

# 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 去除亚硝酸盐的研究

张庆芳<sup>1,2</sup> 迟乃玉<sup>2</sup> 郑学仿<sup>2</sup> 袁玉莲<sup>2</sup> 孟宪军<sup>3</sup>

(大连大学生命科学工作室 大连 116622)<sup>1</sup> (大连大学生物工程学院 大连 116622)<sup>2</sup>

(沈阳农业大学食品学院 沈阳 116622)<sup>3</sup>

**摘要:** 短乳杆菌有较强去除亚硝酸盐能力, 亚硝酸盐含量在 250 mg/L 以内, 接种短乳杆菌 48 h 亚硝酸盐全部去除。短乳杆菌处理亚硝酸盐主要处于亚硝酸还原酶还原亚硝酸盐阶段。短乳杆菌去除亚硝酸盐的最适 pH 值为 5.0 ~ 6.0, 最适温度为 30℃; 在其它条件不变的情况下, 发酵初期 (10 ~ 26 h) 亚硝酸盐去除量随接种量的增加而增加, 最适接种量为 5%。亚硝酸盐含量在 200 mg/L 以内, 短乳杆菌对亚硝酸盐的去除量与底物浓度有极显著的线性关系。

**关键词:** 短乳杆菌, 亚硝酸盐, 去除处理

**中图分类号:** TS255.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0055-06

## STUDY ON REMOVAL OF NITRITE BY *LACTOBACILLUS BREVIS*

ZHANG Qing-Fang<sup>1,2</sup> CHI Nai-Yu<sup>2</sup> ZHENG Xue-Fang<sup>2</sup> YUAN Yu-Lian MENG Xian-Jun<sup>3</sup>

(Life Sciences Workroom in Dalian University, Dalian 116622)<sup>1</sup>

(Bioengineering College of Dalian University, Dalian 116622)<sup>2</sup>

(School of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)<sup>3</sup>

**Abstract:** *Lactobacillus brevis* has very strong ability to remove nitrite. *Lactobacillus brevis* can transfer nitrite completely within 48 hours when the concentration of nitrite is lower than 250 mg/L, this course is finished by the nitrite reductase. During the course of *Lactobacillus brevis* transforming nitrite, optimal pH is 5.0 ~ 6.0; optimal temperature is 30℃; when other conditions are unchanged, the removing ability increases with the increasing of inoculation quantity in initial fermentation stages (10 ~ 26 h), and optimal inoculation quantity is 5%. The ability of removing nitrite for *Lactobacillus brevis* is linearized with substrate concentration remarkably when nitrite content is within 200 mg/L.

**Key words:** *Lactobacillus brevis*, Nitrite, Transformation

由于环境中硝酸盐、亚硝酸盐的大量富集及食品加工中添加化学合成的亚硝酸盐, 使农产品原料、水源、加工食品及饲料中有大量亚硝酸盐残留。亚硝酸盐是一种对人体有害的物质, 它不仅使人直接中毒、致死; 而且是致癌物亚硝胺的前体。近年来研究认为乳酸菌对亚硝酸盐有转化能力<sup>[1~4]</sup>。但目前关于去除亚硝酸盐乳酸菌株的选育及影响乳酸菌去除亚硝酸盐因素的研究还未见报道。本文报道了短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 转化亚硝酸盐的研究, 对于完善乳酸菌转化亚硝酸盐的作用机理, 为乳酸菌对人体的保健功能提供新的科学依据, 还将为消除食品、饲料、水体中亚硝酸残留等问题的研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

乳链球菌 (*Streptococcus lactic* 简写为  $S_1$ ), 赖氏乳杆菌 (*Lactobacillus leichmannii* 简写为  $L_1$ ), 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* 简写为  $L_P$ ), 乳脂链球菌 (*Streptococcus cremoris* 简写为  $Sc$ ), 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* 简写为  $L_c$ ), 嗜热乳链球菌 (*Streptococcus thermophilus* 简写为  $St$ ), 干酪乳杆菌鼠李糖亚种 (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 简写为  $L_K$ ), 干酪乳杆菌鼠李糖亚种突变株 (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 简写为  $L_n$ ), 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis* 简写为  $L_b$ ), 以上菌株由沈阳农业大学食品学院微生物实验室提供。

