (TAN) 含量的检测

参照文献^[9]的靛酚蓝染色法，此方法中铵态氮 (简称为 TAN) 的检测与常规方法略有不同，是用水杨酸钠代替苯酚盐以降低危险性。在 0~1.0 mg/L 范围了取九个点，在 640 nm 处测定吸光值，制作标准曲线。检测反应体系 1.3.3 (1) 中的液体中 NH₄⁺ 的含量。

(4) 培养时间对 LCR 6013 产 N₂O 的影响

在 1.3.3 (1) 的反应体系中，加入含有 50.00 μg/mL 的 NaNO₂ 的 MRS 液体培养基，按体积百分比接入 5% 的种子液，于 37 °C 下分别静置培养 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h、26 h 后，抽取顶空空气中 1 mL 气体，按照 1.3.3 (2) 的方法检测其它 N₂O 的含量，各做三个平行。

1.3.4 NiR 的细胞定位

(1) 含 NiR LCR 6013 细胞的制备

取 LCR 6013 斜面菌苔 1 环接种于液体 MRS 培养基中，37 °C 静止活化培养 24 h 后为种子液。在含有 5.00 μg/mL 的 NaNO₂ 的 1 L 的液体 MRS 培养基中，以体积百分比为 5% 接入种子液，于 37 °C 下静止培养和诱导 24 h，为含 NiR 的 LCR 6013 细胞液 (Cell Broth of Induced Nitrite Reductase 简称为 CBINR)。将 CBINR 于 4 °C，8000 r/min 下离心 30 min 后，弃上清液，用 4 °C 预冷的 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 清洗细胞沉淀两次后，再离心后制得含 NiR 的 LCR 6013 细胞 (Cell of Induced Nitrite Reductase, 简称为 CINR)。

(2) CINR 中周质间隙酶的制备

参照文献^[9]的方法，将 1.3.4 (1) 中所得的 CINR 细胞悬浮于酶提缓冲液中使之终浓度为 110 mg/mL (湿菌体重/缓冲液)，在该菌悬液中加入 20.00 mg/mL 溶菌酶使其终浓度为 0.10% (质量体积百分比)，混匀，于 30 °C 下静置 1 h 以充分溶解 CINR 的细胞壁制得 CINR 周质间隙粗酶液后，于 4 °C、8000 r/min 下离心 30 min 后，上清液为 CINR 周质间隙酶液，沉淀为 CINR 原生质球。

(3) CINR 中细胞质酶的制备

参照文献^[9]的方法，将 1.3.4 (2) 中所得的 CINR 原生质球溶于 5 倍体积的酶提缓冲液中，在冰浴条件下，用功率为 450 W，工作 2 s、间隙 2 s 的条件进行超声破碎处理 5 min 后，于 4 °C、8000 r/min 下离心 30 min 后，上清液为 CINR 细胞质酶，将细胞碎片的沉淀悬浮于 3 mL 酶提取缓冲液中，为细胞碎片悬浮液。取细胞碎片悬浮液 1 mL，加入 100.00 μg/mL NaNO₂ 溶液，使其终浓度为 10.00 μg/mL，于 30 °C 下静置反应 24 h 后按照 1.3.1 的方法测定亚硝酸盐的含量，为 CK3。

(4) 不含 LCR 6013 菌的诱导液降解亚硝酸盐的反应

取 1 mL 的 CBINR，在 10000 r/min 下离心 10 min 后，经过已灭菌的 0.22 μm 滤膜过滤，将 LCR 6013 菌体过滤掉，制得不含 LCR 6013 的发酵液，加入 100.00 μg/mL 的 NaNO₂ 溶液，使其终浓度为 10.00 μg/mL，于 30 °C 下静置反应 24 h 后按照 1.3.1 的方法测定亚硝酸盐的含量，为 CK4。

