

# 乳酸菌降解亚硝酸盐的研究进展

柳念<sup>1</sup>, 陈佩<sup>2</sup>, 高冰<sup>1</sup>, 汪超<sup>1</sup>, 徐宁<sup>1</sup>, 胡勇<sup>1</sup>, 史文博<sup>3</sup>, 李冬生<sup>1</sup>, 周梦舟<sup>1,\*</sup>

(1.湖北工业大学 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北省食品发酵工程技术研究中心, 湖北 武汉 430068;

2.陕西广播电视大学科研处, 陕西 西安 710061; 3.湖北省阿克瑞德检验检测有限公司, 湖北 武汉 430077)

**摘要:** 亚硝酸盐和硝酸盐安全性问题是当今食品安全领域的研究热点, 大多数发酵食品中都含有亚硝酸盐, 这些亚硝酸盐主要由微生物生长代谢产生。大量摄入亚硝酸盐会引发机体一系列的不良反应, 增加人体癌变的机率。本文详细综述亚硝酸盐和硝酸盐的食物来源、对人体健康的影响, 并且总结乳酸菌降解亚硝酸盐的相关研究, 为安全有效地降解亚硝酸盐提供解决方案。

**关键词:** 亚硝酸盐; 硝酸盐; 乳酸菌; 降解

## Progress in Understanding Degradation of Nitrite by Lactic Acid Bacteria

LIU Nian<sup>1</sup>, CHEN Pei<sup>2</sup>, GAO Bing<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, XU Ning<sup>1</sup>, HU Yong<sup>1</sup>, SHI Wenbo<sup>3</sup>, LI Dongsheng<sup>1</sup>, ZHOU Mengzhou<sup>1,\*</sup>

(1. Hubei Cooperative Innovation Center for Industrial Fermentation, Research Center of Food Fermentation Engineering and Technology of Hubei, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2. Research Department, Shaanxi Radios & Television University, Xi'an 710061, China; 3. Hubei Accurate Inspection Testing Co. Ltd., Wuhan 430077, China)

**Abstract:** The safety of nitrite and nitrate is currently a research hotspot in the field of food safety. Most fermented foods contain nitrites that results from microbial growth and metabolism. Intake of large doses of nitrite can initiate a series of adverse reactions in the body, increasing the risk of carcinogenesis. In this paper, the dietary sources of nitrite and nitrate and their impacts on human health are reviewed in detail along with a summary of studies on nitrite degradation by lactic acid bacteria, with the aim of providing a solution for safe and effective degradation of nitrite.

**Key words:** nitrite; nitrate; lactic acid bacteria; degradation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707046

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 07-0290-06

引文格式:

柳念, 陈佩, 高冰, 等. 乳酸菌降解亚硝酸盐的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 290-295. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707046. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Nian, CHEN Pei, GAO Bing, et al. Progress in understanding degradation of nitrite by lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2017, 38(7): 290-295. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707046. <http://www.spkx.net.cn>

硝酸盐和亚硝酸盐在食品中广泛存在, 尤其是在蔬菜和香肠中<sup>[1]</sup>。过剩的蔬菜不易保藏, 如白菜、黄瓜、芹菜和萝卜通常被制作成泡菜或者其他的发酵制品, 其良好风味受到大众的欢迎, 常作为配菜或与主食搭配的开胃小菜食用。但是, 此类发酵风味蔬菜一般都是自然发酵, 依赖于植物体上附着的微生物进行, 而在发酵过程中硝酸还原菌将植物体系中的硝酸盐转化成亚硝酸盐, 导致发酵前期亚硝酸盐大量积累<sup>[2]</sup>。亚硝酸盐有发色、保持风味、抗氧化和抑制革兰氏阳性菌生长等特性, 成为

被广泛使用的食品添加剂, 而过量添加也有导致亚硝酸盐超标的风险<sup>[3-6]</sup>。

食品中亚硝酸盐含量关乎消费者的健康, 过量地食用会引发高铁血红蛋白症, 而且它是亚硝胺形成的重要前体物质, 体内长期积累会引发机体癌变<sup>[7]</sup>。乳酸菌是食品自然发酵中的常见菌种之一, 通常被认为是安全的益生菌, 其代谢产物赋予食品芳香的风味和良好的口感, 并且可以降低发酵环境中pH值, 从而抑制有害菌的生长, 是自然降解亚硝酸盐的理想菌株<sup>[8]</sup>。许多研究表明,

收稿日期: 2016-12-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31601455); 湖北省自然科学基金计划青年杰出人才项目(2015CFB679); 湖北工业大学博士启动基金项目(BSQD14021); 国家大学生创新项目(201610500024)

作者简介: 柳念(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物和发酵工程。E-mail: 1361804685@qq.com

\*通信作者: 周梦舟(1986—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: zmkkelvin@163.com

纯种乳酸菌发酵比自然发酵生成的亚硝酸盐含量低, 由于乳酸菌代谢产生酶、酸和其他物质<sup>[9-10]</sup>, 改变发酵环境, 从而能够高效地降解亚硝酸盐。而且乳酸菌还可以缩短发酵蔬菜的成熟期, 抑制杂菌的生长, 改变发酵蔬菜的感官品质, 从而提高发酵蔬菜的整体质量。