1.2 培养基

葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 2 g,  $KH_2PO_4$  2 g, 蒸馏水 1,000 mL, pH 7.0, 若为固体则加 1.5% 的琼脂粉。

1.3 试验方法

1.3.1 亚硝酸盐测定: 采用盐酸萘乙二胺法。

1.3.2 pH 值测定: 采用 pH B - 4 p 酸度计。

2 结果与分析

2.1 短乳杆菌对亚硝酸盐的转化能力

将  $S_1$ ,  $L_1$ ,  $L_b$ ,  $L_P$ ,  $Sc$ ,  $L_c$ ,  $S_1$ ,  $L_K$ ,  $L_n$  9 株乳酸菌活化后, 各转入 5 支液体管中, 30℃ 恒温培养 48 h, 测各管的  $OD_{620}$  值。取各菌株  $OD$  值一致的液体管, 按 3 % 接种量接入 125 mg/L 的亚硝酸盐培养液中, 于 30℃ 恒温培养, 定时测亚硝酸盐含量, 结果见表 1。

表 1 培养液中亚硝酸盐含量 (mg/L)

菌株	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
$S_1$	79.18	56.40	57.69	44.61	46.32	46.30
$L_1$	77.90	56.75	48.00	40.05	34.10	26.50
$L_b$	70.31	17.24	8.80	0.00	0.00	0.00
$L_P$	105.64	52.61	51.46	33.18	23.09	19.32
$Sc$	79.17	80.40	79.63	56.41	56.00	50.49
$L_c$	95.59	44.60	34.11	25.73	21.87	0.39
$S_1$	102.68	85.92	80.00	64.36	53.54	51.80
$L_K$	88.79	64.81	61.45	34.55	22.69	15.11
$L_n$	48.78	34.92	31.60	18.90	15.09	10.11

由表 1 可看出, 含 125 mg/L 亚硝酸盐的培养液, 接种短乳杆菌 ( $L_n$ ) 48 h, 亚硝酸盐全部被转化。与其他菌株相比, 短乳杆菌有较强的去除亚硝酸盐能力。

2.2 短乳杆菌去除亚硝酸盐的时间

将活化 24 h 的菌液以 3 % 的接种量分别接入含亚硝酸盐为 50 mg/L、100 mg/L、250 mg/L 的培养液中, 这 3 个处理依次用 a1、a2、a3 代表。于 30℃ 恒温培养, 定时测定培

养液的 pH 值、亚硝酸盐, 结果见图 1。

由图 1 可看出, 短乳杆菌去除亚硝酸盐主要是在 8~36 h, 48 h 后亚硝酸盐全部转化。由图还可看出, 48 h 前培养液的 pH > 4.5。

2.3 影响短乳杆菌转化亚硝酸盐因素的研究

2.3.1 pH 对短乳杆菌去除亚硝酸盐的影响: 配制 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 的缓冲培养液各 400 mL, 各等分成两份, 灭菌。将灭菌后的培养液加入等量除菌的亚硝酸盐。其中不同 pH 培养液中的一份按 3 % 的接种量接入菌液, 然后将全部培养液置于 30℃ 恒温培养, 12 h 测定亚硝酸盐。用接种的培养液亚硝酸盐去除量, 减去不接种的同一 pH 值培养液亚硝酸盐的去除量 (酸本身对亚硝酸盐有化学转化作用<sup>[1]</sup>), 结果见图 2。对图中亚硝酸盐去除量进行差异显著性多重比较, 由表 2 可知, 培养液 pH 值为 6.0、5.5、5.0 的亚硝酸盐去除量极显著地高于其它 pH 值下亚硝酸盐的去除量, 而这 3 个处理间没有差异。说明短乳杆菌去除亚硝酸盐的最适 pH 为 5.0~6.0。

