

# 高效降亚硝酸盐乳酸菌的驯化复筛及菌株鉴定

吴慧昊<sup>1</sup>, 牛 锋<sup>2</sup>, 陈珊珊<sup>3</sup>, 钟 琦<sup>2</sup>, 肖俊川<sup>2</sup>

(1.西北民族大学实验中心, 甘肃 兰州 730030; 2.西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030;

3.四川农业大学生命科学与工程学院, 四川 雅安 625014)

**摘 要:** 目的: 筛选出高效降亚硝酸盐乳酸菌, 为今后益生乳酸菌的开发提供一定的理论依据。方法: 从地方特有食品及动物肠道中分离纯化出13株乳酸菌, 采用盐酸萘乙二胺法对13株乳酸菌的体外降亚硝酸盐能力进行测定, 并对降亚硝酸盐效果最强菌株进行驯化培养和抑菌实验, 通过生理生化及16S rDNA法对所分离的降亚硝酸盐能力最强菌株进行鉴定。结果: 获得1株编号为JS3的乳酸菌, 该菌对亚硝酸盐降解率为83.39%, 经过驯化复筛及培养条件优化得到: 培养基中蛋白胨添加量15 g/L、接种量5%、培养温度30℃、培养时间48 h, 其降解率达到93.47%, 同时菌株对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌还具有抑制性能。经鉴定菌株为玉米乳杆菌(*Lactobacillus zeae*), 将其命名为*L. zeae*JS3。结论: 菌株JS3具有高效降解亚硝酸盐能力, 能够成为今后降解亚硝酸盐微生态活性菌的优良菌种。

**关键词:** 降亚硝酸盐; 乳酸菌; 驯化; 抑菌; 鉴定

## Screening and Identification of Nitrite-Degrading Lactic Acid Bacteria

WU Huihao<sup>1</sup>, NIU Feng<sup>2</sup>, CHEN Shanshan<sup>3</sup>, ZHONG Qi<sup>2</sup>, XIAO Junchuan<sup>2</sup>

(1. Centres of Experimentation, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;

2. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;

3. College of Life Science and Engineering, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Objective: To screen nitrite-degrading lactic acid bacteria (LAB), and thus to lay a theoretical foundation for the future development of probiotic lactic acid bacteria. Methods: Totally 13 LAB strains were isolated and purified from unique local foods and animal intestines, and their nitrite-degrading abilities were evaluated by the naphthyl ethylenediamine dihydrochloride spectrophotometric method. Biochemical assays and 16S rDNA sequencing were used to identify the lactic acid bacteria with the highest nitrite-degrading capacity. Results: A nitrite-degrading strain, JS3, was obtained, which was found to be able to degrade 83.39% nitrite. The optimized culture conditions for enhanced nitrite degradation by the selected strain were determined as peptone concentration in medium of 15 g/L, inoculum quantity of 5%, and culture at 30℃ for 48 h, resulting in a degradation rate as high as 93.47%. The strain had obvious antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. It was identified as *Lactobacillus zeae* and named *L. zeae*. JS3. Conclusion: The strain JS3 has efficient nitrite-degrading capacity, and it is potentially an excellent species for the degradation of nitrite in the future.

**Key words:** nitrite degradation; lactic acid bacteria; domestication; antibacterial; identification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201619027

中图分类号: Q93.331

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)19-0160-06

引文格式:

吴慧昊, 牛锋, 陈珊珊, 等. 高效降亚硝酸盐乳酸菌的驯化复筛及菌株鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 160-165.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201619027. <http://www.spkx.net.cn>

WU Huihao, NIU Feng, CHEN Shanshan, et al. Screening and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2016, 37(19): 160-165. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201619027. <http://www.spkx.net.cn>

亚硝酸盐是一种具有强氧化作用的食物添加剂, 广泛应用于食品工业中, 例如腌肉、泡菜、火腿、酸菜、咸鱼等中均含有亚硝酸盐<sup>[1-2]</sup>。但亚硝酸盐食用过量就会

