发酵条件对 *Bacillus amyloliquefaciens* SYBCH47 降解亚硝酸盐的影响

王 爽， 徐 君， 张言周， 管政兵， 蔡宇杰， 廖祥儒*
（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 研究了 *Bacillus amyloliquefaciens* SYBCH47 对亚硝酸盐的降解能力及影响因素。结果表明，*B. amyloliquefaciens* SYBCH47 具有降解亚硝酸盐的能力，当亚硝酸盐质量浓度为 50~200 mg/L 时，菌株对亚硝酸盐的降解率均高于 99%。有氧培养条件下菌种最终 OD_{600} 为 2.34，缺氧培养下为 1.07，但两者最终降解率均高于 99%并且降解率与生长曲线趋势一致。在 30~40 ℃范围内，亚硝酸盐降解率达到 99%以上。接种体积分数选择 1%为最佳。

关键词： 亚硝酸盐；降解率；发酵条件；解淀粉芽孢杆菌
中图分类号：Q 81　**文章编号：**1673-1689(2019)07-0141-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.020

Effect of Fermentation Condition on Nitrite Degradation by *Bacillus amyloliquefaciens* SYBCH47

WANG Shuang, *XU Jun*, *ZHANG Yanzhou*, *GUAN Zhengbing*, *CAI Yujie*, *LIAO Xiangru**
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Ability of *Bacillus amyloliquefaciens* SYBCH47 to degrade nitrite and the effect of fermentation condition on degradation of nitrite by *B.amyloliquefaciens* SYBCH47 was studied. The results showed that among the nitrite concentration of 50~200 mg/L, nitrite degradation rate by *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 was more than 99%. The OD_{600} of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 under aerobic cultivation was 2.34, while under anaerobic cultivation was 1.07. However, nitrite degradation by *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 under both cultivation were more than 99% and the tread of degradation rate is in line with the growth. Among the temperature of 30~40 ℃, the nitrite degradation rate was more than 99%. Inoculation1% had benefited on nitrite degradation.

Keywords: nitrite, degradation rate, fermentation condition, *Bacillus amyloliquefaciens*

亚硝酸盐是潜在的致癌物，可参与反应生成亚硝胺类化合物，在水果蔬菜储藏或发酵过程中极易积累，对食品安全问题构成威胁。大量研究表明，摄入过量亚硝酸盐可导致高铁血红蛋白症[1]。同时，亚

收稿日期： 2016-03-22
基金项目： 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28)；无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310)。
* **通信作者：** 廖祥儒(1964—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生化与分子生物学方面的研究。E-mail：liaoxiangru@163.com
引用本文： 王爽，徐君，张言周，等. 发酵条件对 *Bacillus amyloliquefaciens* SYBCH47 降解亚硝酸盐的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(07)：141-146.

硝胺类化合物还有致突变和致畸的作用。调查表明,某些癌症(食道癌、结肠癌和膀胱癌等)可能与亚硝胺类物质有关。因此,食品中对亚硝酸盐含量有明确的限量标准。发酵食品中亚硝酸盐超标、肉制品中含亚硝酸盐过量、水产养殖水体中亚硝酸盐含量超标等导致食品安全问题[2]。在水产养殖业中,水体中高浓度的亚硝酸盐既危害养殖生物,同时又引起养殖品种发生病害[3]。因此发现有效控制及减少亚硝酸盐的方法亟待解决。

目前,添加食用安全的微生物是减少食品中亚硝酸盐的主要方法之一,主要有短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantrum*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)[2]。关于能有效降解亚硝酸盐菌种的报道主要有乳酸菌及少数芽孢杆菌,如巨大芽孢杆菌[4]、蜡样芽孢杆菌[2]等。沈锡权等[5]研究表明,在冬瓜生盐过程中,前期主要菌群为乳酸菌,后期主要为芽孢杆菌。大多数乳酸菌为厌氧菌,用其降解亚硝酸盐存在一定的局限性。因此,迫切需要发现可高效降解亚硝酸盐的新菌种[6]。作者所在实验室从蜂蜜中分离得到一株解淀粉芽孢杆菌,经检测具有降解亚硝酸盐的能力。解淀粉芽孢杆菌分布广泛、易于分离培养、对人畜无毒无害、对环境无污染,代谢产物丰富、具有较强抗逆能力,生长快、稳定性好,适合作为生防菌生产和应用[7]。解淀粉芽孢杆菌在生长过程中可以产生多种抑菌物质,具有抑制真菌与细菌的能力。目前,解淀粉芽孢杆菌在抑制病原菌方面、环境保护方面及动物饲料反面的应用已受到广泛关注[3]。据报道,饲料中添加芽孢杆菌可改善养殖水质,增强消化酶活性、机体免疫和肠黏膜抗氧化功能等[8]。亚硝酸盐的代谢主要受参与该过程的关键酶活性和菌体的生长速率的影响[9]。作者试图探索该菌对亚硝酸盐的降解能力和影响因素,为将其应用于发酵食品及水产养殖中亚硝酸盐的降解转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验菌种:解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens* H47),作者所在实验室分离自蜂蜜。

