

肉制品中亚硝酸还原酶的应用进展

徐 龙^{1,2}, 梁蕊芳², 靳 烨^{1,*}

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018;

2. 包头轻工职业技术学院生物工程系, 内蒙古包头 010040)

摘 要: 亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NIR)是陆地上氮元素循环过程中降解亚硝酸盐的一个关键酶,能把亚硝酸盐还原生成NO或NH₄⁺。综述了国内外研究者从不同方面对NIR的研究,论述了NIR的组成结构、工作机理及反应特性,总结了产NIR菌株及NIR在肉制品中的应用,并对NIR的研究及应用进行了展望。

关键词: 亚硝酸还原酶, 脱硝细菌, 亚硝酸盐

Research progress in nitrite reductase in meat products

XU Long^{1,2}, LIANG Rui-fang², JIN Ye^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering of Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Bioengineering Department of Baotou Light Industry Vocational Technical College, Baotou 010040, China)

Abstract: Nitrite reductase (NIR) reduces nitrite to NO or NH₄⁺, this is a key step in the nitrogen cycle. The advances in study on NIR, including the structure, catalysis mechanism and the response characteristic were reviewed. Application of NIR and denitrifying bacteria in meat products were summarized. Application and research prospects of NIR in the future were also presented.

Key words: nitrite reductase; denitrifying bacteria; nitrite

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)03-0413-04

亚硝酸盐能够作为食品添加剂,在肉制品加工中被广泛使用,原因在于亚硝酸盐与肌红蛋白反应生成亚硝基肌红蛋白,使肉制品具有诱人的玫瑰红色泽;亚硝酸盐可以有效抑制肉毒梭状芽孢杆菌的繁殖,起到防腐作用;亚硝酸盐可以使肉制品具有弹性,口感良好,产生独特的风味,提高产品品质。世界卫生组织规定每日允许摄食量为亚硝酸钾或钠 $\leq 0.2\text{mg/kg}$ 体重,日本规定肉制品中亚硝酸根不得超过70ppm,我国要求肉制品成品中的亚硝酸含量 $\leq 30\text{mg/kg}$,最大添加量不能超过0.15g/kg。但是,亚硝酸盐残留对人有极大的危害,它能与各种氨基化合物反应,产生致癌的N-亚硝基化合物,如亚硝胺等^[1]。因此有人提出在肉制品中少加甚至不加入亚硝酸盐,为此,科学工作者们在降低亚硝酸盐的添加量与寻找有效的替代物方面正展开积极的研究。随着生物技术的发展,利用可产生亚硝酸盐还原酶降解亚硝酸盐的微生物或者其产生的亚硝酸盐还原酶来降低肉制品中亚硝酸盐含量^[2],已经成为一个新的研究方向。

1 亚硝酸还原酶概述

亚硝酸还原酶(nitrite reductase, 简称NIR)是陆地上氮元素循环过程中的一种酶,是一种降解亚硝

酸盐的关键酶。NIR分为两类,分别含有血红素cd₁和Cu作为辅基(相应简称为cd1NIR、CuNIR)。它们有异化亚硝酸还原酶或同化亚硝酸还原酶的作用,把亚硝酸盐还原生成NO或NH₄⁺。微生物的反硝化作用在全球氮循环过程中起着重要作用,特别是在环境净化方面有着举足轻重的作用。现在公认的反硝化过程分为4步,分别由不同的还原酶催化,其中NO₂⁻转变成NO由NIR所催化,其催化反应为: $\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$; 在一般田间条件下,NO₃⁻是植物吸收的主要形式,当NO₃⁻被细胞吸收后,细胞质中的硝酸还原酶就利用NADH供氢体将NO₃⁻还原为NO₂⁻,NO₂⁻被运到叶绿体,叶绿体内存在的NIR利用光合链提供的还原型Fd作电子供体将NO₂⁻还原为NH₄⁺^[3-6],其催化反应为: $\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ ($E^0 = +0.34\text{V}$)。

