

# 腌制肉中亚硝酸盐抑菌机理的研究进展

董庆利 屠康

(南京农业大学食品科技学院 210095)

**摘要:**亚硝酸盐是肉制品中常用的食品添加剂,具有发色、抑菌、改善风味和质构等作用,特别是亚硝酸盐能够有效的防止肉毒梭状杆菌的生长,但是亚硝酸盐具有毒性,亚硝酸根与肉类中的胺类物质反应生成致癌物亚硝胺,使亚硝酸盐的使用受到限制。已有许多亚硝酸盐抑菌机理的研究报道,本文综述了亚硝酸盐作用的微生物、腌制成分和其它因素对亚硝酸盐抑菌作用的影响,以及亚硝酸盐抑菌分子机理的研究进展,并对亚硝酸盐作用机理的研究方向进行了展望。

**关键词:**亚硝酸盐;腌制肉;抑菌

## Advanced research on mechanisms of nitrite inhibition of bacteria in cured meat

DONG Qing-li, TUKang

College of food science and technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**ABSTRACT:** Sodium nitrite is an essential curing ingredient used to stabilize the curing red color, enhance flavor, act as an antioxidant, and prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* which produces botulism and causes food poisonous. However, nitrites and nitrates may cause methemoglobinemia and other illness, and may react with certain amines to form carcinogenic nitrosamines. In this paper, it has been reviewed that nitrites reacted to the microorganism, curing ingredients and other factors which influenced nitrite bacteriostasis, also including advanced research and future development on nitrite bacteriostasis mechanisms in cured meat.

**Key words:** Cured meat; Nitrite; Bacteriostasis

## 1 引言

腌肉(或称咸肉、腊肉、Bacon 或 Meat Curing)在我国由来已久,腌制操作是用食盐或以食盐为主,并添加亚硝酸钠、蔗糖等腌制材料处理肉类的过程<sup>[1]</sup>,目前已成为许多肉制品加工过程中一个重要的加工环节。亚硝酸盐除有发色作用外,还有延长肉制品货架期寿命和防止肉毒梭状杆菌(*Clostridium botulinum*)生长,并能产生独特的香味,改善腌肉风味。早在1951年Steink和Foster提出,亚硝酸盐是一种有效的肉毒杆菌抗菌剂。随后,Eklund等把肉制成切片进行真空包装,并接种肉毒杆菌的孢子,证实,在特定温度下,亚硝酸盐的浓度与毒素产生、食品败坏延迟都有直接关系<sup>[2]</sup>。Siliker等用贮藏稳定的罐制咸肉证实:在含盐量一定的情况下,要保证腌制肉各种正常的感官特性及其食用品质,关键在于要有一定的亚硝酸盐含量,而硝酸盐则起不到这方面有益的作用<sup>[3]</sup>。

20世纪70年代初,对作为肉腌制剂的亚硝酸盐和硝酸盐影响人体健康的问题引起了人们注意。1971年,美国Stoevsand教授提出,长期食用含有硝酸盐的食品可引起癌症、甲状腺肿大等四种病症<sup>[4]</sup>。用300多种亚硝基化合物做动物试验,其中90%以上引起癌症。在肠道中硝酸盐还原成亚硝酸盐,继之被吸收。并由于高铁血红蛋白的生成而导致发绀。亚硝酸盐的致癌作用主要是亚硝酸根与肉类中的胺类物质反应生成致癌物亚硝胺。给动物喂以大剂量的亚硝酸盐和胺,

能在体内产生足以致癌的亚硝胺浓度<sup>[4]</sup>。

但是,当强制性地吧腌制肉中亚硝酸盐的允许量降到最小程度时,出现了肉毒中毒的危险。这一情况导致了各国政府和工业部门共同进行大量的研究。大致结论是:需要保持一定浓度的亚硝酸盐;同时,还要考虑其它因素,如盐浓度、pH和热处理间的相互作用。对亚硝酸盐的抗微生物机制一直没有研究清楚。研究亚硝酸盐的作用机制,特别是抑制肉毒杆菌毒素产生的机制,以及对其它腐败菌和致病菌的作用是解决亚硝酸盐问题的前提。

从上世纪中期开始,人们对亚硝酸盐在腌肉制品的化学机理进行了大量的研究,但对于亚硝酸盐抑菌机理特别是分子水平上的机理研究较少,当前已经清楚的是亚硝酸盐和氨基酸、缩氨酸(peptides)和铁硫聚合物(iron-sulfur clusters)等的反应<sup>[5]</sup>。从亚硝酸盐分离出的抑菌物包括:亚硝酸<sup>[6]</sup>、过氧亚硝酸盐(Peroxynitrite)<sup>[7]</sup>、Fe-S-NO复合物<sup>[8]</sup>、亚硝基硫醇(Nitrosothiols)和N-亚硝基复合物<sup>[9]</sup>。