(5) 不含 NiR 酶的降解亚硝酸盐的反应

取 1 mL 的 CBINR，于 0.1 MPa 的条件下灭菌 15 min 后，使酶失活，加入 100.00 μg/mL NaNO₂ 溶液，使其终浓度为 10.00 μg/mL，于 30 °C 下静置反应 24 h 后按照 1.3.1 的方法测定亚硝酸盐的含量，为 CK5。

(6) 酶蛋白质含量测定

采用紫外分光光度法^[10]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，绘制标准曲线方程为 $Y=0.618X-2.133$ (式中 Y 为吸光值×1000；X 为蛋白浓度，单位为 μg/mL；回归系数为 $R^2=0.9996$)，将测定的酶蛋白的吸光值代入标准曲线方程，即可计算出酶蛋白的含量。

(7) NiR 酶活测定

测定 NiR 酶活的反应体系为在 1.5 mL 离心管中加入 1 mg 粗蛋白 (根据 1.3.4 (6) 的方法测定酶蛋白浓度，从而确定需要添加的酶液体积)，加入 100 μL 的 100 μg/mL NaNO₂ 溶液，使其终浓度为 10.00

μg/mL, 用 PBS 缓冲液定容为 1 mL, 于 30 °C 下静置反应 24 h 后按照 1.3.1 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 1.3.4 (7) 的反应体系中, 每 1 mg 酶蛋白在 1 h 所降解的亚硝酸钠量 (ng) 为 1 个 NiR 的酶活单位 (U)。

1.4 数据分析

实验数据和绘图均采用 Microsoft Excel 2003 数据分析软件。

2 结果与讨论

2.1 NaCl 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响

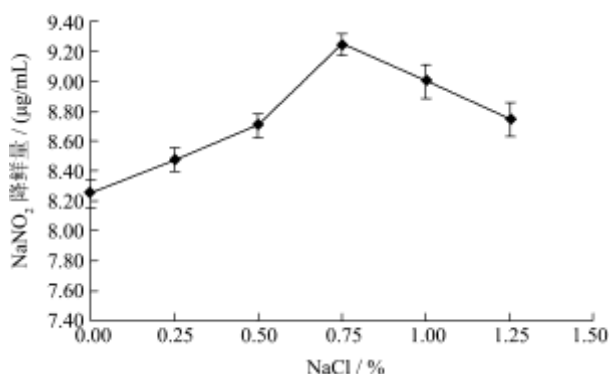


图 1 在 MRS 体系中 NaCl 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响
Fig.1 The effect of NaCl on the degradation by LCR 6013 in MRS system

在 NaCl 初始浓度 (质量体积百分比浓度) 分别为 0.00%、0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25% 的液体 MRS 培养基中, 接种 LCR 6013 以探明其在上述 NaCl 浓度中降解亚硝酸盐的效果, 结果如图 1 所示, 从图中可知, 随着 NaCl 浓度的增高, 亚硝酸盐的降解效果越好, 当 NaCl 浓度为 0.750% 时, 亚硝酸盐的降解量为 9.25 μg/mL, 然后随着 NaCl 浓度进一步增高, 降解量逐渐减少。NaCl 浓度为 0.750% 与对照组相比, 亚硝酸盐的降解具有显著性 ($p \leq 0.01$), 利用 Excel 软件进行单因素方差分析得, $F=1783.95 > F_{crit}=7.71$, 可见 NaCl 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响极显著。在泡菜发酵过程中 NaCl 添加量为 3.00~8.00%^[11], 远高于本研究中所使用的浓度, 可能因为 MRS 培养基中本身含有其它无机盐离子, 当添加的 NaCl 浓度大于 0.75% 时, 培养基中总无机盐的浓度过大而抑制了 LCR 6013 的生长和亚硝酸盐还原酶活性。另一方面可知 LCR 6013 耐盐性不高, 若用于泡菜中亚硝酸盐的控制, 应适当降低 NaCl 添加量, 以保证有效抑制亚硝酸盐的积累。

