

# 乳酸菌抑制N-亚硝胺形成的机理探究及应用效果

李秀明<sup>1</sup>, 刘静静<sup>1</sup>, 闫利娟<sup>2</sup>, 杨 华<sup>2</sup>, 王 洋<sup>3</sup>, 马丽珍<sup>1,\*</sup>

(1.天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384; 2.天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384;  
3.天津农学院水产学院, 天津 300384)

**摘 要:** 将前期实验筛选得到的能够有效抑制红肠中N-亚硝胺形成的乳酸菌发酵剂PRO-MIX5 (木糖葡萄球菌+清酒乳杆菌+类植物乳杆菌) 分别用肉糜培养基和MRS培养基培养, 在亚硝酸盐降解体系和N-二甲基亚硝胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA)形成体系中逐步筛选, 分别排除代谢产物、胞内酶、菌体的作用, 得到的菌体碎片具有抑制NDMA形成的效果后, 进一步筛选MRS培养基中添加的诱导剂种类, 测定菌体碎片添加量对NDMA抑制效果的影响, 最后将最优培养方式得到的菌体碎片分别以湿质量的0.05%、0.25%、0.5%比例应用于红肠和培根的制作中, 以验证其在产品中对N-亚硝胺形成的抑制作用。结果表明, PRO-MIX5抑制N-亚硝胺的形成主要是其菌体碎片的作用, 且使用含有质量浓度0.04 µg/mL的9种N-亚硝胺的MRS肉汤培养基扩增培养PRO-MIX5, 得到的菌体碎片对N-亚硝胺形成的抑制作用效果较好, 应用于3个湿质量比例的红肠和培根中, 均为0.05%比例抑制9种N-亚硝胺形成的效果最佳, 在2种产品中的抑制率分别达到41.04%和13.83%, 应用效果良好。

**关键词:** 乳酸菌; N-亚硝胺; 亚硝酸盐; N-二甲基亚硝胺; 红肠; 培根

## Inhibition Mechanism and Application of Lactic Acid Bacteria on N-Nitrosamine Formation

LI Xiuming<sup>1</sup>, LIU Jingjing<sup>1</sup>, YAN Lijuan<sup>2</sup>, YANG Hua<sup>2</sup>, WANG Yang<sup>3</sup>, MA Lizhen<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Biotechnology, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China;  
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;  
3. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** This study aimed to explore the inhibition mechanism of *Lactobacillus* starter culture PRO-MIX5 (containing *Staphylococcus xylosus* + *Lactobacillus sake* + *Lactobacillus paraplantarum*), which had been obtained in our previous study and found to effectively inhibit the formation of N-nitrosamines in Harbin red sausage, on the formation of N-nitrosamines. PRO-MIX5 was cultured in both minced meat medium and MRS medium for stepwise screening using nitrite degradation system and N-nitrosodimethylamine (NDMA) generation system. As a result, we found that the cell debris but not the metabolites, intracellular enzymes or whole cells could inhibit NDMA formation. Furthermore, the effect of the type of inducer added to MRS medium and the amount of cell debris added on the inhibition of NDMA formation was investigated. Finally, confirmation experiments were conducted by adding the cell debris obtained under optimized conditions at levels of 0.05%, 0.25% and 0.5% (on a wet mass basis) to Harbin red sausage and bacon. The results showed that the cell debris of PRO-MIX5 inhibited NDMA formation. A good inhibition effect was observed by culturing PRO-MIX5 in MRS medium containing 9 N-nitrosamines at a concentration of 0.04 µg/mL. Among the three addition levels, the cell debris at 0.05% showed the highest inhibition effect on the formation of the N-nitrosamines in both Harbin red sausage and bacon with inhibition percentages of 41.04% and 13.83%, respectively, and therefore its application could give good results.

**Keywords:** lactic acid bacteria; N-nitrosamine; nitrite; N-dimethylnitrosamine; Harbin red sausage; bacon

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181202-014

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)02-0141-07

收稿日期: 2018-12-02

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0401200)

第一作者简介: 李秀明(1995—)(ORCID: 0000-0003-4898-0688), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉制品安全控制。

E-mail: 1835505356@qq.com

\*通信作者简介: 马丽珍(1963—)(ORCID: 0000-0003-2744-7171), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品科学与技术。

E-mail: malizhen-6329@163.com

引文格式:

李秀明, 刘静静, 闫利娟, 等. 乳酸菌抑制*N*-亚硝胺形成的机理探究及应用效果[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 141-147. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181202-014. <http://www.spkx.net.cn>

LI Xiuming, LIU Jingjing, YAN Lijuan, et al. Inhibition mechanism and application of lactic acid bacteria on *N*-nitrosamine formation[J]. Food Science, 2020, 41(2): 141-147. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181202-014. <http://www.spkx.net.cn>

*N*-亚硝胺具有致癌、致畸、致突变性, 对人体健康有极大危害。它主要由氮氧化物和仲胺反应生成, 含有大量前体物, 如含亚硝酸盐和胺类物质的食品极易生成*N*-亚硝胺, 且pH值、温度等均是影响其生成的重要因素<sup>[1]</sup>。在腌肉制品加工中, 为了同时起到发色、抑菌、抗氧化、提高风味的作用<sup>[2]</sup>, 按照国家标准, 亚硝酸盐的最大添加量为0.15 g/kg<sup>[3]</sup>, 在加工、贮藏过程中, 肉中蛋白质的降解产物<sup>[4]</sup>可为*N*-亚硝胺的生成提供前体物, 加热温度和时间的影响亦极大地促进*N*-亚硝胺的生成<sup>[5]</sup>, 所以腌肉制品中会有*N*-亚硝胺形成的潜在危险。因此如何降低产品中*N*-亚硝胺的含量对于食品安全控制方面具有重要的意义。