## 2 亚硝酸盐作用的微生物

亚硝酸盐抑菌作用考虑最多的是肉毒梭状芽孢杆菌,受许多因素影响(如亚硝酸盐浓度、环境因素、产品类型等),亚硝酸盐还能抑制其它致病菌蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、产气荚膜杆菌(*Clostridium peringens*),但不是抑制这些致病菌的关键因素<sup>[10]</sup>。

作者简介:董庆利,男,(1979-),博士研究生

屠康,男,(1968-),博士,教授,南京农业大学食品科技学院, E-mail: Kangtu@njau.edu.cn

(收稿日期:2006-03-10 接受日期:2006-03-28)

20 世纪 40 年代后期对亚硝酸钠作为鱼品防腐剂的效果作了评价,发现在低 pH 范围内有一定的效果。高浓度时,亚硝酸盐对金黄色葡萄球菌有抑制效果,并且随着 pH 的下降其抑制效果也增强<sup>[11]</sup>。

亚硝酸盐对包括沙门氏菌(*Salmonella*)的一些肠道细菌及乳酸菌无抗菌效果,虽然在真空包装的腊肉中有抗菌效果,但这可能是由于亚硝酸盐和其它环境因素共同作用的结果,而不是亚硝酸盐本身作用所致<sup>[11]</sup>。

在某些国家,亚硝酸盐应用于奶酪生产中,以控制酪丁酸梭状芽孢杆菌和丁酸梭状芽孢杆菌引起的产气。它对包括产芽孢杆菌(*Clostridium sporogenes*)和产气荚膜杆菌等其它梭状芽孢杆菌也有抑制效果,而这两种菌常用于实验室研究,作为评估亚硝酸及那些可能作为辅助或活化剂的抗菌物质的潜在抗菌效果的对象菌<sup>[11]</sup>。

### 3 腌制成分和其它因素对亚硝酸盐抑菌作用的影响

#### 3.1 腌制成分与处理操作

早在 20 世纪 70 年代, Riemann 就已注意到热力杀菌腊肉的成分和加工中的各种因素在抗肉毒毒素方面有相互作用的效果<sup>[12]</sup>。一些研究者也提出:在半保藏的肉(指杀菌不足,需低温保藏的)中,腌制盐对热损(heat-injured)孢子的抑制效果比对非热损孢子的抑制效果要好得多<sup>[13, 14]</sup>。单独考虑盐水和 pH 的作用:随着 pH 增加,抑制作用所需的盐浓度要提高。Chang 等人<sup>[15]</sup>认为:在货架寿命长的罐头肉制品中,盐对热损孢子的抑制作用也许比 Perigo 因子(指亚硝酸盐与介质生成有抑菌作用的反应物)更为重要。在烟熏大麻哈鱼制品中接入 100 个/g 的 A 型和 E 型肉毒梭状芽孢杆菌,并贮存于不透氧的薄膜袋中,浓度为 3.8% 和 6.1% 的 NaCl 溶液在 7d 贮存期内可分别抑制 E 型和 A 型肉毒梭菌产生毒素<sup>[16]</sup>。如同时使用 100mg/kg 或更高浓度的 NO<sub>2</sub>, 2.5% 浓度的 NaCl 溶液就可抑制 E 型肉毒梭菌毒素的产生, 3.5% NaCl 加 150mg/kg NaNO<sub>2</sub> 对 A 型肉毒梭菌也同样具抑制作用。对更长的培养时间或更高的孢子接种量,其所需的 NaCl 或 NaNO<sub>2</sub> 的用量也要相应提高。

Roberts 等人系统地研究了肉酱中 NaCl、NaNO<sub>2</sub>、NaNO<sub>3</sub>、异抗坏血酸、热处理温度、贮存温度及时间对芽孢生长繁殖的相互作用<sup>[17]</sup>,他们发现:通过增强上述各种因素可明显降低毒素的产生。不管酸性的提高是来自于外加的酸,还是来自于乳酸细菌,低 pH 对肉毒梭状芽孢杆菌的生长及毒素的产生有拮抗作用已是不争的事实。在添加 0.9% 蔗糖的腊肉中如接种有胚芽乳杆菌,经 4 周贮存,49 个样品中只有 1 个产生毒素。然而加蔗糖而不接种乳酸菌的样品中,经 2 周贮存后,52 个样品中就有 50 个产生毒素。只添加 40mg/kg 亚硝酸盐的样品,2 周后 50 个样品有 47 个产生毒素,但 30 个配方中加有 40mg/kg 亚硝酸盐及 0.9% 蔗糖,并接种胚芽乳杆菌的样品,无一产生毒素。虽然这似乎是 pH 直接作用的结果,但其它因素也许也起作用。在以后的研究中,在腊肉的制备过程中加入了 40 或 80mg/kg NaNO<sub>2</sub>、0.7% 蔗糖,并接入乳酸片球菌,将 A 型和 B 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子接种制成的腊肉中,并经真空包装,产品在 27℃ 下,经过 56d 培养后发现:其抗肉毒毒素产生特性方面要比对照组好得多。对照组腊肉中加入了 120mg/kg 的 NaNO<sub>2</sub>,但不含蔗糖及乳酸菌<sup>[18]</sup>。按上述配方制作的腊