1996年Calmels S等通过对脱硝细菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的生物化学和免疫学研究,表明cd₁NIR是催化亚硝化反应生成NO的限速酶^[7]。Roger L等研究发现脱硝细菌(*Alcaligenes xylosoxidans*)能合成天青蛋白,天青蛋白能够在体外作为CuNIR的电子供体,在亚硝酸盐的环境下,标记天青蛋白的基因azuA增加^[8],可见在亚硝酸环境下CuNIR的电子供体增加,从而提高CuNIR降解亚硝酸盐的性能。然而,NIR并非都具有降解亚硝酸的功能,Pereira I.A.C等在不带硝酸盐的硫酸盐还原细菌(*Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*)中提取出NIR,通过电子顺磁共振(EPR)

收稿日期: 2010-09-19 * 通讯联系人

作者简介: 徐龙(1977-),男,博士,农艺师,研究方向:农产品加工与储藏工程。

发现 *D. vulgaris* Hildenborough 不具有用亚硝酸盐作为末端电子接受者的功能,表明NIR在该菌中与亚硝酸盐降解无关,不同于其他菌中提取出的NIR^[9]。

2 亚硝酸还原酶的结构

CuNIR的功能单位是同型三聚体,亚基分子量37ku^[10],共含有六个铜原子。铜原子又分为两类:类型I的铜(T_1Cu)被包埋在每个单体中,距分子表面约4Å,是电子传递中心;类型II的铜(T_2Cu)则被结合在两个单体之间,位于一个约12Å深的溶剂通道底部,是催化中心^[11]。来源于粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)的NIR的单体含有两个β螺旋结构域, T_1Cu 植入其中一个螺旋,由配体His 95、Cys 136、His 145和Met 150协同; T_2Cu 位于两个单体的接触面,由一个水分子和三个组氨酸协同。

cd_1 NIR是一个双功能团酶,催化亚硝酸盐减少一个电子生成NO,双氧减少四个电子生成水,是同型二聚体,亚基分子量为60ku,每个亚基包含一个血红素C和一个血红素d1,该酶位于细菌的周质中。1995年Fulop等和1997年Nurizzo等分别从副球菌属(*Paracoccus pantotrophus*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)测出NIR的高分辨率结构,两个来源的NIR的血红素C以共价键结合于N端α螺旋结构域,血红素d1以非共价键结合于C端β螺旋结构域^[12]。

3 亚硝酸还原酶的工作机理

酶的三维空间结构与其催化活性和调节作用紧密相关,而酶蛋白分子中与底物结合并起催化作用的区域,作为酶的活性中心,是酶起催化作用的关键部位。 $CuNIR$ 还原 NO_2^- 的步骤包括 NO_2^- 与酶的结合、还原反应、结合的中间产物脱水以及NO的释放和酶的重新形成。对于 $CuNIR$ 的催化机理,最近的模型认为 NO_2^- 结合到氧化形式的 T_2Cu 中心,取代一个可溶性分子并在 NO_2^- 的一个氧原子和Asp98残基间形成氢键。当电子从 T_1Cu 中心传递到 T_2Cu 中心后,该氢键的质子从Asp98残基转移到底物的氧原子上形成中间产物 $O=N-O-H$,该氧原子的N-O键随后断裂并形成产物NO,然后在活性中心被释放^[3]。

对于 cd_1 NIR工作机理的研究,则集中在电子供体方面。1978年Chippaux M等人发现,完整的*E.coli*细胞用葡萄糖或甲酸盐做电子供体,能够减少亚硝酸盐。在含有亚硝酸盐的环境中,细胞中含有少量的C型细胞色素 C_{552} ,当去除细胞色素 C_{552} 时,亚硝酸还原酶失去90%的活性,从而认为这种细胞色素能被亚硝酸盐重复氧化,来减少亚硝酸^[13]。但随着研究的深入,人们发现细胞色素C是作为酶的电子供体在起作用。如1995年Williams等人发现,互不相关的天青蛋白、假天青蛋白、细胞色素 C_{550} 和细胞色素 C_{551} 作为 cd_1 NIR的电子供体^[14]。2003年Person等人通过*Paracoccus denitrificans*的基因删除实验确定假天青蛋白和细胞色素 C_{550} 可在体外作 cd_1 NIR的电子供体^[15]。

2002年张庆芳等对乳酸菌降解亚硝酸盐机理进行了研究,认为乳酸菌对亚硝酸盐的降解分为酶降解和酸降解两个阶段。在发酵的前期,培养液pH>4.5时,乳酸菌对亚硝酸盐降解以酶降解为主;发酵后

