

Effects of Preservation Method on the Arginine Deiminase Production of Strain JXU1023*

Yijun Mao, Jiayou Li[#], Sainan Xu, Bixia Liang

College of Biological, Chemical Science and Engineering, Jiaying University, Jiaying
Email: [#]lijayou@mail.zjxu.edu.cn

Received: Dec. 5th, 2011; revised: Dec. 28th, 2011; accepted: Jan. 8th, 2012

Abstract: Arginine deiminase (ADI) can hydrolyse arginine to citrulline and other substrates, which can promote the formation of ethyl carbamate in wine. The stability of strain and enzyme is the base of study and utilization and the preservation method is the key to the stability. Five preservation methods, slant preservation, deep liquid preservation, glycerin preservation, liquid paraffin preservation and freeze drying preservation, were investigated in the preservation of strain JXU1023. Freeze drying preservation was the best method for the stability of the strain and the enzyme in a longer term, although the others were simple to operate. The slant preservation was the right way for a short term in the study and utilization.

Keywords: Arginine Deiminase; Freeze Drying Preservation; Slant Preservation; Stability of Heredity; *Oenococcus oeni*

保藏方法对菌株 JXU1023 产精氨酸脱亚胺酶的影响研究*

毛怡俊, 李加友[#], 徐赛男, 梁碧霞

嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴
Email: [#]lijayou@mail.zjxu.edu.cn

收稿日期: 2011 年 12 月 5 日; 修回日期: 2011 年 12 月 28 日; 录用日期: 2012 年 1 月 8 日

摘要: 精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)可以水解葡萄酒中的精氨酸产生瓜氨酸等物质, 从而促进氨基甲酸乙酯的形成, 有利于产酶菌株生长和产酶能力的高稳定性菌种保藏方法研究是精氨酸脱亚胺酶进一步研究的前提与基础。通过系统考察斜面低温保藏法、深层液体保藏法、甘油低温保藏法、液体石蜡保藏法和冷冻干燥保藏法等 5 种不同保藏方法对菌株 JXU1023 的影响, 发现冷冻干燥保藏法是菌体生长能力和精氨酸脱亚胺酶活力的长期稳定保持的较好方法, 其他几种方法虽然操作简便, 但并不利于菌种的长期稳定保藏, 而斜面低温保藏法可用于生产和研究阶段的短期保藏。

关键词: 精氨酸脱亚胺酶; 冻干保藏; 斜面保藏; 遗传稳定性; 酒类酒球菌

1. 引言

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, EC)又名脲烷, 属多位点致癌物质, 于 2007 年被 WHO 认定为 2A 级致癌物^[1,2]。氨基甲酸乙酯是食品发酵和贮藏过程中的天然产生物, 广泛存在于饮品酒类(葡萄酒、黄酒等)、

酸乳酪、酱油等发酵制品中, 不同的发酵食品中氨基甲酸乙酯含量不一^[3,4]。由于原料和发酵过程中微生物种类的多样性, 食品发酵和贮藏过程中氨基甲酸乙酯的形成机理不尽相同, 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^[5-7](图 1)。

葡萄酒中氨基甲酸乙酯的形成和原料中精氨酸

*基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划(2011R417018)。

[#]通讯作者。

含量有一定的相关性,因为精氨酸通常会被葡萄酒酿造后期的乳酸细菌所分解,产物瓜氨酸和氨甲酰磷酸均是形成氨基甲酸乙酯的前体物质^[8,9]。精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)是精氨酸酶解途径的第一个酶,在精氨酸水解过程具有重要作用,通过掌握葡萄酒中精氨酸酶解的生物学特性,可以利用改进酿造工艺条件的方法有效控制精氨酸的酶解,降低瓜氨酸和氨甲酰磷酸的含量,从而在一定程度上控制葡萄酒中氨基甲酸乙酯的形成。

本文正是基于以上研究思路,从后酵阶段的葡萄酒中分离出一株产精氨酸脱亚胺酶的菌株 JXU1023,通过对其保藏方法的研究,从而为该菌的生物学特性和所产精氨酸脱亚胺酶酶学特性研究奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株

酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*) JXU1023 为本实验室筛选保藏。

2.1.2. 主要仪器设备

U-3000 分光光度计(日本 Hitachi 公司);恒温调速培养器(上海福玛);台式小型冻干机(德国 UNIEQUIP)。

2.1.3. 试剂

蛋白胨、牛肉膏、酵母膏和玉米浆为生化试剂;L-精氨酸和 L-瓜氨酸等化学试剂均为分析纯。

2.1.4. 培养基

种子培养基(g/L):蛋白胨 7.5,牛肉膏 2,氯化钠 3, KH₂PO₄ 2, pH 7.5, 固体培养基另加琼脂 15, 121℃灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 5,酵母膏 5,牛肉膏 2, NaCl 3, KH₂PO₄ 2, MgSO₄ 0.01, MnSO₄ 0.0025, L-精氨酸 10, pH 7.5, 121℃灭菌 15 min。

