

# 紫外线与亚硝基胍复合诱变选育高效 降解亚硝酸盐乳酸菌

李文涛, 苏肖晶, 陈萍\*

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118)

**摘要:** **目的** 通过诱变方法获得高效降解亚硝酸盐的优良乳酸菌应用于降低腌制品中的亚硝酸盐。**方法** 以前期实验筛选获得的降解亚硝酸盐性能较强乳酸菌 D2 作为初始诱变菌株, 采用紫外线和亚硝基胍复合诱变, 选育高效降解亚硝酸盐的乳酸菌。**结果** 经 15 W 紫外线和 0.5 mg/mL 亚硝基胍三轮复合诱变得得到一株优良乳酸菌, 该菌株 24 h 降解亚硝酸盐(200 mg/L)降解率为 91.4%, 较初始菌株提高了 12.7%; 以亚硝酸钠为底物, 其产亚硝酸盐还原酶的比活力为 7.7 mmol/L, 较诱变前提高 42.9%; 连续传代培养后降解亚硝酸盐能力和产亚硝酸盐还原酶活力性能稳定。**结论** 通过紫外线和亚硝基胍复合诱变, 获得一株遗传稳定性良好的高效降解亚硝酸盐的菌株。

**关键词:** 诱变; 亚硝基胍; 紫外线; 亚硝酸盐; 乳酸菌

## Screening of high quality nitrite degrading *Lactobacillus* by UV/NTG mutagenesis

LI Wen-Tao, SU Xiao-Jing, CHEN Ping\*

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**ABSTRACT: Objective** To obtain efficient nitrite degrading lactic acid bacteria by mutagenesis. **Methods** With the strain D2 isolated in the preliminary work as the original strain, the UV/NTG mutagenesis were used to prepare for screening. **Results** After mutagenesis with 15 W UV and 0.5 mg/mL nitrosoguanidine for three times, the new strain obtained degraded 91.4% nitrite (200 mg/L) after cultivation for 24 h, increasing by 12.7% compared with the original. With sodium nitrite as the substrate, the activity of nitrite reductase enzyme reached 7.7 mmol/L, increasing by 42.9%. The ability of nitrite degradation and the activity of nitrite reductase were stable after several generations. **Conclusion** A high quality nitrite degrading strain stable genetic characteristics was obtained via UV/NTG mutagenesis.

**KEY WORDS:** mutagenesis; nitrosoguanidine; UV; nitrite; *Lactobacillus*

基金项目: 吉林省科技支撑重点项目(20120249)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Project of Jilin Province(20120249)

\*通讯作者: 陈萍, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: ccchenping@sina.com

\*Corresponding author: CHEN Ping, Professor, Jilin Agricultural University, No.2888, Xincheng Road, Nangan District, Changchun130118, China. E-mail: ccchenping@sina.com

## 1 引言

发酵腌制食品在中国已有悠久的历史,直到现在,食品腌制过程中的微生物和酶的作用过程仍未被完全阐明,但乳酸菌对腌制品的风味形成、安全性方面都有重要作用<sup>[1]</sup>。在蔬菜腌制过程中,部分微生物能将蔬菜中的硝酸盐还原为亚硝酸盐,当人体摄入亚硝酸盐后,亚硝酸盐能和胃中的含氮化合物结合成具有致癌性的亚硝胺,对人体健康产生危害<sup>[2]</sup>;何淑玲等<sup>[3]</sup>采用人工接种乳酸菌技术来降低腌制品中亚硝酸盐,同时缩短蔬菜制品的发酵周期,改善发酵蔬菜的品质。Oh等<sup>[4]</sup>研究还表明乳酸菌产的亚硝酸盐还原酶也能够降解腌制品中的亚硝酸盐,且该酶是此过程的限速酶,制约着亚硝酸盐还原的速率。本实验在前期工作中筛选获得了降解亚硝酸盐能力较强的乳酸菌,为进一步获得降解效果更好的菌株,采用紫外线和亚硝基胍复合诱变技术,筛选具有高效降解亚硝酸盐性能的乳酸菌菌株,并对其产亚硝酸盐还原酶活力进行测定。这样的“天然食品发酵剂”对缩短蔬菜腌制周期,提高产品品质和安全性具有重要意义。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

