

植物乳杆菌在自制培养基中降解亚硝酸盐的研究

陈中, 林浩, 林伟锋

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 观察植物乳杆菌 *LP-L134-1-P* (简称 LP) 在自制培养基中生长及降解亚硝酸盐状况, 结果发现: 空白培养液中 LP 几乎不降解亚硝酸盐; 在只添加 3% 碳源 (葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉) 的培养液中 LP 不能正常生长、产酸, 72 h 后对亚硝酸盐的降解率只有 6.70% 左右; 在添加 3% 葡萄糖和 2% 氮源的培养液中: 酵母抽提物培养液、酶解的大豆分离蛋白培养液、未酶解的大豆分离蛋白培养液在 72 h 后 pH 分别为 3.84、3.89、4.64, 对亚硝酸盐的降解率为 96.44%、96.27%、36.44%。而硝酸铵培养液 pH 仅为 5.27, 亚硝酸盐降解率为 8.34%。调节乳酸溶液 pH 为 5 或以上时亚硝酸盐降解效果不明显, pH 为 4 和 3 时降解率分别达到 31.33%、87.30%。总之, LP 在培养液中产酸达到 pH 为 4 或以下时酸降解作用才比较强烈, 此时酶降解效果也能显著增强。LP 在碳源和有机氮源的培养液中生长产酸较好, 营养条件已足够供给 LP 达到清除亚硝酸盐的目的。

关键词: 植物乳杆菌; 自制培养基; 亚硝酸盐; 降解

文章编号: 1673-9078(2014)3-53-57

Effects of Simplified Defined Medium on Nitrite Degradation by

Lactobacillus plantarum

CHEN Zhong, LIN Hao, LIN Wei-feng

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* L134-1-P (LP) was investigated in the simplified defined mediums to understand its nutritional requirements and trying to find out nitrite degradation mechanism. It was found that nitrite was barely degraded by LP in blank control. Growth and nitrite reduction activity were restrained in mediums with 3% carbon source (glucose, sucrose and corn starch), the final degradation rate was only 6.70% after 72 h. When adding 3% glucose and 2% nitrogen source, the pH of yeast extract medium, enzymatic and non-enzymatic hydrolysis isolated soy protein mediums were 3.84, 3.89 and 4.64 respectively, with nitrite degradation rate of 96.44%, 96.27% and 36.44 respectively, after 72 h. And the final pH and nitrite degradation rate of ammonium nitrate medium were only 5.27 and 8.34%. On that basis, pH of lactic acid solution was adjusted to 4 and 3, the degradation rates of nitrite were 31.33% and 81.30%, respectively. In short, the degradation course relied on enzymolysis and acid splitting when enough nutrition was offered. And acid splitting and enzymolysis could be reinforced when LP was afforded to ferment solution under pH of 4.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; simplified defined medium; nitrite; degradation

亚硝酸盐是一种强致癌性物质, 可诱发人体消化系统癌变, 人体摄入 0.2~0.5 g 即可引起食物中毒。此外, 亚硝酸盐可使细胞失去运输氧的能力引发组织缺氧性损害^[1-2]。亚硝酸盐在各类腌制食品中广泛存在, 在传统发酵食品 (酱腌菜等) 中的安全性也日益受到人们的关注。酱腌菜由于蔬菜本身的原因, 再加上在加工储藏时也会产生亚硝酸盐^[3]及污染有害微生物, 给产品带来了潜在的安全隐患。