乳酸菌在传统发酵食品中应用广泛(如酸奶、酸菜、发酵香肠等), 有提高产品风味和营养的作用<sup>[6]</sup>。目前学者利用乳酸菌抑制*N*-亚硝胺多针对发酵食品, 如在食品制作时接种活菌发酵, 作用于*N*-亚硝胺前体物, 降解亚硝酸盐<sup>[7-9]</sup>和抑制胺类物质形成<sup>[10-11]</sup>; 也有学者从一些产品中分离筛选出能够降解亚硝酸盐<sup>[12-14]</sup>和生物胺<sup>[15]</sup>的乳酸菌研究其作用机理, 结果表明为酸度、亚硝酸盐还原酶、生物胺氧化酶的作用, 或降低在食品加工过程中生成*N*-亚硝胺, 这可能是乳酸菌产酸降低pH值抑制腐败菌生长, 从而间接抑制了易生成*N*-亚硝胺的物质形成<sup>[16-17]</sup>, 也有学者提出是由于微生物对*N*-亚硝胺具有吸附或降解的作用<sup>[18]</sup>; 肖亚庆等<sup>[19]</sup>研究发现戊糖乳杆菌中位于细胞壁最外层的表层蛋白具有降解*N*-二甲基亚硝胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)和*N*-二乙基亚硝胺(*N*-nitrosodiethylamine, NDEA)的效果, 也可能是由于乳酸菌分泌了可降解*N*-亚硝胺的酶<sup>[20]</sup>。但以上研究多为在发酵温度(如37℃)下探究乳酸菌对*N*-亚硝胺的降解机理, 对于无发酵工艺的产品加工中则不太适用, 如红肠等。

经前期研究(数据未发表), 将腌制好的肉馅在真空搅拌机中加入辅料的同时接种PRO-MIX5乳酸菌发酵剂(木糖葡萄球菌+清酒乳杆菌+类植物乳杆菌), 灌装后首先经过12 h的发酵过程, 再按照红肠的加工工艺进行干燥、蒸煮、烘烤、烟熏等, 实验结果表明接种某些乳酸菌发酵后确实能够减少红肠中*N*-亚硝胺的形成, 降低亚硝酸盐的残留量, 提高产品的安全性, 但发酵会延长

产品的加工周期, 对加工设备和环境卫生要求更高, 且经发酵后红肠产品有微酸味, 消费者不易接受。针对以上问题, 本研究提出假设, 能否在体外培养这种特殊乳酸菌菌株, 探究其抑制*N*-亚硝胺形成的机理, 提取其中有效抑制*N*-亚硝胺的物质, 然后直接添加到类似红肠、培根等没有发酵环节的肉制品中, 不经过发酵即可降低产品中*N*-亚硝胺含量, 提高其食用安全性。

本研究将PRO-MIX5分别于肉糜培养基和MRS培养基中扩增培养, 在亚硝酸盐的降解体系和*N*-二甲基亚硝胺形成体系中, 分别对乳酸菌代谢产物、菌体、胞内酶以及菌体碎片进行筛选, 研究PRO-MIX5乳酸菌发酵剂抑制*N*-亚硝胺形成的机理, 同时提取其中可抑制*N*-亚硝胺形成的物质, 应用于红肠和培根中, 验证其在产品中对*N*-亚硝胺的抑制效果。本研究对生产安全、高品质食品具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜猪肉 天津市康宁肉制品有限公司; PRO-MIX5 意大利萨科公司。

MRS肉汤培养基 北京索莱宝科技有限公司; 二氯甲烷(色谱纯)、硼酸、氯化钾、亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ ) 天津市风船化学试剂科技有限公司; 二甲胺盐酸盐( $\text{DMA}\cdot\text{HCl}$ ) 国药集团化学试剂有限公司; 9种*N*-亚硝胺混标(*N*-nitrosamines, NAS), 包含NDMA、NDEA、*N*-甲基乙基亚硝胺(*N*-nitrosomethylethylamine, NMEA)、*N*-二丁基亚硝胺(*N*-nitrosodibutylamide, NDBA)、*N*-二丙基亚硝胺(*N*-nitrosodipropylamine, NDPA)、*N*-亚硝基哌啶(*N*-nitrosopiperidine, NPIP)、*N*-亚硝基吡咯烷(*N*-nitrosopyrrolidine, NPYR)、*N*-亚硝基吗啉(*N*-nitrosomorpholine, NMOR)、*N*-亚硝基二苯胺(*N*-nitrosodiphenylamine, NDPheA) 美国Supelco公司。

### 1.2 仪器与设备

7890A气相色谱仪 美国安捷伦公司; P/ACE MDQ毛细管电泳仪(配备紫外检测器) 美国贝克曼库勒公司; PB-10酸度计 德国赛多利斯科学仪器有限公司; ZXSD-B1090恒温培养箱 上海智诚仪器设备有限公司

限公司; Z323K通用型高速冷冻离心机 美国赛默飞世尔科技有限公司; SCIENTZ-IIID超声波破碎仪 宁波新芝生物科技有限公司; HS07-314恒温水浴锅 天津华北实验仪器有限公司; VXMNAL旋涡振荡器 美国奥豪斯公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肉糜培养基的制作

猪瘦肉与水以1:2比例匀浆,经4次沸水浴加热10 min、匀浆后于121℃高压灭菌20 min,在所得液体中加入4%葡萄糖,得到肉糜培养基,用于初步探索过程中培养PRO-MIX5乳酸菌使用。

#### 1.3.2 PRO-MIX5乳酸菌培养物处理方式

PRO-MIX5乳酸菌培养物4℃、5 000×g离心15 min,弃掉上清液得到菌体;用25 mmol/L、pH 6的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)4℃、5 000×g离心15 min,冲洗菌体2次;添加终质量浓度为1 mg/mL的溶菌酶在30℃作用2 h,再用超声波细胞破碎仪以200 W的功率,超声2 s、停2 s共进行5 min<sup>[21]</sup>。上述溶液在4℃、10 000×g离心10 min。