肉(称为 Wisconsin 工艺)经感官评定师评定,其品味优于传统方法制得的腊肉<sup>[19]</sup>。与传统工艺相似的方面是 Wisconsin 工艺中也加入 550mg/kg 抗坏血酸钠或异抗坏血酸钠。

#### 3.2 亚硝酸盐-山梨酸盐和其它亚硝酸盐混合物

为了降低腌肉中形成 N-亚硝胺带来的潜在危害性,1978 年美国农业部(USDA)首先将腊肉中 NO<sub>2</sub> 浓度降低至 120mg/kg,并规定其最大亚硝胺含量为 10μg/kg。虽然,120mg/kg 亚硝酸盐加上 550mg/kg 抗坏血酸钠或异抗坏血酸钠足以降低肉毒中毒危害性,但在达到防止肉毒毒素产生这一目的的前提下,尽可能降低硝酸盐含量是非常必要的。为此,1978 年 USDA 提出了允许在腌熏猪肉中添加 40mg/kg 亚硝酸盐和 0.26% 山梨酸盐的建议。但一年以后,由于按该配方生产的腊肉在品味上存在一些问题,这一建议被废止。然而,许多研究小组试验后认为:0.26% 的山梨酸盐结合使用 40 或 80mg/kg 的亚硝酸盐可有效地防止肉毒毒素的产生。

早期有关 40mg/kg 亚硝酸盐加山梨酸盐对腊肉肉毒毒素产生的抑制和延迟作用的研究中,Ivey 等人<sup>[20]</sup>在产品中接入 1100 个/g A 型和 B 型孢子肉毒梭状芽孢杆菌,并将产品在 27℃ 下保温,进行为期 110d 的试验。在既无亚硝酸盐,也无山梨酸盐的情况下,出现有毒样品的时间是 19d;在 40mg/kg 亚硝酸盐、无山梨酸盐的情况下,出现有毒样品的时间是 27d;对含 40mg/kg 亚硝酸盐、0.26% 山梨酸盐或 0.26% 山梨酸盐、不含亚硝酸盐的样品,其产生有毒样品的时间平均超过 110d。亚硝酸盐含量的降低可使熟腊肉中亚硝基吡咯烷含量降低。Sofos 等人(见表 1)发表了一些不同的结果,认为 80mg/kg 亚硝酸盐才能使样品经 60d 贮存后不产生毒素。除了抑制肉毒梭状芽孢杆菌外,山梨酸盐还可减缓贮存过程中亚硝酸盐的分解、消耗<sup>[21]</sup>。

异抗坏血酸的作用是通过螯合金属离子从而提高亚硝酸盐的抑制作用,尽管在某些情况下,它可能因提高了残留亚硝酸盐的消耗速度而降低了亚硝酸盐的功效<sup>[22, 23]</sup>。500mg/kg 的 EDTA 在提高亚硝酸盐功效方面似乎比异抗坏血酸更为有效,但有关这方面的研究报道很有限。另一种螯合剂,8-羟基喹啉作为亚硝酸盐增效剂的功效也得到了肯定。在猪肉糜中,200mg/kg 的 8-羟基喹啉加上 40mg/kg 亚硝酸盐,在 27℃ 下抑制 A 型和 B 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子混合液的时间可达 60d<sup>[24]</sup>。

表 1 亚硝酸盐和山梨酸盐对腊肉产生毒素的影响

(肉毒梭状芽孢杆菌 A 型和 B 型孢子接种种子腊肉中,于 27℃ 下贮存 60d)

| 处理                                   | 产生的毒素量(%) |
|--------------------------------------|-----------|
| 对照(无 NO <sub>2</sub> 、无山梨酸盐)         | 90.0      |
| 0.26% 山梨酸盐,无 NaNO <sub>2</sub>       | 58.8      |
| 0.26% 山梨酸盐,40mg/kg NaNO <sub>2</sub> | 22.0      |
| 0.26% 山梨酸盐,80mg/kg NaNO <sub>2</sub> | 0.0       |
| 无山梨酸盐,120mg/kg NaNO <sub>2</sub>     | 0.4       |

