

乳酸足球菌精氨酸代谢与瓜氨酸积累

杨怡敏^{1,2,3}, 方芳^{1,2,3}, 周朝晖⁴, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 4. 广东珠江桥生物科技股份有限公司, 广东 中山 528415)

摘要: 酿造酱油中氨基甲酸乙酯的主要前体物质瓜氨酸由乳酸足球菌通过精氨酸代谢产生。为了研究酱油中瓜氨酸的积累机制,以分离自酱油成曲的乳酸足球菌 *Pediococcus acidilactici* BBE 1120 为研究对象,考察不同培养条件(碳源、盐浓度、氨基酸)对其积累瓜氨酸的影响。结果表明,高盐环境是导致乳酸足球菌积累瓜氨酸的关键因素,碳源的种类及浓度对瓜氨酸的积累也有一定影响,培养基中精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸含量对瓜氨酸的积累影响不大。该研究结果对阐明酱油发酵过程中氨基甲酸乙酯前体物质的积累机制具有重要意义。

关键词: 酱油;氨基甲酸乙酯;乳酸足球菌;精氨酸脱亚胺酶途径;瓜氨酸

中图分类号:Q 93-3 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2016)03—0247—05

Arginine Metabolism and Citrulline Accumulation of *Pediococcus acidilactici*

YANG Yimin^{1,2,3}, FANG Fang^{1,2,3}, ZHOU Zhaohui⁴, CHEN Jian^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Collaborative Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Guangdong Pearl River Bridge Biological Limited Corporation, Zhongshan 528415, China)

Abstract: Citrulline, a major precursor of ethyl carbamate in soy sauce, is produced by *Pediococcus acidilactici* via the arginine deiminase pathway. The effect of cultural conditions to citrulline accumulation of *Pediococcus acidilactici* BBE 1120 strain isolated from koji was investigated through carbon sources, salt concentration, and amino acids. The mechanism of citrulline accumulation in soy sauce was discussed. The high concentration of NaCl was demonstrated as the key factor to citrulline accumulation of the strain. The types and concentrations of carbohydrates also affected the citrulline accumulation, while insignificant influence was observed with the presence of arginine, citrulline and ornithine. This study is of great importance on the illustration of the accumulation mechanism for ethyl carbamate precursor during soy sauce fermentation.

Keywords: soy sauce, ethyl carbamate, *Pediococcus acidilactici*, arginine deiminase pathway, citrulline

收稿日期: 2014-11-25

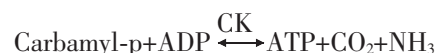
基金项目: 国家自然科学基金项目(31371821); 国家 973 计划项目(2012CB720802)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。E-mail: gdcu@jiangnan.edu.cn

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, 简称 EC)又称尿烷、乌拉坦,国际癌症研究机构(IARC)在 2002 年将氨基甲酸乙酯归类为第 2B 组(或可能令人类患癌的物质),经 2007 年再次评估后又将其改为第 2A 组(可能令人类患癌的物质)^[1]。人体摄入氨基甲酸乙酯后,可通过以下几条途径对其进行代谢:以尿的形式将 5%的氨基甲酸乙酯排出体外;通过肝内酯酶的作用,将 90%以上的氨基甲酸乙酯分解为乙醇、氨和碳水化合物等(这种途径是无毒性的);通过细胞色素 P450 的作用,将 0.5%左右的氨基甲酸乙酯氧化为乙烯基-氨基-甲酸乙酯,然后形成乙烯基-氨基-甲酸乙酯环氧化物,这种环氧化物在体内形成 DNA 加聚物,能破坏 DNA 双链,最终导致机体癌变;另外,同样通过细胞色素 P450 的作用,能将 0.1%左右的氨基甲酸乙酯氧化为 N-羟基-氨基甲酸乙酯,后者能够诱导 Cu²⁺调控的 DNA 损伤,该种途径是较为普遍的一种^[2]。因此,当氨基甲酸乙酯被人体过量持续摄入时,可能会导致肺癌、肝癌等严重肿瘤疾病,对免疫系统造成极大损害。