#### 1.3.3 NDMA模拟体系制备

参考Kuniyuki等<sup>[22]</sup>的方法,并稍作修改,使反应体系中NaNO<sub>2</sub>和DMA·HCl终浓度分别为20 mmol/L和10 mmol/L,且以上试剂均用浓度为25 mmol/L、pH 6的PBS配制,将该体系于80℃水浴锅中反应1 h后,加入6 mol/L NaOH溶液调节pH值至13终止亚硝化反应,置于冰浴中迅速冷却后加入5 mL二氯甲烷,充分振荡1 min,使二氯甲烷与样品充分混匀,在4℃、10 000×g离心5 min,吸取底部二氯甲烷层的清亮部分过0.45 μm滤膜后转入气相色谱仪的小瓶中待上机。

#### 1.3.4 实验设计

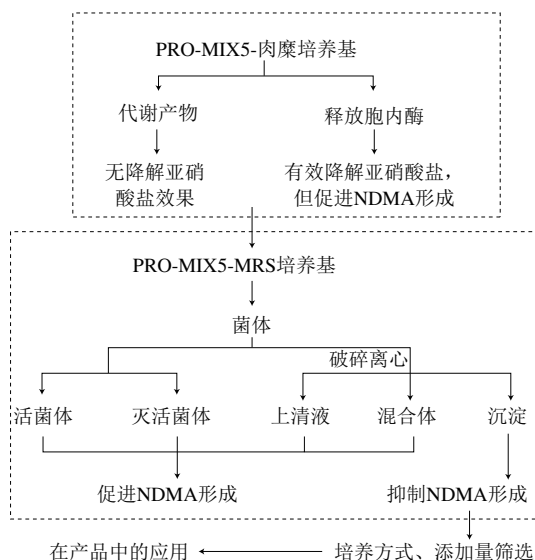


图1 实验设计方案

Fig. 1 Schematic illustration for the experimental design

为了分析PRO-MIX5乳酸菌培养物对N-亚硝胺的抑制机理,分别在降解亚硝酸盐和抑制NDMA形成两个方面进行逐步筛选,实验设计总体方案见图1所示。

#### 1.3.4.1 发酵代谢产物对亚硝酸盐的降解作用

由于PRO-MIX5是在红肠中应用筛选得到能够抑制N-亚硝胺形成的优势乳酸菌发酵剂,且在发酵第12小时效果最佳,为尽量保持在体外制作时所得产物一致,实验以PRO-MIX5商业发酵剂为研究对象,接种在1.3.1节制得的液态肉糜培养基中,发酵12 h(35℃)得到混合发酵液,经4℃、5 000×g离心15 min获得发酵上清液,即为该商业发酵剂的代谢产物。为了解这种混合发酵液和发酵上清液的作用浓度、作用温度和时间是否可以清除模拟体系中的亚硝酸盐,设计了2个实验。

实验方案1的作用温度模拟肉的腌制温度,设定为4℃,在50 mL离心管中分别加入混合发酵液和发酵上清液1.5、3、6 mL,以终质量浓度为0.15 mg/mL加入NaNO<sub>2</sub>标准溶液,添加蒸馏水至30 mL,混合发酵液和发酵上清液的作用时间均为0、8、16 h,在规定时间内立即测定体系中的亚硝酸盐含量。

实验方案2中,为进一步验证发酵上清液,即代谢产物的作用,将发酵上清液的添加浓度提高,取20 mL发酵上清液于50 mL离心管中,以终质量浓度为0.15 mg/mL加入NaNO<sub>2</sub>标准溶液,添加蒸馏水至30 mL,分别置于4℃(模拟腌制温度)和35℃(模拟发酵温度)环境中作用,在作用的第0、8、21、32小时立即取样测定体系中的亚硝酸盐含量。

#### 1.3.4.2 乳酸菌胞内酶释放后对亚硝酸盐的降解作用

按照表1的前处理方式得到4组混合液,对菌体进行溶菌酶作用和细胞破碎处理,使其释放出胞内酶后所得液体分别为混合发酵液、沉淀与水混合物、沉淀与PBS混合物、乳酸组发酵液,各取20 mL于50 mL离心管中,以终质量浓度为0.1 mg/mL加入NaNO<sub>2</sub>标准溶液,添加蒸馏水至30 mL,置于30℃反应,分别测定第0、1、2小时反应体系中亚硝酸盐的残留量。

表1 PRO-MIX5发酵剂降解亚硝酸盐混合液的实验方案  
Table 1 Preparation of nitrite inhibitors from the fermentation broth of PRO-MIX5

| 培养方式   | 前处理方式   | 细胞破碎                          | 所制得混合液    |
|--|---|-------------------------------|-----------|
|  | 不离心(代谢产物对胞内物质降解亚硝酸盐效果的影响)                                   |                               | 混合发酵液     |
| 用含有10 μg/mL NaNO <sub>2</sub> 的肉糜培养基对PRO-MIX5进行体外培养12 h得到发酵液 | 离心得沉淀加上清液等量的蒸馏水(排除代谢产物与胞内物质的相互作用)                           | 先添加溶菌酶破坏细胞壁结构,再用超声波细胞破碎仪破碎细胞膜 | 沉淀与水混合物   |
|  | 离心后得沉淀加0.01 mol/L, pH 7.4的PBS <sup>[19]</sup> (为胞内酶提供较适宜环境) |                               | 沉淀与PBS混合物 |
|  | pH 4.66的乳酸(排除酸的作用)  |                               | 乳酸组发酵液    |



### 1.3.4.3 混合发酵液和沉淀与水混合物对NDMA形成的影响

在生成NDMA的模拟体系中加入混合发酵液和沉淀与水混合物各5 mL于总体积为20 mL的NDMA模拟体系中, 30 ℃保温反应2 h后, 80 ℃加热1 h, 空白对照组(CK组)则直接加热反应, 测定NDMA的生成量。