期,由于乳酸菌本身产生酸,使培养液pH降低,pH<4.0后,亚硝酸盐的降解以酸降解为主^[16]。

4 亚硝酸还原酶的反应特性

到目前为止,国外对亚硝酸盐还原酶的分离纯化、基因的表达和调控,特别是植物亚硝酸还原酶基因的表达和调控、结构研究有诸多报道,并从多种微生物中分离纯化得到亚硝酸还原酶^[17-19]。由于大多数酶都是蛋白质,具有蛋白质的结构和生物学特性,因此,酶需要在适宜的温度、压力、酸碱等物理和化学条件下才具有催化活性。并且,酶的活性受到酶源活化、激活剂和抑制剂的作用、激素调节等各种方式的调节和控制。1970年Solov'ev VI等用超声破碎和高速离心从无色杆菌(*Achromobacter guttatus*)中分离获得亚硝酸还原酶,对该酶的酶学特性进行研究,发现该酶最适反应条件为pH7.4,30~40℃,还原型NADP和FAD增加酶活,主要反硝化产物为NO^[20]。1973年Pfeil E等研究微球菌活菌及粗酶的亚硝酸盐还原酶的活性,结果表明,亚硝酸盐还原酶的活性依赖于pH(适宜pH6.7)并需要NADH,酶活性在pH低于5时急速下降,表明该酶是严格pH依赖酶,并在低pH时抑制NADH合成^[21]。1978年,Eiko Sawada等人从红假单胞菌(*Rhodopseudomonas sphaeroides*)中分离出NIR,其亚硝酸盐耐受力为51μmol/L,最适pH为7.0,最适温度为30℃。该酶被CO、氰化钾和二乙基二硫氨基甲酸酯抑制,被甲碘醋酸盐活化^[22]。

NIR是一种诱导酶,是在环境中存在亚硝酸盐存在的情况下,诱导而生成的酶。1999年Neubauer H通过研究肉糖葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)中亚硝酸还原系统的分子特性表明,厌氧和亚硝酸盐是NIR的诱导因素,尽管检测到转录,但在亚硝酸盐存在时细胞在好氧条件下未表现出亚硝酸还原,表明在转录水平上存在额外氧控制步骤,亚硝酸还原酶在厌氧条件下表达,但在氧增加时快速消失,很有可能是由于在好氧呼吸链竞争了电子^[23]。然而,2007年Giovanni等研究发现,一种酵母*Debaryomyces hansenii* TOB-Y7能够在纯化学合成培养基中、在微需氧条件下利用亚硝酸盐作为唯一氮源,降解亚硝酸盐的能力伴随编码亚硝酸还原酶的YNI1基因表达,并且添加电子传递体NAD(P)H有助于亚硝酸还原酶的产生^[24]。可见,NIR的合成除取决于诱导物以外,还取决于细菌所处的环境和细胞内所含的基因。如果细胞内没有控制某种酶合成的基因和处于适合的环境,即便有诱导物存在也不能合成这种酶。因此,诱导酶的合成取决于内因和外因两个方面。诱导酶在微生物需要时合成,不需要时就停止合成。这样,既保证了代谢的需要,又避免了不必要的浪费,增强了微生物对环境的适应能力。

5 亚硝酸还原酶在肉制品中的应用

5.1 产亚硝酸还原酶菌株在肉制品中的应用

随着肉类加工技术的不断提高,微生物发酵肉制品的研究不断深入,乳酸菌在肉制品中的应用日益广泛。乳酸菌具有降解亚硝酸盐的特性,利用乳酸菌降解亚硝酸盐具有安全可靠、反应温和的优点。李春等通过对乳酸菌混合生长降解亚硝酸盐能力的研究得出,乳