2.2. 方法

2.2.1. 菌种保藏方法

参照文献采用了斜面低温保藏法、深层液体保藏法、液体石蜡保藏法、甘油低温保藏法和冻干保藏法等 5 种不同的菌种保藏方法^[10,11]。

斜面低温保藏法:将活化好的菌种划线接种于斜面培养基, 37℃恒温培养 24 h 后置于 4℃冰箱保藏。

深层液体保藏法:取对数生长期的液体发酵菌种适量于灭菌离心管中, 高速离心后将离心管置于 4℃冰箱保藏。

液体石蜡保藏法:将活化好的菌种划线接种于斜面培养基, 37℃恒温培养 24 h 后倒入无菌液体石蜡, 封口 4℃冰箱保藏。

甘油低温保藏法:取对数生长期的发酵液 2 mL 和无菌甘油 1 mL 于无菌离心管中, 混合均匀后置于 4℃冰箱保藏。

冻干保藏法:将无菌脱脂牛乳 2 mL 加入斜面试管中, 制成浓的菌液;将菌液分装于安瓿瓶中, 低温冰箱冷冻(-70℃)。将预冷安瓿瓶置于真空干燥器的冷冻槽中, 抽至真空度 26.7 Pa(0.2 mmHg), 保持压力 8 h 后取出封口, 室温保藏。

2.2.2. 菌种活化和种子的制备

将不同方法保藏的待测菌接入斜面培养基活化, 37℃恒温培养 8 h, 将活化后的斜面菌种接入种子培养基(装液量 50 mL/500 mL 三角瓶), 摇床转速 170 rpm, 37℃振荡培养 12 h 得液体种子。

2.2.3. 摇瓶发酵

将上述种子以 5%接种量接入发酵培养基, 装瓶量 50 mL/500 mL 三角瓶, 37℃恒温振荡培养 18 h, 摇床转速为 170 rpm。

2.2.4. 分析方法

L-瓜氨酸测定方法参照文献进行比色测定^[12]。

精氨酸脱亚胺酶酶活测定方法:6000 rpm 离心收集 100 mL 发酵液中的菌体, 蒸馏水离心洗涤二次, 沥干水后称量菌体湿重(mg/mL)即为菌体的生长能力。将所收集的湿菌体全部转入 100 mL L-精氨酸溶液(0.5 M, pH 6.5)中。立即置于振荡器中 37℃恒温振荡 3 h(转速为 170 rpm), 测定转化液中新生成 L-瓜氨酸的量。一个单位酶活(1U)定义为 1 min 新生成 1 μmol L-瓜氨酸的酶量, 以 1 mL 发酵液所含酶活单位数量即比酶活(special activity, U/mL)作为比较不同菌种保藏方法对产精氨酸脱亚胺酶能力影响的指标。所有数据均为 5 次重复的平均值。

3. 结果分析

3.1. 斜面低温保藏法对菌体生长和产精氨酸脱亚胺酶能力的影响

斜面低温保藏法是实验室和发酵工业生产过程中常用的生产性菌种保藏方法。该方法操作简单，对仪器设备要求不高，所以被广泛使用。但是当菌体细胞处于这种保藏情况时，细胞代谢并没完全休止，而是处于非常缓慢的生长过程，对于菌种的种质稳定性有一定的负面影响。考察了不同保藏时期的斜面菌种，以了解该方法对于酒类酒球菌菌体生长和产精氨酸脱亚胺酶能力的影响。结果如图 1。

由图 1 可知，斜面低温保藏法对于 JXU1023 的菌体生长和产精氨酸脱亚胺酶能力的影响是一致的。在 60 d 的保藏时间范围内，菌体生长能力与产精氨酸脱亚胺酶能力分别下降 25% 和 15%，并且进一步的实验表明，经过连续 2 代的活化，菌体生长能力与产精氨酸脱亚胺酶能力均可恢复到原来的水平。但是当保藏时间超过 60 d 以后，菌体的生长能力与产精氨酸脱亚胺酶能力都受到严重的损害，且不易恢复。所以认为 JXU1023 斜面保藏以 30 d 为宜，最多不能超过 60 d。