### 1.3.4.4 不同处理方式的菌体对NDMA形成的影响

将在添加10 μg/mL NaNO<sub>2</sub>的MRS培养基扩增培养的PRO-MIX5菌体分别以活菌(离心MRS培养基得到菌体, 用PBS冲洗菌体2次)和死菌(将冲洗后的菌体于100 ℃水浴加热15 min)的状态, 以湿质量的0.1 g加入20 mL形成NDMA的模拟体系中, 且筛选不同的作用方式: 加入模拟体系后直接80 ℃加热反应1 h; 在30 ℃保温作用2 h后, 再80 ℃加热反应1 h, 同时做空白对照。

### 1.3.4.5 菌体不同组分对NDMA形成的影响

用MRS肉汤培养基扩增培养PRO-MIX5后离心得到菌体, 用PBS冲洗菌体两次后, 用菌体与PBS质量比1:4稀释, 将菌体破碎后, 离心得到的上清液为胞内酶粗提液<sup>[23]</sup>, 沉淀为菌体碎片。分别将上清液、沉淀、混合体(上清液+沉淀)加入总体积20 mL的NDMA模拟体系中反应, 同时设置空白对照组, 测定NDMA最终的生成量。

### 1.3.4.6 对乳酸菌培养方式、菌体碎片添加量的筛选

分别使用4种MRS液体培养基: 不添加诱导剂; 添加10 μg/mL NaNO<sub>2</sub>; 添加0.04 μg/mL NAS; 添加10 μg/mL NaNO<sub>2</sub>+0.04 μg/mL NAS, 扩增培养PRO-MIX5, 经1.3.4.5节相同方法处理得到菌体碎片, 按照湿质量分别以0.2%、0.5%、1%、1.5%、2%的比例加入形成NDMA的模拟体系中反应, 同时做空白对照, 最终得到不同培养方式以及添加量对NDMA形成的影响。

### 1.3.4.7 PRO-MIX5菌体碎片在红肠和培根中的应用效果

使用相对较低的添加量将菌体碎片分别以0.05%、0.25%、0.5%的比例(湿质量)应用于红肠和培根的制作中, 同时设置空白对照组, 即不添加菌体碎片, 分别测定4组产品中9种N-亚硝胺含量。

## 1.3.5 指标测定方法

### 1.3.5.1 亚硝酸盐的测定

参照李秀明等<sup>[24]</sup>的毛细管电泳法测定亚硝酸盐残留量。

### 1.3.5.2 N-亚硝胺的测定

参照GB 5009.26—2016《食品中N-亚硝胺类化合物的测定》<sup>[25]</sup>对样品中的N-亚硝胺进行提取、萃取净化、浓缩后过膜。气相色谱条件: 进样量1 μL; 进样口温度250 ℃; 柱箱升温梯度为50 ℃保持4 min, 10 ℃/min速率升至180 ℃保持2 min, 20 ℃/min升至220 ℃, 保持10 min, 后运行以235 ℃保持2 min; 氮磷检测器温度330 ℃; 氢气流速2 mL/min, 空气流速60 mL/min, 载气(N<sub>2</sub>)流速6 mL/min。将过膜

后的样品用该气相色谱条件测定9种N-亚硝胺, 同时进行定量。

### 1.3.5.3 pH值的测定

参照GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》<sup>[26]</sup>的方法进行测定。

## 1.4 数据分析

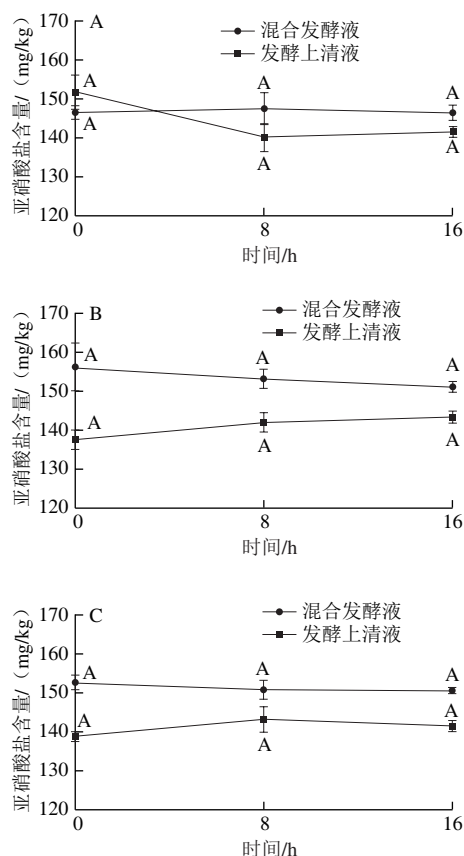
用Microsoft Excel 2010计算平均值和标准偏差, 用Statistix 8.1进行显著性分析, SigmaPlot 10.0作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 在肉糜培养基中培养PRO-MIX5

#### 2.1.1 发酵代谢产物对亚硝酸盐的降解作用

在肉制品加工中常添加亚硝酸盐, 而亚硝酸盐是形成致癌物N-亚硝胺的前体物。乳酸菌代谢产物常存在于发酵上清液中, 其中含有大量乳酸、乳酸菌素、过氧化氢等物质<sup>[27]</sup>。如图2所示, 随着作用时间的延长和添加浓度的增加, 发酵上清液和混合发酵液均不能显著降解体系中的亚硝酸盐含量。



A、B、C分别为添加发酵上清液和混合发酵液1.5、3、6 mL。肩标大写字母表示同处理组不同时间之间差异显著( $P<0.05$ )。图3、4同。

图2 发酵上清液和混合发酵液添加量对模拟体系中亚硝酸盐的降解作用  
Fig. 2 Effects of fermentation supernatant and fermentation broth on degradation of nitrite in simulated system