酸菌高效降解亚硝酸盐能力是通过乳酸菌产亚硝酸盐还原酶的能力和产生乳酸能力共同影响的^[29]。在pH4.5以上以酶降解为主,在pH<4时以酸降解为主^[16]。

乳酸菌在肉制品中的应用主要是用于发酵香肠,随着人们对乳酸菌研究的不断深入,其在肉制品中的亚硝酸盐降解能力也成为研究的一个方面。2004年张庆芳等人的研究表明,短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)有较强去除亚硝酸盐的能力,亚硝酸盐含量在250mg/L以内,接种短乳杆菌48h亚硝酸盐全部去除。亚硝酸盐含量在200mg/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^[26]。2008年,李长青等利用乳酸菌发酵生产低硝牛肉香肠,其理化指标、微生物指标、感官指标等均优于传统的牛肉香肠,且香肠中亚硝酸盐的残留量低于传统牛肉香肠^[27]。蒋欣茵等从多种传统腌制蔬菜中分离到12株乳酸菌,最终筛选出1株能快速降解亚硝酸盐的植物乳杆菌J-10,该菌24h亚硝酸盐降解率为99.2%^[28]。夏岩石等研究了乳酸菌Lact.1对不同浓度亚硝酸盐的降解能力以及不同温度下乳酸菌Lact.1纯培养液降解亚硝酸盐的动态变化,结果表明,一定接种量的乳酸菌Lact.1纯培养液能有效降解亚硝酸盐,其降解亚硝酸盐的最佳浓度为320mg/kg,最适温度为37℃^[29]。王昌禄等从发酵初期的天津冬菜中分离到1株乳酸菌,初步鉴定其为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) W-58,该菌株对亚硝酸盐有明显的降解作用,通过研究温度和底物浓度与分离菌株去除亚硝酸盐量的关系,表明W-58菌株对亚硝酸盐的降解主要为产酶降解^[30]。2009年,龚钢明等通过测定乳酸菌其在MRS液体培养基中降解亚硝酸盐的能力,筛选出降解亚硝酸盐能力较高的菌株,对亚硝酸盐的最适耐受浓度为0~0.4g/L^[31]。

5.2 亚硝酸还原酶在肉制品中的应用

目前,酶在肉制品加工中主要用来嫩化肉类、增加持水力以及肉的重组。NIR在肉制品中降解亚硝酸盐降低其残留的研究,无疑是给酶在肉制品中的应用拓展了一个新领域。1970年Solov'ev VI等研究在香肠加工中应用亚硝酸还原酶降低亚硝酸盐残留,结果表明,应用亚硝酸还原酶在煮熟香肠中,亚硝酸盐残留降低至原来的30%~40%,但其结果依赖于亚硝酸还原酶酶学特性,因为该酶高于50℃后酶活完全损失,亚硝酸盐的残留不能完全控制^[20]。2007年Jacob Gotterup等人对腌肉中葡萄球菌的硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活性与亚硝基肌红蛋白($\text{MbFe}^{\text{II}}\text{NO}$)之间的关系进行了研究,结果表明,只具有硝酸还原酶活性的产生 $\text{MbFe}^{\text{II}}\text{NO}$,而亚硝酸还原酶与 $\text{MbFe}^{\text{II}}\text{NO}$ 的生成率并没有联系。但该研究没有研究亚硝酸还原酶与亚硝酸盐残留的关系^[3]。2006年Tamara V. Tikhonova等人从嗜盐碱硫氧化非氨化细菌中(*Thioalkalivibrio nitratireducens*)分离和提纯到电泳均一性高活性的NIR,该酶能催化减少亚硝酸和羟胺生成氨,而没有其他中间产物^[33]。2009年郑怀忠通过紫外线对巨大芽孢杆菌MPF-906进行了诱变处理,提高了产酶能力,并优化培养基条件使亚硝酸还原酶的酶活达到45.94U/mL;将其应用

在蒸煮香肠中测出亚硝酸残留量为15.84mg/kg,大大低于国标要求的<30mg/kg,与对照相比,降解了82.50%^[34]。虽然早在1970年就有NIR在肉制品中应用的研究,但到目前为止相关的研究非常有限,且仅局限于亚硝酸盐降解的研究,缺少酶对肉制品的质构、色泽、储存、营养变化及安全性等方面的研究。

