

降 *N*-亚硝胺乳酸菌的筛选及其降解特性研究

郭进¹, 晓燕², 刘培清³, 刘宗益⁴, 苏琳¹, 赵丽华¹, 靳焯^{1*}

¹ 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018

² 呼和浩特市抽样监测与重大活动保障中心 呼和浩特 010018

³ 乌兰察布市市场监督管理局 内蒙古乌兰察布 013750

⁴ 乌拉特中旗农牧和科技局 内蒙古巴彦淖尔 015300

摘要 采用高效液相色谱(HPLC)法检测乳酸菌与亚硝胺共培养体系中 *N*-亚硝胺(NAs)的含量,从分离自内蒙古传统发酵制品的 16 株乳酸菌中筛选具有高效降亚硝胺能力的乳酸菌,揭示其降解特性。结果表明:植物乳杆菌 AL6-1 能够高效降解亚硝胺,在培养 36 h、初始 pH 4.5、温度 37 °C 和接种浓度 10¹⁰ CFU/mL 的条件下降解效果提高,*N*-二甲基亚硝胺(NDMA)和 *N*-二乙基亚硝胺(NDEA)最高降解率分别达 63.90% 和 61.65%,且植物乳杆菌 AL6-1 胞内提取液在 6 h 内对 NDMA 和 NDEA 降解率分别达 70.28% 与 71.88%,确定其清除亚硝胺主要是通过胞内提取液的降解作用。

关键词 乳酸菌; *N*-亚硝胺; 筛选; 降解

文章编号 1009-7848(2023)06-0048-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.06.006

N-亚硝胺(NAs)通常是由胺类物质的亚硝化反应生成^[1],其分子式为 R₁NNOR₂,根据分子质量和蒸汽压大小可分为挥发性亚硝胺和非挥发性亚硝胺^[2],其中挥发性亚硝胺广泛存在于食品中,尤其是加工肉制品,是四大食品污染物之一^[3]。大多数亚硝胺具有致癌、致畸、致突变性和很强的基因毒性,与多种器官癌症的发生相关,尤其是食管、肝脏和肾脏的癌症,并可通过胎盘传递给下一代而受到人们的高度关注^[4-5]。

食品污染是一个严重影响食品安全和人类健康的问题。乳酸菌作为益生菌不仅能够提高食品的品质和营养价值,还可在人体中发挥重要生理功能,且近年来益生菌可控制食品中有害物质产生的重要功能已受到广泛关注^[6]。有研究表明乳酸菌可通过吸附或降解途径直接减少食品加工过程中产生的生物胺^[6]、亚硝胺^[7]、苯并芘^[8]和真菌毒素^[9]等污染物。目前,降亚硝胺的乳酸菌主要通过抑制 NAs 形成和清除已生成的 NAs 降低 NAs 的含量。

李秀明^[10]研究发现菌体碎片具有抑制 NDMA 形成的作用。Kim 等发现乳酸菌可直接降低 MRS 培养基中 NDMA 的含量。Nowak 等^[12]研究发现乳酸菌对 NDMA 的抑制能力受环境因素和菌株的影响,且培养上清液、膜提取物和胞内提取物均能不同程度地降低 NDMA 含量。然而,肖亚庆^[13]研究发现菌株降解 NAs 的有效成分为细胞壁上的假定蛋白。

为弄清降亚硝胺乳酸菌的特性,本研究以危害性最强的 NDMA 和 NDEA 作为筛选菌株的依据,采用 HPLC 筛选具有高效降亚硝胺能力的乳酸菌,研究 NAs 胁迫对菌株生长量的影响以及不同环境因素对菌株降亚硝胺能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

16 株乳酸菌,分离自内蒙古传统发酵制品(酸奶、腌菜、风干肉),内蒙古农业大学肉品科学与技术团队提供;乙腈(色谱纯,Fisher),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;EPA 8270/Appendix IX 亚硝胺标品(纯度≥99%,产品编号:502138),Sigma-Aldrich 公司。

Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm) 色谱柱、1260 安捷

收稿日期:2022-06-22

基金项目:内蒙古成果转化项目(2019CG066);内蒙古自治区科技计划项目(201802067);内蒙古自治区自然科学基金重大专项(20202D11);国家自然科学基金项目(32160589)

