

腌制酸菜中亚硝酸盐降解菌的筛选 及其降解特性研究

高小鹏, 苏青, 程同培

(延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000)

摘要:通过划线分离、格里斯试剂比色法、紫外分光光度法测定,从陕北地区的酸菜水中筛选得到11株亚硝酸盐降解菌,经过测定,菌株SQ-4可以高效降解亚硝酸盐,降解率可达97.60%。通过检测硝酸盐和V_C含量可知,该菌株并未通过代谢活动将亚硝酸盐转化为硝酸盐,同时产生了一定量的V_C。

关键词:亚硝酸盐,降解,菌株,V_C

Study on isolation of one bacterial strain capable of nitrite degeneration from traditional pickled vegetable and its characteristics

GAO Xiao-peng, SU Qing, CHENG Tong-pei

(College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: Eleven strains which could degradate nitrite were isolated from sour pickled cabbage water from northern region of Shaanxi. The degradation rate of strain SQ-4 was 97.60%, after detection, result showed the nitrite couldn't be oxidated to nitrate by strain SQ-4 and produced Vitamin C in the process.

Key words: nitrite; degradation; stains; Vitamin C

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)01-0198-03

有研究表明,长期食用自制酸菜会导致食道癌和胃癌的发生,其原因主要是酸菜腌制过程中产生大量的亚硝酸盐,使酸菜中的亚硝酸盐含量超标^[1],过量的亚硝酸盐能够与胃内食物中的仲胺类物质相互作用,转化为亚硝胺而引发癌症^[2],更为严重的是,食入0.3~0.5g亚硝酸盐即可引起中毒甚至死亡^[3-5]。陕北地区人民有常年食用自制酸菜的习俗,本实验从陕北地区长期腌制酸菜的酸菜水中筛选出可以降解亚硝酸盐的菌株,对酸菜中的亚硝酸盐进行降解,并对实验菌株改变酸菜的风味、提高营养进行了探讨,以期减少该地区因长期食用自制酸菜而引发的食道癌和胃癌的发生和生产腌制食品中降低亚硝酸盐含量的研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试水样 延安宝塔区、榆林佳县等地腌制酸菜的酸菜水;培养基 筛选培养基^[6]、LB培养基^[7];对氨基苯磺酸、N-1-萘基乙二胺、2,6-二氯酚靛酚、Ag₂SO₄ 均为分析纯。

隔水式电热恒温培养箱 PYX-DHS-40*50-BS,上海跃进医疗器械厂;紫外分光光度计 UVmini-1240,日本岛津;立式压力蒸汽灭菌锅 LS-B50L,江阴滨江医疗仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 亚硝酸盐降解菌的筛选

1.2.1.1 初筛 无菌操作将取得的酸菜水水样在筛选培养基平板上划线分离,挑取单菌落,多次重复,将纯化得到的菌株于(4±1)℃冰箱保存备用。

1.2.1.2 复筛 将初筛得到的菌株利用格里斯试剂比色法^[8]检测菌株对亚硝酸盐的降解情况,选择降解率较高的菌株作为下一步的实验菌株。

1.2.2 实验菌株降解亚硝酸盐能力的检测

1.2.2.1 亚硝酸盐标准曲线的绘制 参照文献^[6]。

1.2.2.2 培养液中亚硝酸盐含量的测定 取20mg/mL NaNO₂溶液1mL加入到100mL筛选培养基中(培养液中NaNO₂浓度为200mg/L),各实验组加入复筛得到的菌株培养液5%,另取一组不加菌液作为空白对照,(35±1)℃静置培养7d,每隔24h各取适量培养液,8000r/min离心15min,取一定量上清,按白雪娟等^[9]的方法,测定各样品的OD₅₅₀,根据1.2.2.1绘制的NaNO₂标准曲线可计算出各组样品中NaNO₂的残留量。