对人体造成一定的危害, 一般人体摄入0.3~0.5 g的亚硝酸盐可引起中毒, 超过3 g则可致死<sup>[3-4]</sup>。亚硝酸盐是食品添加剂中急性毒性最强的物质之一。其原因一方面是大

收稿日期: 2015-10-09

基金项目: 2014年度国家民委科研项目(14XBZ015); 甘肃省农牧厅攻关项目(GNSW-2007-09)

作者简介: 吴慧昊(1985—), 女, 实验师, 硕士, 主要从事食品微生物研究。E-mail: wuhuihao99@163.com

剂量的亚硝酸盐进入人体内会造成中毒,亚硝酸盐进入血液后与人体中的血红蛋白结合,使正常的血红蛋白变形,失去携氧能力,导致人体组织缺氧,还会对血管产生扩张作用,严重者出现意识丧失、昏迷、呼吸衰竭,甚至死亡<sup>[5-8]</sup>。另一方面,部分亚硝酸盐在一定条件下会转化为亚硝胺,而亚硝胺是一种致癌物质,并能通过胎盘和乳汁引发后代肿瘤。同时,亚硝胺还有致畸和致突变作用。人群中流行病学调查表明,人类某些癌症,如胃癌、肝癌、结肠癌和膀胱癌等可能与亚硝胺有关<sup>[9-11]</sup>。

亚硝酸盐和硝酸盐广泛存在于土壤、水域及植物中,目前广泛采用的含氮农药和化学氮肥及含氮工业废水、废渣对环境土壤和水造成污染,使其中亚硝酸盐含量不断增加,而土壤是水体、植物性食品亚硝酸盐的主要来源。亚硝酸盐残留过高对人有极大的危害,世界上因为亚硝酸盐超标而引发的卫生问题、安全事故时有发生。因此,世界上许多国家呼吁严格控制亚硝酸盐的使用量,并积极地研究利用化学、生物的方法降低食品中亚硝酸盐含量<sup>[12]</sup>。

乳酸菌是很多自然发酵传统食品微生物区系的重要成员,是研究最深入的安全型微生物之一。乳酸菌广泛存在于人体肠道中,具有帮助消化、抗肿瘤、预防癌症、降血脂、降血压、增强免疫力和抵抗力等保健和医疗作用<sup>[13-15]</sup>。在食品生产中,乳酸菌还具有改善食品品质的功效,研究发现,经乳酸菌发酵后,食品风味得以改善、食品安全和营养价值得以提高<sup>[16-18]</sup>。目前,大量研究表明乳酸菌具有降解亚硝酸盐的能力,但是存在菌种及菌株间的差异<sup>[19-20]</sup>。本实验研究从各种样品中分离出乳酸菌菌株,并将初筛得到降亚硝酸盐能力高的乳酸菌进行进一步的驯化培养,使其降解率得到提升,最终获得强降解亚硝酸盐的乳酸菌株,为乳酸菌在今后的食品、环境保护以及饲料生产方面提供菌种资源及参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

实验所用的13株乳酸菌菌种均分离自甘肃特有食物及动物肠道,并于低温冰箱厌氧保存。

对氨基苯磺酸溶液、盐酸萘乙二胺溶液、亚硝酸钠标准溶液的配制参照文献<sup>[21]</sup>。

### 1.2 仪器与设备

MLS-3750 全自动高压灭菌器 日本Sanyo公司; TU-1900双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; GL-21M 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司; PCR扩增仪 日本TaKaRa公司; 核酸电泳仪 北京百晶生物科技有限责任公司; 蛋白质电泳仪 上海天能科技有限公司; 电泳成像装置 安发