第一作者:郭进,女,硕士生

通信作者:靳焯 E-mail: jinyeyc@sohu.com

伦高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;SCI-ENTZ-950E 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技有限公司;SYNERGY H1 酶标仪,雷康恒泰北京商贸有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的培养与筛选 乳酸菌的活化:将实验室中甘油保藏的乳酸菌接种至 MRS 培养基,以体积分数 2% 的接种量于 28 °C/37 °C 条件下经 2 次连续传代培养。降亚硝胺能力的测定:参照肖亚庆^[13]的方法略作修改。将 16 株活化好的乳酸菌按 2% 接种量分别接入 MRS 培养基中,添加质量浓度为 20 μg/mL 的 NAs 标品,使其终质量浓度为 1 μg/mL,放置于 28 °C/37 °C 培养箱中培养 12 h,对照组中不接菌并同等条件下培养。参照方法 GB 5009.26-2016 《食品中 *N*-亚硝胺类化合物的测定》提取培养基中的 NAs,测定其含量,筛选可高效降低 NAs 含量的菌株。

$$\text{亚硝胺清除率} = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100\%$$

式中: S_0 ——对照组上清液亚硝胺含量; S_1 ——试验组上清液亚硝胺含量。

1.2.2 亚硝胺含量的测定 采用 HPLC 测定 NAs 的含量。检测参考肖付刚等^[14]的方法,采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm) 色谱柱,二元梯度洗脱,水相流动相 A 为乙腈,有机流动相 B 为纯水,流速 1 mL/min,进样体积 10 μL,柱温为 25 °C,于 240 nm 处紫外检测器进行测定。具体梯度洗脱程序如表 1 所示。所有样品检测前均经过 0.45 μm 膜过滤。利用 HPLC 进行检测,NDMA 与 NDEA 的保留时间分别为 3.15 和 4.34 min,其标准曲线方程分别为 $y=41.858x-1.8024$ ($R^2=0.9986$) 和 $y=24.861x+0.6011$ ($R^2=0.9993$) (y 为峰面积, x 为亚硝胺浓度)。

表 1 梯度洗脱程序表

Table 1 The gradient elution program

时间/min	流动相	
	A/%	B/%
0.00	20	80
3.00	35	65
16.00	90	10
25.00	20	80

1.2.3 菌株在正常培养和 NAs 胁迫下的生长曲线 将菌株以 2% 的接种量分别接种于普通 MRS 和 NAs 浓度为 1 μg/mL 的 MRS 培养基中,在培养时间 0,2,4,6,8,12,16,20 和 24 h 取样,测定菌液 OD_{600nm} 值,绘制生长曲线。

1.2.4 不同环境因素对菌株降亚硝胺能力的影响

1.2.4.1 时间对乳酸菌降亚硝胺能力的影响 参考 1.2.1 节的方法,将活化后的乳酸菌与亚硝胺于 MRS 培养基中共培养,通过 HPLC 依次测定培养时间为 0,12,24,36,48,72,96,120 和 144 h 的 NAs 含量,研究时间对菌株降亚硝胺能力的影响。

1.2.4.2 初始 pH 值对菌株降亚硝胺能力的影响

参考 1.2.1 节的方法,NAs 质量浓度为 1 μg/mL 的 MRS 培养基在初始 pH 值为 3.5,4.5,5.5,6.5 和 7.5 条件下,对照组中不接菌并同等条件下培养,通过 HPLC 测定不同初始 pH 值条件下 NAs 的含量,计算菌株对 NAs 的清除率。

1.2.4.3 培养温度对菌株降亚硝胺能力的影响

参考 1.2.1 节的方法,在共培养体系中培养温度为 20,28,37 和 45 °C 条件下,对照组中不接菌并同等条件下培养,通过 HPLC 测定不同培养温度条件下 NAs 的含量,计算菌株对 NAs 的清除率。

1.2.4.4 接种浓度对菌株降亚硝胺能力的影响

参考 1.2.1 节的方法,在乳酸菌接种浓度为 10⁶,10⁷,10⁸,10⁹ 和 10¹⁰ CFU/mL 条件下,对照组中不接菌并同等条件下培养,通过 HPLC 测定不同接种浓度条件下 NAs 的含量,计算菌株对亚硝胺的去除率。

