

# 嗜盐四联球菌 *arc operon* 多拷贝基因在精氨酸代谢中的作用

房峻<sup>1,2,3,4</sup>, 李佳莲<sup>1,2,3,4</sup>, 王博<sup>1,2,3,4</sup>, 方芳<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学食品合成生物技术教育部工程研究中心, 江苏 无锡 214122

4 江南大学江苏省食品合成生物技术工程研究中心, 江苏 无锡 214122

房峻, 李佳莲, 王博, 方芳. 嗜盐四联球菌 *arc operon* 多拷贝基因在精氨酸代谢中的作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4766-4777

Fang Jun, Li Jialian, Wang Bo, Fang Fang. Role of multiple copies of *arc operon* genes in arginine metabolism of *Tetragenococcus halophilus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4766-4777

**摘要:**【背景】嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)是一类存在于发酵食品中的耐盐乳酸菌, 研究其精氨酸(arginine, Arg)代谢对解析食品发酵过程中氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)前体积累机制和保障食品安全具有重要意义。【目的】研究酱醪来源嗜盐四联球菌精氨酸脱亚氨基(arginine deiminase, ADI)途径的基因构成, 揭示这些基因对菌株精氨酸代谢和氨基甲酸乙酯前体瓜氨酸(citrulline, Cit)利用与积累的影响。【方法】采用 PCR 扩增与测序分析不同菌株的 ADI 途径基因组成, 通过比较 ADI 途径关键基因转录水平和关键酶活性, 探究环境因素对嗜盐四联球菌代谢氨基酸能力的影响及各拷贝基因参与氨基酸代谢的功能。【结果】酱醪来源嗜盐四联球菌基因组中 ADI 途径基因类型主要有两大类: 以菌株 R23 为代表含有完整 *arc* 操纵子(*operon*)基因且具有最多基因拷贝数; 以菌株 C3 为代表缺失 *arcA* 和 *arcB* 但含有多拷贝 *arcB* 和 *arcC*。基因组中有 *arcA* 的菌株才具有利用精氨酸能力, 并通过利用精氨酸生成瓜氨酸。体系中精氨酸含量和乙醇与脂肪酸的存在均可影响嗜盐四联球菌利用精氨酸积累中间产物瓜氨酸。当精氨酸含量大于 5 g/L 或体系中含有乙醇与脂肪酸时, 嗜盐四联球菌会利用精氨酸积累中间产物瓜氨酸。脂肪酸和乙醇对 ADI 途径的 3 个关键酶均有显著抑制作用, 可使精氨酸脱亚氨基酶(arginine deiminase, ADI)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(ornithine transcarbamylase, OTC)和氨甲酰磷酸激酶(carbamate kinase, CK)的活性分别降低 41.0%、46.4%和 60.0%。嗜盐四联球菌中 *arcB* 转录水平分别是其拷贝 *arcB*<sub>1</sub> 和 *arcB*<sub>2</sub> 的

基金项目: 国家自然科学基金(32172182)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172182)

\*Corresponding author: E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-05-19; Accepted: 2022-07-03; Published online: 2022-07-22

10.5 倍和 29.8 倍, *arcC* 的转录水平分别是 *arcC*<sub>1</sub>、*arcC*<sub>2</sub>、*arcC*<sub>3</sub> 的 17.6、20.3、23.9 倍, 说明 *arcB* 和 *arcC* 在瓜氨酸代谢中起主要作用。【结论】精氨酸含量和乙醇加脂肪酸是影响嗜盐四联球菌代谢精氨酸能否积累瓜氨酸的关键环境因素。嗜盐四联球菌 *arc* operon 的多拷贝基因中, *arcB* 和 *arcC* 基因在瓜氨酸代谢中起主要作用。

**关键词:** 嗜盐四联球菌; 精氨酸代谢; 瓜氨酸; 氨基甲酸乙酯; 精氨酸脱亚氨基途径

## Role of multiple copies of *arc* operon genes in arginine metabolism of *Tetragenococcus halophilus*

FANG Jun<sup>1,2,3,4</sup>, LI Jialian<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Bo<sup>1,2,3,4</sup>, FANG Fang<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Engineering Research Center of Ministry of Education on Food Synthetic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 Engineering Research Center of Food Synthetic Biotechnology of Jiangsu Province, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract: [Background]** *Tetragenococcus halophilus* is a halophilic lactic acid bacterium detected in fermented food. Investigating the arginine (Arg) metabolism of this bacterium is of great importance for disclosing the mechanism of the accumulation of ethyl carbamate (EC) precursors during food fermentation and ensuring food safety. **[Objective]** To identify the key genes of arginine deiminase (ADI) pathway in the genome of *T. halophilus* strains isolated from soy sauce moromi mash, and to reveal the roles of these genes in arginine metabolism and utilization and accumulation of citrulline (the EC precursor). **[Methods]** The key genes involved in ADI pathway were identified for different strains by PCR amplification and sequencing. The transcription levels of key genes of ADI pathway and the activities of corresponding enzymes were compared to reveal the effect of environmental factors on amino acid metabolism and the role of each gene. **[Results]** The genes associated with the ADI pathway in the genome of *T. halophilus* included two categories. One contained intact *arc* operon genes and had the most copies, as represented by strain R23, and the other lacked *arcA* and *arcB* but had multiple copies of *arcB* and *arcC*, as represented by strain C3. Only the strains with *arcA* in their genomes can utilize arginine to produce citrulline. Whether the intermediate product citrulline was accumulated with the utilization of arginine by *T. halophilus* was affected by the content of arginine and the presence of ethanol and fatty acids in the medium. *T. halophilus* accumulated citrulline when arginine was more than 5 g/L or ethanol and fatty acids were present in the medium. In the presence of fatty acids and ethanol, the activities of ADI, ornithine transcarbamylase (OTC), and carbamate kinase (CK), the key enzymes of ADI pathway, were significantly reduced by 41.0%, 46.4%, and 60.0%, respectively. The transcription level of *arcB* in *T. halophilus* was 10.5 and 29.8 times as high as that of *arcB*<sub>1</sub> and *arcB*<sub>2</sub>, respectively, and the transcription level of *arcC* was 17.6, 20.3, and 23.9 times as high as that of *arcC*<sub>1</sub>, *arcC*<sub>2</sub>, and *arcC*<sub>3</sub>, respectively. The results demonstrated that *arcB* and *arcC* played major roles in citrulline

metabolism. [Conclusion] Arginine content and the presence of ethanol and fatty acids are key environmental factors influencing whether citrulline can be accumulated by *T. halophilus* when metabolizing arginine. Among the multiple copies of *arc* operon genes in *T. halophilus*, *arcB* and *arcC* play key roles in citrulline metabolism.