在一份有关亚硝酸盐和山梨酸盐相互作用(影响)的评述中证实,混合后的相对有效性取决于腌制盐成分和生产工艺参数。在 pH5.8~6.0 的牛肝培养琼脂中,如加入 1.0%、1.55 或 2.0% 山梨酸盐,E 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子的萌发率几乎降至零。但在同样浓度下,如 pH 调至 7.0~7.2,则发生异形细胞的萌发和生长<sup>[25]</sup>。当 500mg/kg 亚硝酸盐加入至含有山梨酸盐的高 pH 介质中时,溶菌作用可以得到加强。这些研究

者同时发现,在较高的 pH 下,单独加入 500mg/kg 的亚油酸可防止孢子的产生和生长。在 NaCl 浓度增加或 pH 及贮存温度下降时,山梨酸钾可明显降低猪肉酱中 A 型和 B 型孢子形成毒素的可能性<sup>[26]</sup>。法兰克福鸡香肠中,在抑制产气荚膜梭状芽孢杆菌生长方面,山梨酸盐 - bellaint 混合物与普通亚硝酸盐体系有同样的效果<sup>[27]</sup>。

## 4 亚硝酸盐抑菌分子机理的研究进展

亚硝酸盐是一种富有活性的化学物质,当被导入到复杂的肉系统后,经历了复杂的化学互变和代谢机制(chemical interconversions and metabolism)。形成的一些复合物是稳定的但是具有反应活性。只有很少的亚硝酸盐代谢产物比如氮气( $N_2$ )可被认为是惰性的<sup>[5]</sup>。当以亚硝酸盐形式添加肉组织中,亚硝酸盐在细菌及组织还原物质作用下,形成  $NO_2$  和  $NO$ ,  $NO_2$  具有挥发性,仅残留  $NO$ ,所以进入组织中的物质仅为一半,另一部分与肉组织反应而消失,而  $NO$  特别重要,有人认为它是一种有毒气体,很难清除。 $NO$  再与水结合形成硝酸或亚硝酸,使肉色变淡。

Banwart 定义了防腐剂抑菌作用的四个基本位点:酶和其它蛋白质;遗传系统;细胞壁和细胞膜;必需营养素的连接<sup>[28]</sup>。已经有很多方法用来检测肉中亚硝酸盐形成的复合物,但是这些方法局限性很大。或者它们只能检测某些一些化学种类,或者它们不能区分不同的种类。Griess 反应可以产生有色的偶氮化合物,可以检测亚硝酸盐和相关的  $N(III)$  种,但是在有氧条件下, $NO$  能够转化成  $NO$ 。色谱层析法分析速度慢,而且可以导致种属的化学互变。电极法中  $NO$  易受存在的一些氧化和还原复合物的作用,当然最近的一些改进方法已经克服了一些干扰。电磁自转共振(electron paramagnetic resonance, EPR)光谱能够检测到一些亚硝酰类的物质如亚硝酰铁的复合物(nitrosyl iron complexes),只要这些物质是顺磁性的,即具有奇数个电子。 $^{15}N$ -核磁共振可选择性的检测不同种类但是不是很灵敏,不能检测含有  $^{15}N$  的大分子物质,因此不能从数量上检测添加到食品系统中的亚硝酸盐(以  $N$  计)<sup>[5]</sup>。

亚硝酸盐对肉毒杆菌的抑制作用在以上几个方面都取得了一些进展。

### 4.1 抑制 Fe-S 蛋白和能量代谢

抑制呼吸作用特别是好氧微生物的呼吸作用一直被认为是亚硝酸盐的可能的抑菌机理。这可以解释由巨噬细胞产生的  $NO$  的细胞毒素活动,能够抑制线粒体、细胞色素氧化酶和细菌的末端氧化酶。

早在 1976 年 O'Leary 和 Solberg 发现:被亚硝酸盐抑制的产气芽孢梭状杆菌的可溶性细胞化合物中自由-SH 基的浓度由原来的 91% 下降了<sup>[29]</sup>。Tompkin 等认为由亚硝酸盐产生的亚硝酸,进而产生的  $NO$  可与细菌的 Fe-S 蛋白反应<sup>[30]</sup>。Fe-S 蛋白在好氧和厌氧细菌的能量代谢中都有重要作用,因此可能是亚硝酸盐、 $NO$  和相应复合物的抑菌作用的靶目标。由自然状态下铁硫蛋白的  $[2Fe-2S]$  和  $[4Fe-4S]$  簇,研究显示能够经受温和状态下的亚硝酰基物的作用,产生 EPR 可识别的铁硫亚硝酰基的种群。一些学者认为:亚硝酸盐主动传递和电子传递的抑制作用,是与亚硝酸盐对非血红素酶(例如:铁氧还原蛋白和脱氢酶)的抑制作用相一致的<sup>[31,32]</sup>。螯合剂的存在可以提高抑制作用,其机理可能源自于螯合剂与底物铁的作用:使更多的亚硝酸盐产生  $NO$ , 并与微生物反应而变得