收稿日期: 2013-09-26

作者简介: 陈中 (1968-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程、蛋白质化学与工程

通讯作者: 林伟锋 (1970-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程

目前, 国内外对乳酸菌降解亚硝酸盐方面有较深入研究: 张庆芳^[4]等人研究发现乳酸菌在发酵前期 (pH>4.5 时) 对亚硝酸盐的降解主要由酶降解为主, 发酵后期 (pH<4.5 时) 亚硝酸盐的降解主要以酸降解为主。乳酸杆菌产酸能力强于球菌, 故乳酸杆菌降解亚硝酸盐的能力大于乳酸球菌。龚刚明^[5]等对乳酸菌亚硝酸盐还原酶的酶学性质进行分析后发现, 亚硝酸盐还原酶^[6]的最适温度是 30 °C、最适 pH 5.5, 以亚硝酸钠为底物酶的 Km 值为 120.5 μg/mL。Hashimoto^[7]等人研究发现通过在加工过程中添加乳酸菌可以有效抑制酱腌菜中高浓度的亚硝酸盐积累。Jacob Gotterup^[8]等从发酵香肠、烟熏烤肠和腌肉中筛选出了 9 种可以发酵产生亚硝酸盐还原酶的 *Staphylococcus*,

研究发现其在 30 ℃、pH 为 7.0、转速为 150 r/min 的条件下进行厌氧发酵的最终亚硝酸盐还原酶的酶活达到 6~42 U。以上这些研究都认为乳酸菌有降解亚硝酸盐的能力,但探究乳酸菌降解亚硝酸盐和细菌所需营养源之间关系的报道较少。

本实验是在以往工作的基础上筛选出一株降解亚硝酸盐能力较强的植物乳杆菌 *LP-L134-1-P* (简称 LP),探究其在简单营养源中生长状况及降解亚硝酸盐的能力。通过对比不同营养成分下 LP 生长、降解亚硝酸盐的情况可以推断出 LP 发挥降解亚硝酸盐作用所需的最基本条件以及从营养源角度进一步分析乳酸菌降解亚硝酸盐的机制,建立一种简单快速降解亚硝酸盐的方法,为工业化生产提供理论和实践指导意义。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

菌种:植物乳杆菌 *LP-L134-1-P* (简称 LP),源于华南理工大学轻工与食品学院实验室。葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、大豆分离蛋白均来源于广州市冠丰食品有限公司;亚硝酸盐来自山东海澜化学工业有限公司;酵母抽提物来自山东烟台华海生物制品有限公司;蛋白胨、牛肉膏来自广东环凯微生物生物科技有限公司;磷酸氢二钾来自江苏强盛功能化学股份有限公司;柠檬酸二铵、乙酸钠来自广东光华科技股份有限公司;琼脂粉来自北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 培养液和培养基配方

1.2.1 空白培养液

200 g 去离子水, 0.03 g NaNO_2 。

1.2.2 只添加碳源培养液

葡萄糖培养液: 194 g 去离子水, 6 g 葡萄糖, 0.03 g NaNO_2 ; 蔗糖培养液: 194 g 去离子水, 6 g 蔗糖, 0.03 g NaNO_2 ; 玉米淀粉培养液: 194 g 去离子水, 6 g 糊化(有利于细胞吸收)的玉米淀粉, 0.03 g NaNO_2 。

1.2.3 葡萄糖和不同氮源培养液

酵母抽提物培养液: 190 g 去离子水, 6 g 葡萄糖, 4 g 酵母抽提物, 0.03 g NaNO_2 ; 硝酸铵培养液: 190 g 去离子水, 6 g 葡萄糖, 4 g 硝酸铵, 0.03 g NaNO_2 ; 未酶解的大豆分离蛋白培养液: 190 g 去离子水, 6 g 葡萄糖, 4 g 大豆分离蛋白, 0.03 g NaNO_2 ; 酶解后的大豆分离蛋白培养液: 190 g 去离子水, 6 g 葡萄糖, 0.03 g NaNO_2 , 4 g 酶解后的大豆分离蛋白(称取 4 g 大豆分离蛋白至烧杯中,加水搅拌溶解后在水浴锅中加热到 60~65 ℃,水化 20 min 后加入 1% Alcalase 碱

性蛋白酶,在 60 ℃下搅拌酶解 2 h 即可)。

1.2.4 乳酸菌计数培养基(MRS 固体培养基)

葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 8 g、酵母膏 4 g、磷酸氢二钾 2 g、柠檬酸氢二铵 2 g、乙酸钠 5 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.04 g、吐温-80 1 g、琼脂 15 g,加去离子水 1000 mL,调节 pH 至 6.2±0.2。

1.3 仪器与设备

pHS-25 数显 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司;电子秤,美国双杰电子天平公司;手提式高压灭菌锅,上海三申医疗器械有限公司;紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;水浴恒温振荡器,金坛市宏华仪器厂;超净工作台,苏州净化设备有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 不同碳源培养液中 LP 降解效果比较

配制好的空白培养液、葡萄糖培养液、蔗糖培养液、玉米淀粉培养液(NaNO_2 暂不加入)分别装入 4 个锥形瓶中,放入灭菌锅中高温灭菌。静置放凉后加入 NaNO_2 (提前在硅胶干燥器中干燥 24 h,紫外灯照射 30 min 灭菌)。LP 按 10^5 CFU/mL 的菌体浓度接种到各培养液中,37 ℃下培养 72 h。定时检测培养液中 pH、活菌数及亚硝酸盐含量。

1.4.2 葡萄糖和不同氮源培养液中 LP 降解效果比较

将配置好的四种不同氮源培养液装入锥形瓶中(NaNO_2 暂不加入),放入灭菌锅中高温灭菌。静置放凉后加入 NaNO_2 (提前在硅胶干燥器中干燥 24 h,紫外灯照射 30 min 灭菌)。LP 按 10^5 CFU/mL 的菌体浓度接种到各培养液中,37 ℃下培养 72 h。定时检测培养液中 pH、活菌数及亚硝酸盐含量。

1.4.3 乳酸降解亚硝酸盐的研究

在灭好菌的去离子水中加入 150 mg/L 的亚硝酸钠溶液,分别加入乳酸调节溶液的 pH 为 3、4、5、6 并设置空白组。将上述溶液置于 37 ℃恒温箱保存,定时检测各组溶液中亚硝酸盐浓度的变化。

1.5 测定方法

1.5.1 pH 的测定

pH 值的测定采用 PHS-25 型酸度计,样品重复测定 3 次并取其平均值。

1.5.2 活菌数的测定

活菌数测定采用平板计数法。

1.5.3 亚硝酸盐测定

采用 GB/T5009.33-2003 盐酸萘乙二胺分光光度计比色法, 样品重复测定 3 次取平均值。

1.6 数据分析

采用 Excel 软件对所测数据作统计分析处理, 求出其标准偏差, 并反映在散点图上。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源培养液中 LP 降解效果比较

本实验探究了 LP 在不同碳源培养液中培养 72 h 内 pH、活菌数、亚硝酸盐含量的变化, 结果分别如下图 1、2、3 所示。

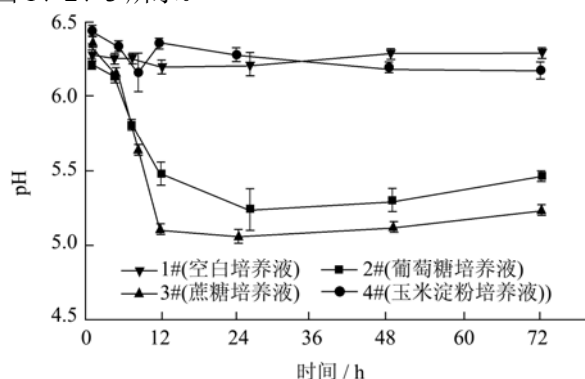


图 1 只添加碳源培养液中 pH 的变化

Fig.1 Changes of samples adding different carbon source in pH

从图 1 可以看出, 空白培养液、玉米淀粉培养液中的 pH 在培养过程中几乎没有变化, 培养 72 h 后 pH 仅为 6.20 左右。原因可能是 LP 没有相应吸收分解淀粉的淀粉酶系, 不能利用淀粉转化为乳酸。葡萄糖培养液、蔗糖培养液中 pH 从开始的 6.32 下降到 72 h 后的 5.46、5.24, 且在培养的前 12 h 内下降趋势较为明显。笔者之前研究发现 LP 在提供充足营养的条件下产酸能力很强, 本试验验证实在只提供碳源的营养条件下, LP 不能正常产酸。