**Keywords:** *Tetragenococcus halophilus*; arginine metabolism; citrulline; ethyl carbamate; arginine deiminase pathway

乳酸菌在发酵食品生产过程中起着非常重要的作用, 来源于酱油和酱类发酵食品的耐盐乳酸菌具有缩短生产周期、提升风味、提高品质等有益食品发酵的作用<sup>[1-3]</sup>。在食品发酵过程中, 由于微生物对含氮物质的不完全利用, 可能代谢产生生物胺、氨基甲酸乙酯等胺类有害物质或其前体<sup>[4]</sup>。氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是在产品发酵过程中生成的一类具有致癌性和遗传毒性的 2A 类致癌物质, 在酒类饮料、酱油等发酵产品中均被检出<sup>[3,5-10]</sup>。瓜氨酸、尿素等氨基酰基化合物是发酵食品中 EC 的前体, 它们可与体系中存在的乙醇反应生成 EC, 对发酵产品的安全性有潜在的影响<sup>[4,11-12]</sup>。

酱油发酵过程中的某些乳酸菌可以通过精氨酸脱亚氨基(arginine deiminase, ADI)途径(图 1), 利用精氨酸(arginine, Arg)并将其转化为 EC 前体物质瓜氨酸(citrulline, Cit)和终产物鸟氨酸(ornithine, Orn)<sup>[13-14]</sup>。其中, 嗜盐乳酸足球菌在高盐(180 g/L NaCl)条件下仍可利用精氨酸生成并积累瓜氨酸, 是酱油乳酸发酵时期 EC 前体瓜氨酸的主要来源之一<sup>[15]</sup>。其他具有 ADI 途径的细菌(包括乳酸菌)在酱油发酵后期受乙醇与脂肪酸协同作用, 利用精氨酸后积累瓜氨酸<sup>[13]</sup>。发酵温度也是影响瓜氨酸积累的因素之一, 乳酸菌在 15 °C 条件下利用精氨酸生成瓜氨酸的转化率及瓜氨酸的含量显著低于 30 °C 和 37 °C<sup>[14]</sup>。有研究表明, 从酱醪中筛选获得的 *Tetragenococcus halophilus* R23 基因组中具有完整的 ADI 途径<sup>[16]</sup>。该菌株合成的精氨

酸脱亚氨基酶(arginine deiminase, ADI)、鸟氨酸氨基酰基转移酶(ornithine transcarbamylase, OTC)和氨基酰磷酸激酶(carbamate kinase, CK)可催化反应进行, 利用精氨酸产生瓜氨酸, 并进一步将瓜氨酸转化为鸟氨酸<sup>[17-19]</sup>。此外, R23 在低盐(100 g/L NaCl)和高盐条件下均可通过 ADI 途径利用精氨酸, 并将积累的瓜氨酸全部转化为鸟氨酸<sup>[16]</sup>。嗜盐四联球菌对高渗透压等环境胁迫因素具有较高的耐受能力, 在酱油发酵过程中发挥了重要作用<sup>[16,20-23]</sup>。

*T. halophilus* R23 全基因组测序结果表明, 基因组中的 ADI 途径还存在除 *arc* 操纵子(operon)外的多个 *arcB* 基因拷贝和多个 *arcC* 基因拷贝<sup>[24]</sup>。本研究考察酱醪来源的不同 *T. halophilus* 菌株的 ADI 途径基因完整度, 通过比较具有不同 ADI 途径基因组成的菌株对精氨酸、瓜氨酸的利用情况, 揭示各基因在精氨酸代谢中的作用和影响因素, 以期阐明嗜盐四联球菌精氨酸代谢机制提供理论参考。

## 1 材料与amp;方法

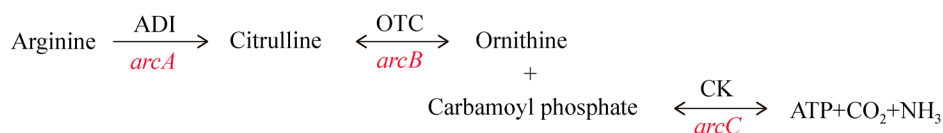
### 1.1 菌株

本研究所用嗜盐四联球菌菌株(R9、R13、R23、R44、C3)分离自高盐稀态酱油发酵的酱醪<sup>[25]</sup>。

### 1.2 培养基

种子培养基(g/L): MRS 培养基, 氯化钠 100.00。

固体培养基(g/L): MRS 培养基, 琼脂 20.00, 氯化钠 100.00。



**图1 精氨酸脱亚氨基途径** ADI: 精氨酸脱亚氨基酶, 由 *arcA* 基因编码; OTC: 鸟氨酸氨甲酰基转移酶, 由 *arcB* 基因编码; CK: 氨甲酰磷酸激酶, 由 *arcC* 基因编码

Figure 1 The arginine deiminase pathway. ADI: Arginine deiminase, encoded by the *arcA* gene; OTC: Ornithine transcarbamylase, encoded by the *arcB* gene; CK: Carbamate kinase, encoded by the *arcC* gene.