如图3所示,在4℃和35℃条件下添加发酵上清液的模拟体系中亚硝酸盐含量随着反应时间的延长均未显著降低,可知随着发酵上清液添加量的增加、反应温度的提高和反应时间的延长,菌体发酵的代谢产物依然没有显著降解亚硝酸盐的效果,综上结果说明在发酵时能够起到降解亚硝酸盐的物质并不存在于乳酸菌的发酵代谢产物中。

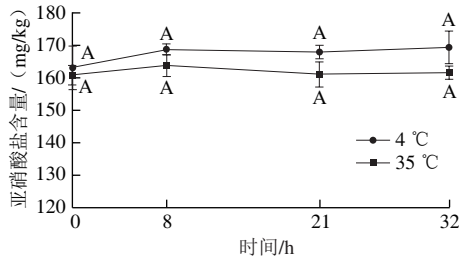
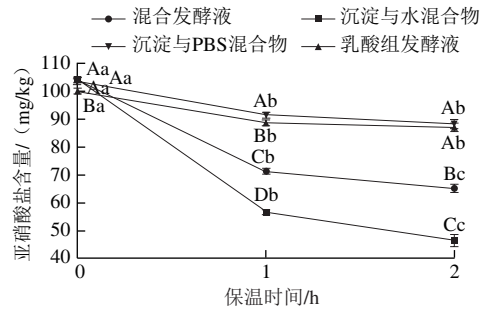


图3 温度对模拟体系中亚硝酸盐的降解作用

Fig. 3 Effect of temperatures on degradation of nitrite in simulated system

### 2.1.2 乳酸菌胞内酶释放后对亚硝酸盐的降解作用

张馨月等<sup>[21]</sup>报道,LCR6013中降解亚硝酸盐主要为亚硝酸盐还原酶的作用,且该酶属于胞内酶,主要存在于细胞同质间隙,对亚硝酸盐降解作用显著,其次为细胞质酶和细胞碎片。按照1.3.4.2节的实验方法制备乳酸菌发酵液,其中在培养基中添加亚硝酸盐的目的是作为诱导剂促进降解亚硝酸盐的物质产生,且其添加量对降解效果相关性较大<sup>[28]</sup>。按照表1的方法步骤对乳酸菌发酵液处理后进行实验,结果如图4所示。实验结果表明,由PRO-MIX5制得的混合发酵液、沉淀与水混合物、沉淀与PBS混合物、乳酸组发酵液随着反应时间的延长,均能对亚硝酸盐起到降解作用( $P<0.05$ ),且不同处理方式对亚硝酸盐降解率由大到小顺序依次为:沉淀与水混合物>混合发酵液>乳酸组发酵液>沉淀与PBS混合物,其中混合发酵液和沉淀与水混合物处理方式在保温反应过程中对亚硝酸盐降解率具体如表2所示,说明将细胞破碎释放出胞内酶后,对亚硝酸盐降解作用显著,但沉淀与水混合物降解效果优于混合发酵液是由于胞内酶释放后不稳定<sup>[29]</sup>,且可能受到上清液中代谢产物如过氧化氢的作用影响了其活性,而用水取代发酵上清液后破碎菌体则能较好地使胞内酶和菌体碎片发挥作用,在保温2 h时对亚硝酸盐的降解率可达53.49%,相反,用0.01 mol/L、pH 7.4的PBS并不能更好地维持亚硝酸盐还原酶的稳定性,反而使酶活性大大下降,此结果与文献<sup>[21]</sup>结果不一致,可能是由于菌种的不同,对PBS的pH值和浓度的耐受性也不同。



不同小写字母表示不同反应时间同一处理组之间差异显著( $P<0.05$ )。

图4 PRO-MIX5胞内酶释放后对亚硝酸盐的作用情况

Fig. 4 Effect of PRO-MIX5 on nitrite degradation after release of intracellular enzymes

表2 混合发酵液和沉淀与水混合物在保温反应过程中对亚硝酸盐的降解率

Table 2 Degradation percentages of nitrite by fermentation broth and mixture of precipitate and water at constant reaction temperature

|       | 混合发酵液   |         | 沉淀与水混合物 |         |
|-------|---------|---------|---------|---------|
|       | 保温反应1 h | 保温反应2 h | 保温反应1 h | 保温反应2 h |
| 降解率/% | 31.31   | 37.45   | 43.31   | 53.49   |

### 2.1.3 混合发酵液和沉淀与水混合物对NDMA形成的影响

目前国标中仅规定肉制品中NDMA残留量不能超过 $3\text{ }\mu\text{g/kg}$ <sup>[30]</sup>,因此以形成NDMA的模拟体系对微生物抑制剂的制作进一步筛选。如表3所示,混合发酵液和沉淀与水混合物均极大地促进了NDMA的形成,这可能是由于本步骤采用的是肉糜培养基,且经过接菌发酵后,蛋白质降解使体系中含有二级胺类物质,为N-亚硝胺的形成提供了大量的前体物<sup>[31]</sup>。混合发酵液对NDMA形成的促进能力显著高于沉淀与水混合物( $P<0.05$ ),且其促进能力几乎为沉淀与水混合物的2倍(表3)。由于沉淀与水混合物已离心除去上清液,由此说明该发酵剂的代谢产物中可能存在着能够促进NDMA形成的物质,因而所制备的发酵液沉淀中可能存在能够抑制NDMA形成的物质,且该物质可能存在于菌体中。

表3 混合发酵液和沉淀与水混合物对NDMA形成的影响

Table 3 Effects of fermentation broth and mixture of precipitate and water on the formation of NDMA

| 添加物质    | NDMA质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|-------------------------------|
| 混合发酵液   | $64.91 \pm 2.93^{\text{A}}$   |
| 沉淀与水混合物 | $37.51 \pm 0.74^{\text{B}}$   |
| CK组     | $7.24 \pm 0.13^{\text{C}}$    |