1.2.2.3 亚硝酸盐降解率的测定 根据以下公式可计算出不同实验菌株对NaNO₂的降解率:

$$\text{NaNO}_2\text{的降解率}(\%) = (X_0 - X_1) / X_0 \times 100\%$$

式中: X₀—不同培养时刻空白组样品中NaNO₂含量; X₁—不同培养时刻实验组样品中NaNO₂残留量。

根据各实验菌株不同培养时刻的降解率,选出降解率最高的一株为本研究的目的菌株,同时,绘制目的菌株对亚硝酸盐的降解曲线。

收稿日期: 2011-01-14

作者简介: 高小鹏(1976-),男,讲师,研究方向:资源与环境微生物学。

1.2.3 亚硝酸盐去向的研究 培养液中的亚硝酸盐减少后,可能被实验菌株吸收利用,也可能被氧化为硝酸盐,为了得知亚硝酸盐的去向,在培养不同时刻测定亚硝酸盐的同时,还需测定培养液中硝酸盐的含量。

取1.2.2.2中第一步得到的滤液10mL,采用锌粒还原法^[9]测定培养液中硝酸盐含量,根据 NaNO_2 标准曲线计算滤液中还原后 NaNO_2 总含量,根据以下公式计算滤液中 NaNO_3 含量:

$$X = (X_B - X_A) \times 1.232$$

式中: X_A —不同培养时刻样品中 NaNO_2 含量;
 X_B —不同培养时刻样品中经还原后 NaNO_2 总含量;
 X —试样中 NaNO_3 含量。

以时间为横坐标,以 NaNO_3 含量为纵坐标,绘制培养液中 NaNO_3 含量变化曲线。

1.2.4 实验菌株降解亚硝酸盐产生维生素C的研究 实验菌株不仅要降低酸菜水中亚硝酸盐的含量,还要能增加酸菜的营养,主要研究了酸菜水中维生素C的变化情况,维生素C含量测定采用2,6-二氯酚靛酚滴定法^[10],以时间为横坐标、以维生素C含量为纵坐标,绘制不同培养时刻维生素C的含量曲线。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐降解菌的筛选结果

将取得的酸菜水水样在筛选培养基固体平板上多次划线分离后,得到22株菌,利用格里斯试剂比色法^[8]初步筛选出具有降解亚硝酸盐能力的实验菌株11株,分别编号为SQ-1、SQ-2、SQ-3、SQ-4、SQ-5、SQ-6、SQ-7、SQ-8、SQ-9、SQ-10、SQ-11。

2.2 实验菌株降解亚硝酸盐能力的测定结果

2.2.1 亚硝酸盐标准曲线的绘制 采用1.2.2.1的方法,绘制出的亚硝酸钠标准曲线如图1。

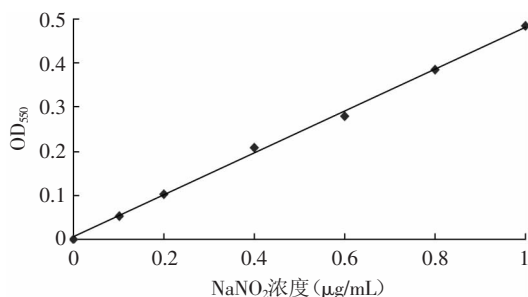


图1 NaNO_2 标准曲线
Fig.1 Standard curve of NaNO_2

由绘制所得的标准曲线方程为 $y=0.4772x+0.0052$,相关系数 $R^2=0.9984$,拟合度较好,可以用于后续实验中的样品测定。

2.2.2 实验菌株降解亚硝酸盐能力的测定结果 根据1.2.2.2和1.2.2.3的测定方法,各实验菌株培养7d时对 NaNO_2 的降解情况如图2。

由图2可知,11株实验菌株除SQ-7外,其他菌株都对 NaNO_2 有较高的降解率,其中SQ-4、SQ-5、SQ-9、SQ-10降解率都达到了80%以上,SQ-4降解率最高,达到了97.6%,因此,选择SQ-4作为此次研究的目的菌株,以培养时间为横坐标,以 OD_{550} 为纵坐标,绘制出菌株