1.2 培养基

1)LB 培养基(g/L):NaCl 10,胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5;pH 调至 7.1±0.1。

2)亚硝酸钠培养基(g/L):LB 培养基,亚硝酸钠 0.15;pH 调至 7.1±0.1。

1.3 主要试剂及仪器

1.3.1 试剂 亚硝酸钠:国药集团化学试剂有限公司;含量测定所用试剂及配置方法参考 GB 5009.33—2010。

1.3.2 仪器 分光光度计:SHIMADZU 公司;LRH-250A 型生化培养箱:广东省医疗器械厂;TGL-16M 型高速离心机:湖南湘仪实验仪器开发有限公司。

1.4 方法

1.4.1 实验菌种降解亚硝酸盐的能力 将保藏于-80 ℃甘油管中的试验菌以 2%的接种体积分数接到 50 mL LB 培养基中,30 ℃摇床培养 12 h,进行菌种活化。将活化种子液以 1%接种体积分数分别接种到 50 mL 亚硝酸钠液体培养基和 50 mL LB 液体培养基中,30 ℃恒温培养,分别于 2、4、6、8、10、12 h 取样测定菌体浓度、pH 及亚硝酸钠含量。平行试验做 3 次重复,求平均值。以时间为横坐标,分别以菌体浓度、pH 值及亚硝酸钠降解率为纵坐标作图。

1.4.2 实验菌对亚硝酸盐降解影响因素的研究

1)培养条件:将保藏于-80 ℃甘油管中的试验菌以 2%的接种体积分数接到 50 mL LB 培养基中,30 ℃摇床培养 12 h,进行菌种活化。将活化后的种子液以 1%接种体积分数接种到 50 mL 亚硝酸钠培养基和 50 mL LB 培养基中,分别于 30 ℃恒温培养和 200 r/min 摇床培养。于 2、4、6、8、10、12 h 取样测定菌体浓度、pH 及亚硝酸钠质量浓度。平行试验做 3 次重复,求平均值。以底物浓度为横坐标,以菌体浓度及亚硝酸盐降解率为纵坐标作图。

2)底物浓度:配制亚硝酸钠质量浓度分别为 50、100、150、200、250 mg/L 的 50 mL LB 培养基。按 1%的接种体积分数加入活化后的种子液,于 30 ℃恒温培养,分别于 2、6、10 h 后测定发酵液中亚硝酸盐质量浓度。平行试验做 3 次重复,求平均值。以底物质量浓度为横坐标,分别以菌体浓度、亚硝酸盐降解量及亚硝酸盐降解率为纵坐标作图。

3)温度:向亚硝酸钠培养基中加入 1%活化后种子液,分别置于 20、25、30、35 ℃下恒温培养,10 h 后测菌体浓度,pH 和亚硝酸盐质量浓度。平行试验做 3 次重复,求平均值。以温度为横坐标,分别以菌体浓度及亚硝酸盐降解率为纵坐标作图。

4)接种体积分数:分别按 0.2%、1%、5%接种体

积分数向亚硝酸钠培养基中接入种子液。置于 30 ℃下恒温培养,于 2、5、10 h 测菌体浓度及亚硝酸盐质量浓度。平行试验做 3 次重复,求平均值。以时间为横坐标,菌体浓度和亚硝酸盐降解率为纵坐标作图。