1.2.5 不同细胞组分对菌株降亚硝胺能力的影响

参考 Nowak 等^[12]的方法略作修改,研究胞内提取物、胞外代谢物和细胞壁对 NAs 的清除作用。将第 3 代菌液在 4 °C,12 000 g 条件下离心 15 min 得菌株胞外提取液与菌体沉淀。然后加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)悬浮清洗菌体沉淀 3 次,再经超声破碎(300 W,工作 2 s,间歇 3 s,180 次,0 °C)后再次离心(12 000 g,15 min,4 °C)后收集上清得胞内提取液。将菌体沉淀重悬于 PBS 中,并通过 100 °C 高温加热处理 10 min 致死后可得到细胞壁。分别添加 NAs 至上述胞内提取液、胞外代谢物和细胞壁中,使其终质量浓度为 1 μg/mL,以终质量浓度为 1 μg/mL 亚硝胺

的 PBS 缓冲液及 MRS 培养基作为对照,置于培养箱培养,分别在 0,0.5,3,6,12,24 和 36 h 取样,经 HPLC 测定 NAs 含量。

1.3 数据处理

所有数据均平行测定 3 次,用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 Origin2018 软件绘制图表, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 降亚硝胺乳酸菌的筛选

将分离自内蒙古传统发酵制品的 16 株乳酸菌于 MRS 培养基中与 NAs 共培养,利用 HPLC 检测亚硝胺的含量。结果如表 2 所示,不同菌株的降亚硝胺能力具有特异性,与肖亚庆^[13]和 Kim 等^[11]研究结果一致。由表可知,植物乳杆菌 AL6-1 对培养基中 NDMA 的去除率为 27.95%,显著高于其

它菌株($P < 0.05$),而植物乳杆菌 ML2-2、植物乳杆菌 37X-6 和戊糖片球菌 37X-8 对 NDMA 有不同程度的促进作用,清除率分别为 -1.49%, -7.11%和 -5.11%,此现象与李木子^[15]研究结果一致,原因是亚硝胺具有挥发性,在培养过程中 NAs 含量发生不同程度变化。16 株乳酸菌对 NDEA 的清除率范围为 -9.77%~25.23%,其中植物乳杆菌 37X-6 对培养基中 NDEA 的去除率显著高于其它菌株($P < 0.05$),为 25.23%,而植物乳杆菌 AL6-1、CL4-3、X3-2B、37X-11 和瑞士乳杆菌 SL-1 与植物乳杆菌 37X-6 的降亚硝胺能力无显著差异($P > 0.05$),分别为 20.32%,19.14%,17.17%,19.96%和 25.09%。植物乳杆菌 AL6-1 对 2 种 NAs 的降低率之和为 48.27%,因此选取具有较高降亚硝胺能力的植物乳杆菌 AL6-1 用于后续研究。

表 2 不同菌株的降亚硝胺能力

Table 2 Decreasing effect of different strains on concentrations of NAs

菌种名称	菌株编号	清除率/%	
		NDMA	NDEA
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	AL6-1	27.95 ± 1.53 ^a	20.32 ± 1.94 ^{ab}
	BL4-8	11.44 ± 2.02 ^c	4.92 ± 1.50 ^c
	CL4-3	11.99 ± 1.27 ^c	19.14 ± 1.89 ^{ab}
	ML2-2	-1.49 ± 0.38 ^{cd}	-0.23 ± 0.13 ^c
	X3-2B	2.40 ± 0.60 ^{de}	17.17 ± 0.78 ^{ab}
	37X-6	-7.11 ± 2.40 ^e	25.23 ± 1.33 ^a
戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	30X-5	20.36 ± 1.89 ^b	-2.12 ± 0.78 ^c
	30X-7	22.99 ± 2.92 ^b	-9.77 ± 1.14 ^c
	37X-8	-5.11 ± 1.13 ^e	-0.53 ± 0.19 ^c
	37X-9	6.14 ± 0.81 ^d	16.34 ± 2.39 ^b
	37X-11	21.47 ± 2.42 ^b	19.96 ± 3.21 ^{ab}
	37X-13	24.00 ± 2.91 ^b	15.82 ± 2.08 ^b
	37X-14	10.51 ± 1.52 ^c	2.34 ± 0.86 ^c
	37X-15	2.47 ± 0.24 ^{de}	4.65 ± 0.83 ^c
乳酸片球菌 (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	X3-4B	11.82 ± 2.87 ^c	16.63 ± 0.85 ^b
瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i>)	SL-1	17.24 ± 1.12 ^{de}	25.09 ± 43.83 ^a