SQ-4在不同培养时刻对 NaNO_2 降解曲线如图3。

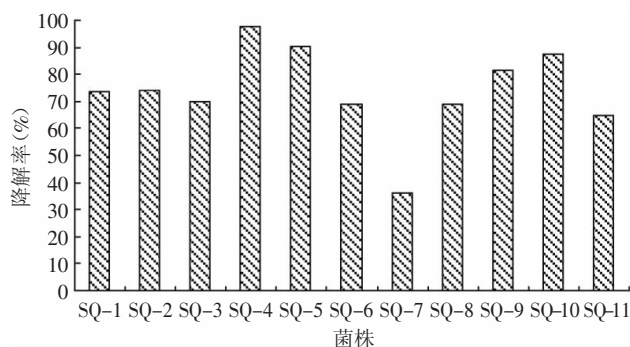


图2 各实验菌株对 NaNO_2 的降解率

Fig.2 The degradation rates of strains to NaNO_2

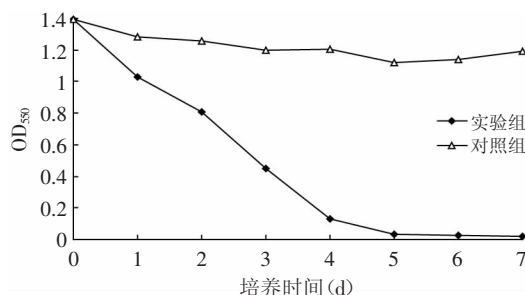


图3 菌株SQ-4对 NaNO_2 的降解曲线

Fig.3 Degradation curve of SQ-4 to NaNO_2

由图3可知,在开始0~5d,培养液中 NaNO_2 含量急剧降低,第5d后趋于平缓,并且在第7d NaNO_2 几乎全部消失,其降解率可达97.60%;而未加菌的对照组 NaNO_2 含量略有下降,这可能是由于空气中的氧将部分 NaNO_2 氧化所致。

2.3 亚硝酸盐去向的研究结果

培养液中的 NaNO_2 含量明显降低,可能被实验菌株吸收利用,也可能被氧化为硝酸盐,经过测定,不同培养时刻培养液中 NaNO_2 和 NaNO_3 含量变化情况如图4。

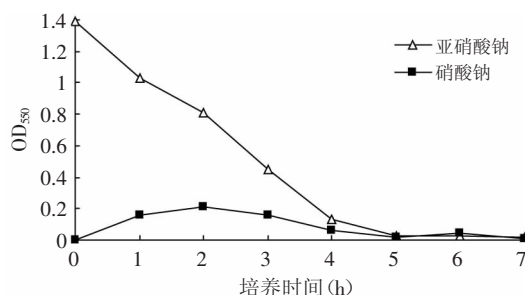


图4 NaNO_2 和 NaNO_3 含量变化曲线

Fig.4 The content change of NaNO_2 and NaNO_3

由图4可知,在培养过程中, NaNO_2 含量明显下降,而 NaNO_3 却没有明显变化,由此可知,减少的 NaNO_2 并没有被转化为 NaNO_3 ,可能转化为其他物质或是被SQ-4在生长过程中利用转化为自身的物质。

2.4 菌株SQ-4产维生素C的研究

采用2,6-二氯酚靛酚滴定法测定不同培养时刻培养液中的 V_c 的含量,以培养时间为横坐标,以 V_c 的

(下转第203页)

- [13] Enoki Y, Ohga Y, Ishidate H, et al. Primary structure of myoglobins from 31 species of birds[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008, 149: 11-21.
- [14] Joseph P, Suman S P, Li S, et al. Characterization of bison (*Bison bison*) myoglobin[J]. Meat Science, 2010, 84(1): 71-78.
- [15] 孙京新, 周光宏, 罗欣. 不同质量猪肉冷藏期间高铁肌红蛋白还原酶活性及相关特性变化研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 389-393.
- [16] 王伟, 汤宇, 金邦荃. 猪心肌高铁肌红蛋白还原酶米氏方程建立与动力学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 176-180.
- [17] Møller J K S, Jensen J S, Skibsted L H, et al. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture[J]. European Food Research and Technology, 2003, 216(6): 463-469.
- [18] Gündoğdu A K, Karahan A G, Çakmakç M L. Production of nitric oxide (NO) by lactic acid bacteria isolated from fermented products[J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(1): 35-38.
- [19] Gøtterup J, Olsen K, Knöchel S, 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(1): 303-310.
- [20] Polidori P, Cavallucci C, Beghelli D, et al. Physical and