注:肩标大写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

### 2.2 PRO-MIX5培养

为排除肉糜培养基为N-亚硝胺形成提供胺类物质等前体物,且进一步验证有效物质存在于菌体中,将PRO-MIX5接种至MRS肉汤培养基中进行培养。

## 2.2.1 不同处理方式的菌体对NDMA形成的影响

表4 处理方式对NDMA形成的影响  
Table 4 Effects of treatment on NDMA formation

| 作用方式      | NDMA质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------|-------------------------------|
| 活菌        | $13.82 \pm 0.70^{\text{B}}$   |
| 活菌保温作用2 h | $18.41 \pm 1.27^{\text{A}}$   |
| 死菌        | $11.36 \pm 1.66^{\text{C}}$   |
| 死菌保温作用2 h | $11.78 \pm 0.66^{\text{C}}$   |
| CK组       | $6.99 \pm 0.13^{\text{D}}$    |

如表4所示, 4种作用方式均不同程度地促进NDMA形成, 但促进效果远低于2.1.3节的结果, 其中活菌在模拟体系中保温2 h, NDMA形成量明显高于其他3组, 且添加活菌直接亚硝化反应组中NDMA形成量也高于死菌组, 说明在活菌保温2 h的过程中以及在80℃中反应, 活菌可能产生了一些能够促进NDMA形成的物质。而死菌在模拟体系中保温2 h对NDMA促进效果几乎一致, 且促进率较低, 对比活菌结果, 推测菌体中可能含有抑制N-亚硝胺形成的物质, 且该物质不是一种活性蛋白酶, 具有一定耐热性。

## 2.2.2 菌体不同组分对NDMA形成的影响

表5 PRO-MIX5菌体经破碎后不同位置的产物对NDMA形成的影响  
Table 5 Effect of broken cells versus supernatant of PRO-MIX5 on the formation of NDMA

| 添加量            | 处理方式 | NDMA质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----------------|------|-------------------------------|
| 0.1 g菌体细胞破碎后离心 | 上清液  | $8.81 \pm 0.24^{\text{B}}$    |
|                | 沉淀   | $5.08 \pm 0.31^{\text{D}}$    |
| 0.1 g菌体细胞破碎    | 混合体  | $11.19 \pm 0.65^{\text{A}}$   |
| CK组            |      | $7.59 \pm 0.86^{\text{C}}$    |

如表5所示, 沉淀组, 即添加PRO-MIX5的菌体碎片(包含细胞壁碎片、细胞膜碎片、细胞器、包涵体等物质)对NDMA的形成具有显著的抑制效果, 可能是由于菌体碎片对N-亚硝胺具有一定的吸附作用<sup>[18,32]</sup>, 但其具体机理仍需进一步深入研究; 上清液和混合体则促进了NDMA形成, 其中混合体组促进效果显著大于上清液, 说明沉淀物菌体碎片的存在可能会增加上清液对NDMA形成的促进作用, 其具体相互作用的机理亟待研究。

## 2.2.3 对乳酸菌培养方式、菌体碎片添加量的筛选

如表6所示, 使用添加0.04  $\mu\text{g/mL}$  NAS的MRS培养基扩增培养PRO-MIX5, 得到的菌体碎片对NDMA形成的抑制效果最佳, 随着添加量的变化, 对NDMA的抑制效果较为稳定, 且在筛选的几个添加量范围内添加量越低, NDMA的形成量越低, 可使用添加量范围较广, 以此作为为本实验筛选出的抑制NDMA形成效果较好的抑制物质, 进一步应用于实际产品的加工中。

表6 不同培养方式所制得的菌体碎片以及不同添加量对NDMA形成的影响

Table 6 Effect of addition of  $\text{NaNO}_2$  and/or NAS at different levels to MRS medium on the formation of NDMA

| MRS培养基中<br>添加物质      | 菌体碎片添加量          |                 |                 |                 |                 |
|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                      | 0.2%             | 0.5%            | 1%              | 1.5%            | 2%              |
| 无添加物质                | $7.33 \pm 0.12$  | $7.67 \pm 0.52$ | $6.35 \pm 0.53$ | $6.84 \pm 0.91$ | $5.73 \pm 0.48$ |
| $\text{NaNO}_2$      | $4.69 \pm 0.43$  | $4.45 \pm 0.27$ | $5.50 \pm 0.22$ | $6.82 \pm 0.36$ | $8.01 \pm 0.61$ |
| NAS                  | $4.23 \pm 1.01$  | $4.55 \pm 0.33$ | $4.76 \pm 0.19$ | $4.90 \pm 0.55$ | $6.20 \pm 0.28$ |
| $\text{NaNO}_2$ +NAS | $5.12 \pm 0.11$  | $4.53 \pm 0.64$ | $5.26 \pm 0.57$ | $5.24 \pm 0.84$ | $6.17 \pm 0.63$ |
| CK组                  | $12.33 \pm 0.93$ |                 |                 |                 |                 |