6 展望

亚硝酸盐是一种重要的食品添加剂,但其过量使用会给人体带来很大危害,所以世界上许多国家呼吁严格控制亚硝酸或硝酸盐使用量,研究利用可降解亚硝酸盐的微生物或其产生的亚硝酸还原酶,采用生物处理的方法,来降低食品中亚硝酸盐含量,应是一个可行的研究方向。但是,国外对NIR在肉制品中应用的研究几乎没有,仅集中在能产生NIR的菌种在发酵香肠中的应用效果。国内的研究虽然涉及到了NIR在肉制品中的应用,但目前只研究到粗酶的应用效果,而对NIR的精酶的提取、NIR的晶体结构、NIR的固定化及其应用涉足不深,并缺少从分子水平对产NIR菌种和NIR降解亚硝酸盐机理的研究。可见,NIR对亚硝酸盐降解的研究还具有很大的空间和实际应用价值。

参考文献

- [1] 唐爱明,夏延斌. 肉制品中亚硝酸盐降解方法、机理及研究进展[J]. 食品与机械, 2004(2): 35-37.
- [2] 艳杨,赵春燕,孙君社. 降低肉制品中亚硝酸盐残留量的方法及研究进展[J]. 肉类工业, 2007(2): 24-27.
- [3] 胡朝松,李春强,廖文彬. 铜型亚硝酸还原酶的电子传递模式及催化机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1136-1142.
- [4] Iupac. Nitrite reductase[M]. Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bioinorg/MO.html>. 1997.
- [5] Iubmb. EC 1_7_2_1[Z]. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/7/2/1.html>. 2010.
- [6] 扬州大学. 植物生理学[Z]. <http://jpkc.yzu.edu.cn/course/zhwshl/ppebook/03z/ppe0304.html>. 2010.
- [7] Calmels S, Ohshima H, Henry Y, et al. Characterization of bacterial cytochrome cdt-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(3): 533-536.
- [8] Roger L, Harris, Robert R, et al. Coordinate synthesis of azurin I and copper nitrite reductase in *Alcaligenes xylosoxidans* during denitrification[J]. Arch Microbiol, 2006, 186: 241-249.
- [9] Pereira I A C, Legall J. Characterization of a heme c nitrite reductase from a non-ammonifying microorganism, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough[M]. 2000: 119-130.
- [10] Stirpe A, Guzzi R, Wijma H, et al. Calorimetric and spectroscopic investigations of the thermal denaturation of wild type nitrite reductase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2005, 1752: 47-55.
- [11] 刘盛权,张俊英,刘明毅. 亚硝酸还原酶的突变体1257E₁酶促反应过渡态之一的类似物的晶体结构[C]. 2002.
- [12] Rudolf D C M. Cytochrome c nitrite reductase further investigations of the multiheme enzyme by X-Ray crystallography,

site-directed mutagenesis, and EPR spectroscopy[D]. Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, Germany, 2004.

[13] Chippaux M, Giudici D, Abou-Jaoud A, et al. A mutation leading to the total lack of nitrite reductase activity in *Escherichia coli* K 12[J]. *Molec Gen Genet*, 1978, 160: 225-229.

[14] Williams PA, Fülöp V, Leung YC, et al. Pseudospecific docking surfaces on electron transfer proteins as illustrated by pseudoazurin, cytochrome c550 and cytochrome cd1 nitrite reductase[J]. *Nat Struct Biol*, 1995, 2: 975-982.

[15] Pearson IV, Page MD, van Spanning RJ, et al. A mutant of *Paracoccus denitrificans* with disrupted genes coding for cytochrome c550 and pseudoazurin establishes these two proteins as in vivo electron donors to cytochrome cd1 nitrite reductase[J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 6308-6315.

[16] 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, 28(8): 27-31.

[17] Schumacher W, Kroneck P M H. Dissimilatory hexaheme c nitrite reductase of "Spirillum" strain 5175: purification and properties[J]. *Arch Microbiol*, 1991, 156: 70-74.

[18] Olmo-Mira M F, Cabello P, Pino C, et al. Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1[J]. *Arch Microbiol*, 2006, 186: 339-344.

[19] Vígara J, García-Sánchez M I, Garbayo I, et al. Purification and characterization of ferredoxin nitrite reductase from the eukaryotic microalga *Monoraphidium braunii*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40: 401-405.

[20] Solov'ev V, Prokosheva G. The activity of nitrite reductase isolated from *Achromobacter guttatus* (strain 921) [J]. *Trudy, Vsesoyuznyi Nauchno-Issledovatel'skii Institut Myasnoi Promyshlennosti*, 1970, 23(1): 365-374.