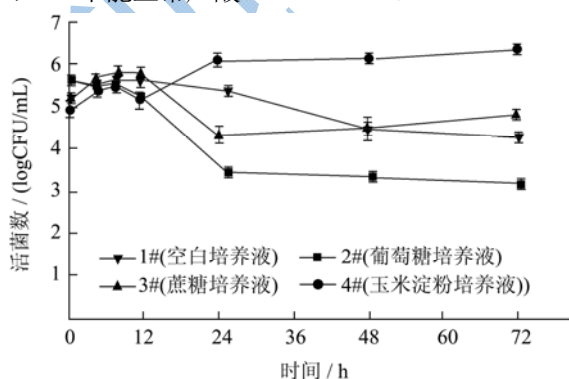


图 2 只添加碳源培养液中活菌数的变化

Fig.2 Changes of samples adding different carbon source in viable cell numbers

从图 2 可以看出, 空白培养液、蔗糖培养液、葡萄糖培养液中活菌数在培养的 72 h 内处于下降趋势, 玉米淀粉培养液中活菌数培养 72 h 后活菌数可增长到 2.32×10^6 CFU/mL。原因可能是玉米淀粉培养液中化学组成除了淀粉, 还包含少量的蛋白质、脂肪、生长因子等, 相较于化学纯度较高的葡萄糖、蔗糖培养液能为乳酸菌细胞提供更全面均衡的营养。另外结合图 1 可知, 葡萄糖培养液和蔗糖培养液在 12 h 左右培养液中的渗透压经历了较大程度的改变, 大幅度地改变渗透压必然导致微生物生长不利, 甚至死亡^[9], 故在 12~24 h 内 LP 的活菌数呈下降趋势。

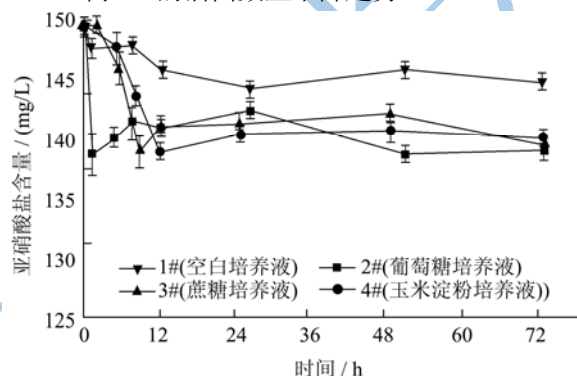


图 3 只添加碳源培养液中亚硝酸盐含量变化

Fig.3 Changes of samples adding different carbon source in nitrite content

从图 3 可以看出, 空白培养液中亚硝酸盐含量几乎没有变化, 碳源培养液中亚硝酸盐的降解量很低, 且亚硝酸盐的降解主要发生在培养的前 12 h 内。结合图 1、2 可知, 只提供碳源的情况下不能满足 LP 生长所必需的营养条件, 在前 12 h 内 LP 利用葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉等供其生长、产酸, 通过酸降解、酶降解的综合作用达到降解亚硝酸盐的目的。12 h 后营养物质消耗殆尽, 培养液中渗透压发生较大改变, 乳酸菌细胞生长、产酸速率急剧下降, 故亚硝酸盐含量保持稳定。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。