2.2 Vc 对 LCR 6013 乳酸菌降解亚硝酸钠的影响

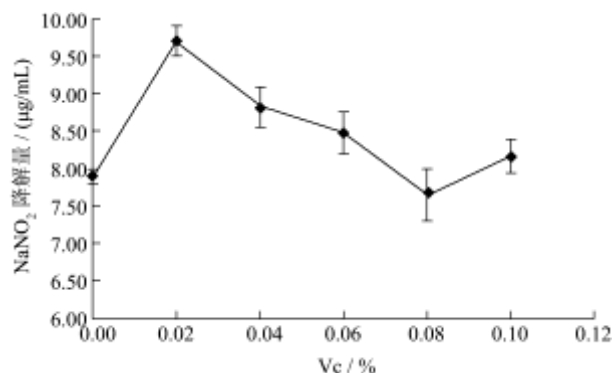


图 2 在 MRS 体系中 Vc 对 LCR 6013 降解亚硝酸盐的影响
Fig.2 The effect of Vc on the degradation by LCR 6013 in MRS system

Vc 初始浓度 (质量体积百分比浓度) 分别为 0.00%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10% 的液体 MRS 培养基中, 接种 LCR 6013 以研究其在上述 Vc 浓度中降解亚硝酸盐的效果, 结果如图 2 所示, 从图中可知, 当 Vc 为 0.02% 时降解亚硝酸盐的效果最好, 所降解的 NaNO₂ 的浓度为 9.70 μg/mL。当 Vc 浓度进一步提高时, 降解效果逐渐降低。与对照组相比, Vc 浓度为 0.02% 时能显著提高 LCR 6013 降解亚硝酸盐能力 ($p \leq 0.01$)。利用 Excel 软件单因素方差分析得, $F=210021.40 > F_{crit}=10.00$, 可见 Vc 对 LCR 6013 乳酸菌降解亚硝酸盐的影响极显著。泡菜发酵过程中, 白菜的初始 Vc 含量为 0.014%, Vc 含量随发酵时间延长而下降, 比较不同配方 Vc 含量变化规律, 得出结论泡菜发酵过程中产酸越慢, Vc 损失速度越慢, 可推断 Vc 渗透到泡菜汁后可被乳酸菌利用^[12]。在厌氧条件下, *Paracoccus halodenitrificans* 中亚硝酸盐还原酶的酶活反应的电子供体为抗坏血酸盐时, 有 N₂O 生成, 但不产生 NO^[13]。由此可知, 适量的 Vc 含量有利于 LCR 6013 降解亚硝酸盐, 但是 Vc 浓度过高时, 降解效果减弱。

2.3 在 MRS 体系中 LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径

根据生物脱氮的理论, 亚硝酸盐的降解可能源于两个途径: (1) NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂, 称为反硝化作用, 亚硝酸盐还原酶为 cytochrome cd₁ 或 copper-containing Nir, 该途径中还涉及到一氧化氮还

原酶 (Nor) 和一氧化二氮还原酶 (Nos) [14]; (2) $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$, 称为铵化作用, 亚硝酸盐还原酶通常为 cytochrome c NrfA [15], *Escherichia coli* 中的 NrfA 还能将可能存在的中间产物 NO 和 NH_2OH 还原为 NH_4^+ , 具有肠道 NO 解毒作用 [16]。为了确证在 MRS 体系中 LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径源于何种途径, 因此需要进行深入研究。早在 80 年代, 曾报道了环境中硝化菌属降解 NO_2^- 的途径, 但乳酸菌属降解亚硝酸盐的途径研究尚未见报道。本研究中, 采用 ECD-气相色谱法检测 MRS 体系中顶空中的气体组分 N_2O , 结果如图 3 所示, 从图中可看出, N_2O 的保留时间为 5.42 min, 体积百分比含量为 28.81×10^{-6} , 不接种 LCR 6013 的 CK1 组和不添加 NaNO_2 的 CK2 组均没有 N_2O 气体的出峰, 可见气体 N_2O 是 MRS 反应体系中的 LCR 6013 降解亚硝酸盐的重要特征产物。