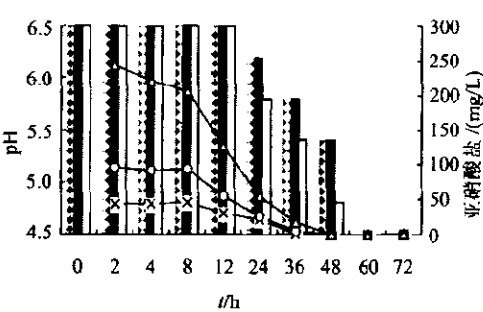


图 1 亚硝酸盐与 pH 值变化曲线

—○— (a1) pH, — (a2) pH,  
□ (a3) pH, —x— (a1) 亚硝酸盐,  
—○— (a2) 亚硝酸盐, —△— (a3) 亚硝酸盐

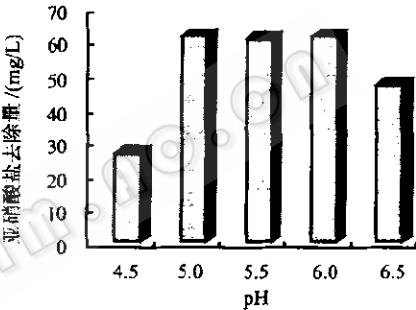


图 2 不同 pH 值下亚硝酸盐去除量

表 2 处理间差异显著性比较

pH	平均数 $\bar{x}$	差 异 显 著 性			
		$\bar{x}$ -26.26	$\bar{x}$ -46.84	$\bar{x}$ -60.40	$\bar{x}$ -61.42
6.0	61.51	35.25**	14.67**	1.11	0.09
5.0	61.42	35.16**	14.58**	1.02	
5.5	60.40	34.14**	13.56**		
6.5	46.84	20.58**			
4.5	26.26				

注: \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著

2.3.2 温度对短乳杆菌去除亚硝酸盐的影响: 配制 pH 值为 6.0 的培养液, 加入一定量的亚硝酸盐, 均分成 5 份, 每份 200 mL。灭菌后按 3 % 接种量接入菌液, 分别置于 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 温度条件下恒温培养, 于 12 h、36 h 测亚硝酸盐, 结果见图 3。从图 3 可看出, 不论是在 12 h, 还是 36 h, 不同温度间亚硝酸盐去除量有差异。进一步进行差异显著性多重比较, 见表 3, 4。可知, 不论是 12 h, 还是 36 h, 30℃ 亚硝酸盐的去除量都极显著地高于其它温度亚硝酸盐的去除量。说明 30℃ 是短乳杆菌去除亚硝酸盐的最适温度。

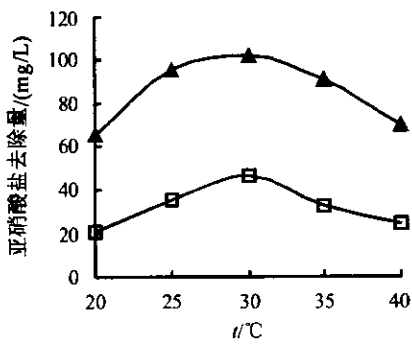


图3 不同温度下亚硝酸盐去除量  
□-12h, ▲-36h

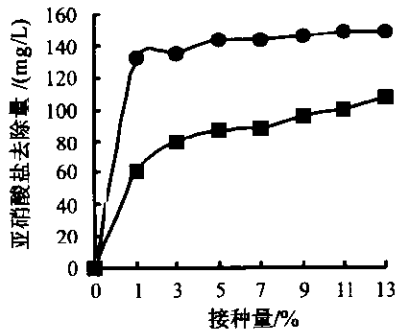


图4 接种量对亚硝酸盐去除量的影响  
■-10h, ●-26h

表3 12h处理间差异显著性比较

温度 (°C)	平均数 $\bar{x}$	差 异 显 著 性			
		$\bar{x}$ -20.54	$\bar{x}$ -24.54	$\bar{x}$ -32.55	$\bar{x}$ -35.02
30	46.45	25.91**	21.91**	13.90**	11.43**
25	35.02	14.48**	10.48**	2.47**	
35	32.55	12.01**	8.01**		
40	24.54	4.0**			
20	20.54				