具有抗菌效果。

Woods 等研究了亚硝酸盐对肉毒梭状芽孢杆菌细胞作用机制,尤其是葡萄糖的作用机制<sup>[33]</sup>。他们发现当将亚硝酸盐添加到接种到含葡萄糖的介质中产气芽孢梭状杆菌的细胞悬浮液中时,细胞间的 ATP 浓度和从细胞排出丙酮酸迅速急剧下降。丙酮酸增加说明亚硝酸盐是作用在 phosphotransfer 系统上的,而此系统是肉毒杆菌的 ATP 重要来源。Phosphotransfer 系统将丙酮酸转化为二氧化碳、氢和乙酰磷酸,进一步由醋酸激酶和 ADP 作用转化为醋酸。此系统由三种铁硫蛋白组成:丙酮酸:铁氧化还原蛋白酶、铁氧化还原蛋白酶和氢化酶。Wood 等推论认为亚硝酸盐抑制产气芽孢梭状杆菌的一个重要机制即是  $NO$  与丙酮酸-铁氧化还原蛋白酶(PFR)的非血红素铁形成了复合物。

在 Woods 等的研究的基础上,Reddy 等研究将经过亚硝酸盐-抗坏血酸钠处理的肉毒梭状芽孢杆菌的抽提物在 EPR 上进行分析,发现  $NO$  与铁硫化合物反应形成铁-亚硝酰化物。后者的存在导致了诸如铁氧化还原蛋白等 Fe-S- $NO$  复合物的破坏<sup>[34]</sup>。

Carpenter 等研究了亚硝酸盐和亚硝酰基复合物对丙酮酸:铁氧化还原蛋白酶的作用机制,他们报道认为亚硝酸盐引起肉毒梭状芽孢杆菌中的 EPR 可识别的 Fe-S- $NO$  复合物产量变化<sup>[35]</sup>。

McMindes 和 Siedler 认为亚硝酸盐中丙酮酸:铁氧化还原蛋白酶的抑制作用与巯基集团活动有关。

Payne 等研究了不同抑菌作用的亚硝酰基复合物对肉毒杆菌的 Fe-S 蛋白的作用机制,他们研究发现复合物的细菌活动和分离蛋白的抑制作用之间没有相关性<sup>[36]</sup>,例如, RBS 对铁氧化还原蛋白的 Fe-S 的聚簇作用很小,而且 RBS 上的 Fe-S 蛋白生长水平很低。他们推论认为 Fe-S- $NO$  复合物可能抑制了 Fe-S 的聚簇合成,但其过程机理不明。

有研究认为  $NO$  钝化了其它 Fe-S 蛋白的活性。Fe-S 蛋白中的 Fe-S 的聚簇,其 Fe 原子与 S 完全结合(fully coordinated),因此在铁氧化还原蛋白对  $NO$  不是很敏感。但是柠檬酸循环中的顺乌头酸酶参与柠檬酸盐和异柠檬酸盐的互变时,因其含有  $[4Fe-4S]$  簇所以极易受  $NO$  的攻击。这是因为聚簇中的一个铁原子不与半胱氨酸结合,而与结合水或柠檬酸盐结合。另一个对  $NO$  敏感的 Fe-S 蛋白是亚铁螯合酶,它将铁转化为血红素<sup>[37]</sup>。

乳酸菌对亚硝酸盐的抵抗作用是众所周知的,但机理直到现在才清楚:这些菌中缺少铁氧还原蛋白。梭状芽孢杆菌中含铁氧还原蛋白和氢化酶,它们在丙酮酸厌氧降解过程中具有电子传递作用产生 ATP、 $H_2$  和  $CO_2$ 。梭状芽孢杆菌中的铁氧还原蛋白其相对分子质量为 6000,每摩尔含有 8 个铁原子和 8 个活泼态硫原子。

### 4.2 抑制其它蛋白

Riha 和 Solberg 认为亚硝酸盐对产气荚膜杆菌的抑菌作用是作为亚硝酸提供的亚硝酸盐与含巯基的细菌细胞之间的反应<sup>[38]</sup>。亚硝酸与巯醇反应产生亚硝基硫醇,对酶有抑制作用,如 3-磷酸甘油醛脱氢酶。与蛋白作用有关的巯醇和其复合物如亚硝基半胱氨酸可以储备  $NO$ ,并重新释放用于后续反应,或将  $NO$  转化为高亲核性的受体基团。