1.4.3 亚硝酸盐的测定 测定方法根据标 GB 5009.33—2010 中第二法——分光光度法对亚硝酸盐含量进行测定,方法略有改动。

1)标准曲线的绘制:吸取 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.75、1.00、1.25 mL 亚硝酸钠标准使用液(相当于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.75、5.0、6.25 μg 亚硝酸钠),分别置于 25 mL 带塞比色管中。向比色管中分别加入 1 mL 对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置 5 min,再加入 0.5 mL 盐酸萘乙二胺溶液,加去离子水至比色管刻度处,混匀,静置 12~15 min,以零管作为零点,于波长 538 nm 下测吸光度,绘制亚硝酸钠含量标准曲线。

2)样品测定:取 5 mL 发酵液以 8 000 r/min 的转速离心 2 min,取 4 mL 上清液加 1 mL 亚铁腈化钾溶液,摇匀,再加入 1 mL 乙酸锌溶液,反应 30 min。8 000 r/min 离心 5 min。然后根据标准曲线对亚硝酸盐质量浓度进行测定。

3)亚硝酸盐降解能力表示方法:

亚硝酸盐降解量(mg/L)=初始培养基中亚硝酸盐质量浓度−发酵液中残留的亚硝酸盐质量浓度

$$\text{亚硝酸盐降解率}(\%)=\frac{\text{亚硝酸盐降解量}}{\text{初始培养基中亚硝酸盐质量浓度}}\times 100\%$$

4)菌体浓度及 pH 的测定:菌体浓度用分光光度计测发酵液在 OD_{600} 下的吸光度,以初始培养基作对照。pH 用 pHS-3C 型酸度计测量。

2 结果与分析

2.1 实验菌降解亚硝酸盐的能力及亚硝酸盐对实验菌生长的影响

含有亚硝酸钠的培养基对实验菌株生长有一定的影响,见图 1、图 2。图 1 显示试验菌株在含有亚硝酸钠和不含亚硝酸钠的 LB 培养基中相比,吸光度值较高。说明试验菌株可能利用亚硝酸钠作为氮源生长或亚硝酸钠的存在改变细胞膜的通透性,对菌体生长有一定的促进作用。图 2 显示,从 4~8 h 亚硝酸钠降解率显著增加,此时菌体处于对数生长期,而从 8~12 h 降解率增加趋于平缓。在 8 h 时,亚硝酸钠降解率达到 99.58%,12 h 时降解率达到 99.83%。与不含亚硝酸钠的发酵液相比,在含有亚硝酸钠的发酵液中发酵液 pH 较高,且从 4 h 时 pH 便不再降低,可能是由于此时亚硝酸钠被还原,使发酵液 pH 升高。

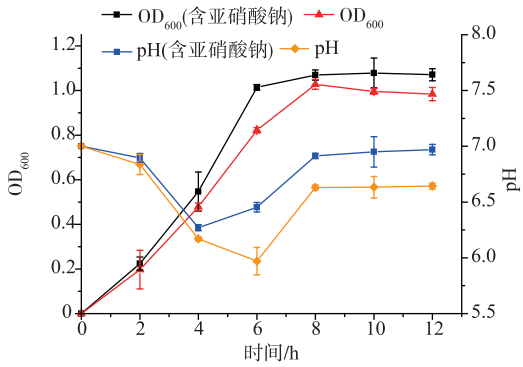


图 1 亚硝酸钠对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 生长的影响

Fig. 1 Effect of $NaNO_2$ on the growth of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

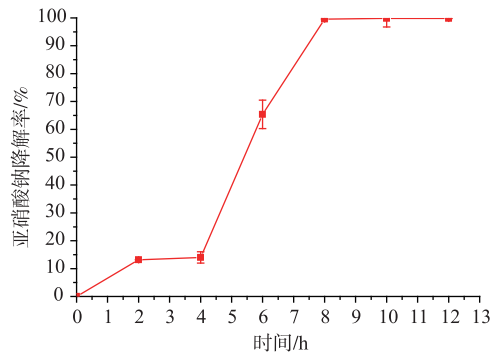


图 2 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 对亚硝酸盐的降解能力

Fig. 2 Ability of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 to degrade nitrite

2.2 培养条件对菌株生长及亚硝酸盐降解率的影响

根据生物脱氮理论,亚硝酸盐的降解可能源于两个途径:第一种途径为反硝化作用,即:$NO_2^-\rightarrow NO\rightarrow N_2O\rightarrow N_2$,此途径中还原酶为 cytochrome cd1 型 Nir 或 copper-containing 型 Nir,该途径中还涉及 Nor 和 Nos[10];第二种途径为亚硝酸盐的同化或异化作用,即 $NO_2^-\rightarrow NH_4^+$。此途径中还原酶为 NrfA[11],NirA 或 NirBD[12]。传统认为细菌的反硝化过程是在厌氧条件下完成的,自 Robertson 等[13]发现了好氧反硝化细菌 *Thiosphaera pantotroph* 后,对好氧反硝