氨基甲酸乙酯是某些发酵食品在发酵过程中经由微生物代谢产生的可致癌物质,酱油中就含有一定量的氨基甲酸乙酯。酱油是一种有着悠久历史的传统调味品,受到世界各地的广泛欢迎,与人们的日常饮食密切相关。而酱油中氨基甲酸乙酯的存在可能会导致酱油潜在的不安全性,因此迫切需要了解酱油中氨基甲酸乙酯的形成机制,以便采取相应控制措施。

在不同的发酵食品中,由于原料、参与的微生物以及发酵工艺等因素的不同,氨基甲酸乙酯的形成机理也各不相同,尿素、氨甲酰磷酸、瓜氨酸、焦碳酸二乙酯和氰化物等均可与乙醇反应生成氨基甲酸乙酯^[3-5]。而在酱油发酵过程中,氨基甲酸乙酯的主要前体物质是瓜氨酸和乙醇,其中瓜氨酸主要是由酱醪中的乳酸菌经由精氨酸脱亚胺酶途径(Arginine deiminase pathway, 简称 ADI 途径)降解精氨酸产生^[6],该途径主要涉及 3 个酶,分别为精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, 简称 ADI),鸟氨酸转氨甲酰酶(Ornithine transcarbamylase, 简称 OTC),氨基甲酸激酶(Carbamate kinase, 简称 CK),其具体反应如下:



在高盐稀态酱油的制备过程中,发酵前期是瓜氨酸的快速生成时期,乳酸足球菌是酱油中生成与积累瓜氨酸的主要微生物^[6]。乳酸菌的 ADI 途径受到环境因素的调控,例如 Vrancken 等研究发现,pH、盐浓度、温度对 *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 的 ADI 途径有所影响^[7-8]。糖类涉及能量代谢的物质也可能对 ADI 途径产生影响^[9-10]。在不同的环境因素下,ADI 途径反应产物中瓜氨酸和鸟氨酸的比例也会随之变化。根据高盐稀态酱油酿造工艺,以乳酸足球菌 *Pediococcus acidilactici* BBE 1120 为研究对象,考察不同环境因素(碳源、盐浓度、涉及 ADI 途径的 3 种氨基酸)对其精氨酸代谢与酱油中氨基甲酸乙酯前体物质瓜氨酸积累的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高盐稀态酱油样品,取自广东某酱油厂;乳酸足球菌 *Pediococcus acidilactici* BBE 1120,分离自酱油成曲;MRS 培养基,购自英国 Oxoid 公司;精氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸标样,购自上海生工生物工程股份有限公司;CO₂ 气体,购自江苏省无锡市新南化学气体有限公司。

1.2 仪器与设备

厌氧培养箱,三洋公司制造;PHS-3C 型酸度计,杭州亚美电子仪器厂制造;1200 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司制造。

1.3 方法

1.3.1 测定酱油发酵过程样品中糖的种类与含量 取酱油厂成曲拌盐水后的第 0、1、4、7 天的高盐稀态酱油样品,采用 8 000 r/min 离心样品 5 min,取上清液。准确移取 3.0 mL 上清液至 10.0 mL 容量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,充分摇匀,8 000 r/min 对其离心 10 min。移取 1.0 mL 上清液至 50.0 mL 容量瓶中,氮吹仪吹干后,用超纯水稀释至刻度,取 3.0 mL 过 0.22 μm 尼龙滤膜后用于高效阴离子交换色谱分析^[11]。

1.3.2 不同培养条件对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响 从乳酸足球菌甘油管中取菌液划线至 MRS 固体培养基,于 37 °C 厌氧培养箱中

培养 20 h,挑取单菌落接种至 50 mL MRS 培养基,于 37 ℃厌氧培养箱中培养 20 h,采用 8 000 r/min 离心培养液 5 min。弃上清液,用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液洗涤菌体两次,弃上清液,收集菌体,将菌体加入相应的培养体系,充分悬浮后于 37 ℃厌氧培养箱培养。培养开始前取样品 1 mL,培养后定期取样。