蛋白中的其它氨基酸也有上述种类,如亚硝基酪氨酸已被用作哺乳动物的过氧亚硝酸盐是否存在的一个标记。亚硝酸盐对赖氨酸的去氨基作用已被用作食品中蛋白是否与亚硝

酸盐反应得一个标记<sup>[39]</sup>。

#### 4.3 抑制 DNA 和基因表达

亚硝酸盐在中性条件下不与 DNA 的碱基反应,但是 NO 和亚硝基硫醇在过氧化物和氢过氧化物存在下分别发生 strand breakage<sup>[40]</sup>。这些反应在需氧条件下对李斯特菌和大肠杆菌组织的抑制作用有所减弱。RNA 还原酶在 DNA 形成中有重要作用,它是另一个 NO 和相关种群的作用位点。Kroncke 等研究发现 NO 能够攻击锌指类型(zinc finger- type)的 DNA 连接蛋白,影响到基因的调节作用<sup>[41]</sup>。

分子生物学技术的发展使许多研究者从抑制细菌的毒素基因表达上开展了许多研究。Szabo 等最先建立了检测肉毒梭菌 A~E 型毒素基因的 PCR 技术<sup>[42]</sup>,毒素产生需要毒素基因的转录表达,通过测定转录时产生的短期的 RNA,可以替代实际毒素的检测。应用实时 PCR(Real-time PCR)和竞争性反转录 PCR(competitive reverse transcription PCR, cRT-PCR)方法已成功用于肉毒梭状芽胞杆菌 E 种毒素基因表达的检测<sup>[43,44]</sup>。Sharkey 等应用 cRT-PCR 分别对亚硝酸盐和山梨酸盐对肉毒梭状芽胞杆菌 E 种的 mRNA 抑制作用进行了研究,发现 pH 7.0 的介质中添加 1mg/mL 山梨酸钠或 0.1mg/mL 分别使总 RNA 中毒素 mRNA 的量减少了 10% 和 25%<sup>[45]</sup>。

#### 4.4 抑制细胞壁和细胞膜

芽孢杆菌的细胞壁上有 DL-二氨基庚二酸盐和半乳糖,在电镜下观察,它属于典型的革兰氏阳性菌,有一个无定形的电子密集的内层,和一个排列规则的具有圆柱形亚组(通常指的是 Slayer)的外层。Slayer 蛋白分子量是 40 到 200kDa,从 Clostridium difficile 中已分离出 32 kDa 和 45 kDa 两种蛋白<sup>[5]</sup>。

一些抑菌剂通过抑制细胞壁的单体或它们的多聚合物以抑制细胞壁的合成,其它作用没有进入细胞中,一种与细胞壁或细胞膜的反应可能是改变细胞的渗透性,削弱营养成分通过细胞的运输,或者使细胞成分的流失。只有对细胞壁的破坏通常不能杀死细菌的细胞,反而增加渗透性会增加有毒种群的进入。

O'Leary 和 Solberg 发现 14mM 的亚硝酸盐抑制产气荚膜杆菌后呈现深灰色或棕色,其均匀性也发生了改变并且很难在缓冲液中分散。他们推论认为这种着色与细胞壁或细胞膜的破坏有关<sup>[46]</sup>。Payne 等也发现芽孢杆菌的细胞在硫化铁、半胱氨酸和亚硝酸盐的混合液存在下颜色更深,且发生聚集。Buchman 和 Hansen 在研究亚硝酸盐和 S-亚硝基硫醇对 Bacillus cereus T 的芽孢生长的抑制作用机制时发现,亚硝酸盐对需氧菌的抑制作用与膜巯基基团(membrane sulphydryl groups)的钝化有关,而这些巯基基团对细胞的发育有重要作用,更为重要的是,研究结果联系了巯基修正作用和实际抑制作用,可能的靶蛋白是参与营养运输的重要蛋白<sup>[47]</sup>。当将 SNP 添加到产芽孢杆菌和 L. monocytogenes 的培养基中后,发现顺磁性的种群减少,并在几十分钟内腐烂(decay)。这说明亚硝酸盐与硫醇发生了反应,放出了 NO。快速的内在反应与细胞膜的硫醇基团消失有关。但是,研究发现通过这种处理芽孢杆菌被破坏, L. monocytogenes 不发生反应。通过对比发现, L. monocytogenes 在厌氧和需氧条件下对 Roussin 黑盐(Roussin's black salt, RBS)非常敏感,这就说明两种复合物的抑制机制是不相同的。

也有研究发现在一些亚硝基复合物存在下细胞发生了消散(lysis),产芽孢杆菌在 RBS 和 SNP 存在下的细胞生长用电镜观察,低浓度时出现水泡,高浓度时发生消散。通过对比发现,在亚硝酸盐、NO 或 SIN-1 的杀菌浓度下没有发现细胞的