玛西亚生物技术(上海)有限公司; DNA测序仪 吉泰生物科技有限责任公司。

### 1.3 培养基

乳酸细菌(MRS)液体培养基(g/L): 蛋白胨10、牛肉膏10、酵母粉5、葡萄糖20、无水乙酸钠5、柠檬酸二胺2、磷酸氢二钾2、硫酸镁0.58、硫酸锰0.25,吐温-80 1 mL,蒸馏水1 L, pH 6.6~6.8,  $1 \times 10^5$  Pa灭菌20 min。固体培养基在液体培养基基础上加入17.5 g/L琼脂。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 亚硝酸盐含量的测定

采用盐酸萘乙二胺法<sup>[21]</sup>进行标准曲线的绘制及亚硝酸盐含量的测定。经测定,标准曲线回归方程为 $y=0.6082x+0.00897$  ( $R^2=0.9923$ ),其中 $y$ 为吸光度值; $x$ 为亚硝酸盐含量/(mg/mL)。亚硝酸盐含量在0~2 mg/mL  $\text{NaNO}_2$ 的质量浓度范围内线性关系良好。

#### 1.4.2 菌株初筛

将分离纯化的13株乳酸菌于MRS液体培养基中活化24 h,按5%的接种量接种于100 mL含400  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 的MRS液体培养基中,在37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养48 h后,取菌悬液于8 000 r/min离心,上清液于538 nm波长处测定其吸光度( $A_{538\text{nm}}$ )值,同时做平行和空白对照。

#### 1.4.3 菌株驯化与复筛

将初筛得到的高效降解菌株,按5%的接菌量接种到100 mL含1 000  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 的MRS液体培养基中,在37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养72 h后,吸取5 mL至质量浓度为2 000  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 溶液中,继续恒温培养72 h。菌株在培养基中驯化72 h后,取5%菌液继续接入含2 000  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 的MRS液体培养基中,连续传代驯化培养30 d。

将驯化菌液离心得到菌体,与生理盐水混合形成菌悬液。将此菌悬液按5%的接菌量接种到100 mL含400  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 的MRS液体培养基中,在37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养48 h,离心(8 000 r/min)取上清液,测定其 $A_{538\text{nm}}$ 值,同时做平行与对照实验。

#### 1.4.4 抑菌性能测定

将50 mL固体培养基灭菌后冷却到45  $^{\circ}\text{C}$ 与1 mL指示菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)混合均匀后倒平板,待平板凝固后放上灭菌的牛津杯。调整菌悬液浓度 $10^8$  CFU/mL,用移液枪分别量取100  $\mu\text{L}$ 的菌培养液,加入牛津杯中,盖上皿盖,将平皿置于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱扩散,然后于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h,观察小孔周围抑菌圈直径,每个指示菌做两个重复,测抑菌圈直径,求平均值。

#### 1.4.5 菌株最适降解条件选择

##### 1.4.5.1 菌株单因素试验

以含400  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 的MRS为基础培养基,通过改变蛋白胨添加量(10、15、20 g/L)、接菌量(1%、2%、5%)、培养时间(24、48、72 h)、培养温度

(30、35、40℃)等因素,来测定各因素对菌株降解亚硝酸盐含量的影响。

#### 1.4.5.2 正交试验设计

以蛋白胨添加量、接菌量、培养温度、培养时间为试验因素,采用四因素三水平正交试验对菌株降解亚硝酸盐的最适生长条件进行选择。

#### 1.4.6 亚硝酸盐降解菌株鉴定

采用生理生化及16S rDNA法对所分离的降亚硝酸盐最强菌株进行鉴定。生理生化特性鉴定:对分离的菌种分别进行过氧化氢酶、氧化还原酶、明胶液化、6.5% NaCl、15℃生长实验和糖发酵产酸实验。运动性检查:采用半固体培养基穿刺法。

16S rDNA扩增及序列测定方法参照文献[22],聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

测序完成提交菌株JS3的16S rDNA序列在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中进行比对,选取与之相似性最高的10株菌的16S rDNA序列,进行Clustal X比对,MEGA软件分析,采用Neighbor-Joining构建系统发育树,Bootstrap 1 000次进行稳定性验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 降亚硝酸盐菌株的筛选及驯化