分离嗜盐四联球菌培养基(g/L): MRS 培养基, 氯化钠 100.00, 溴甲酚紫 0.06, 生酱油 100.00, 制霉菌素 50 000.00 U/L, 琼脂 18.00。

氨基酸利用培养基 A (g/L): 酵母膏 5.00, 牛肉膏 5.00, 胰蛋白胨 5.00, 氯化钠 180.00, 葡萄糖 0.50, 吐温 80 1.00, 七水合硫酸镁 2.00, 一水合硫酸锰 0.50, 柠檬酸三胺 2.00, 硫酸亚铁 0.40, 磷酸氢二钾 2.00, 碳酸钙 0.10, 磷酸吡哆醛 0.05, pH 6.0。

氨基酸利用培养基 B: 氨基酸利用培养基 A, 20.00 mL/L 乙醇, 2.50 g/L 脂肪酸(油酸、亚油酸和硬脂酸分别占 50%、40%和 10%)。

### 1.3 主要试剂和仪器

MRS 培养基, Oxoid 有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、Fast Quant RT 反转录试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 2×*Taq* Plus Master Mix (Dye), 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; SYBR® Premix *Ex Taq* TM II, 大连宝生物工程有限公司; 氨检测试剂盒, Sigma-Aldrich 公司; 其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪, 安捷伦公司; Qubit® 荧光定量仪, Thermo Fisher Scientific 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂。

### 1.4 *T. halophilus* 分离与鉴定方法

取发酵 6 个月的酱醪, 梯度稀释后涂布于分离嗜盐四联球菌培养基平板, 30 °C 静置培养

7 d; 挑选单菌落至种子培养基 30 °C 静置培养 4 d, 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 取菌体并提取基因组, 对 *groEL* 基因扩增结果为阳性的菌株用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增<sup>[16]</sup>。将 PCR 产物送天霖生物科技无锡有限公司测序。通过与 NCBI 数据库的序列比对分析, 确定菌株种属。

### 1.5 *T. halophilus* ADI 途径关键基因分析

将 *T. halophilus* 菌株培养至对数期后期  $OD_{600}$  为 2.0, 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体并提取基因组, 以 *T. halophilus* R23 的 *arcA*、*arcB*、*arcC* 基因为模板进行 PCR 扩增; PCR 反应体系: 2×*Taq* Plus Master Mix (Dye) 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 模板(50 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL; PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min<sup>[3]</sup>。PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 *T. halophilus* 代谢精氨酸、瓜氨酸能力测定

#### 1.6.1 不同基因型 *T. halophilus* 代谢氨基酸能力分析

将不同基因型 *T. halophilus* 菌株培养至对数期后期( $OD_{600}=2.0$ ), 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0)洗涤, 然后分别重悬于表 1 中所述 4 组培养基中, 30 °C 静置培养 5 d, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 取上清液, 通过高效液相色谱法测

表 1 *Tetragenococcus halophilus* 利用氨基酸能力分析

Table 1 Analysis of utilization of arginine and citrulline by *Tetragenococcus halophilus*

Group	Arginine (g/L)	Citrulline (g/L)	Media
A	5.0	4.0	Amino acid utilization medium A
B	5.0	4.0	Amino acid utilization medium B
C	0.0	4.0	Amino acid utilization medium A
D	0.0	4.0	Amino acid utilization medium B

定氨基酸含量<sup>[26]</sup>。

### 1.6.2 精氨酸浓度对 R23 代谢氨基酸的影响

将 *T. halophilus* 培养至对数期后期 ( $OD_{600}=2.0$ ) 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤, 然后分别重悬于氨基酸利用培养基 A 中, 并添加组分 1 (2.0 g/L 精氨酸与 0.5 g/L 瓜氨酸)、组分 2 (3.0 g/L 精氨酸与 0.5 g/L 瓜氨酸)、组分 3 (5.0 g/L 精氨酸与 4.0 g/L 瓜氨酸), 30 °C 静置培养 5 d, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 取上清液测定氨基酸含量<sup>[26]</sup>。

### 1.7 ADI 途径基因转录水平和关键酶活的测定

将 *T. halophilus* R23 培养至对数期后期 ( $OD_{600}=2.0$ ), 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤并将菌体重悬于种子培养基或表 2 各组分培养基中, 30 °C 静置培养 4 h。4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 获得菌体后用液氮研磨进行细胞破壁, 用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并进行反转录获得 cDNA。用 *arcA*、*arcB* 和 *arcC* 及其拷贝基因的引物分别进行 RT-qPCR, 并以 16S rRNA 基因作为内参基因<sup>[3]</sup>。利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法对 RT-qPCR 结果进行相对定量分析<sup>[27]</sup>。

加 1 mL PBS 缓冲液重悬破壁后的菌体, 4 °C、8 000 r/min 离心 2 min 取上清液测定酶活。精氨酸脱亚氨酶(ADI)、鸟氨酸转氨酶(OTC)、氨基甲酸酯激酶(CK)酶活的测定参照 De

表 2 环境因素对 R23 代谢氨基酸能力分析

Table 2 Analysis of environmental factors on the ability of R23 to metabolize amino acids

Group	Arginine (g/L)	Citrulline (g/L)	Media
I	2.0	0.5	Amino acid utilization medium A
II	3.0	0.5	Amino acid utilization medium A
III	5.0	0.5	Amino acid utilization medium A
IV	2.0	0.5	Amino acid utilization medium B

Angelis 等的方法<sup>[28-30]</sup>。

### 1.8 数据处理与统计学分析

所有试验均重复 3 次, 使用 SPSS 26 进行数据处理和显著性分析, 并用 Adobe Illustrator 2022、Origin 2022 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酱醪来源嗜盐四联球菌 ADI 途径的基因组组成类型