2.2 葡萄糖和不同氮源培养液中 LP 降解效果比较

比较

乳杆菌对碳源的利用情况如下: 葡萄糖>蔗糖>淀粉^[10], 而双糖(蔗糖)、多糖(玉米淀粉)等需在乳酸菌细胞中水解为单糖才能被细胞吸收。故在下一步试验中选择葡萄糖作为碳源, 在不同氮源培养液中测定 72 h 内 pH、活菌数、亚硝酸盐含量的变化, 结果如下图 4、5、6 所示。

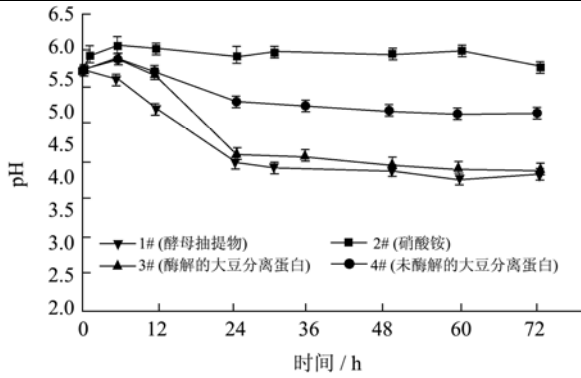


图4 添加葡萄糖及不同氮源培养液中 pH 的变化

Fig.4 Changes of samples adding glucose and different nitrogen source in pH

从图4可以看出,硝酸铵培养液中pH在培养过程中保持在5.50左右,并无明显的变化,说明硝酸铵不能作为无机氮源提供LP菌体的生长。酵母抽提物培养液、酶解后的大豆分离蛋白培养液中pH下降趋势最为明显,培养72h后均能降至3.80左右。未酶解的大豆分离蛋白培养液中pH下降速率相对较慢,72h后降至4.62。三种有机氮源培养液在前24h内pH的下降幅度很大,24h后pH渐趋平缓,说明培养24h后培养液中的营养物质几乎被吸收殆尽。从pH的下降幅度来看,LP直接利用大豆分离蛋白的效率较低,而酵母抽提物、经酶解后的大豆分离蛋白含有较易被细胞吸收的氨基酸、多肽等物质,故能显著促进细胞生长产酸。

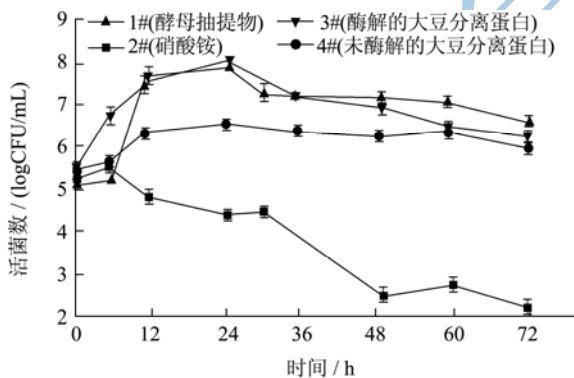


图5 添加葡萄糖及不同氮源培养液中活菌数的变化

Fig.5 Changes of samples adding glucose and different nitrogen source in viable cell numbers

由图5可以看出,72h内硝酸铵培养液中活菌数一直呈下降趋势,72h后活菌数仅为 2.2×10^2 CFU/mL。原因如下:其一,LP不能利用硝酸铵作为氮源提供其生长;其二,当培养体系中无机盐的浓度超过某一临界值时乳酸菌会为抵抗高盐浓度形成离子梯度,必然导致菌体生长受抑制。培养液中硝酸铵浓度过高,无机盐浓度过高会对乳酸菌细胞造成毒害作用。而有机氮源培养液中活菌数的变化趋势均为先增加然后保持

稳定甚至下降,其中酵母抽提物组、酶解的大豆分离蛋白组LP生长状况良好,在培养的72h内菌体最高浓度均可达 10^8 CFU/mL。未酶解的大豆分离蛋白培养液中活菌数最高可达 2.19×10^6 CFU/mL,说明大豆分离蛋白的酶解物对LP的增殖有显著的促进作用。