注:同一列不同上标字母的均值间存在显著差异($P < 0.05$)。

2.2 植物乳杆菌 AL6-1 在正常培养和 NAs 胁迫下的生长曲线

由图 1 可知,在 MRS 培养基中植物乳杆菌 AL6-1 在接种后 4 h 后迅速进入对数生长期,20 h 进入稳定期,最大生物量为 $OD_{600nm} = 1.75$;在亚硝胺终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 MRS 培养基中,植物

乳杆菌 AL6-1 的生物量低于正常条件,且 20 h 内未明显进入稳定期,最大生物量为 $OD_{600nm} = 1.72$ 。由此可知,亚硝胺在一定程度上可抑制植物乳杆菌 AL6-1 的生长,可能由于亚硝胺具有毒性^[13],导致细胞损伤,从而延长乳酸菌的迟滞期并降低对数期的生长速率。

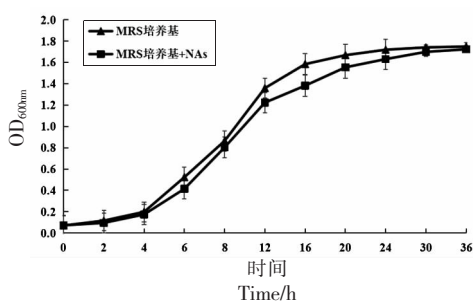


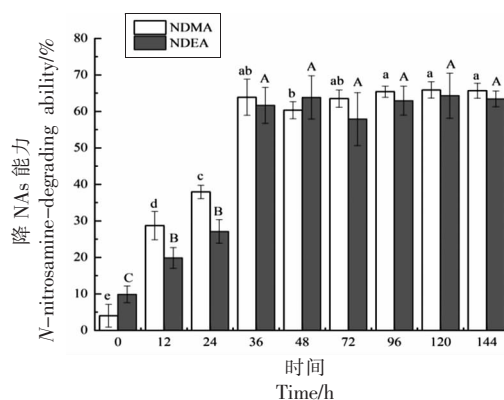
图 1 植物乳杆菌 AL6-1 在正常条件和亚硝胺胁迫下的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *L. plantarum* AL6-1 in normal conditions and under the stress of NAs

2.3 不同环境因素对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响

2.3.1 培养时间对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响 Nowak 等^[12]认为乳酸菌降低 NDMA 能力取决于菌株的生长期。由图 2 可知,植物乳杆菌 AL6-1 对 NDMA 和 NDEA 清除率变化趋势相同,在 0~36 h,亚硝胺清除率随着时间延长呈现增长趋势,在清除时间为 36 h 时,NDMA 和 NDEA 清除率已经趋于稳定,此时清除率分别为 63.90% 和 61.65%,与 48,72,96,120 和 144 h 无显著差异 ($P>0.05$)。推测原因可能是乳酸菌在含亚硝胺的培养体系中缓慢进入对数生长期,在 36 h 到达稳定期,使其降解率达到最大值且趋于稳定,在此过程中随着乳酸菌数量增多导致亚硝胺含量急剧下降。

2.3.2 初始 pH 值对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响 pH 值对菌株的降解和吸附作用具有重要影响,其可以通过改变微生物的生长繁殖及酶活性影响降解能力,并在吸附过程中可对离子交换过程以及细胞壁上官能团的电离状态产生一定影响^[16]。由图 3 可知,在 pH 3.5~7.5 时,植物乳杆菌 AL6-1 对 NDMA 和 NDEA 均具有降 NAs 能力且变化趋势相同,呈先上升后下降趋势;当 pH 4.5 时,亚硝胺清除率显著高于其它组 ($P<0.05$),为 37.63%;随着 pH 值的升高,亚硝胺清除率在 pH 6.5 时基本趋于稳定,此时清除率为 26.51%,与 pH 7.5 时无显著性差异 ($P>0.05$)。因此,可确定 pH 4.5 为植物乳杆菌 AL6-1 降低 NAs



注:不同小写字母表示植物乳杆菌 AL6-1 对 NDMA 去除率差异显著 ($P<0.05$),不同大写字母表示 *L. plantarum* AL6-1 对 NDEA 去除率差异显著 ($P<0.05$),下同。