研究前期对 *T. halophilus* R23 基因组测序和注释分析表明, 嗜盐四联球菌基因组中存在 ADI 途径关键基因 *arcB* 和 *arcC* 的多个拷贝<sup>[24]</sup>。为全面了解嗜盐四联球菌基因组中与精氨酸代谢相关基因的组成, 本研究通过 PCR 扩增和基因测序与比对, 对分离自酱醪的 12 株(图 2 只展示代表性菌株)嗜盐四联球菌基因组中存在的 ADI 途径关键基因进行了分析和比较。由图 2 可知, 酱醪来源 *T. halophilus* 的 ADI 途径关键基因组组成主要分为两大类(类型 1 含有 *arcA* 和 *arcB*, 类型 2 缺失 *arcA* 和 *arcB*)的 5 种亚类型: 具有包括 *arcA*、*arcB*、*arcC* 在内的全部基因(R23); 具有 *arcA* 和 *arcB* 但缺失 *arcC* 和 *arcB*<sub>1</sub> 两个基因(R9); 缺失 *arcA* 和 *arcB* 两个基因但具有多拷贝基因 *arcB* (*arcB*<sub>1</sub>, *arcB*<sub>2</sub>)和 *arcC* (*arcC*, *arcC*<sub>1</sub>, *arcC*<sub>2</sub>, *arcC*<sub>3</sub>) (C3); 缺失 *arcA*、*arcB* 和 *arcC*<sub>1</sub> 3 个基因(R44); 仅具有 *arcC*、*arcB*<sub>1</sub> 和 *arcC*<sub>3</sub> 3 个基因(R13)。为比较不同 *arc* operon 基

因组成型对菌株代谢精氨酸和瓜氨酸的影响, 并分析各拷贝基因与瓜氨酸代谢的关系, 后续研究选取代表性菌株 R23、C3 和 R44 作为研究对象。

## 2.2 基因组成型与菌株精氨酸和瓜氨酸代谢的关系

由图 3A 可知, 基因组中有 *arcA* 的菌株才具有利用精氨酸并将其转化为瓜氨酸的能力; 在同时含有精氨酸和瓜氨酸的体系中, 有 *arcB* 的菌株 R23 将瓜氨酸转化为鸟氨酸的能力显著高于缺失此基因的菌株 C3 和 R44。当在有利于瓜氨酸积累的体系中(含乙醇和脂肪酸), 具有 *arcA* 和 *arcB* 的 R23 从利用精氨酸转变为少量积累精氨酸, 瓜氨酸向鸟氨酸的转化显著减弱; 菌株 C3 和 R44 利用瓜氨酸能力显著低于正常培养体系(图 3B)<sup>[15]</sup>。缺少 *arcA* 的菌株 C3 和 R44 能生成少量精氨酸的原因尚不清楚, 推测可能通过谷氨酸乙酰化途径生成<sup>[31]</sup>。当体系中只含瓜氨酸时, R23 利用瓜氨酸的能力显著高于无 *arcB* 基因的菌株 C3 和 R44 (图 3C), 说明 *arcB* 对菌株利用瓜氨酸的影响大于 *arcB*<sub>1</sub> 和 *arcB*<sub>2</sub>; 在含有乙醇和游离脂肪酸的体系中, 各菌株利

用瓜氨酸的能力略有下降(图 3D)。上述结果表明, 基因组中有 *arcA* 的菌株才具有利用精氨酸的能力, 并通过利用精氨酸生成瓜氨酸。后续将进一步研究环境因素如何影响具有完整 *arc operon* 的菌株 R23 代谢精氨酸和瓜氨酸, 以及 *arcB* 和 *arcC* 各拷贝基因的作用。

## 2.3 精氨酸浓度对 R23 代谢氨基酸的影响

高盐稀态酱油发酵过程酱醪中由原料水解生成的精氨酸总量为 5 g/L 左右。为研究体系中精氨酸含量是否影响 *T. halophilus* 降解瓜氨酸, 本研究考察了具有完整 ADI 途径的代表菌株 *T. halophilus* R23 在不同精氨酸浓度体系中对精氨酸和瓜氨酸的利用情况。由图 4 可知, 当体系中精氨酸含量不高于 3 g/L 时, R23 利用精氨酸基本不积累中间代谢产物瓜氨酸; 当体系中精氨酸含量为 5 g/L 时, R23 利用精氨酸并积累瓜氨酸。虽然 R23 在 2、3、5 g/L 精氨酸体系中都能完全代谢精氨酸, 但是当体系中精氨酸含量高于 3 g/L 时, *T. halophilus* 利用精氨酸后开始积累中间代谢产物瓜氨酸。这说明, 体系中的精氨酸含量也是影响 *T. halophilus* 利用精氨酸能否积累 EC 前体瓜氨酸的关键因素之一。

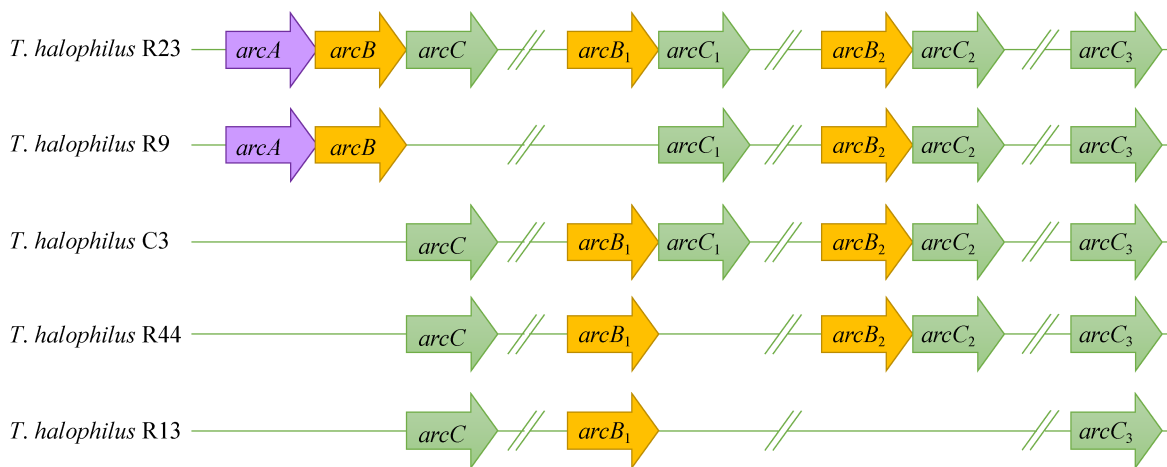


图 2 *Tetragenococcus halophilus* 中 *arc* 基因簇的组成分析

Figure 2 Characterization of *arc* genes in *Tetragenococcus halophilus*.