3.2. 深层液体保藏法对菌体生长与产精氨酸脱亚胺酶能力的影响

深层液体保藏法常用于厌氧菌的保藏。酒类酒球菌属兼性厌氧菌类，考察了在低温液体状态下菌体生长与产精氨酸脱亚胺酶稳定性的关系。结果如图 2。

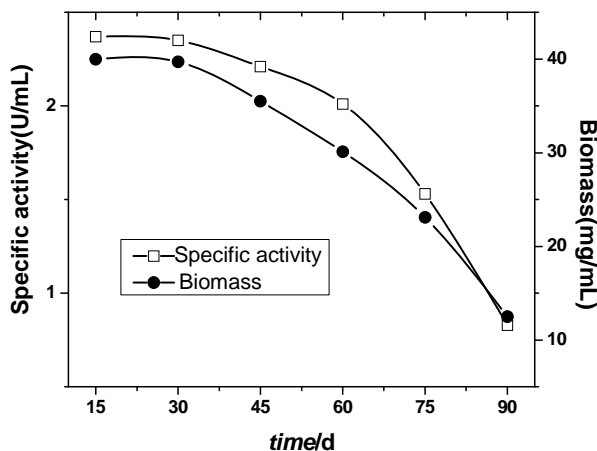


Figure 1. Effects of low temperature slant preservation on JXU1023 in different time

图 1. 斜面低温保藏法中保藏时间对菌体生长与产酶能力的影响

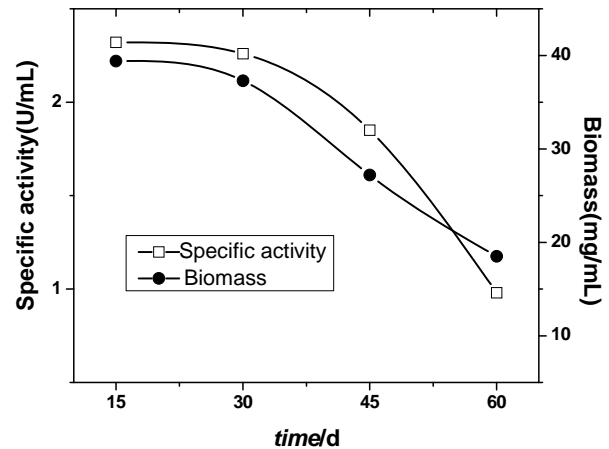


Figure 2. Effects of deep liquid preservation on JXU1023 in different time

图 2. 深层液体保藏法中保藏时间对菌体生长与产酶能力的影响

由图 2 可以看出，当保藏期大于 45 d 时，菌体生长与产精氨酸脱亚胺酶能力都受到较大的影响，分别下降了 22% 和 32%。可能的原因是由于 JXU1023 是兼性厌氧菌，能在低氧分条件下缓慢代谢，所以在深层液体保藏中，菌体并未完全处于休眠状态，还是有一定的活性，当菌体保藏时间过长之后，其产精氨酸脱亚胺酶的能力受到严重影响。

3.3. 液体石蜡保藏法对菌体生长和产精氨酸脱亚胺酶能力的影响

液体石蜡保藏法利用与深层液体保藏法相同的原理，通过为旺盛生长的菌体提供一个缺氧的环境，使之达到代谢休止或缓慢生长。通过测定不同保藏时期的液体石蜡保藏菌种的菌体生长和产精氨酸脱亚胺酶能力情况，考察该方法对菌体遗传稳定性的影响。结果如图 3。

资料表明该方法对于较多的细菌是可以进行长达 2~3 年的长期保藏的。而从图 3 可以看出，虽然菌体生长在测定的时间内受保藏方法的影响较小，在 60 d 的保藏后，单位体积发酵液中菌体的生物量并没有明显的下降，但是产精氨酸脱亚胺酶能力却下降了 81%，所以该方法不适合 JXU1023 的保藏。