#### 2.1.1 降亚硝酸盐乳酸菌初筛结果

表1 各乳酸菌菌株48 h内对NaNO<sub>2</sub>的降解量

Table 1 The degradation percentage of NaNO<sub>2</sub> by LAB strains in 48 h

菌株来源	菌株编号	NaNO <sub>2</sub> 平均降解率/%	菌株来源	菌株编号	NaNO <sub>2</sub> 平均降解率/%
牧民酸奶	ZK	66.47	藏粪肠道	ZOA1	27.08
牧民酸奶	XZ	45.10	藏粪肠道	ZOA2	20.01
天水浆水	JS2	57.72	兰州酸菜	CL04	34.67
天水浆水	JS3	83.39	兰州酸菜	CL05	65.60
天水浆水	JS4	81.66	兰州酸菜	CL06	72.14
兰州浆水	ZC004	64.85	牧民酸奶	MSNQ1	61.37
兰州浆水	ZL010	75.06			

由表1可知,在13株乳酸菌中,对初始质量浓度为400 μg/mL的亚硝酸盐降解率在80%~90%之间的菌株有2株,降解率在50%以下的有4株。这些菌株经过48 h培养降解率最高的为JS3,其降解率为83.39%,说明JS3与其他菌株在相同的条件下更能适应高质量浓度的亚硝酸盐溶液,表现出较强的降解优势。而降解率最低的是菌株ZOA2,其降解率仅为20.01%。由此可见,不同的乳酸菌菌株均具有一定的亚硝酸盐降解能力,但是降解能力大小不同。

#### 2.1.2 降解亚硝酸盐乳酸菌的驯化复筛

从表1初筛结果中选出3株降解率高的菌株,进行高质量浓度亚硝酸盐的驯化复筛,经连续的驯化培养后,3株菌降亚硝酸盐能力见表2。

表2 菌株驯化后对NaNO<sub>2</sub>的降解能力

Table 2 The NaNO<sub>2</sub> degradation capacity of three selected strains

菌株编号	JS3	JS4	ZL010
平均降解率/%	89.240±0.325	87.350±0.226	80.295±0.191

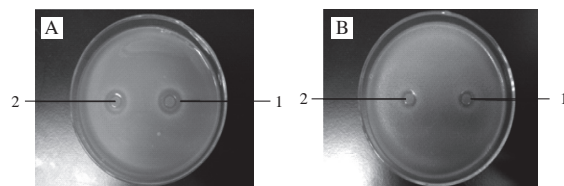
由表2可知,将菌株培养在含2 000 μg/mL NaNO<sub>2</sub>的MRS培养基中,JS3、JS4、ZL010这3株菌的降亚硝酸盐能力较初筛时都有了明显提升,说明这3株菌在亚硝酸盐质量浓度从400~2 000 μg/mL的增加过程中表现出了非常好的生长态势,具有了一定的耐亚硝酸盐能力,主要表现为当亚硝酸盐质量浓度升高时,其降解率亦增高,在此过程中菌株JS3的优势更为突出,表现出最高的降亚硝酸盐的能力,其降解率为89.24%。

### 2.2 抑菌效果

表3 各乳酸菌对指示菌的抑菌圈平均直径

Table 3 Inhibition zone diameters of strains JS3 and JS4

指示菌	JS3	JS4
枯草芽孢杆菌	11	11
金黄色葡萄球菌	17	15



1.菌株JS3; 2.菌株JS4。

图1 菌株JS3对金黄色葡萄球菌(A)和枯草芽孢杆菌(B)的抑制效果

Fig. 1 Inhibitory effect of JS3 on *Staphylococcus aureus* (A) and *Bacillus subtilis* (B)