本文将通过详述亚硝酸盐的形成和安全阈值、乳酸菌降解亚硝酸盐机理以及乳酸菌降解亚硝酸盐的影响因素, 为安全有效地降解亚硝酸盐提供解决方案。

## 1 亚硝酸盐来源及危害

在食品安全角度上, 亚硝酸盐基本上被消费者视为不健康的食品添加剂, 因此控制其来源及添加量尤为重要。主要是因为亚硝酸盐会引发高铁血红蛋白症, 而且硝酸盐在体内会转化为亚硝酸盐, 再经过一系列的人体代谢形成致癌前体物质亚硝胺<sup>[11-12]</sup>。世界卫生组织统计日常饮食中硝酸盐每日摄入量大约为43~141 mg, 外源硝酸盐主要来自于植物食品和饮用水中, 饮用水中占14%, 而87%的硝酸盐摄入量与蔬菜食品有关<sup>[13-16]</sup>, 尤其生菜和菠菜等多叶蔬菜比块茎类蔬菜更容易积累大量的硝酸盐<sup>[17-18]</sup>。氮元素的吸收、硝酸还原酶活力、增长率、生长条件(土壤温度、光照强度、降雨量等)都会影响蔬菜中最终硝酸盐的含量, 而且在不适当的贮藏条件下或者加工过程中硝酸盐会大量转化为亚硝酸盐, 成为人体摄入亚硝酸盐的途径之一<sup>[19-21]</sup>。人通常每天摄入亚硝酸盐的含量为1.2~3.0 mg<sup>[13]</sup>, 蔬菜中的亚硝酸盐含量仅占总摄入量的2.2%, 腌制肉类中的亚硝酸盐含量却占总摄入量的4.8%<sup>[14]</sup>, 经过口腔中部分共生菌代谢将硝酸盐转化为亚硝酸盐总摄入量的93%, 人体自身代谢过程也会增加体内亚硝酸盐含量。因此, 控制蔬菜制品和肉制品中硝酸盐和亚硝酸盐含量至关重要, 尤其控制肉制品会显著降低其对人体的危害。1920年美国畜牧农业部进行的研究暴露了肉制品在加工过程中的安全问题<sup>[22]</sup>。此后, 美国农业部首次规定硝酸盐和亚硝酸盐的用量不超过200 mg/kg。发现硝酸盐和亚硝酸盐的添加会产生亚硝胺后, 1978年严格限制额外添加硝酸盐等腌制剂于培根中, 从而更有效地控制亚硝酸盐的生成, 同时, 美国相关部门也制定了腌制添加剂最高允许添加量, 如表1<sup>[23]</sup>所示。

表1 美国肉和家禽制品中添加剂的最高允许添加量

Table 1 Maximum allowable dose levels for curing ingredients used in meat and poultry in the United States

添加剂	添加方法			
	浸渍	按压	粉碎	干制
亚硝酸钠	200	200	156	625
亚硝酸钾	200	200	156	625
硝酸钠	700	700	1 718	2 187
硝酸钾	700	700	1 718	2 187

注: 浸渍和按压添加方法是基于添加剂与卤水质量比; 粉碎和干制添加方法是基于生肉的质量<sup>[24]</sup>。

## 2 乳酸菌降解亚硝酸盐机理

硝酸盐和亚硝酸盐降解方法主要分为物理降解、化学降解、生物法降解<sup>[25]</sup>。物理降解法主要是高温处理, 高温处理不仅可以抑制植物中硝酸还原酶的活力, 同时可以杀死产亚硝酸盐的硝酸还原菌, 但高温处理会影响蔬菜自身的营养价值, 而且在除杂菌的同时也杀死有益微生物<sup>[26]</sup>。化学降解主要是加入抗氧化剂, 如抗坏血酸和异抗坏血酸, 化学法降解亚硝酸盐的能力强, 但是这些抗氧化剂却容易被氧化, 不利于运用到复杂食品体系当中。因此, 化学法降解亚硝酸盐还有待深入探究。生物法降解亚硝酸盐是一种高效健康的方法, 其中最有效降解亚硝酸盐的微生物是乳酸菌<sup>[27]</sup>, 主要包括植物乳杆菌、短乳杆菌、肠膜明串球菌、啤酒片球菌、乳酸粪链球菌等<sup>[28]</sup>。乳酸菌降解亚硝酸盐主要体现在其代谢过程中产乳酸和一系列酶, 同时乳酸菌成为优势菌时, 能抑制其他杂菌的生长, 从而抑制亚硝酸盐再生。