消散,因此可能细胞消散是下疳的次生效应或者存在其它的抑菌机制<sup>[48]</sup>。

## 5 腌制肉中亚硝酸盐抑菌分子机理的研究展望

亚硝胺能成为食品组成成分,是通过使用亚硝酸盐作为添加剂,然后通过加工制备过程而形成。腌制肉已引起人们的极大注意,是因为加进亚硝酸盐形成亚硝胺的潜力最大,并且因为摄取的亚硝酸盐可能导致胃中亚硝胺的形成。解决“亚硝酸盐问题”有两个关键方法,其一是利用可以全部或部分代替亚硝酸盐的试剂;其二是在含有正常亚硝酸盐含量的食品中利用可以阻止亚硝胺类化合物形成的试剂。研究腌制肉中亚硝酸盐抑菌机理特别是分子机理可为解决“亚硝酸盐问题”提供理论依据。

研究亚硝酸盐抑菌的分子机理,包括亚硝酸盐如何对细菌靶细胞进行定位、攻击和反应从而产生抑制作用,然后选择和设计可以模拟亚硝酸盐抑菌机理的复合物,作为替代亚硝酸盐的新的食品防腐剂、抗氧化剂或广义的抑菌剂<sup>[5]</sup>。这是将来的研究方向和前景。

#### 参考文献

- [1] 孔保华,罗欣,彭增起.肉制品工艺学[M].黑龙江:黑龙江科学技术出版社,2001:203~216
- [2] Eklund M. W., Wieler D. I., Poyssky F. T. Outgrowth and toxin production of nonproteolytic type B Clostridium botulinum at 3.3 to 5.6 °C [J]. J Bacteriol. 1967, 93(4): 1461~1462
- [3] Silliker J. H., Greenberg R. A., Schack W. R. Effect of individual curing ingredients on the shelf stability of canned comminuted meats [J]. Food Technology. 1958, 12: 551~554
- [4] Fennema O. R.. Food Chemistry (2nd edition) [M]. Revised and Expanded. 1985, 645~646
- [5] Cammack R., Joannou C. L., Cui X.-Y., et al., Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation [J]. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 1411: 475~488
- [6] Tarr H. L. A.. Bacteriostatic action of nitrites [J]. Nature. 1941, 147: 417~418
- [7] Zhu L., Gunn C., Beckman J. S.. Bactericidal activity of peroxynitrite [J]. Arch. Biochem. Biophys. 1992, 298: 452~457
- [8] Asan T., Solberg M.. Inhibition of Clostridium perfringens by heated combinations of nitrite, sulphur and ferrous or ferric ions [J]. Appl. Environ. Microbiol. 1976, 31: 49~52
- [9] Wasseman A. E., Huhtanen C. N. Nitrosamines and the inhibition of Clostridia in medium heated with sodium nitrite [J]. J. Food Sci. 1972, 37: 785~786
- [10] NAS. The health effects of nitrite, nitrate, and N-nitroso compounds [M]. Natl. Acad. of Sciences, Natl. Acad. Press, Washington, D. C. 1981
- [11] [美] James M. Jay 编著.徐岩,张继民,汤丹剑,等译.现代食品微生物学(第五版).北京:中国轻工业出版社,2001:252~256
- [12] Riemann H. Safe heat processing of canned cured meats with regard to bacterial spores [J]. Food Technol. 1963, 17: 39~49
- [13] Duncan C. L., Foster E. M.. Role of curing agents in the preservation of shelf-stable canned meat products [J]. Appl. Microbiol. 1968, 16: 401~405
- [14] Roberts T. A., Ingram M.. The effect of sodium chloride, potassium nitrate and sodium nitrite on the recovery of heated bacterial spores [J]. Food Technol. 1966, 1: 147~163