由表3、图1可知,JS3和JS4对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均具有一定的抑制效果,JS3、JS4对于枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径相同,均为11 mm,而对于金黄色葡萄球菌的抑制效果,JS3的抑菌圈直径为17 mm高于JS4,因此后续实验选取JS3菌株进行实验。

### 2.3 菌株最适降解条件选择

#### 2.3.1 单因素试验结果

对菌株JS3采用单因素试验研究其对NaNO<sub>2</sub>的降解效果。李春等<sup>[23]</sup>研究发现,培养基中蛋白类物质也具有降解亚硝酸盐的能力,因此选取蛋白胨添加量作为一个重要的试验因素,由图2A可知,蛋白胨添加量对NaNO<sub>2</sub>的降解效果有一定影响,蛋白胨添加量越高,降解率越高。由图2B可知,高温不利于菌株对NaNO<sub>2</sub>的降解,这



主要是因为高温抑制菌株JS3的生长,从而降低菌株对 $\text{NaNO}_2$ 的降解量。菌株的接菌量为5%时, $\text{NaNO}_2$ 的降解率最高,主要是因为初始菌的数量增多,后续扩增繁殖中菌数增多,从而对 $\text{NaNO}_2$ 的降解率提高(图2C)。由图2D可知,培养时间为48 h时,菌株对 $\text{NaNO}_2$ 的降解率最高,时间过短过长都不利于 $\text{NaNO}_2$ 的降解,时间过短菌株生长周期不足,时间过长,菌体大量衰老死亡,因此使其对 $\text{NaNO}_2$ 的降解率降低。

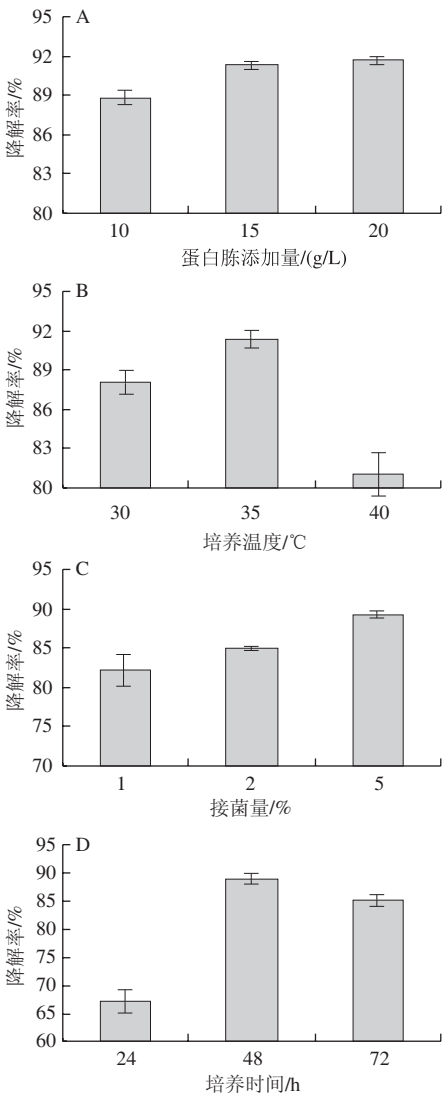


图2 蛋白胨添加量(A)、培养温度(B)、接菌量(C)和培养时间(D)对JS3降解 $\text{NaNO}_2$ 的影响

Fig. 2 Effect of inoculum quantity on the degradation rate of  $\text{NaNO}_2$

### 2.3.2 正交试验结果

JS3菌株正交试验结果见表4。不同因素对亚硝酸盐的降解影响程度依次为培养时间>蛋白胨添加量>接菌量>培养温度。由K值可以看出,菌株降亚硝酸盐的最优条件为 $A_2B_3C_2D_3$ ,在此条件下测得平均降解率为90.850%。低于试验4组与6组,说明各因素间存在交互作用。