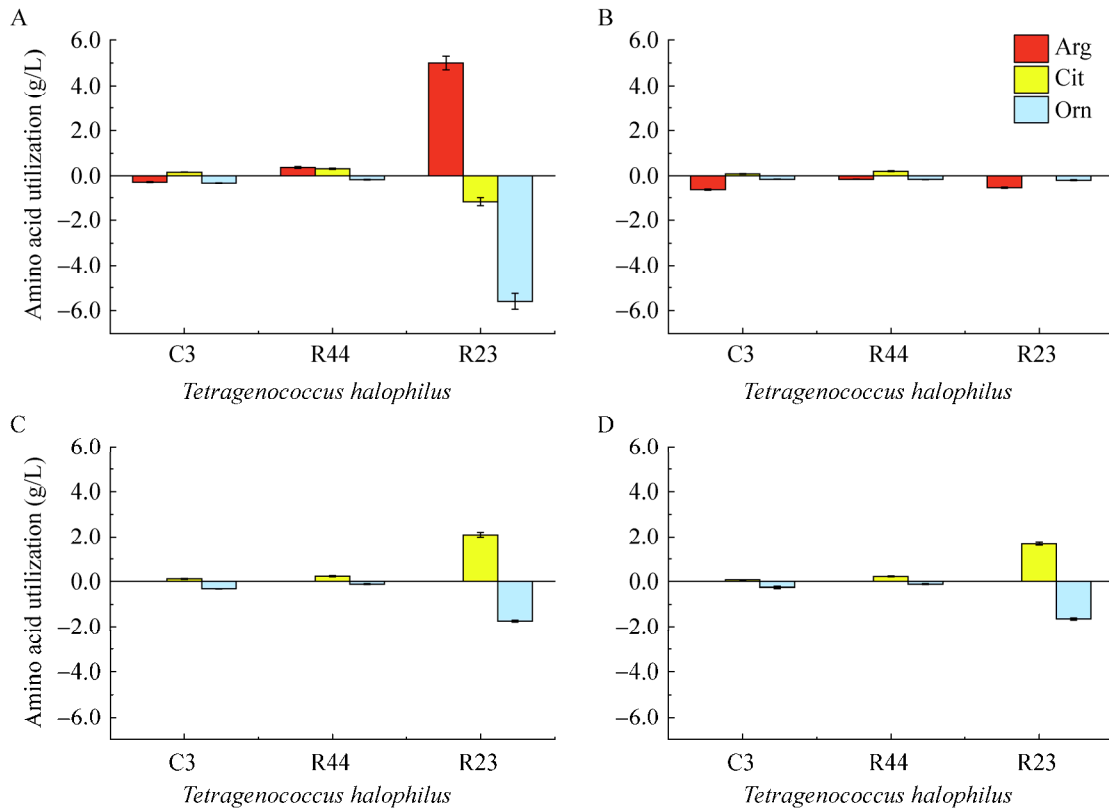


图3 不同基因型 *Tetrigenococcus halophilus* 利用精氨酸和瓜氨酸的比较 A: 5.0 g/L 精氨酸+4.0 g/L 瓜氨酸; B: 5.0 g/L 精氨酸+4.0 g/L 瓜氨酸+2.5 g/L 脂肪酸混合溶液(油酸、亚油酸、硬脂酸)+20 mL/L 乙醇; C: 4.0 g/L 瓜氨酸; D: 4.0 g/L 瓜氨酸+2.5 g/L 脂肪酸混合溶液(油酸、亚油酸、硬脂酸)+20 mL/L 乙醇

Figure 3 Comparison of utilization of arginine and citrulline by *Tetrigenococcus halophilus* with various *arc* genes. A: 5.0 g/L Arg+4.0 g/L Cit; B: 5.0 g/L Arg+4.0 g/L Cit+2.5 g/L fatty acid (oleic acid, linoleic acid, stearic acid)+20 mL/L ethanol; C: 4.0 g/L Cit; D: 4.0 g/L Cit+2.5 g/L fatty acid (oleic acid, linoleic acid, stearic acid)+20 mL/L ethanol.

#### 2.4 环境因素对 R23 精氨酸代谢相关基因表达和酶活的影响

前期研究和上述结果证实, *T. halophilus* R23 在一定条件下可以有效降解体系中的精氨酸与瓜氨酸, 但其代谢这 2 个氨基酸的能力受环境因素影响, 而且较高浓度的精氨酸、适当浓度的乙醇和脂肪酸都可降低 R23 对精氨酸和瓜氨酸的利用能力<sup>[3,15,20]</sup>。为了解 *T. halophilus* 精氨酸代谢的调控机制, 本研究考察了 *T. halophilus* R23 在不同环境条件下培养 4 h 后 ADI 途径关键基因 *arcA* 和 *arcB* 的转录情况,

以及与瓜氨酸生成和消耗相关酶 ADI 和 OTC 的表达情况。由图 5A 可知, 当体系中精氨酸含量为 2 g/L 和 3 g/L 时,  $arcA/arcB < 1$ , 说明 *T. halophilus* R23 在此条件下编码生成瓜氨酸酶的基因表达量低于编码利用瓜氨酸酶的基因表达量。当体系中含有 5 g/L 精氨酸或含有乙醇与脂肪酸混合物时,  $arcA/arcB > 1$ , 说明在该条件下 *T. halophilus* R23 编码生成瓜氨酸酶的基因表达量高于编码利用瓜氨酸酶的基因表达量。乙醇与脂肪酸对 *arcA* 和 *arcB* 的比值影响最大, 当它们存在时可使  $arcA/arcB$  从 0.81 增加到 1.54。

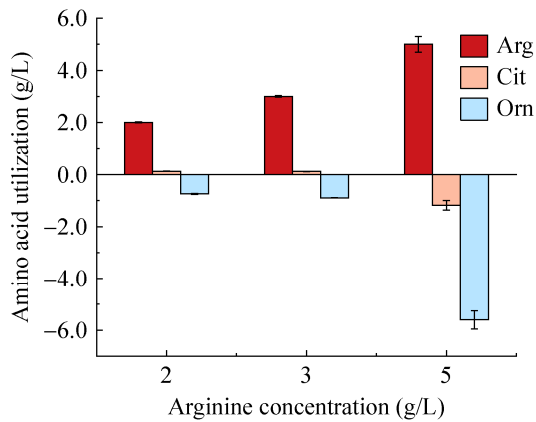


图 4 精氨酸浓度对 *Tetrigenococcus halophilus* R23 氨基酸代谢的影响

Figure 4 Effect of concentration of arginine on amino acid metabolism in *Tetrigenococcus halophilus* R23.