[21] Pfeil E, Liepe H. The effect of the nitrite reductase system on the residual nitrite content of dry sausages, and its dependence on external conditions[J]. *Fleischwirtschaft*, 1973, 53(12): 1745-1747.

[22] Sawada E, Satoh T, Kitamura H. Purification and properties

of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1978, 19(8): 1339-1351.

[23] Neubauer H, Pantel I, Gotz F. Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(5): 1481-1488.

[24] Giovanni V, Michele D, Elisabetta C. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(3): 633-645.

[25] 李春, 韩建, 春郑凯. 乳酸菌混合生长降解亚硝酸盐能力的研究[J]. *工业微生物*, 2008, 38(6): 23-26.

[26] 张庆芳, 迟乃玉, 郑学仿. 短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* 去除亚硝酸盐的研究[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 55-60.

[27] 李艳青, 于长青. 利用乳酸菌发酵生产低硝牛肉香肠的研究[J]. *食品科技*, 2008(4): 67-69.

[28] 蒋欣茵, 李晓晖, 张伯生. 腌制食品中降解亚硝酸盐的乳酸菌分离与鉴定[J]. *中国酿造*, 2008(1): 13-16.

[29] 夏岩石, 孙春风. 乳酸菌降解亚硝酸盐的动态研究[J]. *湖南科技学院学报*, 2008, 29(8): 44-46.

[30] 王昌禄, 隋志文, 武晋海. 亚硝酸盐降解菌的分离及其降解特性[J]. *中国酿造*, 2008(9): 33-36.

[31] 龚钢明, 管世敏, 邵海, 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离鉴定[J]. *食品工业*, 2009(5): 12-13.

[32] Götterup 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: 303-310.

[33] Tikhonova T V, Slutsky A, Antipov A N, et al. Molecular and catalytic properties of a novel cytochrome c nitrite reductase from nitrate reducing haloalkaliphilic sulfur oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764: 715-723.

[34] 郑怀忠. 产亚硝酸还原酶菌株发酵特性及酶在肉制品中的应用[D]. 集美大学, 2009.

(上接第412页)

[8] 王四维, 蒋蕴珍, 过世冬. 山梨酸和涂膜联合作用延长青虾货架期的效果[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(10): 211-213.

[9] Park S, Stan S D, Daeschel M A, et al. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria × ananassa*) to control mold growth during cold storage [J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(4): 202-207.

[10] 姜爱华, 李宗军, 刘焱. 蜂胶、CMC、山梨酸钾在冷却肉保藏中的交互效应[J]. *食品工业*, 2010(2): 55-57.

[11] Charvalos E, Tzatzarakis M, Tsatsakis A, et al. Controlled release of water-soluble polymeric complexes of sorbic acid with antifungal activities[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 770-775.

[12] 冯治平, 吴世业. 复合防腐剂用于雪梨果汁保藏性能研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(10): 135-136.

[13] 焦晶晶, 章宇, 张巨林, 等. 生物化学复合防腐剂在橙汁防腐保鲜中的协同增效作用[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(12):

238-241.

[14] 马玉山, 梁咏梅. 山梨酸钾在肉制品中的应用实例[J]. *肉制品加工与设备*, 2006(8): 3-4.

[15] 李爱江, 刘丽莉, 杨协立. 低温灌肠肉制品中复合防腐剂的研究[J]. *肉类加工*, 2006(1): 20-23.

[16] 曹英超. 复合山梨酸钾对低温牛肉制品保鲜的研究[J]. *肉类研究*, 2006(2): 31-33.

[17] 王陆玲, 全明晓, 韩红梅, 等. 鱼精蛋白抑菌效果及在肠肉制品中的应用研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 215-217.

[18] 黄友琴, 李孚杰, 冯希, 等. 复合防腐剂延长鱼糕保质期研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 285-289.

[19] 李自强, 林洪君, 孙鸿举. 乙醇和山梨酸钾对鲜食葡萄采后灰霉菌的抑制作用[J]. *食品研究与开发*, 2006, 127(9): 130-133.

[20] 刘书亮, 詹莉. 纳他霉素与山梨酸复配改良MRS培养基的研究[J]. *中国酿造*, 2008(1): 33-35.