### 2.1 酸降解

在蔬菜自然发酵过程中, 亚硝酸盐的含量随发酵时间的延长先增加后下降, 乳酸菌在发酵体系中对亚硝酸盐降解有明显效果。Wu Chongde等<sup>[29]</sup>研究了植物乳杆菌沪酿1.08和鲁氏酵母CGMCC3791联合发酵泡菜, 发酵泡菜中的亚硝酸盐的含量明显低于自然发酵体系中的亚硝酸盐含量, 而且联合发酵泡菜中生物胺的形成也受到抑制。他们通过气相色谱-质谱联用仪分析自然发酵体系, 一共有22种酸被鉴别出来, 在中国泡菜中主要的酸是丁酸、苯乙酸、正壬酸、肉豆蔻酸、9-十六碳烯酸、棕榈酸, 而在酸萝卜中主要是壬酸、棕榈酸、硬脂酸, 中国泡菜和酸萝卜中的酸含量分别占总酸含量的67.5%和88.72%。Yang Hongyan等<sup>[30]</sup>的研究也表明发酵蔬菜发酵12 d后pH值由7.3降至4.0, 同时亚硝酸盐的含量在第6天时显著降低, 其中乳酸和乙酸是最主要的挥发性酸。研究发现发酵香肠中接种清酒乳杆菌, 其pH值由6.31降至4.52, 相应的亚硝酸盐含量由100 mg/kg降到9.6 mg/kg; 而自然发酵香肠pH值仅仅降至5.42, 亚硝酸盐的含量也只降至32.1 mg/kg<sup>[31]</sup>。以上研究表明发酵环境中pH值对亚硝酸盐的降解有显著的促进作用, 而pH值的显著下降与乳酸菌产酸有着密切的关系, 但具体是哪些酸促进亚硝酸盐降解还待进一步研究。

林浩等<sup>[32]</sup>的研究表明, 亚硝酸盐降解率与pH值呈显著负相关、与总酸度呈显著正相关, 发酵体系中的酸是影响亚硝酸盐降解的关键因素。因为, 在去离子水中直接添加不同浓度的乳酸后发现, 当调节溶液初始pH值为3、总酸为1.04%时对亚硝酸盐的清除作用效果显著, 证明了乳酸菌降解作用主要依靠酸降解。张庆芳等<sup>[33]</sup>研究也表明, 乳酸降解亚硝酸盐有两个阶段, 分别为酸降解

和酶降解,在pH值小于4.0时,亚硝酸盐的降解主要是由于乳酸菌代谢产酸,而且随pH值的降低,亚硝酸盐降解能力增强,这是因为发酵环境中的pH值过低,而多数细菌生长最适pH值为6.5~7.5,因此不耐酸的亚硝酸盐生成菌的生长都会被抑制,从而有效抑制亚硝酸盐的生成,同时酸通过化学反应将 $\text{NO}_2^-$ 转变为 $\text{NO}_3^-$ ,减少亚硝酸盐的残留<sup>[34]</sup>。唐爱明等<sup>[35]</sup>研究表明,pH值随着乳酸含量的增加而降低,当pH值小于7时,硝酸还原酶的活力会受到抑制,从而在一定程度上抑制亚硝酸盐的生成。Tiso等<sup>[36]</sup>研究表明,乳酸菌的生长导致发酵环境的酸化。 $\text{NO}_2^-$ 通过非酶歧化反应生成NO,在一定程度上降解亚硝酸盐。因此,低pH值有利于亚硝酸盐的降解,通过抑制发酵环境中的不利微生物的生长,例如酵母、霉菌和大肠等;还可以通过调控酶活力促进亚硝酸盐的降解;其次通过低酸环境,使得 $\text{NO}_2^-$ 发生非酶歧化化学反应,有效地降低亚硝酸盐含量。

## 2.2 抑制亚硝酸盐还原菌生长

乳酸菌代谢产有机酸抑制有害微生物生长的研究已相当成熟,而乳酸菌的抑菌作用不仅仅因为代谢产乳酸,乳酸菌代谢生成的细菌素也有强的抑菌作用<sup>[37]</sup>,尤其是乳酸杆菌属代谢生成的细菌素,与抑制革兰氏阳性菌的生长有着密切的关系,主要抑制菌包括大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、荧光假单胞菌、产碱假单胞菌等,而部分抑制菌具有强的硝酸还原能力,所以乳酸菌通过抑制硝酸还原菌的代谢减少亚硝酸盐的生成<sup>[34]</sup>。周光燕<sup>[38]</sup>对116株乳酸菌进行产细菌素乳酸菌初步筛选,发现其中5株乳酸菌代谢产生新的蛋白质,分别为A-13干酪乳杆菌干酪亚种、J-5棒状乳杆菌棒状亚种、6-7鼠乳杆菌、7-4干酪乳杆菌假植物亚种、A-7弯曲乳杆菌。将这5株产细菌素的乳酸菌接种到发酵泡菜中,结果发现亚硝酸盐含量明显低于未接种的自然发酵泡菜,说明产细菌素的5株乳酸菌能有效地降解亚硝酸盐。在黄微微<sup>[39]</sup>的研究中也提到将产细菌素的乳酸菌与其他乳酸菌混合发酵,结果也发现其亚硝酸盐降解率、抑菌圈大小和总酸含量都高于未接种产细菌素的乳酸菌。Liu Wenli等<sup>[40]</sup>从传统的发酵食品中分离出的屎肠球菌Y31产细菌素Y31,在接种菌株Y31的发酵泡菜中细菌素Y31快速生成,而未接种菌株Y31的发酵泡菜在发酵2 d时就达到亚硝酸盐最大生成量,约为37 mg/kg,接种菌株Y31的发酵体系中亚硝酸盐生成量一直保持在9.9 mg/kg以下,表明细菌素Y31可有效抑制亚硝酸盐生成菌的生长。Fang Fang等<sup>[41]</sup>从自然发酵泡菜和传统奶酪产品中分离出4株乳酸菌,研究其对食品腐败微生物或病原菌的抗菌活性,包括革兰氏阳性菌和阴性菌。其中棒状乳酸杆菌属BBE-H3,展现出高水平降解亚硝酸盐能力,而且棒状乳酸杆菌BBE-H3代谢产生抗菌物质,抗菌物质在pH 4.0~4.5有强的活力,在不同