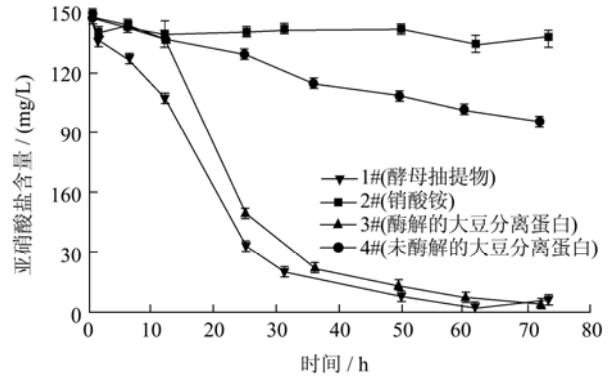


图6 添加葡萄糖及不同氮源培养液中亚硝酸盐含量变化

Fig.6 Changes of samples adding glucose and different nitrogen source in nitrite content

从图6可以看出,硝酸铵培养液中LP对亚硝酸盐的降解效果很差,培养72h后亚硝酸盐含量仅由150.00 mg/L下降到137.49 mg/L。硝酸铵培养液中pH并无明显的变化,且活菌数在培养过程中一直呈下降趋势,故LP对亚硝酸盐的酸降解、酶降解作用较弱,亚硝酸盐含量变化很小。酵母抽提物培养液中亚硝酸盐下降速率最快,在培养的前24h内下降幅度最大(与培养液中pH的变化规律一致),培养72h后亚硝酸盐含量降至5.30 mg/L。酶解后的大豆分离蛋白培养液中亚硝酸盐降解速率仅次于酵母抽提物组,培养72h也能达到4.40 mg/L的极低水平。未酶解的大豆蛋白培养液中亚硝酸盐含量呈稳步下降趋势,72h后亚硝酸盐含量下降至95.36 mg/L。结合图4、5、6可知,酶解后的大豆分离蛋白相较于未酶解的大豆分离蛋白能够显著促进LP产酸、对LP菌体的增殖作用也非常明显(活菌数上升一个数量级)。

2.3 乳酸降解亚硝酸盐的研究

从图7可以看出,乳酸溶液中pH随着时间的延长亚硝酸盐含量均会出现不同程度的下降,空白对照组则基本保持不变。乳酸溶液pH越低,亚硝酸盐含量下降的趋势也越明显。原因是乳酸可通过与亚硝酸盐发生歧化反应达到去除亚硝酸盐的目的。当调节乳酸溶液初始pH在5或以上时,亚硝酸盐含量在24h内下降不足20 mg/L,降解效果不明显。乳酸溶液初始pH调节为4时,放置24h后亚硝酸盐含量可下降至68.67 mg/L。乳酸溶液初始pH为3时亚硝酸盐含量下降速率很快,放置10h后即可达到18.68 mg/L,

24 h 后的亚硝酸盐降解率可达到 87.3%。

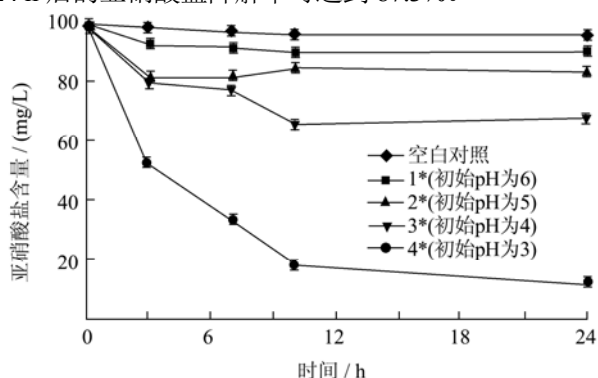


图7 不同 pH 乳酸溶液降解亚硝酸盐能力比较

Fig.7 Variation trend of nitrite degradation in lactic acid solution with different pH