化菌株的报道陆续增加,如 *Pseudomonas aeruginosa*[13]、*Pseudomonas chloritidis –mutans*[15]、*Alcaligenes piechaudii*[16]、*Bacillus licheni–form*[17]等[18]。

因此,通过测定静止培养和摇床培养的菌体吸光度及亚硝酸盐降解率来确定溶氧量对菌体生长及亚硝酸盐降解能力的影响,结果见图 3。两种培养条件下,菌体对数生长期基本相同,但摇床培养菌体浓度最大值远高于静止培养,亚硝酸盐降解率基本同时达到最大,且最大值没有明显差异(P>0.05)。

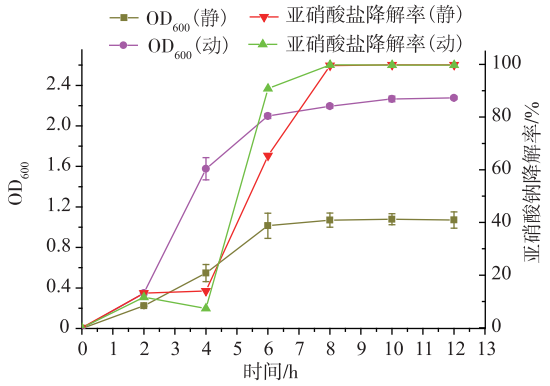


图 3 培养条件对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 生长及降解亚硝酸盐的影响

Fig. 3 Effect of culture condition on the growth and nitrite degradation of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

2.3 底物质量浓度对菌体生长及亚硝酸盐降解率的影响

加入 50、100、150、200、250 mg/L 亚硝酸钠的 LB 培养基经过灭菌后用 1.4.3 所述方法检测亚硝酸钠质量浓度分别为 38.5、81.4、107.9、147.8、191.9 mg/L。将活化后菌种接种于含不同质量浓度亚硝酸钠的培养基中,亚硝酸钠的降解结果见图 4–5。10 h 后在含亚硝酸钠 50~200 mg/L 的培养基中降解率都超过 99%,但在 250 mg/L 时降解率为 94.6%,可能是由于亚硝酸钠质量浓度过高对菌株的毒性增大所致。

2.4 温度对菌体生长及亚硝酸盐降解率的影响

不同培养温度对菌种生长及亚硝酸盐降解的影响见图 6。菌体在含亚硝酸钠的培养基中最适生长温度为 40 ℃。40 ℃时菌种生长速率最快,相应的亚硝酸钠降解速率也最大。25 ℃及 45 ℃时菌体生长变缓慢,亚硝酸钠降解率降低。培养 10 h 后,虽然 30 ℃和 35 ℃菌体浓度低于 40 ℃培养条件的菌浓,但 30、35、40 ℃培养条件下的亚硝酸钠降解率都能达到 99%以上,表明微生物及相关的酶的温度适应性较强。

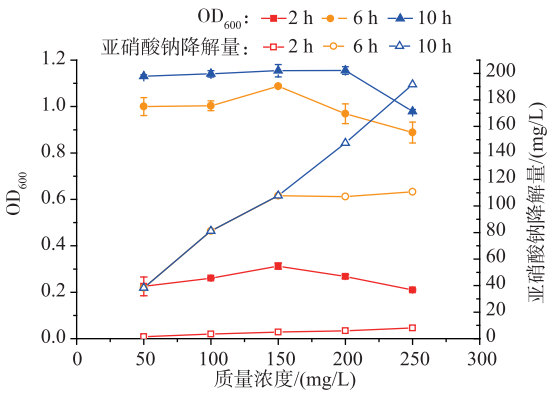


图 4 $NaNO_2$ 质量浓度对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 生长及亚硝酸盐降解量的影响

Fig. 4 Effect of $NaNO_2$ concentration on the growth and nitrite degradation amount of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