蛋白水解酶(胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶)条件下活力相应下降,这意味着该抗菌物质是一种蛋白质或者多肽,可能是乳酸菌代谢产生的乳酸菌素。在研究中,乳酸菌素不仅对一些革兰氏阴性菌有抑制作用,而且对部分乳酸菌属也有抑制作用,例如产生精胺的乳杆菌DSM20100。乳酸菌素主要是通过抑制硝酸还原菌的生长减少亚硝酸盐的含量,但具体的抑菌作用机理还需进一步研究。

## 2.3 酶降解

乳酸菌的代谢产物十分丰富,研究表明一些乳酸菌代谢产亚硝酸盐还原酶,可以高效地降解亚硝酸盐。在蔬菜发酵中,当pH值大于4.5时,亚硝酸盐的降解主要是酶降解<sup>[42]</sup>,研究表明pH 5.0是硝酸还原酶活力启动点。Wolf等<sup>[43]</sup>研究植物乳杆菌在发酵过程中产生亚硝酸盐还原酶,将发酵体系中的亚硝酸盐降解为无毒的 $\text{NH}_4^+$ ,这与张庆芳等<sup>[33]</sup>的研究推论相一致,其推论表明乳酸菌生长过程中不断代谢产酸,但发酵体系中pH值却一直处于较高的水平,这可能是亚硝酸盐还原酶将亚硝酸盐转化为 $\text{NH}_4^+$ ,但 $\text{NH}_4^+$ 与酸中和未导致发酵液pH值下降。但随着发酵时间的延长,pH值会不断降低,这可能是因为在低酸的环境下,亚硝酸盐还原酶的活力下降,亚硝酸盐的降解由酶降解转为酸降解。龚刚明等<sup>[44]</sup>研究的乳酸菌亚硝酸盐酶学性质表明,亚硝酸盐还原酶的最适pH值为5.5,在酸性条件下酶还保留部分酶活力,在碱性条件下酶的活力全部消失。研究还指出亚硝酸盐还原酶的最适温度为30℃,当温度低于15℃时,亚硝酸盐还原酶的活力不到原来的10%,所以温度也是乳酸菌降解亚硝酸盐的一个重要影响因素。一般乳酸菌的生长温度均在37℃左右,但大多数传统的自然发酵都是在秋冬季,发酵制品也不易腐败变质,所以筛选耐寒又能产亚硝酸盐还原酶的乳酸菌十分重要。卢海强等<sup>[45]</sup>从发酵酸菜中分离出5株具有较强降解亚硝酸盐能力的低温乳酸菌,其中一株冷明串球菌高产亚硝酸盐还原酶,其酶活力达到68.4 U/mL,此菌株在自然发酵降解亚硝酸盐中将有巨大的潜在用途。乳酸菌代谢产亚硝酸盐还原酶的相关研究较多,但关键酶的细胞定位、降解途径和降解机理还需进一步研究。Liu Dongmei等<sup>[46]</sup>研究鼠李糖乳杆菌LCR6013具有降解亚硝酸盐特性,而菌株LCR6013所产的亚硝酸盐还原酶有助于亚硝酸盐的降解,降解的途径是通过硝酸呼吸途径( $\text{NO}_2^- > \text{NO}^- > \text{N}_2\text{O}^- > \text{N}_2$ ),而不是氨化作用,因为代谢产物是 $\text{N}_2\text{O}$ 而不是 $\text{NH}_4^+$ 。进一步研究表明,壁膜间隙中亚硝酸盐还原酶活力是细胞浆中亚硝酸盐还原酶活力的2.5倍,因此亚硝酸盐还原酶主要在鼠李糖乳杆菌LCR6013壁膜间隙中,是胞内酶,但其具体位置还有待进一步研究。而王盼等<sup>[47]</sup>对植物乳杆菌DMDL9010中亚硝酸盐还原酶基因进行克隆、表达和纯化,通过聚合

酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增后进行编码序列到载体上, 再制作感受态细胞后构建重组质粒, 后将其转化到大肠杆菌上, 经诱导后的工程菌可将 50  $\mu\text{g/mL}$  的亚硝酸盐降解90%以上。