用, 综上所述得出菌株JS3的最适降解条件为试验6组, 即: 培养基中蛋白胨添加量15 g/L、接菌量5%、培养温度30 °C、培养时间48 h, 其降解率达93.47%。

表4 菌株JS3对 $\text{NaNO}_2$ 降解条件优化的正交试验方案及结果  
Table 4 Orthogonal array design with experimental results for the optimization of culture conditions for  $\text{NaNO}_2$  degradation by strain JS3

试验号	A蛋白胨添加量/(g/L)	B接菌量/%	C培养温度/°C	D培养时间/h	平均降解率/%
1	1 (10)	1 (1)	1 (30)	1 (24)	67.565
2	1	2 (2)	2 (35)	2 (48)	87.175
3	1	3 (5)	3 (40)	3 (72)	84.420
4	2 (15)	1	2	3	91.110
5	2	2	3	1	76.165
6	2	3	1	2	93.470
7	3 (20)	1	3	2	80.865
8	3	2	1	3	86.560
9	3	3	2	1	75.380
$K_1$	239.160	239.540	247.595	219.110	
$K_2$	260.745	249.900	253.665	261.510	
$K_3$	242.805	253.270	241.450	262.090	
$k_1$	79.720	79.847	82.532	73.037	
$k_2$	86.915	83.300	84.555	87.170	
$k_3$	80.935	84.423	80.483	87.363	
R	7.195	4.576	4.072	14.326	

### 2.4 菌株鉴定

#### 2.4.1 菌株形态特征

经分离纯化的菌株JS3在固体培养基上培养3 d后, 菌落呈乳白色, 表面光滑, 隆起, 菌落边缘整齐, 如图3A所示。在显微镜下观察发现, 菌株为革兰氏阳性菌, 椭圆形, 细胞大小形态均一, 单细胞大小为 $(0.9\sim1.2)\mu\text{m}\times(1.3\sim2.1)\mu\text{m}$ , 大部分成对存在, 部分呈单个或短链状存在, 见图3B。

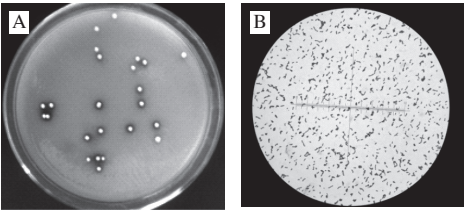


图3 菌株JS3的平板菌落形态(A)和革兰氏染色(B)结果

Fig. 3 Colony of strain JS3 and its Gram staining on plates

#### 2.4.2 菌株生理生化鉴定结果

将菌株JS3活化后接种于MRS液体培养基中, 经24 h恒温培养后发现, 菌株贴试管壁并沿试管壁向底部生长, MRS液体培养基表层无菌生长, 由此说明该菌为兼性厌氧菌。菌株于半固体培养基穿刺后, 仅在穿刺线上生长, 且边缘十分清晰, 表明菌株无运动性。接触酶和氧化酶反应均为阴性。不能利用尿素, 不能产生 $\text{H}_2\text{S}$ , 生理生化鉴定结果见表5。

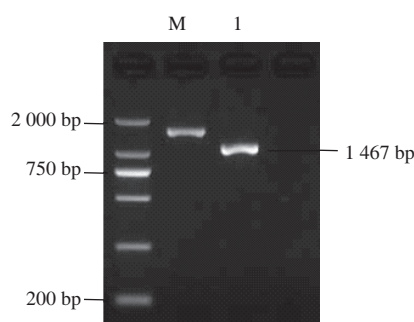
表5 菌株生理生化鉴定结果  
Table 5 Physiological and biochemical characterization