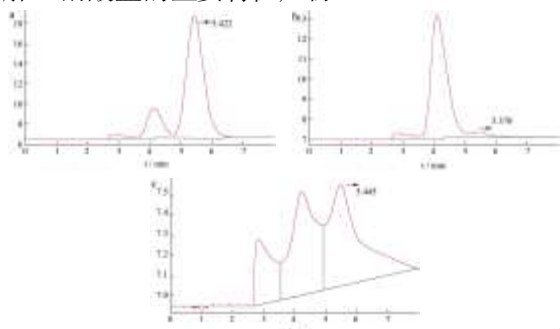


图 3 LCR 6013 降解亚硝酸盐产物 N_2O 的气相色谱图

Fig.3 The gas chromatogram of N_2O produced by LCR 6013 in the processing of nitrite degradation

注: a: 试验组, b: CK1, c: CK2。

为了进一步确证 LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径是源于 (1) $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的途径, 而非铵化途径, 还采用了改进的靛酚蓝染色法检测铵化作用的终产物 NH_4^+ , 进而确认 LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径。MRS 体系中铵态氮 (TAN) 检测结果, 实验组与

CK1、CK2 中的 TAN 的含量非常接近为 $0.650 \mu\text{g/mL}$ 。从上述两个方面的实验结果, 可以确证 LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径是源于 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的途径, 而非铵化途径。以下的不同的培养时间的影响进一步确证了亚硝酸盐的降解途径。

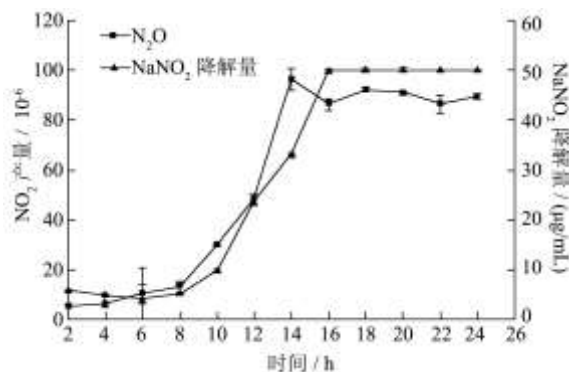


图 4 培养时间对 N_2O 产量的影响

Fig.4 The effect of time on N_2O produced by LCR 6013 in MRS system

不同的培养时间对 LCR 6013 降解亚硝酸盐产 N_2O 的影响如图 4 所示, 由图 4 可看出, 在 MRS 体系中, NaNO_2 的初始添加量为 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, 降解量随时间推移逐渐增大, 16 h 时能将 NaNO_2 完全降解。随着时间延长, N_2O 的产量逐渐增大, 12~14 h 段呈最大增长速率, 14 h 时达到 N_2O 的体积百分比产量最大为 96.61×10^{-6} 。之后稍有降低, 体积百分比含量在 $86.10 \times 10^{-6} \sim 91.04 \times 10^{-6}$ 之间。由此可知, LCR 6013 降解 NaNO_2 的产物含有 N_2O 。在 14 h 后, N_2O 气体的含量略有下降, 推测的原因可能有: (1) 反应时间延长, N_2O 有所泄漏所致; (2) 随反应时间延长, N_2O 发生其它的反应, 是否发生了 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的反应, 需要进行进一步的验证。

2.4 亚硝酸盐还原酶 (NiR) 的定位

表 1 LCR 6013 中亚硝酸盐还原酶的定位

Table 1 The localization of nitrite reductase in LCR 6013

组分	周质间隙酶	细胞质酶	CK3	CK4	CK5
NaNO_2 降解量/ $\mu\text{g/mL}$	7.51 ± 0.038	3.00 ± 0.091	3.43 ± 0.02	0.013 ± 0.002	0.017 ± 0.003
酶活/U	312.64 ± 1.57	124.69 ± 3.81			