菌株:实验前期从酸菜中筛选的降解亚硝酸盐乳酸菌 D2。

主要试剂: MRS 培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司);亚硝基胍(1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, NTG 上海蓝季科技发展有限公司日本进口);甲基紫精(阿拉丁试剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

### 2.2 仪器与设备

JYP2-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Delta320 pH 计(梅特勒-托利多(上海)有限公司);UV-1800 紫外可见分光光度计(岛津贸易(上海)有限公司);高速冷冻离心机(上海精宏实验室设备有限公司)。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 菌悬液的制备

接种乳酸菌于 MRS 液体培养基中 37 °C 培养(16±2) h 至对数期,离心(8000 r/min, 10 min)收集菌体,

用生理盐水洗涤 2 次,将菌体悬浮于生理盐水中,应用平板菌落计数法制成 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU/mL 的菌悬液,备用。

#### 2.3.2 降解亚硝酸盐乳酸菌的诱变

##### 2.3.2.1 紫外诱变

取 10 mL 稀释后菌悬液于培养皿中,在黑暗条件下,置于 15 W 紫外灯下 30 cm 处,在搅拌状态下分别照射 0、30、60、90、120、150、180 s。分别取不同照射时间,进行菌落计数,计算紫外致死率。每个照射时间做 3 个平行样。

##### 2.3.2.2 亚硝基胍诱变

分别取 0.5 mg/mL NTG 溶液 1 mL,加入到 1 mL 菌悬液中,30 °C 条件下,分别振荡 0、30、60、90 min,取 100 μL 诱变液涂平板,于 37 °C,培养 2~3 d。计算致死率确定最佳诱变时间。

取 0.50、0.75、1.00 mg/mL NTG,处理一定时间,按上述方法菌落计数,计算致死率,确定最佳诱变剂量。每一因素做 3 个平行样。

##### 2.3.2.3 复合诱变

以亚硝基胍的最佳诱变时间和剂量对菌悬液进行诱变,再进行紫外线照射诱变。复合诱变进行 3 轮。

#### 2.3.3 复合诱变乳酸菌株的初筛

为了让诱变处理的悬浮液最大限度的保留遗传特性,紫外线诱变后取 100 μL 菌液接种于 100 mL MRS 液体培养基,37 °C 静止培养 4~6 h 后,将培养的菌体涂布于筛选 MRS 培养皿,用锡纸包裹后 37 °C,培养至长出菌落。挑取不同部位菌落出现较早、长势旺盛的菌落作为初筛菌株。

#### 2.3.4 复合诱变乳酸菌株的复筛

选取初筛菌株,接种于 100 mL 含 200 mg/L NaNO<sub>2</sub> 的 MRS 中 37 °C,培养 24 h 后测定降解亚硝酸盐的量。筛选出降解率最高的菌种作为最终实验菌株。

#### 2.3.5 亚硝酸盐还原酶比活力的测定

采用文献方法<sup>[5-6]</sup>测定亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase enzyme, NiR)的活性。酶活力单位定义:在 35 °C、pH 6.0 条件下,1 min 催化还原 1 nmol 亚硝酸钠所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

#### 2.3.6 指标测定

亚硝酸盐含量按 GB/T 5009.33-2010<sup>[7]</sup> 测定。

诱变致死率(%)=100%×(诱变前菌落数-诱变后菌落数)/诱变前菌落数

亚硝酸盐降解率(%)=100%×(降解前亚硝酸盐含

量-诱变后亚硝酸盐含量)/诱变前亚硝酸盐含量

### 2.3.7 诱变菌株性能稳定性的研究

将诱变菌株连续培养 10 代, 对培养后的菌种亚硝酸盐降解率及酶活力进行测定, 研究其各项性能指标的遗传稳定性。

## 3 结果与分析

### 3.1 紫外诱变时间的确定

诱变致死率为 80%~90%时<sup>[8]</sup>, 容易筛选到变异幅度大的突变菌株, 以此为依据确定诱变剂量。菌株经不同时间紫外线照射后的致死率曲线见图 1。由图知: 照射时间 50 s 时致死率在 80%以上, 高于 90 s 时致死率 99%以上。选择照射时间 60 s 为最佳诱变时间, 此时的致死率为 83%。