ADI 途径中的关键酶 ADI、OTC、CK 分别与瓜氨酸生成、瓜氨酸消耗和氨甲酰磷酸的生成有关，其中 ADI 和 OTC 的活性直接影响体

系中瓜氨酸的含量。由图 5B 可知，随着精氨酸浓度的增加，3 种酶活均逐渐降低，说明底物浓度增加在一定程度上抑制了精氨酸的代谢。脂肪酸和乙醇对 ADI 途径的 3 个关键酶均有显著抑制作用，可使 ADI、OTC 和 CK 的活性分别减少 41.0%、46.4%和 60.0%。低精氨酸浓度(2 g/L 和 3 g/L)条件下，ADI 的活性低于 OTC，即催化瓜氨酸生成的酶活低于催化瓜氨酸分解的酶活，*T. halophilus* R23 利用精氨酸后不积累瓜氨酸。然而在乙醇加脂肪酸体系中 ADI 的活性高于 OTC，说明 *T. halophilus* R23 在此条件下利用精氨酸可积累瓜氨酸。虽然较高精氨酸浓度(5 g/L)条件下 ADI 的活性略低于 OTC，这可能是因为其调控效率低于乙醇加脂肪酸的条件，相关酶的合成尚未达到与基因表达一致的水平(图 5A)，也可能与 *T. halophilus* R23 基因组中 *arcB<sub>1</sub>* 和 *arcB<sub>2</sub>* 的表达有关。

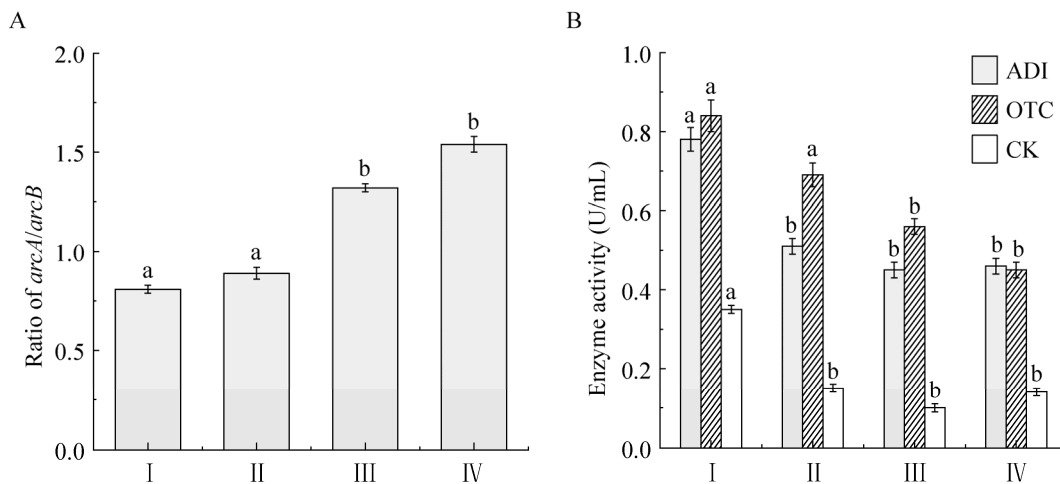


图 5 环境因素对 *Tetrigenococcus halophilus* R23 (A) *arcA* 和 *arcB* 基因转录水平及(B) ADI、OTC、CK 酶活性的影响 I : 2.0 g/L 精氨酸; II : 3.0 g/L 精氨酸; III : 5.0 g/L 精氨酸; IV : 2.0 g/L 精氨酸+2.5 g/L 脂肪酸混合溶液(油酸、亚油酸、硬脂酸)+20 mL/L 乙醇。不同小写字母表示组间具有显著性差异( $P < 0.05$ )

Figure 5 Effect of cultivation conditions on (A) transcription levels of *arcA* and *arcB* and (B) activities of ADI, OTC, CK in *Tetrigenococcus halophilus* R23. I : 2.0 g/L Arg; II : 3.0 g/L Arg; III : 5.0 g/L Arg; IV : 2.0 g/L Arg+2.5 g/L fatty acid mixed solution (oleic acid, linoleic acid, stearic acid)+20 mL/L ethanol. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups ( $P < 0.05$ ).



## 2.5 *T. halophilus* R23 多拷贝基因转录水平的比较

为了解 *T. halophilus* R23 基因组中 *arc* operon 各拷贝基因在其精氨酸代谢中所起的作用, 比较了正常条件下培养 *T. halophilus* R23 的 ADI 途径多拷贝基因的转录水平。由图 6 可知, *arcB* 转录水平分别是 *arcB*<sub>1</sub> 和 *arcB*<sub>2</sub> 的 10.5 倍和 29.8 倍, 说明在催化瓜氨酸分解代谢过程中 *arcB* 基因起主要作用。通过比较 *arcC* 及其多拷贝基因的转录水平发现, *arcC* 的转录量分别是其多拷贝基因 *arcC*<sub>1</sub>、*arcC*<sub>2</sub> 和 *arcC*<sub>3</sub> 的 17.6、20.3 和 23.9 倍, 说明在分解氨甲酰磷酸产生 ATP 的反应中, *arcC* 基因起主要作用(图 6)。以上结果说明, 虽然嗜盐四联球菌基因组中含有多拷贝 *arc* operon 基因, 但 *arcA*、*arcB* 和 *arcC* 是通过 ADI 途径代谢精氨酸起主要作用的基因。