考察不同糖对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响时,培养体系分别为:含有 5 g/L 精氨酸,不同质量浓度葡萄糖(0、2、4、6、8 g/L)的 MRS 培养基(pH 5.5);含有 5 g/L 精氨酸,不同质量浓度甘露糖(0、3、6、9、12 g/L),不含葡萄糖的 MRS 培养基(pH 5.5);含有 5 g/L 精氨酸,不同质量浓度蔗糖(0、8、16、24、32、40 g/L),不含葡萄糖的 MRS 培养基(pH 5.5)。培养 4 d 后取样用于 HPLC 分析。

考察 NaCl 质量浓度对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响时,培养体系为含有 5 g/L 精氨酸的 MRS 培养基(pH 5.5),其 NaCl 质量浓度分别为 0、10、16、18、20、22 g/dL,培养 7 d 后取样用于 HPLC 分析。

考察额外添加 ADI 途径中 3 种氨基酸对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响时,培养体系分别为:含有 18 g/dL NaCl,不同质量浓度精氨酸(0、2.5、5、10、20 g/L)的 MRS 培养基(pH 5.5);含有 18 g/dL NaCl,5 g/L 精氨酸,不同质量浓度瓜氨酸(0、2.5、5、10、20 g/L)的 MRS 培养基(pH 5.5);含有 18 g/dL NaCl,5 g/L 精氨酸,不同质量浓度鸟氨酸(0、1.9、3.8、7.6、15.2 g/L)的 MRS 培养基(pH 5.5)。培养 7 d 后取样用于 HPLC 分析。

1.3.3 氨基酸的测定 待测定样品的处理方法:采用 8 000 r/min 离心样品 5 min,取 200 μ L 上清液,加入 800 μ L 三氯乙酸以沉淀蛋白质,用 0.22 μ m 水系滤膜对其过滤处理后用于游离氨基酸的测定。游离氨基酸的测定采用高效液相色谱法^[12]。

2 结果与讨论

2.1 酱醪中糖的种类及含量分析

研究碳源对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响时,主要考察酱醪中糖类物质对菌株积累瓜氨酸的影响。由于在高盐稀态酱油制备过程中,发酵前 7 d 是瓜氨酸的快速积累时期,因此首先对酱油发酵前 7 d 酱醪中糖类物质的种类及含量进行了分析,结果如表 1 所示。

表 1 高盐稀态酱油发酵前期样品中糖的种类及含量

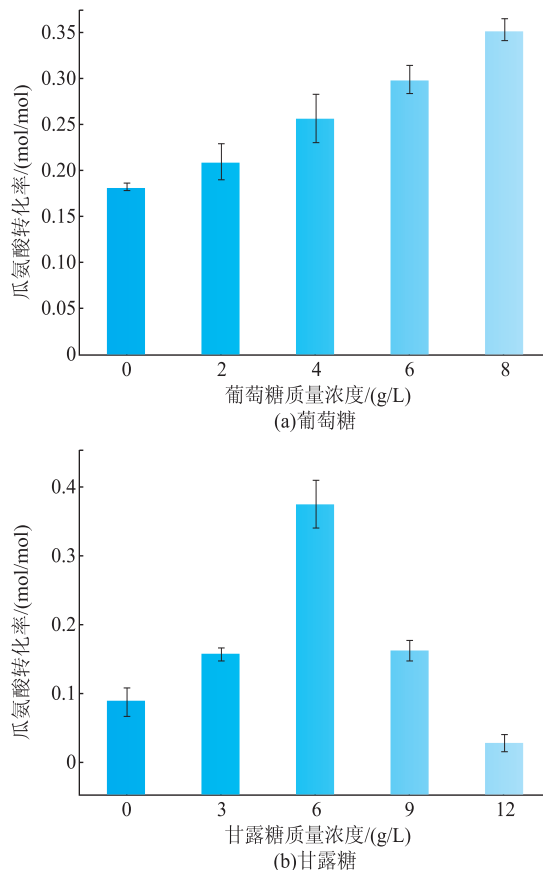
Table 1 Quantification of sugars in morimi