图 2 培养时间对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响
Fig.2 Effect of incubation time on degradation of NAs by *L. plantarum* AL6-1

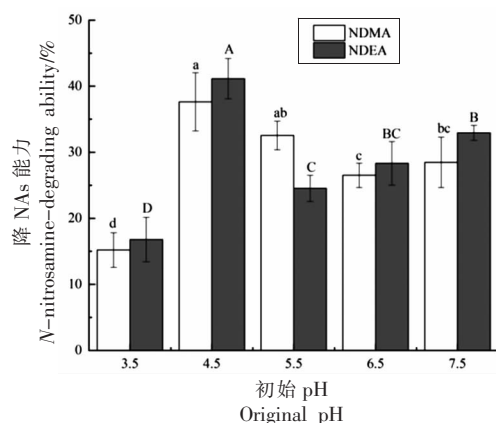


图 3 初始 pH 值对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响
Fig.3 Effect of pH value on degradation of NAs by *L. plantarum* AL6-1

含量的最适 pH 值。孙学颖等^[17]发现产品在发酵阶段 pH 值可降到最低,pH 值为 4.69,同时亚硝胺含量达到最低值,推测在 pH 值较低条件下乳酸菌对亚硝胺起到降解作用,与本试验研究结果一致。

2.3.3 培养温度对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响 温度对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响如图 4 所示,在培养温度为 20~45 °C 时,植物乳杆菌 AL6-1 对 NDMA 和 NDEA 均具有降 NAs 能力且变化趋势相同,呈先上升后下降趋势。当温度在 20~37 °C 范围内时,NAs 清除率随着温度的升高而增长;当培养温度为 37 °C 时,NDMA

和 NDEA 清除率分别为 35.00% 和 28.81%，显著高于其它温度 ($P < 0.05$)，可确定 37 °C 为植物乳杆菌 AL6-1 降低 NAs 的最适培养温度；当温度高于 37 °C 时，NAs 清除率显著降低 ($P < 0.05$)。原因可能是培养温度通过影响细胞膜流动性、细胞结构、细胞膜脂肪酸和蛋白质的组成及含量以及酶活性来影响乳酸菌的生长和代谢，进而影响菌株的降 NAs 能力^[18]。

2.3.4 接种浓度对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响 接种浓度对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响如图 5 所示。随着接种浓度的增加，植物乳杆菌 AL6-1 对 NDMA 的清除率逐步增

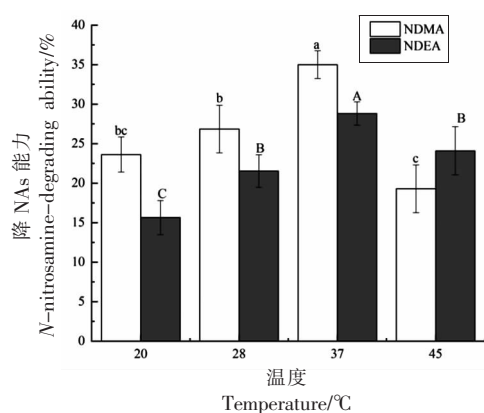


图 4 培养温度对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响
Fig.4 Effect of incubation temperature on degradation of NAs by *L. plantarum* AL6-1

2.4 不同细胞组分对植物乳杆菌 AL6-1 降亚硝胺能力的影响

植物乳杆菌 AL6-1 不同细胞组分对 NAs 的降解作用如表 3 所示，胞内提取物对 NDMA 和 NDEA 含量的变化趋势相同，在 0~6 h 范围内亚硝胺含量随着时间增加而逐渐降低；在 6 h 时，NDMA 和 NDEA 含量已经趋于稳定，其含量分别为 0.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此时降解率分别为 70.28% 与 71.88%，显著低于 0, 0.5, 3 h 时亚硝胺的含量 ($P < 0.05$)，而与 12, 24, 36 h 无显著差异 ($P > 0.05$)，研究结果表明植物乳杆菌 AL6-1 胞内酶对亚硝胺具有降解作用。肖亚庆^[13]研究发现戊糖乳杆菌 R3 胞内提取液对 NAs 具有一定降解作用，但降解能力不显著 ($P > 0.05$)。Nowak 等^[12]发现胞内提取液可降低 NAs 含量，并且菌株可以将 NDMA