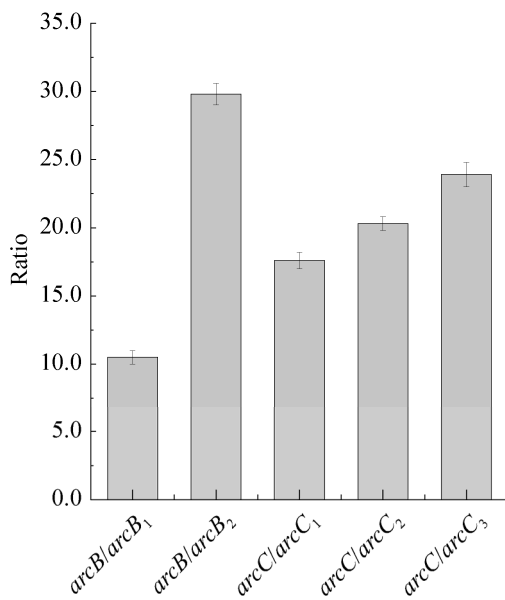


图 6 *Tetragenococcus halophilus* R23 基因组中 *arc* operon 多拷贝基因转录水平的比较

Figure 6 Comparison of the transcriptional levels of *arc* operon multiple copies gene in *Tetragenococcus halophilus* R23 genome.

## 3 讨论与结论

乳酸菌是参与食品发酵的重要功能性细菌。研究乳酸菌在食品发酵过程通过 ADI 途径的精氨酸代谢调控机制, 对评估其参与食品发酵时是否与致癌物氨基甲酸酯前体瓜氨酸积累有关具有重要意义。白酒发酵体系中的 *Bacillus amyloliquefaciens*、*Staphylococcus pasteurii* 和乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* 与 *Lactococcus garvieae* 均具有完整 ADI 途径并能通过 ADI 途径积累瓜氨酸。受各菌种在酒醅中丰度和含量的影响, 芽孢杆菌和乳球菌被证实是酒醅中利用精氨酸生成瓜氨酸的主要贡献者<sup>[30]</sup>。然而, 白酒发酵体系中环境因素如何影响具有 ADI 途径的细菌代谢氨基甲酸酯前体相关氨基酸目前尚不清楚。黄酒发酵醪液中具有 ADI 途径的菌主要为乳杆菌(*L. plantarum*、*L. hilgardii*、*L. diolivorans*、*L. brevis*、*L. casei* 和 *L. fermentum*), 它们代谢精氨酸的能力与是否具有 *arcA* 基因有关<sup>[32]</sup>。虽然有研究证实来源于葡萄酒发酵体系的乳酸菌代谢精氨酸和合成瓜氨酸受 pH 和温度等因素影响, 但这些乳酸菌 ADI 途径的基因构成和基因表达调控机制并不十分清楚<sup>[33-34]</sup>。酱油发酵体系中可通过 ADI 途径代谢精氨酸并积累瓜氨酸的乳酸菌主要包括 *P. acidilactici*、*Weissella* 和 *T. halophilus*。盐胁迫和温度是酱油乳酸发酵时期影响 *P. acidilactici* 和 *W. confusa* 从精氨酸到瓜氨酸转化率的重要因素, 而细胞膜通透性的改变是酱油乙醇发酵时期包括 *T. halophilus* 在内具有 ADI 途径的细菌合成与积累瓜氨酸的主要影响因素<sup>[13-14]</sup>。表面活性剂可增强细胞膜通透性, 从而通过抑制鸟氨酸转氨甲酰酶活性促进瓜氨酸的积累<sup>[35]</sup>。酱油发酵过程大豆中脂质水解产生的游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)是酱醪体系中存在的表面活性

剂<sup>[36]</sup>, 酱醪中产生的乙醇提高了 FFAs 的溶解度, 进而增强了细胞膜通透性且促进瓜氨酸向胞外转运, 造成瓜氨酸的积累<sup>[13]</sup>。本研究通过基因转录水平和酶表达水平分析证实了乙醇加脂肪酸是影响 *T. halophilus* 利用精氨酸并积累瓜氨酸的关键因素。此外, 本研究证实了酱醪来源的 *T. halophilus* 基因组中均存在 *arc operon* 关键基因 *arcB* 和 *arcC* 的多个拷贝, 并初步将其分为含有 *arcA* (以菌株 R23 为代表)和缺失 *arcA* (以菌株 C3 为代表)的两种类型。在解析 *T. halophilus arc operon* 基因构成的基础上, 本研究首次揭示了其 ADI 途径相关基因在代谢精氨酸和瓜氨酸中的功能与差异: 酱醪来源 *T. halophilus* 基因组中 *arcB* 和 *arcC* 基因转录水平显著高于它们的拷贝基因 *arcB<sub>1</sub>*、*arcB<sub>2</sub>* 和 *arcC<sub>1</sub>*、*arcC<sub>2</sub>*、*arcC<sub>3</sub>*, 在瓜氨酸代谢和精氨酸脱亚氨基途径的催化反应中起主要作用。

本研究通过解析酱醪来源 *T. halophilus* 菌株基因组中 *arc operon* 基因组成的多样性特点, 揭示了该菌种在代谢精氨酸和瓜氨酸能力方面的菌株差异性。通过考察菌株在不同条件下代谢精氨酸和瓜氨酸的能力及 ADI 途径相关基因表达情况, 初步阐明了 *T. halophilus* 合成和积累氨基甲酸乙酯前体瓜氨酸的代谢调控机制。本研究结果揭示了嗜盐四联球菌在酱油发酵过程中通过 ADI 途径进行的精氨酸代谢调控机制, 并可为评价参与食品发酵细菌的安全性提供理论参考。