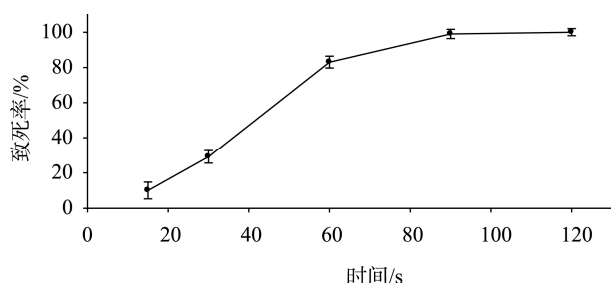


图 1 紫外线诱变致死率曲线

Fig. 1 Curve of UV mutagenesis on mortality

### 3.2 亚硝基胍诱变时间和剂量的确定

不同作用时间的致死率结果如表 1。由表 1 可见,

NTG 在 0.5 mg/mL 浓度下, 诱变时间 90 min 以上时,

致死率在 100%; 45 min 以下致死率低于 70%, 确定 60 min 为最佳诱变时间, 此时致死率在 85.1%。

在最佳诱变时间 60 min 条件下, NTG 最优作用剂量结果如表 2。由表 2 知: 最优作用剂量为 0.5 mg/mL, 此时致死率为 83.2%。若剂量再增大, 菌株致死率高于 90%, 不利于正突变株的筛选。

### 3.3 紫外和亚硝基胍复合诱变结果

将活化后的 D2 菌株按最优诱变条件处理, 试验共进行 3 轮复合诱变筛选。将诱变后的菌株均匀涂布于 MRS 平板, 37 °C 恒温培养 2~3 d。初筛选出 50 株菌落大, 表面光滑的菌株复筛。从诱变菌株降解亚硝酸盐能力、产酶特性等情况分析结果得到正突变株 16 株, 正突变率为 32%, 其中, 6 株正突变株(D2-A、B、C、D、E、F)的各项指标结果见表 3。

由表 3 知: 诱变菌株 D2-F 降解亚硝酸盐率达 91.4%, 较诱变前 D2 菌株高出 12.7%, 产亚硝酸盐还原酶的酶活力较诱变前提高了 42.9%。因此, 选择 D2-F 菌株作为目标菌株做下一步的遗传稳定性研究。

### 3.4 诱变菌株性能遗传稳定性的研究

将突变菌株 D2-F 传代培养, 每一代均接种于液体 MRS 培养基中 37 °C, 培养 24 h 后测定菌株降解亚硝酸盐、产 NiR 活力指标。诱变菌株 D2-F 的传代稳定试验结果见表 4。

由表 4 知: 诱变菌株经传代培养后, 亚硝酸盐降解率和产 NiR 的比活力稳定性良好。

表 1 NTG 最佳诱变时间的确定( $n=3$ )

Table 1 Determination of the optimal time of NTG mutagenesis ( $n=3$ )

诱变时间(min)	0	30	45	60	90
致死率(%)	0	33.4±3.86	67.5±2.75	85.1±2.53	99.6±1.32

表 2 NTG 最佳诱变浓度的确定( $n=3$ )

Table 2 Determination of the optimal concentration of NTG mutagenesis ( $n=3$ )

诱变剂量(mg/mL)	0	0.25	0.5	0.75	1
致死率(%)	0	40.8±3.77	83.2±3.54	94.1±2.09	99.6±1.43

表 3 复合诱变菌株各项性能指标的测定

Table 3 Determination of the performance indicators of

compound mutant strain		
菌株	降解率/%	NiR 比活力/(mmol/mL)
D2	78.7	5.39
D2-A	85.5	5.36
D2-B	87.8	5.39
D2-C	89.3	7.07
D2-D	87.5	6.64
D2-E	88.6	7.57
D2-F	91.4	7.70