- [15] Chang P. C., Akhtar S., Burke M. T., et al. Effect of sodium nitrite on *Clostridium botulinum* in canned luncheon meat: Evidence for a Perigo- type factor in the absence of nitrite [J]. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 1974, 7: 209~ 212
- [16] Paquette M. W., Rohach M. C., Sofos J. N., et al. Concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on color and sensory qualities of commercially prepared bacon [J]. *J. Food Sci.* 1980, 45: 1293~ 1296
- [17] Roberts T. A., Gibson A. M., Robinson, A.. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. II. Growth in pork slurries prepared from "high" pH meat (range 6.3~ 6.8) [J]. *J. Food Technol.* 1981, 16: 267~ 281
- [18] Tanaka N., Meske L., Doyle M. P., et al. Plant trials of bacon made with lactic acid bacteria, sucrose and lowered sodium nitrite [J]. *J. Food Protect.* 1985, 48: 679~ 686
- [19] Tanaka N., Gordon N. M., Lindsay R. C., et al. Sensory characteristics of reduced nitrite bacon manufactured by the Wisconsin process [J]. *J. Food Protec.* 1985, 48: 687~ 692
- [20] Ivey F. J., Shaver K. J., Christiansen L. N., et al. Effect of potassium sorbate on toxigenesis by *Clostridium botulinum* in bacon [J]. *J. Food Protec.* 1978, 41: 621~ 625
- [21] Sofos J. N., Busta F. F., Allen C. E.. Influence of pH on *Clostridium botulinum* control by sodium nitrite and sorbic acid in chicken emulsions [J]. *J. Food Sci.* 1980, 45: 7~ 12
- [22] Tompkin B. L., Christiansen L. N., Shaparis A. B.. Enhancing nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* with isoscorbate in perishable canned cured meat [J]. *Appl. microbiol.* 1978, 35: 59~ 61
- [23] Tompkin B. L., Christiansen L. N., Shaparis A. B.. Iron and anti botulinal efficacy of nitrite [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37: 351~ 353
- [24] Pierson M. D., Reddy N. R.. Inhibition of *Clostridium botulinum* by antioxidants and related phenolic compounds in comminuted pork [J]. *J. Food Sci.* 1982, 47: 1926~ 1929, 1935
- [25] Seward R. A., Deibel R. H., Lindsay R. C.. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in micro- cultures [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44: 1212~ 1221
- [26] Roberts T. A., Gibson A. M., Robinson A.. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. III. The effect of potassium sorbate [J]. *J. Food Technol.* 1982, 17: 307~ 326
- [27] Vareltsis. K., Buck E. M., Labbe R. G.. Effectiveness of a betala sorbate system versus sodium nitrite for color development and control of total aerobes, *Clostridium perfringens* and *Clostridium sporogenes* in chicken frankfurters [J]. *J. Food Protect.* 1984, 47: 532~ 536
- [28] Banwart G. J.. *Basic Food Microbiology* [M]. Van Nostrand Reinhold, New York, 1989
- [29] O'Leary V., Solberg M.. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, 31: 208~ 212
- [30] Tompkin R. B., Christiansen L. N., Shaparis A. B.. The effect of iron on botulinal inhibition in perishable canned cured meat [J]. *J. Food Technol.* 1978, 13: 521~ 527
- [31] Roberts, T. A., Gibson A. M., Robinson A.. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. III. The effect of potassium sorbate [J]. *J. Food Technol.* 1982, 17: 307~ 326
- [32] Yarbrough J. M., Rake J. B., Egon R. G.. Bacterial inhibitory effect of nitrite: Inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 39: 831~ 834
- [33] Woods L. F. J., Wood J. M., A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*, *J. Appl. Bacteriol.* 1982, 52: 109~ 110
- [34] Reddy D., Lancaster J. R. Jr., Comfort D. P.. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: Electron spin resonance detection of iron- nitric oxide complexes [J]. *Science.* 1983, 221: 769~ 770
- [35] Carpenter C. E., Reddy D. S. A., Cornforth D. P., Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate- ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite, *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53: 549~ 552
- [36] Payne M. J., Glidewell C., Cammack R., Interactions of iron- thiol- nitrosyl compounds with the phosphoroclastic system of *Clostridium sporogenes* [J]. *J. Gen. Microbiol.* 1990, 136: 2077~ 2087
- [37] Drapier J. C., Interplay between NO and [Fe- S] clusters: Relevance to biological systems, *Methods: A Companion to Methods Enzymol.* 1997, 11: 319~ 329
- [38] Riha J. W. E., Solberg M.. *Clostridium perfringens* inhibition by sodium nitrite as a function of pH, inoculum size and heat [J]. *J. Food Sci.* 1975, 40: 439~ 442
- [39] Boese M., Keese M. A., Becker K., et al. Inhibition of glutathione reductase by nitrosyl- iron- dithiolate complex [J]. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 21767~ 21773
- [40] Roy B., Lepoivre M., Henry Y., et al. Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits [J]. *Biochemistry* 1995, 34: 5411~ 5418
- [41] Kroncke K. D.. Nitric oxide destroys zinc- sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc Finger- Type yeast transcription activator lac9 [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 200: 1105~ 1110
- [42] 陈家华. 现代食品分析新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 446~ 448
- [43] Kimura B., Kawasaki S., Nakano H., et al. Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified atmosphere packaged fish [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67: 206~ 216
- [44] Mc Grath S., Dooley J. S. G., Haylock R. W.. Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription- PCR [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66: 1423~ 1428
- [45] Sharkey F. H., Markos S. I., Haylock R. W.. Quantification of toxin- encoding mRNA from *Clostridium botulinum* type E in media containing sorbic acid or sodium nitrite by competitive RT- PCR [J]. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 232: 139~ 144
- [46] Sleytr U. B., Messner P.. Crystalline surface layers in prokaryotes [J]. *J. Bacteriol.* 1988, 170: 2891~ 2897
- [47] Buchman G. W., Hansen J. N.. Modification of membrane sulfhydryl groups in bacteriostatic action of nitrite [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53: 79~ 82
- [48] Joannou C.. Characterization of the bactericidal properties of sodium nitroprusside and other pentacyanonitrosyl complexes on the food- spoilage bacterium *Clostridium sporogenes* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 64: 3195~ 3201