- chemical characteristics of donkey meat from Martina Franca breed[J]. Meat Science, 2009, 82(4): 469-471.
- [21] James T Wu, Robert K Pleper, Lily H Wu, et al. Isolation and characterization of myoglobin and its two major isoforms from sheep heart[J]. Clinical Chemistry, 1989, 35(5): 778-782.
- [22] Millar S J, Moss B W, Stevenson M H. Some observations on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat[J]. Meat Science, 1996, 42(3): 277-288.
- [23] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [24] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [25] Krzywicki k. The determination of haem pigments in meat [J]. Meat Science, 1982, 7(1): 29-36.
- [26] Boardman N K, Adair G S. Isolation of two myoglobins from horse-heart extracts and the determination of the molecular weight of the main component[J]. Nature, 1956, 177(4519): 1078-1079.
- [27] Suman S P, Joseph P, Li S, et al. Primary structure of goat myoglobin[J]. Meat Science, 2009, 82(4): 456-460.
- [28] Motoyama M, Kobayashi M, Sasaki K, et al. *Pseudomonas* spp convert metmyoglobin into deoxymyoglobin[J]. Meat Science, 2010, 84(1): 202-207.

(上接第199页)

含量为纵坐标, 得到 V_c 含量变化情况如图5。

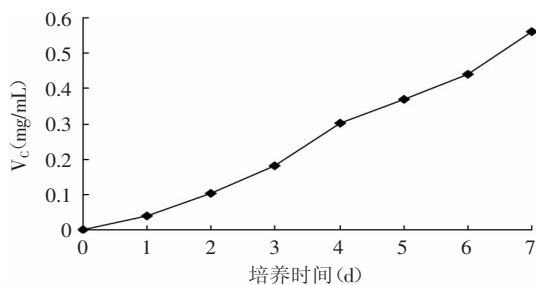


图5 SQ-4产 V_c 曲线

Fig.5 The content curve of V_c produced by SQ-4

由图5可知, 菌株SQ-4在利用 $NaNO_2$ 的过程中, 能够产生 V_c , 并且其含量随培养时间的延长而增加, 这有助于增加酸菜的营养, 改善酸菜的风味。

3 结论

3.1 本实验经过筛选得到11株对亚硝酸盐具有降解能力的菌株, 通过测定得知, 菌株SQ-4在培养0~5d时, 亚硝酸盐迅速下降, 7d时亚硝酸盐含量降至最低, 降解率高达97.60%。

3.2 通过还原法测定培养液中硝酸盐含量, 可知实验菌株在降低亚硝酸盐的过程中, 并没有将亚硝酸盐氧化为硝酸盐, 而是将亚硝酸盐吸收利用转化为菌体自身的物质或者转化为其他物质。

3.3 实验菌株在利用亚硝酸盐的过程中, 可以产生维

生素C, 而且维生素C的含量随培养时间的延长而增加, 由此可知, 菌株SQ-4不仅可以降低酸菜水中的亚硝酸盐, 而且还可以实现改善酸菜风味, 增加营养的功效。

参考文献

- [1] 卫生部. 卫生部关于2005年全国食物中毒事件报告情况的通报[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(3): 269.
- [2] 惠永倩. 强化学致癌物—N-亚硝基化合物[J]. 人民军医, 1982, 15(1): 25-27.
- [3] 丁之恩. 亚硝酸盐与亚硝胺在食品中的作用及其机理[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 19(2): 199-205.
- [4] 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): 63-64.
- [5] 朱效兵, 石晶红. 亚硝酸盐与人体健康[J]. 河套大学学报, 2007, 4(4): 67-68.
- [6] 夏岩石, 孙春风. 乳酸菌降解亚硝酸盐的动态研究[J]. 湖南科技学报, 2008, 29(8): 44.
- [7] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 372.
- [8] 白雪娟, 徐世众. 格里斯试剂比色法测定肉制品中亚硝酸盐含量[J]. 肉类工业, 2008(7): 46-47.
- [9] 肖义夫, 廖百森, 赵舰, 等. 铈粒还原法快速测定食品中的硝酸盐[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 316.
- [10] 王秀奇. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 195-199.