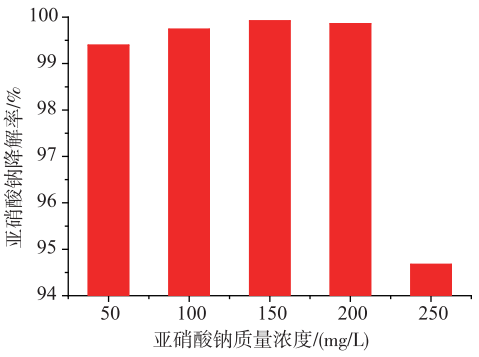


图 5 $NaNO_2$ 质量浓度对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 降解亚硝酸盐的影响

Fig. 5 Effect of $NaNO_2$ concentration on nitrite degradation of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

2.5 接种体积分数对菌体生长及亚硝酸盐降解率的影响

不同接种体积分数对菌体生长及亚硝酸盐的降解结果见图 7–8。随着添加量的增大,菌数增加。1%接种体积分数与 5%接种体积分数终亚硝酸盐降解率基本相同(P>0.05),为节约成本应选择以 1%接种体积分数进行接种。

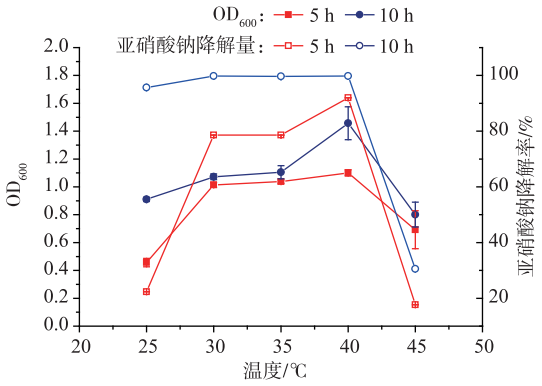


图 6 温度对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 的生长及降解亚硝酸盐的影响

Fig. 6 Effect of temperatures on the growth and nitrite degradation of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

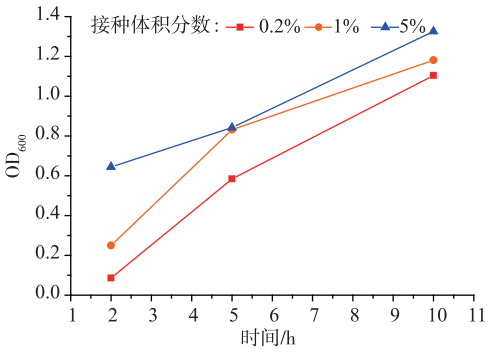


图 7 接种体积分数对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 生长的影响

Fig. 7 Effect of inoculum size on the growth of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

3 结 语

利用生物法降解亚硝酸盐采用生长细胞作为反应介质进行亚硝酸盐的降解,其不足之处在于降解过程受到微生物生长规律的限制,易出现系统不稳定的现象。 目前,除利用加入微生物降解食品中的亚硝酸盐外, 还可利用 Nir 进行亚硝酸盐的生物降解,与全细胞催化剂相比,酶具有反应效率高、催化特异性强、过程易分离和控制等优势。 但是要得到大量的食用安全的 Nir 至今还没有很好的方法[2,19]。因此,探索试验菌株的产酶条件并从试验菌株发酵液中有效分离纯化亚硝酸盐还原酶以及测定酶学性质需要进一步研究。可运用基因组学、转录组学、蛋白质组学深入研究并阐明亚硝酸盐还原酶表达调控的分子机理,利用基因操作技术,针对性的构建高效表达亚硝酸盐还原酶的基因工程菌。

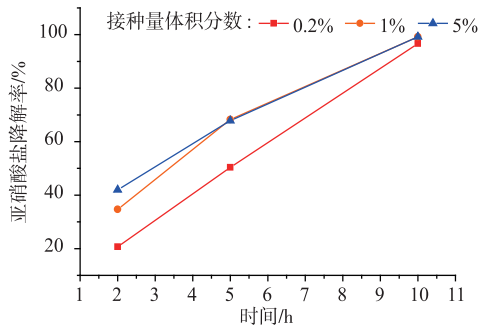


图 8 接种体积分数对 *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 降解亚硝酸盐的影响

Fig. 8 Effect of inoculum size on nitrite degradation of *B. amyloliquefaciens* SYBCH47