免疫化学法、质子迁移法和细胞组分法常用于亚硝酸盐还原酶在细胞内的定位研究。国外对亚硝酸盐还原酶定位时, 采用细胞组分法, 即用溶菌酶处理制得周质间隙酶; 高压破碎菌体后, 通过超高速离心和 chapso 去垢剂处理得到膜结合酶。随着免疫化学的发展, 90 年代后, 免疫标记法作为更准确直观的细胞定位方法被广泛应用。Mark 等人 [17] 采用胶体金标记法对环境中的重要反硝化细菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中

cytochrome *cd*₁ NiR 进行定位, 结果表明 NiR 位于周质间隙或细胞膜内侧, 两者之间的性质差异很大, 纯化方法也不同。有关乳酸菌中亚硝酸盐还原酶的定位未见报道, 本研究采用细胞组分法, 即用溶菌酶溶解细胞壁得周质间隙酶, 超声破碎原生质球后, 离心得到细胞质酶。结果由表 1 所示, 从表 1 中可知, CK4、CK5 都几乎没有亚硝酸盐的降解能力, 可见细胞的上清液不含有亚硝酸盐还原酶的酶活, 排除了胞外酶和

酸降解的作用。组分中 CINTR 周质间隙粗酶和 CINTR 细胞质酶显示了亚硝酸盐降解的酶活, 降解 NaNO_2 分别为 $7.51 \mu\text{g/mL}$ 和 $3.00 \mu\text{g/mL}$, NiR 酶活分别为 312.64 U 和 124.69 U , 前者是后者的 2.5 倍。因此, 在 MRS 体系中 LCR 6013 降解亚硝酸盐的亚硝酸盐还原酶 (NiR) 为胞内酶, 且大部分处于周质间隙中, 细胞质中有较少的酶活, 细胞碎片部分 (CK3) 也体现了部分的降解效果, 但由于细胞碎片溶液浑浊而无法测定酶活。

3 结论

在 MRS 体系中, 当 NaNO_2 初始添加量为 $10.00 \mu\text{g/mL}$, NaCl 、 Vc 浓度分别为 0.75% 、 0.02% 时, LCR 6013 对亚硝酸盐的降解量最高分别为 $9.29 \mu\text{g/mL}$ 和 $9.89 \mu\text{g/mL}$, 与对照比, 降解效果显著 ($p \leq 0.01$)。 NaNO_2 初始添加量为 $10.00 \mu\text{g/mL}$ 时, 顶空气体中含有体积百分比为 28.81×10^{-6} 的 N_2O 气体, 反应体系中没有检测到 NH_4^+ , 可知 LCR 6013 对亚硝酸盐的降解途径最可能为反硝化过程: $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, 而非铵化作用; NaNO_2 初始添加量为 $50.00 \mu\text{g/mL}$ 时, 经过 16 h 后 LCR 6013 能够将 NaNO_2 完全降解, 在 14 h 时 N_2O 气体的体积百分比含量为 96.61×10^{-6} ; 周质间隙中含有的亚硝酸盐还原酶 NiR 的酶活是细胞质中的 2.5 倍。以上结果表明, LCR 6013 能有效降解 MRS 体系中亚硝酸盐, 源于细胞内的亚硝酸盐还原酶的降解作用, 降解的产物含有气体 N_2O , 最可能通过反硝化途径 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 将亚硝酸盐降解完。本研究为乳酸菌属微生物降解亚硝酸盐的途径的阐明提供一个重要方法。对降解途径 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 中的气体 NO 和 N_2 的产生规律还需要深入研究; 对亚硝酸盐还原酶 NiR 的精确定位也需要进一步研究, 例如通过纯化出 NiR 酶蛋白, 制备抗体进行精确定位; 还需要对 LCR 6013 中周质间隙和细胞质中的 NiR 是否为同一类酶、两部分中 NiR 的性质和结构进行深入研究。此研究弥补了国内外对于乳酸菌属微生物降解亚硝酸盐途径的空白。