加，当接种浓度为 10^{10} CFU/mL 时，NDMA 清除率显著高于其它组 ($P < 0.05$)，为 26.58%。而植物乳杆菌 AL6-1 对 NDEA 的清除率在接种浓度为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内无显著差异 ($P > 0.05$)；当接种浓度高于 10^8 CFU/mL 时，NDEA 的清除率随着接种浓度的增加而增大，当接种达到 10^{10} CFU/mL，NDEA 含量显著降低 ($P < 0.05$)，其清除率为 19.67%。结果显示，在一定接种浓度范围内，植物乳杆菌 AL6-1 的降 NAs 能力与接种浓度之间呈正相关关系，与肖亚庆^[13]的研究结果一致，因此确定接种浓度 10^{10} CFU/mL 为植物乳杆菌 AL6-1 的最适接种浓度。

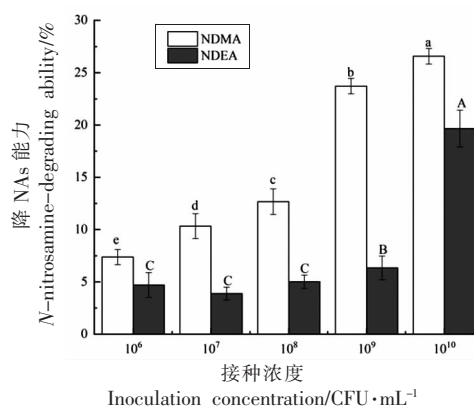


图 5 接种浓度对植物乳杆菌 AL6-1 降 NAs 能力的影响
Fig.5 Effect of inoculation concentration on degradation of NAs by *L. plantarum* AL6-1

作为氮源利用。Grill 等^[19]研究发现双歧杆菌 BB536 的胞内提取物具有降低亚硝胺含量的能力，且热变性后未观察到亚硝胺含量变化，结果表明胞内提取液中的酶反应参与了亚硝胺的降解过程，与本试验研究结果一致。由以上分析可知植物乳杆菌 AL6-1 胞内提取液的降解作用可能是其清除 NAs 的主要途径。

植物乳杆菌 AL6-1 胞外代谢物对 NAs 清除效果在 36 h 内无显著差异。NAs 与胞外代谢物共培养 36 h 后，NDMA 和 NDEA 含量分别为 0.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，表明植物乳杆菌 AL6-1 通过代谢作用所产生的胞外代谢物不能降解亚硝胺。

灭活后的植物乳杆菌 AL6-1 细胞壁与 NAs 共培养 36 h，在 0 h，培养体系中 NDMA 含量显著

低于胞内提取物与胞外代谢物 ($P < 0.05$), 为 $0.93 \mu\text{g/mL}$, 对 NDEA 含量无显著影响 ($P > 0.05$); 在 0~36 h, 培养体系中 NDMA 和 NDEA 含量范围分别

为 $0.91\sim 0.93 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.93\sim 0.96 \mu\text{g/mL}$, 无显著差异 ($P > 0.05$), 表明植物乳杆菌 AL6-1 细胞壁可在短时间内吸附 NDMA, 吸附率为 4.12%。

表 3 胞内提取液对 NAs 的降解作用

Table 3 Degrading effect of different cell components on concentrations of NAs

时间/h	NDMA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			NDEA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	胞内提取物	胞外代谢物	细胞壁	胞内提取物	胞外代谢物	细胞壁
0	$0.97 \pm 0.00^{\text{Aa}}$	$0.97 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.93 \pm 0.03^{\text{Ab}}$	$0.98 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.97 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.96 \pm 0.01^{\text{Aa}}$
0.5	$0.77 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$0.98 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$0.92 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.79 \pm 0.01^{\text{BCb}}$	$0.96 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.96 \pm 0.00^{\text{Aa}}$
3	$0.73 \pm 0.02^{\text{Cc}}$	$0.96 \pm 0.03^{\text{Aa}}$	$0.92 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$0.76 \pm 0.01^{\text{Bb}}$	$0.95 \pm 0.04^{\text{Aa}}$	$0.95 \pm 0.02^{\text{Aa}}$
6	$0.68 \pm 0.01^{\text{Dc}}$	$0.96 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.92 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.71 \pm 0.01^{\text{Cb}}$	$0.96 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.96 \pm 0.03^{\text{Aa}}$
12	$0.66 \pm 0.01^{\text{Dc}}$	$0.96 \pm 0.03^{\text{Aa}}$	$0.91 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.69 \pm 0.02^{\text{Db}}$	$0.95 \pm 0.03^{\text{Aa}}$	$0.95 \pm 0.01^{\text{Aa}}$
24	$0.66 \pm 0.00^{\text{Dc}}$	$0.95 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$0.92 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$0.70 \pm 0.02^{\text{Cb}}$	$0.96 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.93 \pm 0.03^{\text{Aa}}$
36	$0.67 \pm 0.02^{\text{Dc}}$	$0.95 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$0.91 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$0.68 \pm 0.01^{\text{Db}}$	$0.94 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$0.94 \pm 0.01^{\text{Aa}}$