### 3 影响乳酸菌降解亚硝酸盐的因素

#### 3.1 食品基质对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响

在乳酸菌降解亚硝酸盐的代谢过程中, 糖类除了发挥提高肉制品的风味和色泽的作用外, 还是乳酸菌代谢过程中所需的碳源, 因此它直接影响着乳酸菌对亚硝酸盐的降解。马汉军等<sup>[48]</sup>研究了葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖对植物乳杆菌生长代谢的影响, 结果表明在香肠发酵前期添加糖和未添加糖的对照组相比有明显的差异, 在加糖的各组间, 葡萄糖和蔗糖对乳酸菌生长代谢的促进作用最明显。主要体现在添加1%的蔗糖和葡萄糖增加乳酸菌的生物量, 同时促进乳酸菌代谢产酸和快速降低发酵环境中的pH值, 这主要是因为乳酸菌较容易吸收利用蔗糖和葡萄糖。而糖添加到香肠发酵中, 促进乳酸菌的同时也促进乳酸菌降解亚硝酸盐, 实验表明相比于空白对照, 添加1%的葡萄糖和添加1%的蔗糖的发酵体系中亚硝酸盐的含量迅速下降, 而且发酵终期亚硝酸盐几乎没有残留。值得关注的是乳酸菌产生的一些胞外多糖也具有降解亚硝酸盐的能力。Seo等<sup>[49]</sup>研究发现植物乳杆菌 YML009 在生长过程中会产生胞外多糖, 其中含有68.1%的糖通过进一步研究, 发现纯化出来的多糖有强的降解亚硝酸盐的能力, 对亚硝酸盐的清除率达到43.93%。

在自然发酵体系中, 无机盐的添加可以降低蔬菜和肉制品中的水分含量, 抑制微生物的生长, 是延长食物贮藏期的一种有效的方式。在自然发酵体系中, 乳酸菌在发酵中后期生长代谢旺盛, 如若加入过量的氯化钠腌制, 乳酸菌会脱水死亡, 导致乳酸菌降解亚硝酸盐的效果也会明显的下降。董硕等<sup>[50]</sup>对氯化钠添加量对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响进行了研究, 结果表明当氯化钠的含量大于3%时有很明显的抑制作用, 当氯化钠的含量大于5%时, 乳酸菌的生长几乎停滞。通过实验得知, 乳酸菌的生长与氯化钠的含量呈负相关, 但发酵液中的乳酸菌数与亚硝酸盐的含量呈现正相关, 说明适量添加食盐有利于发酵体系中亚硝酸盐降解。而在研究中还发现, 在不同的氯化钠含量下, 乳酸菌菌体数大约相同时, 氯化钠还是会抑制亚硝酸盐的降解。这个结果表明氯化钠可能不仅抑制乳酸菌的生长代谢, 还可能抑制了酶降解, 抑制亚硝酸盐还原酶的产生或者抑制其降解亚硝酸盐的酶活力。因此, 在发酵体系中, 食品基质直接影响着乳酸菌降解亚硝酸盐的效率。

#### 3.2 发酵条件对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响

食品在自然发酵过程中容易生成大量亚硝酸盐, 控制发酵条件可以明显缓解亚硝酸盐生成, 例如发酵温度、pH值、时间等。黄丹等<sup>[51]</sup>的研究表明, 发酵温度和初始pH值对戊糖片球菌的生长代谢有明显的影 响, 当环境温度和初始pH值分别为30  $^{\circ}\text{C}$  和5.5时, 乳酸菌生长量和产酸量最多, 当发酵温度和初始pH值过高过低时, 其生长代谢都会受到不同程度的影响。在周强等<sup>[52]</sup>的研究中也提到, 当温度低于20  $^{\circ}\text{C}$ , 蔬菜中亚硝酸盐含量在第3天出现峰值, 而当温度为30  $^{\circ}\text{C}$  时, 亚硝酸盐含量峰值在第1天出现, 之后迅速下降, 虽然低温条件下抑制亚硝酸盐的生成, 但发酵温度为30  $^{\circ}\text{C}$  时, 发酵前期体系中亚硝酸盐生成快, 但是发酵后期亚硝酸盐含量明显低于低温发酵中的亚硝酸盐, 说明发酵体系中乳酸菌受温度的影响, 导致最终亚硝酸盐含量受到影响。Kim等<sup>[53]</sup>将不同乳酸菌分别添加在发酵体系中, 发现发酵温度为15  $^{\circ}\text{C}$  乳酸菌在第7天亚硝酸盐降解率接近100%, 在-1  $^{\circ}\text{C}$  时短杆乳酸菌降解率仅57.1%, 而且在温度为-1  $^{\circ}\text{C}$  发酵20 d 后亚硝酸盐的含量还有明显的增加, 这与Kang等<sup>[54]</sup>的研究相一致。而在Lee等<sup>[55]</sup>研究中也表明, 泡菜在5  $^{\circ}\text{C}$  贮藏3~5周内发酵体系中亚硝酸盐含量没有明显的增加, 这说明在整个发酵过程中, 发酵温度对乳酸菌降解亚硝酸盐有显著影响。刘广福等<sup>[56]</sup>对乳酸菌接种发酵和自然发酵酸菜样品采集进行分析, 发现接种乳酸菌发酵酸菜在发酵过程中亚硝酸盐含量一直处于较低水平, 在第5天出现峰值, 发酵至15 d亚硝酸盐几乎消失; 自然发酵前期酸菜中亚硝酸盐含量不断升高, 在第7天时亚硝酸盐含量达到峰值, 含量为20.84  $\text{mg/kg}$ , 在30 d后才接近消失。这些研究表明, 发酵前期的pH值和发酵温度要适宜乳酸菌的生长, 发酵时间延长大约30 d后再食用, 调控好发酵条件可以抑制整个发酵过程中亚硝酸盐生成。