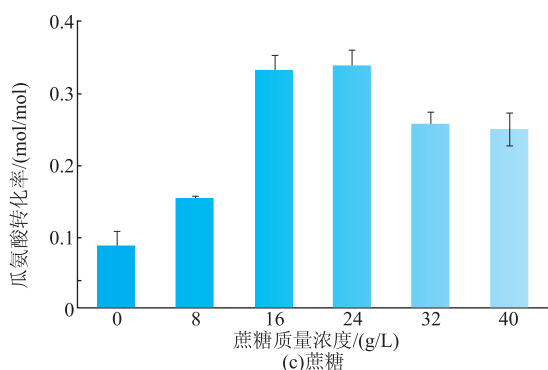
样品发酵 天数/d	阿拉伯糖 质量浓度/ (g/L)	葡萄糖 质量浓度/ (g/L)	甘露糖 质量浓度/ (g/L)	蔗糖 质量浓度/ (g/L)
0	0.005	0.030	0.064	0.194
1	0.162	2.015	4.111	16.809
4	0.212	6.060	3.533	32.107
7	0.397	5.357	9.072	37.756

在酱油前期发酵过程中,酱醪中主要含有葡萄糖,甘露糖和蔗糖等糖类物质。对酱醪进行离心处理后,在其上清液中,葡萄糖的质量浓度在 0~7 g/L,甘露糖的质量浓度在 0~10 g/L,蔗糖质量浓度最高,在 0~38 g/L。

2.2 碳源对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

原料中碳源的种类及含量会影响菌体的生长,也会对菌体的代谢产生一定影响。乳酸菌精氨酸代谢途径可能会受到碳源等能量物质的影响^[9-10],因此考察了发酵前期酱醪中主要的 3 种糖类物质对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响,结果如图 1 所示。





瓜氨酸转化率:每转化 1 mol 精氨酸生成瓜氨酸的物质的量
图 1 碳源对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

Fig. 1 Effect of sugars on citrulline accumulation by *P. acidilactici*

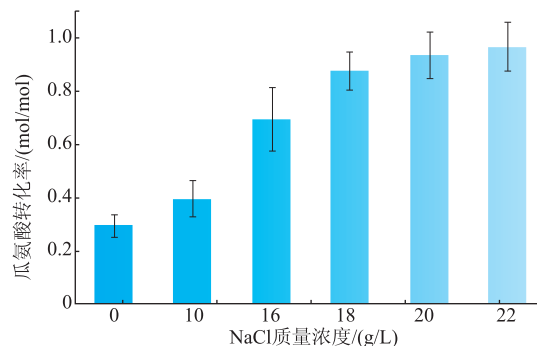
在含糖类物质时,瓜氨酸的转化率为 0.18。随着葡萄糖质量浓度的升高,瓜氨酸的转化率也随之升高,当葡萄糖质量浓度为 8 g/L 时,瓜氨酸的转化率达到 0.35。随着甘露糖质量浓度的升高,瓜氨酸的转化率先升高后下降,在甘露糖质量浓度为 6 g/L 时,瓜氨酸的转化率最高,达到 0.38。随着蔗糖质量浓度的升高,瓜氨酸的转化率亦是先升高后下降,在蔗糖质量浓度为 24 g/L 时,瓜氨酸的转化率最高,达到 0.34。在整个 ADI 途径中,由 CK 催化的反应是产能反应。在碳源(糖类物质)充足的情况下,该步反应可能会被抑制,进而由 OTC 催化的反应也会受到抑制,瓜氨酸积累量可能会因此上升。

2.3 食盐质量浓度对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

在高盐稀态酱油发酵过程中,酱醪中 NaCl 的质量浓度常高达 18 g/dL,高盐环境对酱醪中微生物的代谢会产生一定影响,进而可能会对瓜氨酸的积累造成影响。因此,考察了 NaCl 对乳酸足球菌经由 ADI 途径积累瓜氨酸的影响,结果如图 2 所示。