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
尿素	-	果糖	+	棉子糖	-	硝酸盐(还原)	-
山梨糖	-	阿拉伯醇	-	6.5% NaCl	+	鼠李糖	-
接触酶	-	蔗糖	+	甘露醇	+	精氨酸	-
麦芽糖	+	半乳糖	+	卫矛醇	-	乳糖	+
蔗糖	+	葡萄糖	+	木糖醇	-	糊精	+
木糖	-	甘露糖	+	枸橼酸盐	-	丙二酸盐	-
淀粉	-	纤维二糖	+	硫化氢	-	明胶液化	-
$\beta$ -半乳糖苷	+	氧化酶	-	甲基红	+	V.P	+

注：+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

#### 2.4.3 菌株JS3分子生物学鉴定

在培养基中挑取菌体，变性后离心取上清作模板，使用16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No.RR176) 进行PCR扩增目的片段，结果见图4。将上述扩增产物进行测序，获得JS3菌株16S rDNA部分基因序列(1 467 bp)，在GenBank数据库中通过在线序列BLAST比对检索，结果显示JS3菌株的16S rDNA序列与*Lactobacillus zeae*的16S rDNA序列具有100%同源性。



M. DL2000 DNA Marker; 泳道1. 16S rDNA PCR产物。

图4 菌株JS3的16S rDNA PCR扩增结果

Fig. 4 Electrophoresis of PCR amplification products of bacterial 16S rDNA from JS3

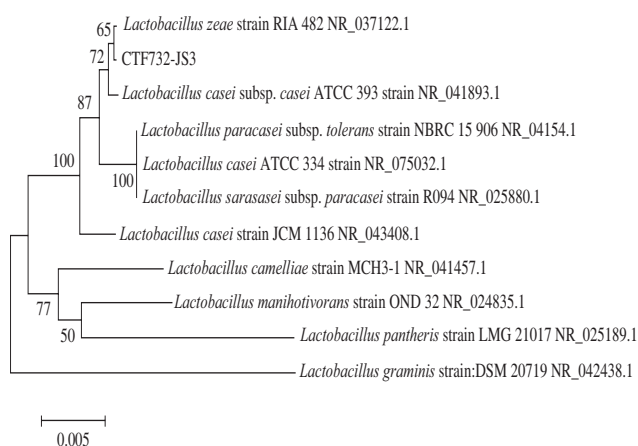


图5 依据16S rDNA序列构建的菌株JS3与相关菌株的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain JS3 and related strains based on 16S rDNA

使用Neighbor-Joining构建系统发育树，结果如图5所示。系统发育树上与菌株JS3的16S rDNA同源性较高的菌株均为乳杆菌属(*Lactobacillus*)，与*Lactobacillus zeae* RIA 482菌株在发育树上聚为一簇，具有较近的进化距离。

因此，根据以上形态特点和生理生化特征，结合《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[24]</sup>和《乳酸细菌：基础、技术和应用》<sup>[25]</sup>，将分离的菌株JS3鉴定为乳杆菌属、玉米乳杆菌，将其命名为*L. zeae*JS3。

### 3 结论

从分离纯化的13株乳酸菌中筛选出1株降亚硝酸盐能力非常好的菌株JS3，经过驯化复筛及培养条件优化，JS3的亚硝酸盐的降解率达到93.47%，其最佳降解条件为培养基中蛋白胨添加量15 g/L、接菌量5%、培养温度30℃、培养时间48 h。通过生理生化和分子生物学鉴定，将菌株鉴定为乳杆菌属、玉米乳杆菌，将其命名为*L. zeae*JS3。

乳酸菌对亚硝酸盐具有降解能力，这是因为乳酸菌生长时产生的大量乳酸，会使pH值急剧下降，低的pH值环境可以抑制亚硝酸盐的形成，乳酸也会使生成的亚硝酸盐进行化学降解，同时乳酸菌在亚硝酸盐的诱导下产生了亚硝酸盐还原酶，即乳酸菌本身具有还原作用<sup>[26]</sup>。蔬菜、腌肉中存在的一些大肠杆菌、金黄色葡萄球菌能使硝酸盐还原成亚硝酸盐，而JS3具有抑制其生长的作用，从另一源头截断亚硝酸盐的形成，进一步证明菌株JS3潜在的应用价值。