#### 3.3 抗氧化物质对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响

抗氧化物质可以有效地清除亚硝酸盐, 例如黄酮类、抗坏血酸和异抗坏血酸都有强的清除亚硝酸盐的能力, 一些研究表明抗氧化物质还对乳酸菌的生长代谢有影响, 这些都直接影响着最终乳酸菌对亚硝酸盐的降解。张海均等<sup>[57]</sup>研究发现, 适当的添加石榴皮多酚提取物可以促进乳酸菌的生长代谢, 在提取多酚质量浓度为0.13~0.44  $\text{mg/mL}$  时对乳酸菌的生长有明显的促进作用, 若提取多酚质量浓度增加, 乳酸菌数不会再随之增加, 反而会受到一定的抑制。石榴皮多酚的添加促进乳酸菌的生长, 石榴皮多酚提取物对大肠杆菌有强的抑制作用, 同时还会抑制硝酸还原酶的酶活力<sup>[58]</sup>, 进一步抑制亚硝酸盐产生, 同时发酵液中亚硝酸盐降解量也相应提高, 但是当提取多酚质量浓度高于0.44  $\text{mg/mL}$  时, 亚硝酸盐降解也会受到抑制。所以在发酵过程中, 适当添加

一些石榴皮多酚提取物,可以促进乳酸菌生长和亚硝酸盐降解。刘瑾等<sup>[59]</sup>将大蒜添加到发酵白菜体系中,发现添加5%大蒜发酵体系中,亚硝酸盐含量峰值明显比空白组的亚硝酸盐含量峰值低,而且发酵10 d,添加5%大蒜体系中亚硝酸盐含量明显低于未添加大蒜空白对照。而在发酵体系中,大蒜对乳酸菌代谢有明显影响,其中添加5%大蒜体系中pH值降到了3.96,而在未加大蒜体系中pH值大约为5.0。而且,在添加5%大蒜体系中,可滴定酸含量也是最高,但是添加15%、20%大蒜发酵体系中产酸量与未加大蒜发酵体系中产酸量均无明显变化,即过量添加大蒜并不能更明显促进乳酸菌产酸,所以适当在发酵体系中添加大蒜有促进产酸效果。在发酵体系中加入大蒜,在发酵第6天乳酸菌含量却显著的上升,而且后期添加大蒜的发酵体系中乳酸菌量明显高于未加大蒜发酵体系,表明大蒜的添加促进乳酸菌的生长。其次,大蒜还有强的抗菌作用,在促进乳酸菌生长代谢情况下,还可以抑制金黄色葡萄球菌等有害微生物的生长<sup>[60]</sup>。这些研究表明,一些抗氧化物质的添加对整个发酵体系都有影响,包括对亚硝酸盐、乳酸菌,但是其作用机理还有待阐明,并且抗氧化物质的种类和抗氧化能力对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响也值得进一步研究。

#### 4 结语

亚硝酸盐和硝酸盐在食物中广泛存在,对人体健康有很大的威胁,所以对食品中硝酸盐和亚硝酸盐的控制刻不容缓。乳酸菌作为食品自然发酵的原始有益菌,对高效安全降解亚硝酸盐、不破坏食品基质和风味有着得天独厚的优势。目前,对于乳酸菌降解亚硝酸盐的研究还不成熟,主要集中于产酸和产亚硝酸盐还原酶,对于其作用的分子机制知之甚少。而且在发酵食品这个复杂的环境中,对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响因素也有很多,尤其是一些特殊添加物如大蒜、石榴皮多酚提取物等作用机理及还有待阐明,这些因素使得乳酸菌降解亚硝酸盐的研究仅限于实验室,离工业化生产还有一定距离。所以,将来还需要对乳酸菌菌株的筛选、乳酸菌降解亚硝酸盐的分子机制、基因组学以及乳酸菌与发酵食品体系的相互作用机制进一步深入研究,为未来工业化生产中安全有效地降解亚硝酸盐提供解决方案。