注: \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著

表4 36h处理间差异显著性比较

温度 (°C)	平均数 $\bar{x}$	差 异 显 著 性			
		$\bar{x}$ -65.40	$\bar{x}$ -69.61	$\bar{x}$ -91.10	$\bar{x}$ -91.52
30	102.26	36.86**	32.65**	11.16**	6.74**
25	95.52	30.12**	25.91**	4.42**	
35	91.10	21.49**	21.49**		
40	69.61	4.21**			
20	65.40				

注: \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著

2.3.3 接种量对短乳杆菌去除亚硝酸盐的影响: 配制 pH 值为 6.0 的培养液, 加入一定量的亚硝酸盐, 均分成 8 份, 每份 200 mL。灭菌后分别按 1%、3%、5%、7%、9%、11%、13% 的比例接入菌液, 于 30℃ 恒温培养。于 10 h、26 h 测定亚硝酸盐, 结果见图 4。由图 4 可知, 在 10 h 随着接种量增加, 亚硝酸盐去除量在增加, 极差 R=45.78; 在 26 h 随着接种量增加, 亚硝酸盐去除量也在增加, 极差 R=16.55。对亚硝酸盐的去除量进行差异显著性多重比较, 见表 5, 6。可知, 在 10 h, 只有 5% 与 7%, 9% 与 11% 接种量间亚硝酸盐去除量差异不显著, 其它处理间差异都极显著; 在 26 h, 接种量 1% 与 3% 之间亚硝酸盐去除量差异不显著, 接种量 5%、7%、9%、11%、13% 之间亚硝酸盐去除量差异不显著, 但在接种量 5%~13% 与 1%~3% 之间亚硝酸盐的去除量有极显著的差异。通过以上分析可认为: 如果在短时间 (10 h 左右) 内使亚硝酸盐快速去

除, 可以通过增加接种量来实现; 如果接种后培养时间较长 (26 h 左右), 5% 接种量就可以实现亚硝酸盐大量去除。

表 5 10h 处理间差异显著性比较

接种量 (%)	平均数 $\bar{x}$	差 异 显 著 性					
		$\bar{x}$ -60.94	$\bar{x}$ -78.95	$\bar{x}$ -86.85	$\bar{x}$ -88.66	$\bar{x}$ -95.33	$\bar{x}$ -99.03
13	106.72	45.78**	27.77**	19.87**			
11	99.03	38.09**	20.08**	12.18**	18.06**	11.39**	7.72**
9	95.33	34.39**	16.38**	8.48**	10.37**	3.70	
7	88.66	27.72**	9.71**	1.81	6.67**		
5	86.85	25.91**	7.9**				
3	78.95	18.01**					
1	60.94						

注: \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著

表 6 26h 处理间差异显著性比较

接种量 (%)	平均数 $\bar{x}$	差 异 显 著 性					
		$\bar{x}$ -131.78	$\bar{x}$ -134.92	$\bar{x}$ -143.18	$\bar{x}$ -143.94	$\bar{x}$ -146.30	$\bar{x}$ -148.33
13	148.33	16.55**	13.41**	5.15	4.39	2.03	
11	148.33	16.55**	13.41**	5.15	4.39	2.03	0
9	146.30	42.52**	11.38**	3.12	2.36		
7	143.94	12.16**	9.02**	0.76			
5	143.18	11.40**	8.26**				
3	134.92	3.14					
1	131.78						

注: \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著

2.3.4 底物浓度对短乳杆菌去除亚硝酸盐的影响: 配制 pH 值为 6.0 的培养液, 分装 8 个三角瓶中, 每份 200 m L, 分别按 25 mg/L、50 mg/L、75 mg/L、100 mg/L、125 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 的量加入亚硝酸盐。按 3% 的接种量接入菌液, 在 30℃ 恒温培养,