### 参考文献：

- [1] 万素英, 李琳, 王慧君. 食品防腐和食品防腐剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 110-118.
- [2] 刘程, 周汝忠. 食品添加剂实用大全[M]. 北京: 北京工业出版社, 1999: 56-59.
- [3] 曹会兰. 亚硝酸盐对人体的危害和预防[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(2): 57-58.
- [4] 范丽平, 林婷, 张海松, 等. 降亚硝酸盐乳酸菌的鉴定及生长特性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 221-224.
- [5] CROSS A J, FERRUCCI L M, RISCH A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association[J]. Cancer Research, 2010, 70(6): 2406-2414. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3929.
- [6] 皇甫超申, 史齐, 李延红, 等. 亚硝酸盐对人体健康的利害分析[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(8): 733-736.
- [7] 刘荣森, 张泽根. 蔬菜中硝酸盐、亚硝酸盐测定方法[J]. 农业科学, 2011(12): 49.
- [8] 朱新鹏. 食品中亚硝酸盐检测的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(3): 48-51.
- [9] MEY D E, KLERCK K D, MAERE H D, et al. The occurrence of *N*-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation[J]. Meat Science, 2014, 96: 821-828. DOI:10.1016/j.meatsci.2013.09.010.

- [10] RASSAF T, FERDINANDY P, SCHULZ R. Nitrite in organ protection[J]. British Journal of Pharmacology, 2013, 171: 1-11. DOI:10.1111/bph.12291.
- [11] 何淑玲, 李博, 籍保平, 等. 泡菜中亚硝酸盐问题研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 85-87.
- [12] SHAHIDI F, PEGG R B. Nitrite-free meat curing systems: update and review[J]. Food Chemistry, 1992, 43(3): 185-191. DOI:10.1016/0308-8146(92)90171-W.
- [13] CHONG E S L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action[J]. World Journal of Microbiol and Biotechnol, 2014, 30(2): 351-374. DOI:10.1007/s11274-013-1499-6.
- [14] PARVEZ S, MALIK K A, KANG S A, et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(6): 1171-1185. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x.
- [15] BOSCH M, FUENTES M C, AUDIVERT S, et al. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(4): 803-809. DOI:10.1002/jsfa.6467.
- [16] 马霞, 韩迪, 张吉, 等. 乳酸菌在发酵果蔬中的应用[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(1): 40-42.
- [17] YAN P M, XUE W T, TAN S, et al. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting chinese paocai[J]. Food Control, 2008, 19(1): 50-55. DOI:10.1016/j.foodcont.2007.02.008.
- [18] YOUNG Y K, WOODAMS E E, HANG Y D. Production of probiotics cabbage juice by lactic acid bacteria[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(12): 1427-1430.
- [19] CHAMPAGNE C P, TOMPKING T A, BUCKLEY N D, et al. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage[J]. Food Microbiology, 2010, 27(7): 962-972. DOI:10.1016/j.fm.2010.06.003.
- [20] 黄丽慧, 张雁, 陈于陇, 等. 发酵蔬菜中亚硝酸盐消长规律及调控技术的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 303-307.
- [21] 卫生部. GB 5009.33—2010 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [22] 孟令帅, 张颖, 邹婷婷, 等. 辣白菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 130-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201511025.
- [23] 李春, 王宝才, 刘丽波. 亚硝酸盐降解影响因素的研究[J]. 食品工业, 2010(4): 7-9.
- [24] 布坎南R E, 吉本斯N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所翻译组, 译. 8版. 北京: 科学出版社, 1994: 729-759.
- [25] 张刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 41-45.
- [26] 吴海波, 张兰威, 黄艳玲. 不同地域发酵蔬菜分离的乳酸菌抑菌效果及降亚硝酸盐能力的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 80-83.