#### 参考文献:

- [1] BOZKURT H, BAYRAM M. Color and textural attributes of sucuk during ripening[J]. *Meat Science*, 2006, 73(2): 344-350. DOI:10.1016/j.meatsci.2006.01.001.
- [2] BARRANGOU R, YOON S S, BREIDT F, et al. Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2877-2884. DOI:10.1128/AEM.68.6.2877-2884.2002.
- [3] BA H V, SEO H W, CHO S H, et al. Antioxidant and anti-foodborne bacteria activities of shiitake by-product extract in fermented sausages[J]. *Food Control*, 2016, 70: 201-209. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.05.053.
- [4] BAKA A M, PAPAVERGOU E J. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44(1): 54-61. DOI:10.1016/j.lwt.2010.05.019.
- [5] NASSEHINIA H R, MEHDINIA S M, GHORBANI R, et al. Nitrite concentration in distributed sausage in Semnan Province[J]. *Payesh*, 2008, 7(3): 197-202.
- [6] RIAZI F, ZEYNALI F, HOSEINI E, et al. Oxidation phenomena and color properties of grape pomace on nitrite-reduced meat emulsion systems[J]. *Meat Science*, 2016, 121: 350-358. DOI:10.1016/j.meatsci.2016.07.008.
- [7] BRYAN N S, ALEXANDER D D, COUGHLIN J R, et al. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(10): 3646-3665. DOI:10.1016/j.fct.2012.07.062.
- [8] WU R, YU M, LIU X, et al. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of suan-cai, a traditional food made in Northeast China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 211: 23-31. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.028.
- [9] MAIA L B, MOURA J J G. Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2011, 16(3): 443-460. DOI:10.1007/s00775-010-0741-z.
- [10] YU S M, ZHANG Y. Effects of lactic acid bacteria on nitrite degradation during pickle fermentation[J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 781/782/783/784: 1656-1660. DOI:10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.1656.
- [11] CHUI J S W, POON W T, CHAN K C, et al. Nitrite-induced methaemoglobinaemia-aetiology, diagnosis and treatment[J]. *Anaesthesia*, 2005, 60(5): 496-500. DOI:10.1111/j.1365-2044.2004.04076.x.
- [12] BEDALE W, SINDELAR J J, MILKOWSKI A L. Dietary nitrate and nitrite: benefits, risks, and evolving perceptions[J]. *Meat Science*, 2016, 120: 85-92. DOI:10.1016/j.meatsci.2016.03.009.
- [13] QUALITY D. Nitrate and nitrite in drinking water development of WHO guidelines for drinking water quality[M]. Geneva: World Health Organization, 2007: 1-21.
- [14] ARCHER D L. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(5): 872-875. DOI:10.4315/0362-028X-65.5.872.
- [15] National Research Council. The health effects of nitrate, nitrite, and *N*-nitroso compounds[M]. Pittsburgh: National Academy Press, 1981.
- [16] LARSEN F J, SCHIFFER T A, BORNIQUEL S, et al. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans[J]. *Cell Metabolism*, 2011, 13(2): 149-159. DOI:10.1016/j.cmet.2011.01.004.
- [17] HORD N G, TANG Y, BRYAN N S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 90(1): 1-10. DOI:10.3945/ajcn.2008.27131.
- [18] European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain[J]. *EFSA Journal*, 2008, 6(6): 1-56. DOI:10.2903/j.efsa.2008.689.
- [19] HAKEEM K R, AHMAD A, IQBAL M, et al. Nitrogen-efficient rice cultivars can reduce nitrate pollution[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 18(2): 1184-1193. DOI:10.1007/s11356-010-0434-8.