表4 菌株 D2-6 的遗传稳定性结果( $n=3$ )  
Table 4 Results of genetic stability of D2-F ( $n=3$ )

传代次数	第1代	第5代	第10代
降解率/%	91.40±2.52	91.20±1.26	91.30±1.40
酶活力/(mmol/mL)	7.70±0.05	7.60±0.05	7.50±0.03

## 4 讨论

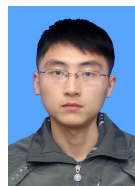
近年来,紫外和亚硝基胍复合诱变技术已应用到微生物菌种的改造领域,使育种工作更高效。李旭媛<sup>[9]</sup>等应用该复合诱变技术提高了蜡状芽孢杆菌产淀粉酶的活力。本文经紫外线照射和 NTG 处理复合诱变 3 轮后,最终得到一株亚硝酸盐降解率为 91.4%,产 NiR 的比活力为 7.7 mmol/L 的菌株 D2-F,较初始菌株各项指标分别提高了 12.7% 和 43.4%。连续培养 10 代后各项性能稳定,其遗传稳定性良好。说明经紫外线照射和亚硝基胍复合诱变乳酸菌,可以有效提高菌体的亚硝酸盐降解率和产 NiR 的比活力。为以后更深入研究应用乳酸菌改善腌制品各项指标,特别是降低亚硝酸盐含量,提高腌制品安全性具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Yoon JH, Kang SS, Mheen TI, *et al.* Lactobacillus kimchii sp. nov., a new species from kimchi [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 1789-1795.
- [2] Caballero-Salazar S, Riverón-Negrete L, Ordáz-Téllez MG, *et al.* Evaluation of the antimutagenic activity of different vegetable extracts using an in vitro screening test [J]. Proc West Pharmacol Soc, 2002, 45: 101-103.
- [3] 何淑玲, 李博, 籍保平, 等. 泡菜中亚硝酸盐问题的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 85-87.
- [4] He SL, Li B, Ji BP, *et al.* Research progress of nitrite content in pickles [J]. Food Ferm Ind, 2005, 31(11): 85-87.
- [5] Oh CK, Oh MC, Kim SH. The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from kimchi [J]. J Med Food, 2004, 7(1): 38-44.
- [6] 刘萍, 罗岩, 张莹, 等. 亚硝酸盐还原酶的分离纯化及其性质研究[J]. 中国酿造, 2011, (9): 22-26.
- [7] Liu P, Luo Y, Zhang Y, *et al.* Isolation, purification and properties of nitrite reductase from *Bacillus megaterium* MPF-906 [J]. China Brewing, 2011, (9): 22-26.
- [8] 张雪, 陈萍, 毕云枫, 等. 木糖氧化产碱菌中亚硝酸盐还原酶基因的克隆与表达[J]. 吉林大学学报(医学版), 2013, (7): 691-693.
- [9] Zhang X, Chen P, Bi YF, *et al.* Cloning and expression of nitrite reductase gene from *Alcaligenes xylosoxidans* [J]. J Jilin Univ (Med Edition), 2013, (7): 691-693.
- [10] GB/T 5009. 33-2010 食品中亚硝酸盐和硝酸盐含量的测定[S].
- [11] GB/T 5009. 33-2010 Determination of nitrite and nitrate in foods [S].
- [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] Yan JX, Xu RB, Chen P, *et al.* Screening and mutagenesis of lactic acid bacteria producing nitrite reductase [J]. J Jilin Agr Univ, 2013, 35(1): 94-97.
- [14] 李旭媛, 王刚, 费卓群, 等. 紫外-亚硝基胍复合诱变筛选高产淀粉酶菌株[J]. 中国生物制品学杂志, 2012(11): 1543-1546.
- [15] Li XY, Wang G, Fei ZQ, *et al.* Screening of high amylase-producing strains by mutagenesis with ultraviolet ray and ni-trosoguanidine [J]. China J Biol, 2012, 25(11): 1543-1546.

(责任编辑:赵静)

## 作者简介



李文涛, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: lwt909477435@163.com



陈萍, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: ccchenping@sina.com