在不同 NaCl 质量浓度培养条件下,乳酸菌瓜氨酸转化率呈现出差异。在无 NaCl 情况下,乳酸足球菌少量积累瓜氨酸,瓜氨酸的转化率为 0.29。随着 NaCl 质量浓度的升高,乳酸足球菌瓜氨酸的转化率也随之升高,在 NaCl 质量浓度为 22 g/dL 时转化率几乎达到 100%,即精氨酸全部转化生成成为瓜氨酸,而瓜氨酸并未进一步转化生成鸟氨酸。换言之,NaCl 的存在一定程度上抑制了瓜氨酸向鸟氨酸的进一步转化,导致瓜氨酸的积累。而高盐稀态酱油发酵过程中 NaCl 质量浓度高达 18 g/dL,这一高

盐环境会导致瓜氨酸的大量积累。



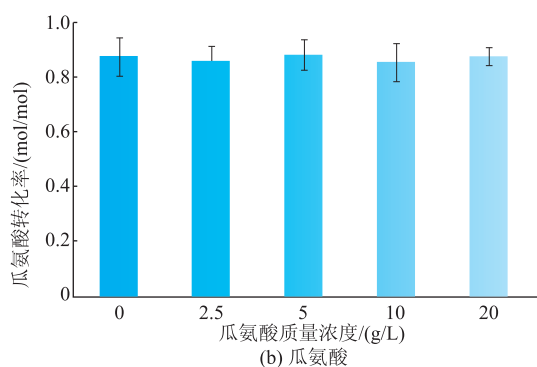
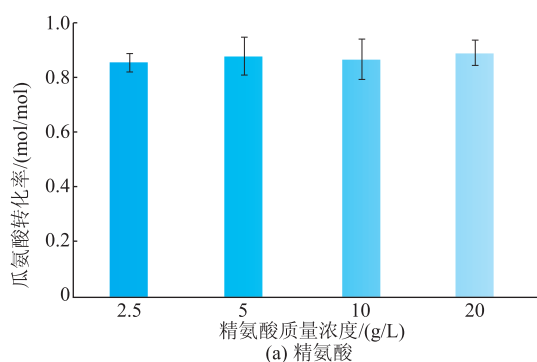
瓜氨酸转化率:每转化 1 mol 精氨酸生成瓜氨酸的物质的量
图 2 NaCl 质量浓度对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

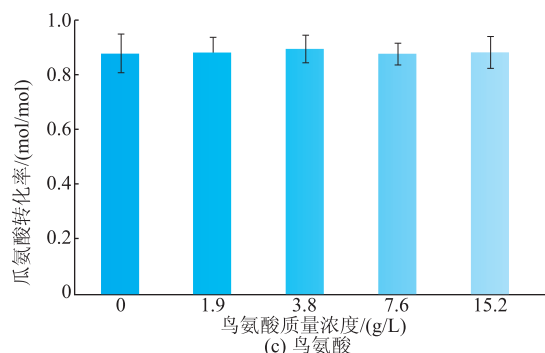
Fig. 2 Effect of NaCl on citrulline accumulation by *P. acidilactici*

2.4 精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

ADI 途径中涉及 3 种氨基酸的代谢,分别为精氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸。这 3 种氨基酸的质量浓度可能影响乳酸足球菌的 ADI 途径,进而对瓜氨酸积累造成影响。因此,考察了额外添加这 3 种氨基酸对瓜氨酸积累的影响,结果如图 3 所示。

当培养体系精氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸质量浓度不同时,除在不添加精氨酸,18 g/dL NaCl 浓度的 MRS 培养基中不积累瓜氨酸外,其它培养体系中瓜氨酸转化率差异不大,均大于 80%。





瓜氨酸转化率:每转化 1 mol 精氨酸生成瓜氨酸的物质的量

图 3 添加 3 种氨基酸对乳酸足球菌积累瓜氨酸的影响

Fig. 3 Effect of additions of amino acids on citrulline accumulation by *P.acidilactici*