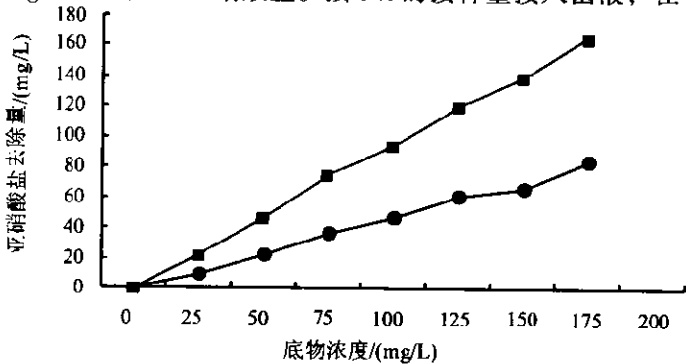


图 5 不同底物浓度亚硝酸盐去除量

在 32 h 底物浓度为 25 mg/L, 其亚硝酸盐全部分解, 在计算相关性时, 这一点未考虑

● 10h, ■ 32h

于 10 h, 32 h 测定亚硝酸盐 (图 5)。对亚硝酸盐去除量与底物浓度作相关性分析, 不论是在 10 h ( $r=0.9978$ ,  $r_{0.05}=0.7067$ ,  $r_{0.01}=0.8343$ ), 还是在 32 h ( $r=0.9970$ ,  $r_{0.05}=0.7545$ ,  $r_{0.01}=0.8745$ ), 亚硝酸盐的去除量与底物浓度有极显著的线性关系。

### 3 讨论

前期研究推导出, 乳酸菌对亚硝酸盐的转化分为酶转化和酸转化 2 个阶段<sup>[1]</sup>。在发酵的前期, 培养液 pH>4.5 时, 这期间乳酸菌对亚硝酸盐去除以酶去除为主; 在发酵后期, 由于乳酸菌本身产生酸, 使培养液 pH 值降低, 当 pH<4.0 后, 亚硝酸盐的去除主要以酸转化为主。由本研究可知 (图 1), 接种短乳杆菌去除亚硝酸盐的过程中, 培养液的 pH>4.5; 进一步研究 pH、温度、接种量、底物浓度与短乳杆菌去除亚硝酸盐量的关系, 可以看出基本符合酶反应的特性。因此说, 短乳杆菌去除亚硝酸盐主要处于亚硝酸还原酶去除亚硝酸盐阶段。

短乳杆菌去除亚硝酸盐能力强的原因可能有 2 点: (1) 由研究可知, 在发酵初期 (12h) 接种的 9 株乳酸菌培养液的 (培养液中含亚硝酸盐初始浓度 125 mg/L) pH 值都大于 4.5, 短乳杆菌对亚硝酸盐的转化量比较大 (见表 1), 有可能是短乳杆菌的产酶量较大。(2) 由于短乳杆菌产酸能力较差, 加之酶还原亚硝酸盐产生氨的中和作用 ( $\text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{亚硝酸还原酶}} \text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ ,  $\text{OH}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ), 使发酵液的 pH 值一直处于很高水平 (pH>4.5), 从而使处理中的亚硝酸盐一直处于酶转化阶段; 由研究可知<sup>[1]</sup>, 相同时间内乳酸菌在酶转化亚硝酸阶段对亚硝酸盐的去除量较大。因此接种短乳杆菌的发酵液中亚硝酸盐会快速、大量被去除。

**致谢** 本研究得到沈阳农业大学食品学院薛景珍教授的大力支持, 特此致谢。

### 参考文献

- [1] 张庆芳, 迟乃玉, 郑 艳, 等. 食品与发酵工业, 2002, 28 (8): 27~31.
- [2] 郭晓红, 杨洁彬, 张建军. 食品与发酵工业, 1989, 4: 26~34.
- [3] 杨洁彬, 郭兴华, 傅晓丽, 等. 乳酸菌——生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 4: 154~160.