参考文献

- [1] Spencer JPE, Whiteman M, Jenner A, et al. Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 28 (7): 1039-1050
- [2] Santamaria P. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2006, 86(1): 10-17
- [3] Sen NP, Seaman SW, Baddoo PA, et al. Formation of N-nitroso-N-methylurea in various samples of smoked/dried fish, fish sauce, seafood, and ethnic fermented/pickled vegetables following incubation with nitrite under acidic conditions [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49 (4): 2096-2103
- [4] Hashimoto T. The cause on the abnormal accumulation of nitrite in pickles of Chinese cabbage [J]. Journal of the Japanese society for Food Science and Technology, 2001, 48 (6): 409-415
- [5] 吕玉涛. 产亚硝酸盐还原酶短乳杆菌发酵条件优化及酶的分离纯化研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2010
Lv Yu-tao. Research on optimization of fermentation conditions and isolation of nitrite reductase produced by *Lactobacillus brevis* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2010
- [6] 韩梅, 王衍强, 彭帅, 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离与鉴定 [J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 4(42): 216-219
Han Mei, Wang Yan-Qiang, Peng Shuai, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria of degradation of nitrite [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2011, 4(42), 216-219
- [7] 刘冬梅, 吴晖, 余以刚, 等. *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 719 对泡菜中亚硝酸盐的影响 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, 36(7): 140-144
Liu Dong-mei, Wu Hui, Yu Yi-gang, et al. Effect of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 719 on inhibition of nitrites in pickles [J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2008, 36(7): 140-144
- [8] Phuong TT, Boyd C. Comparison of phenate and salicylate methods for determination of total ammonia nitrogen in fresh water and saline water [J]. The Word of Aquaculture Society, 2012, 43(6): 885-889
- [9] Grant M, Hochstein L. A dissimilatory nitrite reductase in *Paracoccus halodenitrificans* [J]. Archives of Microbiology, 1984, 137: 79-84
- [10] 李慎涛, 张富春. 蛋白科学指南[M]. 北京, 科学出版社, 2007
Li Shen-tao, Zhang Fu-chun. Protein Science Guide [M]. Beijing: Science Press, 2007
- [11] 吴晖, 刘冬梅, 余以刚, 等. 泡菜中亚硝酸盐的研究进展 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 63-66
Wu Hui, Liu Dong-mei, Yu Yi-gang, et al. Review on Nitrite in Pickles [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7): 63-66

- [12] 齐海萍,胡文忠,姜爱丽,等.白菜泡菜发酵过程中的主要成分变化[J].食品研究与开发,2010,31(8):4-7
Qi Hai-ping, Hu Wen-zhong, Jiang Ai-li, et al. The variance of main components during Cabbage Pickle fermentation [J]. Journal of Food Research and Development, 2010,31(8): 4-7
- [13] Rocco L, Mancinelli SC. The purification and properties of a cd-cytochrome nitrite reductase from *Paracoccus halodenitrificans* [J]. Archives of Microbiology, 1986, 145: 202-208
- [14] Baek SH, Shapleigh JP. Expression of nitrite and nitric oxide reductases in free-living and plant-associated *agrobacterium tumefaciens* C58 cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005,71(8): 4427-4436
- [15] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, et al. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39(3): 175-181
- [16] Pook S, Leach R, Moir W, et al. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c reductase of *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 277: 23664-23669
- [17] Mark SC, Alahari A. Localization of the cytochrome cd₁ and copper nitrite reductase in denitrifying bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172 (5): 2558-2562