3 结 语

本实验结果表明,NaCl 质量浓度是影响乳酸足

球菌积累瓜氨酸的一个重要因素。在培养基含有 18 g/dL NaCl 的培养条件下,乳酸足球菌瓜氨酸对精氨酸的转化率大于 80%,只要乳酸足球菌在培养体系中对精氨酸的降解时间够长,瓜氨酸会大量积累。因此,在高盐稀态酱油酿造过程中,高盐环境是导致氨基甲酸乙酯前体物质瓜氨酸积累的一个关键因素。此外,碳源(糖类物质)的种类及含量对瓜氨酸积累亦有一定影响,在碳源缺乏时,瓜氨酸转化率较低;随着碳源含量的升高,瓜氨酸的转化率呈上升趋势。而额外添加精氨酸等 3 种氨基酸对瓜氨酸积累影响不大。

目前,尚未见有如何降低酱油中氨基甲酸乙酯含量的研究报道。而本研究结果可为如何调整高盐稀态酱油酿造相关工艺,以降低氨基甲酸乙酯前体物质,进而为减少或控制酱油中氨基甲酸乙酯含量,提供研究思路和理论基础。

参考文献:

- [1] 张瑞雨,梁孟军,李旭. 酒中氨基甲酸乙酯的研究[J]. 医学信息,2014,27(8):466.
ZHANG Ruiyu,LIANG Mengjun,LI Xu. Research advancement of ethyl carbamate in liquor[J]. *Medical Information*,2014,27(8):466.(in Chinese)
- [2] 杨晓丽,郑凤娥,王冬妍,等. 酒中氨基甲酸乙酯的产生及危害分析[J]. 品牌与标准化,2014(2):20-21.
YANG Xiaoli,ZHENG Fenge,WANG Dongyan,et al. Formation of ethyl carbamate in liquor and evaluation of its hazards[J]. *Enterprise Standardization*,2014(2):20-21.(in Chinese)
- [3] Spano G,Massa S,Arena M E,et al. Argininemetabolism in wine *Lactobacillus plantarum*;in vitro activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamylase(OTCase)[J]. *Annals of Microbiology*,2007,57(1):67-70.
- [4] Uthurry C A,Lepe J A,Lombardero J,et al. Ethyl carbamate production induced by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine[J]. *Food Chemistry*,2006,94(2):262-270.
- [5] Terrade N,Mira de Orduna R. Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation[J]. *Journal of Applied Microbiology*,2006,101(2):406-411.
- [6] Zhang J,Fang F,Chen J,et al. The arginine deiminase pathway of koji bacteria is involved in ethyl carbamate precursor production in soy sauce[J]. *FEMS Microbiology Letters*,2014,358(1):91-97.
- [7] Vrancken G,Rimaux T,WoutersD,et al. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt[J]. *Food Microbiology*,2009,26(7):720-727.
- [8] Vrancken G,Rimaux T,Weckx S,et al. Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101[J]. *International Journal of Food Microbiology*,2009,135(3):216-212.
- [9] Poolman B,Driessen A J,Konings W N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*,1987,169(12):5597-5604.
- [10] Rimaux T,Rivière A,Hebert E M,et al. A putative transport protein is involved in citrulline excretion and re-uptake during arginine deiminase pathway activity by *Lactobacillus sakei*[J]. *Research in Microbiology*,2013,164(3):216-225.
- [11] 朱松,戴军,陈尚卫,等. 高效阴离子交换色谱法检测酱油中的单糖及双糖[J]. 分析测试学报,2012,31(11):1411-1415.
ZHU Song,DAI Jun,CHEN Shangwei,et al. Determination of monosaccharide and disaccharide in soy sauce by ion chromatography[J]. *Journal of Instrumental Analysis*,2012,31(11):1411-1415.(in Chinese)
- [12] Henderson J W,Ricker R D,Bidlingmeyer B A,et al. Rapid,accurate,sensitive,and reproducible HPLC analysis of amino acids [J]. *Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent*,2000,1100:1-10.