- [20] HORD N G, TANG Y, BRYAN N S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 90(1): 1. DOI:10.3945/ajcn.2008.27131.
- [21] CHUNG J C, CHOU S S, HWANG D F. Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures[J]. Food Additives & Contaminants, 2004, 21(4): 317-322. DOI:10.1080/02652030410001668763.
- [22] BINKERD E F, KOLARI O E. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat[J]. Food & Cosmetics Toxicology, 1975, 13(6): 655-661. DOI:10.1016/j.meatsci.2016.03.009.
- [23] SINDELAR J J, MILKOWSKI A L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet[J]. Nitric Oxide, 2012, 26(4): 259-266. DOI:10.1016/j.niox.2012.03.011.
- [24] BRADBERRY S M, GAZZARD B, VALE J A. Methaemoglobinaemia caused accidental contamination of drinking water with sodium nitrite[J]. Journal of Toxicology Clinical Toxicology, 1994, 32(2): 173-178. DOI:10.3109/15563659409000447.
- [25] 毛青秀, 邓钢桥, 邹朝辉, 等. 蔬菜中亚硝酸盐降解方法研究进展[J]. 湖南农业科学, 2012(7): 109-111. DOI:10.3969/j.issn.1006-060X.2012.07.034.
- [26] MENARD C, HERAUD F, VOLATIER J L, et al. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France[J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2008, 25(8): 971-988. DOI:10.1080/02652030801946561.
- [27] SCOTT K P, GRATZ S W, SHERIDAN P O, et al. The influence of diet on the gut microbiota[J]. Pharmacological Research, 2013, 69(1): 52-60. DOI:10.1016/j.phrs.2012.10.020.
- [28] PAIK H D, LEE J Y. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition[J]. Meat Science, 2014, 97(4): 609-614. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.03.013.
- [29] WU C D, ZHENG J, HUANG J, et al. Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via co-culture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Annals of Microbiology, 2013, 64(2): 847-857. DOI:10.1007/s13213-013-0724-8.
- [30] YANG H Y, ZOU H F, QU C, et al. Dominant microorganisms during the spontaneous fermentation of suan cai, a chinese fermented vegetable[J]. Food Science & Technology Research, 2014, 20(5): 915-926. DOI:10.3136/fstr.20.915.
- [31] WANG X H, REN H Y, LIU D Y, et al. Effects of inoculating *Lactobacillus sakei*, starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of chinese fermented sausages[J]. Food Control, 2013, 32(2): 591-596. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.01.050.
- [32] 林浩, 林伟锋, 陈中. 2株乳酸菌对亚硝酸盐的降解作用及其降解机理的初步分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 65-68.
- [33] 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): 27-31.
- [34] YU S M, ZHANG Y. Effects of lactic acid bacteria on nitrite degradation during pickle fermentation[J]. Advanced Materials Research, 2013, 781/782/783/784: 1656-1660. DOI:10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.1656.
- [35] 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, 20(2): 35-37. DOI:10.3969/j.issn.1003-5788.2004.02.020.
- [36] TISO M, SCHECHTER A N. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions[J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0119712. DOI:10.1371/journal.pone.0119712.
- [37] NISHIE M, NAGAO J, SONOMOTO K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications[J]. Biocontrol Science, 2012, 17(1): 1-16. DOI:10.4265/bio.17.1.
- [38] 周光燕. 四川地区自然发酵泡菜中乳酸菌的生物特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006: 1-52.
- [39] 黄薇薇. 优良发酵性能和产抑菌肽乳酸菌筛选及在发酵蔬菜中的应用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009: 1-73.
- [40] LIU W L, ZHANG L W, SHI J, et al. Assessment of the safety and applications of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation *paocai*[J]. Food Control, 2015, 50: 637-644. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.10.004.
- [41] FANG F, FENG T T, DU G C, et al. Evaluation of the impact on food safety of a *Lactobacillus coryniformis* strain from pickled vegetables with degradation activity against nitrite and other undesirable compounds[J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2016, 33(4): 623-630. DOI:10.1080/19440049.2016.1156774.
- [42] 纪淑娟, 孟宪军. 大白菜发酵过程中亚硝酸盐消长规律的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001(2): 42-46. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2001.02.011.
- [43] WOLF G, HAMMES W P. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in *Lactobacilli*[J]. Archives of Microbiology, 1988, 149(3): 220-224. DOI:10.1007/BF00422008.
- [44] 龚钢明, 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, 30(1): 58-60. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.01.017.
- [45] 卢海强, 霍文敏, 谷新晰, 等. 产亚硝酸盐还原酶低温乳酸菌的筛选鉴定及发酵特性[J]. 河北农业大学学报, 2015(1): 87-91. DOI:10.13320/j.cnki.jauh.2015.0016.
- [46] LIU D M, WANG P, ZHANG X Y, et al. Characterization of nitrite degradation by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LCR 6013[J]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e93308. DOI:10.1371/journal.pone.0093308.
- [47] 王盼, 费永涛, 刘冬梅, 等. 植物乳杆菌DMDL 9010中亚硝酸盐还原酶的基因克隆、表达和纯化[J]. 现代食品科技, 2015(6): 150-155. DOI:10.1371/journal.pone.0093308.
- [48] 马汉军, 潘润淑. 糖在中式发酵香肠中的应用研究[J]. 肉类工业, 2001(增刊1): 134-136. DOI:10.3969/j.issn.1008-5467.2001.z1.042.
- [49] SEO B J, BAJPAI V K, RATHER I A, et al. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2015, 49(4): 282-292. DOI:10.5530/ijper.49.4.6.
- [50] 董硕, 迟乃玉, 张庆芳. 氯化钠对乳酸菌降解亚硝酸盐的影响[J]. 中国酿造, 2010, 29(7): 103-105. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2010.07.029.
- [51] 黄丹, 刘有晴, 于华, 等. 四川传统发酵肉中乳酸菌的分离及发酵特性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 149-152. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.03.023.
- [52] 周强, 刘蒙佳. 腌制条件对泡菜亚硝酸盐含量及pH值的影响[J]. 中国调味品, 2013, 38(5): 28-30. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2013.05.007.
- [53] KIM S H, KANG K H, KIM S H, et al. Lactic acid bacteria directly degrade *N*-nitrosodimethylamine and increase the nitrite-scavenging ability in kimchi[J]. Food Control, 2017, 71: 101-109. DOI:10.1080/1048398.2012.660251.
- [54] KANG K H, LEE S J, HA E S, et al. Effects of nitrite and nitrate contents of Chinese cabbage on formation of *N*-nitro-sodimethylamine during storage of kimchi[J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2016, 45: 117-125. DOI:10.3746/jkfn.2016.45.1.117.
- [55] LEE G I, LEE H M, LEE C H. Food safety issues in industrialization of traditional Korean foods[J]. Food Control, 2012, 24(Suppl 1/2): 1-5. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.09.014.
- [56] 刘广福, 王硕, 朱兴旺, 等. 接种发酵和自然发酵酸菜的亚硝酸盐含量对比分析[J]. 中国酿造, 2013, 32(7): 74-76. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2013.07.021.
- [57] 张海均, 贾冬英, 赵甲元, 等. 石榴皮多酚提取物对泡菜中亚硝酸盐消减机理研究[J]. 中国调味品, 2012, 37(3): 62-66. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2012.03.015.
- [58] FISCHER U A, CARLE R, KAMMERER D R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n)[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 807-821. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.156.
- [59] 刘瑾, 燕平梅, 邸建文, 等. 大蒜对发酵白菜中亚硝酸盐含量影响的研究[J]. 食品工程, 2009(3): 31-34. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2009.03.010.
- [60] RASTOGI L, ARUNACHALAM J. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential[J]. Materials Chemistry and Physics, 2011, 129(1/2): 558-563. DOI:10.1016/j.matchemPhys.2011.04.068.