## 2.3 PRO-MIX5菌体碎片在红肠和培根中的应用效果

表7 PRO-MIX5菌体碎片对9种N-亚硝胺形成的影响

Table 7 Effects of addition of PRO-MIX5 debris on the formation of nine N-nitrosamines

| 品种 | 组别    | $\mu\text{g/kg}$           |                            |                            |                            |                             |                             |                             |                            |                             |
|----|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|    |       | NDMA                       | NMEA                       | NDEA                       | NDPA                       | NDBA                        | NPYR                        | NPYR                        | NMOR                       | NDPhA                       |
| 红肠 | CK    | $2.61 \pm 0.20^{\text{A}}$ | $0.85 \pm 0.15^{\text{A}}$ | $0.47 \pm 0.09^{\text{A}}$ | $0.48 \pm 0.05^{\text{A}}$ | $1.91 \pm 0.03^{\text{B}}$  | $6.06 \pm 0.10^{\text{B}}$  | $1.08 \pm 0.35^{\text{C}}$  | $1.87 \pm 0.34^{\text{A}}$ | $16.83 \pm 0.83^{\text{A}}$ |
|    | 0.05% | $1.23 \pm 0.09^{\text{B}}$ | $0.35 \pm 0.06^{\text{B}}$ | $0.44 \pm 0.10^{\text{B}}$ | $1.13 \pm 0.06^{\text{A}}$ | $3.42 \pm 0.08^{\text{C}}$  | $3.57 \pm 0.09^{\text{B}}$  | $1.73 \pm 0.09^{\text{B}}$  | $1.18 \pm 0.14^{\text{C}}$ | $5.92 \pm 0.19^{\text{D}}$  |
|    | 0.25% | $2.74 \pm 0.08^{\text{A}}$ | $0.84 \pm 0.07^{\text{A}}$ | $0.16 \pm 0.02^{\text{B}}$ | $1.11 \pm 0.15^{\text{A}}$ | $5.54 \pm 0.22^{\text{C}}$  | $4.38 \pm 0.17^{\text{C}}$  | $1.26 \pm 0.16^{\text{BC}}$ | $2.35 \pm 0.12^{\text{A}}$ | $8.61 \pm 0.23^{\text{B}}$  |
|    | 0.5%  | $0.95 \pm 0.03^{\text{B}}$ | $0.56 \pm 0.04^{\text{B}}$ | $0.23 \pm 0.04^{\text{B}}$ | $0.40 \pm 0.03^{\text{B}}$ | $8.87 \pm 0.11^{\text{A}}$  | $6.66 \pm 0.14^{\text{A}}$  | $2.56 \pm 0.06^{\text{A}}$  | $4.22 \pm 0.16^{\text{A}}$ | $3.39 \pm 0.05^{\text{D}}$  |
|    | CK    | $3.15 \pm 0.03^{\text{A}}$ | $2.17 \pm 0.01^{\text{A}}$ | $2.84 \pm 0.09^{\text{A}}$ | $8.06 \pm 0.02^{\text{A}}$ | $12.41 \pm 0.39^{\text{A}}$ | $8.30 \pm 0.60^{\text{A}}$  | $3.88 \pm 0.22^{\text{A}}$  | $1.52 \pm 0.05^{\text{D}}$ | —                           |
| 培根 | 0.05% | $2.28 \pm 0.35^{\text{A}}$ | $1.10 \pm 0.21^{\text{B}}$ | $1.69 \pm 0.25^{\text{B}}$ | $1.55 \pm 0.06^{\text{B}}$ | $14.29 \pm 0.86^{\text{A}}$ | $6.66 \pm 0.10^{\text{B}}$  | $4.70 \pm 0.60^{\text{A}}$  | $4.92 \pm 0.34^{\text{A}}$ | —                           |
|    | 0.25% | $5.39 \pm 0.38^{\text{A}}$ | $1.69 \pm 0.19^{\text{B}}$ | $2.00 \pm 0.05^{\text{B}}$ | $2.15 \pm 0.01^{\text{B}}$ | $16.33 \pm 0.11^{\text{A}}$ | $11.16 \pm 0.11^{\text{A}}$ | $4.41 \pm 0.37^{\text{A}}$  | $2.30 \pm 0.15^{\text{C}}$ | —                           |
|    | 0.5%  | $5.64 \pm 0.09^{\text{A}}$ | $2.15 \pm 0.12^{\text{A}}$ | —                          | $2.35 \pm 0.07^{\text{B}}$ | $14.64 \pm 0.10^{\text{A}}$ | $10.90 \pm 0.12^{\text{A}}$ | $3.72 \pm 0.14^{\text{A}}$  | $3.57 \pm 0.07^{\text{B}}$ | —                           |
|    | CK    | $3.15 \pm 0.03^{\text{A}}$ | $2.17 \pm 0.01^{\text{A}}$ | $2.84 \pm 0.09^{\text{A}}$ | $8.06 \pm 0.02^{\text{A}}$ | $12.41 \pm 0.39^{\text{A}}$ | $8.30 \pm 0.60^{\text{A}}$  | $3.88 \pm 0.22^{\text{A}}$  | $1.52 \pm 0.05^{\text{D}}$ | —                           |

注: —, 未检出。不同肩标字母表示不同处理组间N-亚硝胺生成量的差异显著( $P < 0.05$ )。

根据表7, 相比CK组, 在红肠中添加0.05%和0.5%的菌体碎片能够显著降低产品中NDMA的形成, 抑制率分别为53.03%和63.52%, 其中以0.05%添加量对9种N-亚硝胺总形成量的抑制效果最佳, 抑制率可达到41.04%、0.25%和0.5%添加量对9种N-亚硝胺总形成量抑制率分别为16.13%和13.48%。在培根中添加0.05%的菌体碎片抑制N-亚硝胺的效果相对较好, 对NDMA形成的抑制率为27.58%, 对9种N-亚硝胺形成总量的抑制率为13.83%, 而0.25%和0.5%添加量无显著抑制效果。说明所制得的菌体碎片不仅能够抑制产品中N-亚硝胺的形成, 且在较低添加量下就能起到抑制作用, 应用效果良好。

## 3 结论

PRO-MIX5的菌体碎片具有抑制N-亚硝胺形成的效果, 且使用添加0.04  $\mu\text{g/mL}$  NAS的MRS肉汤培养基培养PRO-MIX5, 经过4℃、5 000×g离心15 min得到菌体, 用25 mmol/L, pH 6的PBS冲洗菌体2次, 再以该PBS以1:4的比例稀释, 添加终质量浓度为1 mg/mL的溶菌酶作用后, 超声波破碎5 min, 经4℃、10 000×g离心10 min得到的沉淀(菌体碎片)为能够有效抑制N-亚硝胺形成的物质; 以添加量均为0.05%应用于红肠和培根的加工