注: 同一列不同大写上标字母表示不同时间条件下 NAs 含量存在显著差异 ($P < 0.05$), 同一行不同小写字母表示不同细胞组分对 NDMA 和 NDEA 的降解作用存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3 结论

本试验利用 HPLC 筛选具有高效降亚硝胺能力的菌株, 并揭示其降解特性及机理。研究表明植物乳杆菌 AL6-1 具有高效降亚硝胺能力, 在亚硝胺终质量浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的共培养体系中 NDMA 和 NDEA 的降解率分别为 27.95% 和 18.32%; 且植物乳杆菌 AL6-1 降解能力受不同环境因素的影响, 确定其最佳培养时间为 36 h, 最适 pH 值为 4.5, 最适温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 最佳接种浓度为 10^{10} CFU/mL ; 通过研究植物乳杆菌 AL6-1 胞内酶提取液、胞外代谢物及细胞壁对 NAs 含量的影响, 发现清除 NAs 主要是通过胞内提取液的降解作用, 在 6 h 时, NDMA 和 NDEA 降解率分别为 70.28% 与 71.88%, 且细胞壁对 NAs 有一定的吸附作用。本研究为该菌株能进一步应用于食品中降低亚硝胺含量提供重要参考依据。

参 考 文 献

- [1] EVELINE D M, HANNELORE D M, HUBERT P, et al. Volatile *N*-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(13): 2909-2923.
- [2] YURCHENKO S, MÖLDER U. The occurrence of volatile *N*-nitrosamines in Estonian meat products [J]. *Food Chemistry*, 2005, 100 (4): 1713-1721.
- [3] 邓秀英. 食品中亚硝胺类与癌及其预防[J]. *中国食品卫生*, 1999, 11(1): 49-50.
DENG X Y. Nitrosamines in food and cancer and its prevention (review)[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 1999, 11(1): 49-50.
- [4] 刘雨萱, 黄晓红, 徐晔, 等. 肉制品中 *N*-亚硝胺的危害、形成机制及乳酸菌对其控制效果的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(16): 283-289.
LIU Y X, HUANG X H, XU Y, et al. The progress of carcinogenic effects of nitrosamines on meat products a its controlling by lactic acid bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46 (16): 283-289.
- [5] SHAO X, XU B, CHEN C, et al. The function and mechanism of lactic acid bacteria in the reduction of toxic substances in food: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62 (21): 5950-5963.
- [6] 刘彩霞, 刘双平, 徐岳正, 等. 乳酸菌强化技术降低黄酒浸米过程生物胺的积累[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 166-173.
LIU C X, LIU S P, XU Y Z, et al. Reducing biogenic amines accumulation in rice soaking process of Huangjiu based on enhancing technique of *Lactobacillus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(5): 166-173.