综合 LP 在简单培养基中降解亚硝酸盐数据可知：培养液中 pH 在 5 以上时，乳酸浓度偏低导致对亚硝酸盐的酸降解作用较弱，此时 LP 的酶降解作用也很弱，亚硝酸盐降解作用不明显。供给 LP 的营养物质能促使 LP 产酸使培养液 pH 降至 4 或以下时酸降解作用较强，此时酶降解作用也会显著增强，最终达到对亚硝酸盐的清除作用。

3 结论

3.1 LP 在只提供碳源的情况下生长、产酸均受到抑制，亚硝酸盐降解率仅为 6.7%。LP 对不同碳源的利用情况为：单糖（葡萄糖）≈双糖（蔗糖）>多糖（玉米淀粉）。

3.2 LP 降解亚硝酸盐所必需的营养物质为碳源和有机氮源。酵母抽提物、酶解后的大豆分离蛋白培养液中亚硝酸盐降解率 72 h 后可达 96.44%、96.27%，未酶解的大豆分离蛋白培养液降解率仅为 36.44%，由此可知，LP 对氮源的利用情况为：酵母抽提物≈酶解后的大豆分离蛋白>未酶解的大豆分离蛋白>硝酸铵。

3.3 3%碳源和 2%有机氮源即可充分供给 LP 生长、产酸、降解亚硝酸盐效果良好。直接添加乳酸至溶液 pH 为 4 时 24 h 后亚硝酸盐降解率达 31.33%，pH 为 3 时降解率可达 87.3%，降解亚硝酸盐效果良好。

3.4 营养供给不足时 LP 生长、产酸受抑制；当培养液中营养物质足够供给 LP 产酸至 4 或以下时细胞生长、清除亚硝酸盐效果良好。

参考文献

[1] Li Ling, Wang Peng, Xu Xing-lian, et al. Influence of Various

Cooking Methods on the Concentrations of Volatile N-Nitrosamines and Biogenic Amines in Dry-Cured Sausages [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(5): 560-565

[2] Cockburn A, Brambilla G, Fernández M, et al. Nitrite in Feed: From Animal Health to Human Health [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 270(3): 209-217

[3] 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):63-65

Wu Hui, Liu Dong-mei, Yu Yi-gang, et al. Review on Nitrite in Pickles [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7): 63-65

[4] 张庆芳,迟乃玉,郑燕,等.乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J].食品与发酵工业,2002,8(28):27-31

Zhang Qing-fang, Chi Nai-yu, Zheng Yan, et al. The Study on Mechanism of Nitrite Degradation by Lactic Acid Bacteria [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 8(28): 27-31

[5] 龚刚明,吕玉涛,管世敏,等.乳酸菌亚硝酸盐还原酶制备及酶学性质[J].中国酿造,2011,1:58-60

Gong Gang-ming, Lv Yu-tao, Guan Shi-min, et al. Preparation and Properties of Nitrite Reductase from *Lactobacillus* [J]. China Brewing, 2011, 1: 58-60

[6] Atkins P, Overton T, Rourke, et al. Inorganic Chemistry 4th and Karen Biological Inorganic Chemistry [M]. New York; W.H.Freeman & Company, 2006

[7] Hashimoto T. The cause on the abnormal accumulation of nitrite in pickles of Chinese cabbage(*Brassica pekinensis* Rupr) [J]. Journal of the Japanese society for Food Science and Technology, 2001, 48(6): 409-415

[8] Jacob Götterup, Karsten Olsen, Susanne Knöchel, et al. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(3): 303-310

[9] 卜永士,郭本恒.一株干酪乳杆菌的生物学特性研究[J].乳业科学与技术,2004,2:49-51

Bu Yong-shi, Guo Ben-heng. Studies on the Biological Properties of *Lactobacillus casei* [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2004, 2: 49-51

[10] 张刚.乳酸细菌—基础、技术和应用[M].化学工业出版社,2007

Zhang Gang. Lactic Acid Bacteria [M]. Chemical Industry Press, 2007