中,对9种N-亚硝胺形成的总量抑制效果相对较好,阻断率分别为41.04%和13.83%,研究结果对肉制品安全控制方面具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 马俪珍, 张健斌, 孟培培. 食品中亚硝胺类化合物的危害及控制研究进展[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(2): 1-4; 45. DOI:10.3969/j.issn.1009-6221.2012.02.001.
- [2] 朱丽. 亚硝酸盐在食品加工中的作用及其应用[J]. 大家健康(学术版), 2013, 7(4): 19.
- [3] 国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 93; 95.
- [4] DRABIK-MARKIEWICZ G, DEJAEGHER B, DE M E, et al. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of *N*-nitrosamine in heated cured pork meat[J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1539-1545. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.149.
- [5] 李欣, 孔保华, 马俪珍. 肉制品中亚硝胺的形成及影响因素的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 353-357. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.10.091.
- [6] 曹振辉, 刘永仕, 潘洪彬, 等. 乳酸菌的益生功能及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 366-370; 377. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.072.
- [7] LIAO E, XU Y, JIANG Q, et al. Effects of inoculating autochthonous starter cultures on *N*-nitrosodimethylamine and its precursors formation during fermentation of Chinese traditional fermented fish[J]. Food Chemistry, 2019, 271(15): 174-181. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.186.
- [8] 游刚, 吴燕燕, 李来好, 等. 添加复合乳酸菌再发酵对腌干鱼肉微生物、亚硝酸盐和亚硝胺的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 109-115. DOI:10.3969/j.issn.2095-0780.2015.04.016.
- [9] 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:10.1016/j.foodcont.2016.06.039.
- [10] 赵冰, 李素, 成晓瑜, 等. 乳酸菌对羊肉风干香肠的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 109-114. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201505021.
- [11] 魏晓璐. 黄酒乳酸菌酸化发酵对降低生物胺的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 1-61.
- [12] 闫金星, 许润博, 陈萍, 等. 产亚硝酸盐还原酶的乳酸菌的筛选及诱变[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(1): 94-97.
- [13] 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, 38(1): 87-91. DOI:10.13320/j.cnki.jau.2015.0016.
- [14] 杜晓华, 刘书亮, 蒲彪, 等. 四川泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选鉴定及其应用[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 48-52. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2013.04.025.
- [15] 刘玉晗, 卢士玲, 陆静, 等. 乳酸菌中生物胺氧化酶菌株的筛选[J]. 现代食品科技, 2016, 32(4): 106-113. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.4.018.
- [16] HU Y, XIA W, GE C. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(7): 1021-1031. DOI:10.1007/s11274-006-9330-2.
- [17] NIE X, LIN S, ZHANG Q. Proteolytic characterization in grass carp sausage inoculated with *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 840-844. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.08.096.
- [18] NOWAK A, KUBERSKI S, LIBUDZISZ Z. Probiotic lactic acid bacteria detoxify *N*-nitrosodimethylamine[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014, 31(10): 1678-1687. DOI:10.1080/19440049.2014.943304.
- [19] 肖亚庆. 戊糖乳杆菌降N-亚硝胺及其在香肠发酵中的应用研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018: 26-28.
- [20] 杨汝德, 陈琼, 陈惠音. 乳酸菌发酵制品研究的现状与发展[J]. 现代食品科技, 2003, 19(b11): 79-83. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2003.s1.024.
- [21] 张馨月, 刘冬梅, 许喜林, 等. LCR 6013降解亚硝酸盐的途径及其亚硝酸盐还原酶的初步定位[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2627-2632; 2662. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.11.024.
- [22] KUNIYUKI T, TOSHIKO H, TOMOE N, et al. Inhibition of *N*-nitrosation of secondary amines *in vitro* by tea extracts and catechins[J]. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1998, 412: 91-98. DOI:10.1016/S1383-5718(97)00178-2.
- [23] 苑宝玲, 陈彩云, 李云琴, 等. 假单胞菌胞内酶粗提液对藻毒素MCLR的降解[J]. 环境化学, 2009, 28(6): 854-858. DOI:10.3321/j.issn:0254-6108.2009.06.016.
- [24] 李秀明, 马俪珍. HPLC法同时检测果蔬及肉制品中硝酸盐和亚硝酸盐含量[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 301-307. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201812046.
- [25] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中N-亚硝胺类化合物的测定: GB 5009.26—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-12.
- [26] 国家卫生和计划生育委员会. 食品pH值的测定: GB 5009.237—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-4.
- [27] 张志焱, 刘红莲, 刘海涛, 等. 乳酸菌发酵上清液对肉仔鸡生产性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(15): 78-82. DOI:10.3969/j.issn.0258-7033.2013.15.020.
- [28] 应碧, 昌晓宇, 刘志文, 等. 亚硝酸盐胁迫下植物乳杆菌WU14亚硝酸盐还原酶的食品级高效诱导表达及其酶学性质研究[J]. 中国农业科学, 2015, 48(7): 1415-1427. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2015.07.16.
- [29] 唐爱明. 乳酸菌降解肉制品中亚硝酸盐机理及菌株筛选研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004: 9.
- [30] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 10-11.
- [31] WARTHESEN J J, SCANLAN R A, BILLS D D, et al. Formation of heterocyclic *N*-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1975, 23: 898-902. DOI:10.1016/j.cnsns.2014.06.007.
- [32] FAGHFOORI Z, GARGARI B P, GHARAMALEKI A S, et al. Cellular and molecular mechanisms of probiotics effects on colorectal cancer[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 463-472. DOI:10.1016/j.jff.2015.08.013.