- [7] 孙学颖, 王甜, 刘建林, 等. 发酵剂和蛋清对调理肉饼中亚硝胺含量的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 177-184.
SUN X Y, WANG T, LIU J L, et al. Effect of starter and albumen on *N*-nitrosamine formation in beef patties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 177-184.
- [8] 漆叶琼, 张佳涛, 潘向辉, 等. 乳杆菌吸附苯并芘的特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 956-964.
QI Y Q, ZHANG J T, PAN X H, et al. Binding of benzo (a) pyrene by *Lactobacilli* strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(7): 956-964.
- [9] 唐璎, 孟宪刚, 邓展瑞, 等. 西北酸菜中吸附黄曲霉毒素 B1 乳酸菌株的筛选鉴定及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 60-65.
TANG Y, MENG X G, DENG Z R, et al. Screening and stability of an aflatoxin B1-adsorbing lactic acid bacterium isolated from pickled vegetable in northwest China[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 60-65.
- [10] 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.
LI X M, LIU J J, YAN L J, et al. Inhibition mechanism and application of lactic acid bacteria on *N*-nitrosamine formation[J]. Food Science, 2020, 41(2): 141-147.
- [11] 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.
- [12] ADRIANA N, SŁAWOMIR K, ZDZISŁAWA L. Probiotic lactic acid bacteria detoxify *N*-nitrosodimethylamine [J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2014, 31(10): 1678-1687.
- [13] 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.
XIAO Y Q. Decrease of *N*-nitrosamines by *Lactobacillus pentosus* R3 and its utilization in sausage fermentation[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018: 26-28.
- [14] 肖付刚, 赵钧馨, 孙军涛, 等. HPLC 同时检测肉制品中 9 种亚硝胺[J]. 食品科技, 2018, 43(10): 352-356.
XIAO F G, ZHAO J X, SUN J T, et al. Screening for 9 nitrosamines in meat products sold in the market by HPLC[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(10): 352-356.
- [15] 李木子. 微生物发酵技术降低风干肠中亚硝胺的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
LI M Z. Degradation of nitrosamines in Harbin dry sausages by microbial fermentation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [16] LI X H, XU H X, GAO B, et al. Efficient biosorption of Pb (II) from aqueous solutions by a PAH-degrading strain *Herbaspirillum chlorophenolicum* FA1[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2018, 57(25): 64-71.
- [17] 孙学颖, 辛晓琦, 刘建林, 等. 复合发酵剂和香料对发酵香肠中 *N*-亚硝胺形成的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 194-202.
SUN X Y, XIN X Q, LIU J L, et al. Inhibition of compound fermentation agents and spices on *N*-nitrosamine formation in fermented sausage[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 194-202.
- [18] 杨胜平, 章缜, 程颖, 等. 培养温度对腐败希瓦氏菌 DSM6067 生长动力学及细胞膜理化特性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 228-236.
YANG S P, ZHANG Z, CHENG Y, et al. Effects of culture temperature on the growth parameters of *Shewanella putrefaciens* DSM6067 and its membrane physic-chemical properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 228-236.
- [19] GRILL J P, CROCIANI J, BALLONGUE J. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines[J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20(5): 328-330.

Screening, Degradation Characteristics and Mechanism of Lactic Acid Bacteria with Degradation of *N*-Nitrosamine

Guo Jin¹, Xiao Yan², Liu Peiqing³, Liu Zongyi⁴, Su Lin¹, Zhao Lihua¹, Jin Ye^{1*}

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

²Hohhot Sampling Monitoring and Major Activities Support Center, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

³Ulanqab Market Supervision and Administration, Ulanqab 013750, Inner Mongolia

⁴Urad Middle Banner Agriculture, Animal Husbandry and Science and Technology Bureau, Bayannur 015300,

Inner Mongolia)

Abstract The lactobacillus with high *N*-nitrosamine-degrading ability was screened from 16 strains of lactobacillus isolated from traditional fermentation products in Inner Mongolia by high performance liquid chromatography which was used to detect the content of *N*-nitrosamine in the co-culture system of lactic acid strain and *N*-nitrosamine, and its degradation characteristics and mechanism were revealed. The study showed that *L.plantarum* AL6-1 could efficiently degrade *N*-nitrosamines, and the degradation effect could be improved when the incubation time was 36 h, the initial pH was 4.5, the temperature was 37 °C or the inoculation concentration was 10¹⁰ CFU/mL in the culture system with the final concentration of *N*-nitrosamines of 1 µg/mL. The maximum degradation effect of *N*-dimethylnitrosamine and *N*-diethylnitrosamine was 63.90% and 61.65%, respectively. And the degradation rate of *L.plantarum* AL6-1 intracellular extract on NDMA and NDEA reached 70.28% and 71.88%, respectively, within 6 hours. It was determined that the removal of nitrosamines was mainly through the degradation of intracellular extract.

Keywords lactic acid bacteria; *N*-nitrosamines; screening; degradation