3.4. 甘油低温保藏法对精氨酸脱亚胺酶活力的影响

由图 4 可知，JXU1023 在甘油低温保藏过程中菌体生长和产酶能力所受影响与液体石蜡保藏时情况

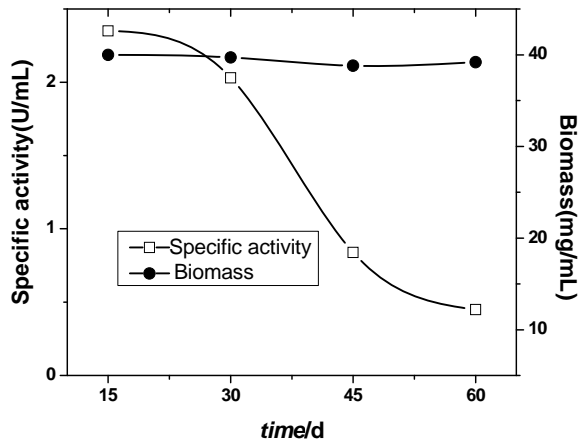


Figure 3. Effects of liquid olefin preservation on JXU1023 in different time

图 3. 液体石蜡保藏法中保藏时间对菌体生长与产酶能力的影响

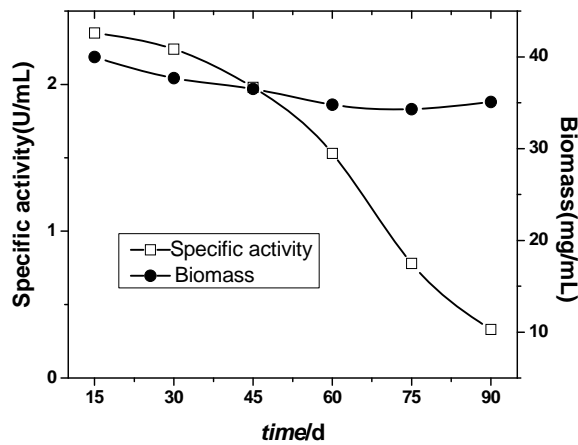


Figure 4. Effects of low temperature glycerol preservation on JXU1023 in different time

图 4. 甘油低温保藏法中保藏时间对菌体生长与产酶能力的影响

基本一样，即菌体的生长活性受保藏时间的影响较小，而精氨酸脱亚胺酶却随保藏时间的变化影响较大。

3.5. 冻干保藏法对精氨酸脱亚胺酶活力的影响

冻干保藏法是目前最有效的菌种保藏方法之一，绝大部分的微生物都可以采用此方法进行长期保存，存活率较高。通过比较不同保藏时间的 JXU1023 活化后的菌体生长能力和精氨酸脱亚胺酶比活力，发现用

该方法保藏了 5 年的菌种直接活化后，发酵菌体的生物量达到 39.4 mg/mL，而发酵液中精氨酸脱亚胺酶比活力为 2.03 U/mL，并没有出现显著下降，菌种的生长和产酶能力均得到了较好的保持。

4. 结论

对于利用 *Oenococcus oeni* JXU1023 菌株进行精氨酸脱亚胺酶的生产与研究，其菌株较为安全的长期保藏方法是用冻干保藏法，而在生产和研究过程中适当结合斜面低温保藏法进行短时间保藏是较为妥当的，可以减少菌种保藏的工作量。

参考文献 (References)

- [1] R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet Oncology*, 2007, 8(4): 292-293.
- [2] E. Dybing, J. O'Brien, A. G. Renwick and T. Sanner. Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic-an overview. *Toxicology Letters*, 2008, 180(2): 110-117.
- [3] D. W. Lachenmeier, A. V. Samokhvalov, J. Leitz, K. Schoeberl, T. Kuballa, I. V. Linskiy, C. I. Minko and J. Rehm. The composition of unrecorded alcohol from eastern Ukraine: Is there a toxicological concern beyond ethanol alone? *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(10): 2842-2827.
- [4] 石维妮, 刘晓毅, 赵玉琪, 李想, 刘艳. 发酵性食品中的氨基甲酸乙酯含量调研[J]. *中国酿造*, 2009, 11: 124-126.
- [5] S. Giuseppe, M. Salvatore, E. A. Mario, et al. Arginine metabolism in wine *Lactobacillus plantarum*: in vitro activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamylase (OTCase). *Annals of Microbiology*, 2007, 57(1): 67-70.
- [6] C. A. Uthurry, J. A. Sua' rez Lepe, J. Lombardero, et al. Ethyl carbamate production induced by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, 2006, 94(2): 262-270.
- [7] N. Terrade, R. Mira de Orduna. Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(2): 406-411.
- [8] 刘欠欠, 高年发, 李磊, 韩德新. 不同产区、不同品种酿酒葡萄汁中精氨酸含量的检测[J]. *酿酒科技*, 2009, 9: 122-125.
- [9] T. Tonon, A. Lonvaud-Funel. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Chemistry*, 2002, 19(5): 451-461.
- [10] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 154-160.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 418-419.
- [12] 李加友, 曹瑜, 焦庆才. 酶法转化液中 L-瓜氨酸的分光光度法测定[J]. *分析试验室*, 2005, 24(12): 8-10.