通过对 *B. amyloliquefaciens* SYBCH47 亚硝酸盐降解能力探究,表明该菌具有高效降解亚硝酸盐的能力。试验菌株在含有亚硝酸盐的培养基中生长速率及终质量浓度略高于不含亚硝酸盐的培养基。原因可能是该菌能利用亚硝酸盐作为氮源或是亚硝酸盐改变了细胞的通透性,促进细胞生长。在 30~40 ℃能快速生长并在 10 h 内对亚硝酸盐的降解率达到 99%以上,最适温度为 40 ℃。在亚硝酸钠质量浓度 50~200 mg/L 范围内,亚硝酸盐的终降解率略有升高,变化并不明显,在其质量浓度为 250 mg/L 时,降解率明显降低。作者探索了试验菌株降解亚硝酸盐的影响因素,为进一步将该菌运用于发酵食品及水产养殖业提供了参考。

参考文献:

[1] PIETRO S. Nitrate invegetables:toxicity,content,intake and EC regulation[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2006,86(1):10-17.

[2] LIU Dongmei,LUO Tonghui ,YANG Danxia,et al. Identification and nitrite degradation ability of *Bacillus cereus* LJ01 [J]. **Journal of South China University of Technology:Natural Science Edition**,2015,43(6):135-141.(in Chinese)

[3] ZHANG Juan,YANG Caimei,CAO Guangtian,et al. *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a probiotic[J]. **Chinese Journal of Animal Nutrition**,2014,26(4):863-867.(in Chinese)

[4] 杨艳. 巨大芽孢杆菌产亚硝酸盐还原酶的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2007.

[5] SHEN Xiquan,ZHAO Yongwei,WU Zufang,et al. Bacteria community changes and its quality related in raw process of pickled wax gourd[J]. **Journal of Food Science and Biotechnoiogy**,2012,31(4):111-116.(in Chinese)

[6] BIN J,KAI Y,LAI Z,et al. Aerobic denitrification:a review of important advances of the last 30 years[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**,2015,20:643-651.

[7] GUAN Xiaohuan,Jiang Hua. The research on development of bacillus amyloliquefaciens[J]. **Biotech World**,2013:4-9.(in Chinese)

[8] LI Weifen ,DENG Bin,CHEN Nannan,et al. Effects of bacillus on water quality,growth and activity of intestinal mucosa of ctenopharyngodon ideUus[J]. **Journal of Hydroecology**,2012,33(1):65-70.(in Chinese)

[9] XIN Y,SEN Q,CONG Y,et al. Effects of reduced graphene oxide on the activities of anammox biomass and key enzymes[J]. **Chemical Engineering Journal**,2015,276:106-112.

[10] BAEK S H,SHAPLEIGH J P. Expression of nitrite and nitric oxide reductases in free-living and plantassociated agrobacterium tumefaciens C58 cells[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2005,71(8):4427-4436 .

[11] SCHMIDT I,SLIEKERS O,SCHMID M,et al. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners [J]. **FEMS Microbiology Ecology**,2002,39(3):175-181.

[12] ZHANG Xinyue,LIU Dongmei,XU Xilin,et al. The degradation pathway of nitrite by LCR 6013 and the primary localization of its nitrite reductase[J]. **Modern Food Science and Technology**,2013,29(11):2627-2632.(in Chinese)

[13] ROBERTSON L A,KUENEN J G. Aerobic denitrification:a controversy revived[J]. **Arch Microbiol**,1984,139:351-354.

[14] CHEN F,XIA Q,JU L K. Aerobic denitrification of Pseudomonas aeruginosa monitored by online nad (p)h fluorescence[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2003,69(11):6715-6722.

[15] MA Fang,ZHOU Dandan,WANG Hongyu,et al. Characteristics of psammophytes of an aerobic denitrifier[J]. **Journal of Harbin Institute of Technology**,2006,38(4):575-577.(in Chinese)

[16] PAI S L,CHONG N M,CHEN C H,et al. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment[J]. **Bioresource Technology**,1999,68(2):179-185.

[17] KIM J K,PARK K J,CHO K S,et al. Aerobic nitrifcation-denitrifcation by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. **Bioresource Technology**,2005,96(17):1897-1906.

[18] SHI Xiaotong,LI Yanqin ,XING Gongwei.et al. Screening and primary identification of an aerobic denitrifier isolate with salt tolerance[J]. **Biotechnology Bulletin**,2013,3:175-180.(in Chinese)

[19] WANG Pan,FEI Yongtao,LIU Dongmei,et al. Cloning,expression,and purification of the nitrite reductase gene from *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010[J]. **Modern Food Science and Technology**,2015,31(6):150-155.(in Chinese)