## REFERENCES

- [1] Ogasawara M, Yamada Y, Egi M. Taste enhancer from the long-term ripening of miso (soybean paste)[J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 736-741
- [2] 刘佳乐, 周朝晖, 李铁桥, 卢丽玲, 方芳. 酱油发酵过程强化嗜盐四联球菌对酱油品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 96-106  
Liu JL, Zhou ZH, Li TQ, Lu LL, Fang F. Effect of *Tetragenococcus halophilus* on soy sauce quality prepared by fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 96-106 (in Chinese)
- [3] 王博. 酱醪嗜盐四联球菌菌株特性比较及功能研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018  
Wang B. Comparison characteristics and function of *Tetragenococcus halophilus* from soy sauce moromi[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese)
- [4] Abt E, Incorvati V, Robin LP, Redan BW. Occurrence of ethyl carbamate in foods and beverages: review of the formation mechanisms, advances in analytical methods, and mitigation strategies[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(12): 2195-2212
- [5] Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 2008, 84(6): 176-188
- [6] Sakano K, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 33(5): 703-714
- [7] 田夏琼, 江华明, 关统伟, 杨涵, 彭忠, 林宜锦, 张家旭, 赵小林. 浓香型白酒发酵过程中氨基甲酸乙酯形成的关联因子探究[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 59-63  
Tian XQ, Jiang HM, Guan TW, Yang H, Peng Z, Lin YJ, Zhang JX, Zhao XL. Correlation factors of ethyl carbamate formation during the fermentation of strong-flavor baijiu[J]. China Brewing, 2022, 41(1): 59-63 (in Chinese)
- [8] Riachi LG, Santos A, Moreira RFA, De Maria CAB. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits[J]. Food Chemistry, 2014, 149: 159-169
- [9] Wang PH, Sun JY, Li XM, Wu DH, Li T, Lu J, Chen J, Xie GF. Contribution of citrulline to the formation of ethyl carbamate during Chinese rice wine production[J]. Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2014, 31(4): 587-592
- [10] Wu PG, Cai CG, Shen XH, Wang LY, Zhang J, Tan Y, Jiang W, Pan XD. Formation of ethyl carbamate and changes during fermentation and storage of yellow rice wine[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 108-112
- [11] Mira De Orduña R, Liu SQ, Patchett ML, Pilone GJ. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid

- bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 183(1): 31-35
- [12] Zhou K, Siroli L, Patrignani F, Sun YM, Lanciotti R, Xu ZL. Formation of ethyl carbamate during the production process of Cantonese soy sauce[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2019, 24(8): 1474
- [13] Fang F, Zhang JR, Zhou JW, Zhou ZH, Li TQ, Lu LL, Zeng WZ, Du GC, Chen J. Accumulation of citrulline by microbial arginine metabolism during alcoholic fermentation of soy sauce[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(9): 2108-2113
- [14] Zhou K, Zhang X, Li BY, Shen CQ, Sun YM, Yang JY, Xu ZL. Citrulline accumulation mechanism of *Pediococcus acidilactici* and *Weissella confusa* in soy sauce and the effects of phenolic compound on citrulline accumulation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 757542
- [15] Zhang JR, Fang F, Chen J, Du GC. 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
- [16] 廖淡宜, 方芳, 陈坚, 堵国成, 刘龙. 嗜盐四联球菌的分离及其精氨酸代谢[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(1): 48-53  
Liao DY, Fang F, Chen J, Du GC, Liu L. Isolation and arginine metabolism detection of a *Tetragenococcus halophilus* strain[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(1): 48-53 (in Chinese)
- [17] Arena ME, Saguir FM, Manca De Nadra MC. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 52(3): 155-161
- [18] Baur H, Luethi E, Stalon V, Mercenier A, Haas D. Sequence analysis and expression of the arginine-deiminase and carbamate-kinase genes of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 179(1): 53-60
- [19] Kameya M, Asano Y. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 57: 36-41
- [20] Gürtler M, Gänzle MG, Wolf G, Hammes WP. Physiological diversity among strains of *Tetragenococcus halophilus*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1998, 21(1): 107-112
- [21] Wu CD, Liu CL, He GQ, Huang J, Zhou RQ. Characterization of a multiple-stress tolerance *Tetragenococcus halophilus* and application as starter culture in Chinese horsebean-chili-paste manufacture for quality improvement[J]. Food Science and Technology Research, 2013, 19(5): 855-864
- [22] Justé A, Van Trappen S, Verreth C, Cleenwerck I, De Vos P, Lievens B, Willems KA. Characterization of *Tetragenococcus* strains from sugar thick juice reveals a novel species, *Tetragenococcus osmophilus* sp. nov., and divides *Tetragenococcus halophilus* into two subspecies, *T. halophilus* subsp. *halophilus* subsp. nov. and *T. halophilus* subsp. *flandriensis* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 1): 129-137
- [23] Willems K, Willems M, Dardenne F. Microbiological observations during storage of thick juice on a pilot and industrial scale[J]. Proceedings of the General Assembly of the International Commission for Sugar Technology, Madrid, Spain, 2003: 419-448
- [24] 廖淡宜. 酱醪中嗜盐四联球菌的分离及特性研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015  
Liao DY. Isolation and characterization of *Tetragenococcus halophilus* strains from moromi[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
- [25] 王博, 陈坚, 堵国成, 方芳. 酱醪嗜盐四联球菌的分类及特性研究[J]. 微生物学报, 2018, 58(10): 1826-1838  
Wang B, Chen J, Du GC, Fang F. Classification and characteristics of *Tetragenococcus halophilus* derived from moromi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(10): 1826-1838 (in Chinese)
- [26] 陈兵, 王雅珍, 黄薇薇, 王艳梅, 马宇亮. 反相高效液相色谱-质谱联用法测定抑菌肽功能单元的氨基酸序列[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5): 522-527  
Chen B, Wang YZ, Huang WW, Wang YM, Ma YL. Determination of amino acid sequence of antibacterial peptide function units by using RPHPLC-MS method[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(5): 522-527 (in Chinese)
- [27] Wang GL, Xia XL, Li XL, He FH, Li JL. Identification and expression analysis of the MSP130-related-2 gene from *Hyriopsis cumingii*[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2015, 14(2): 4903-4913
- [28] Archibald RM. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma[J]. Journal of Biological Chemistry, 1944, 156(1): 121-142
- [29] De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollán G, Gobbetti M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway

- enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB<sub>1</sub>[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6193-6201
- [30] 仇钰莹, 方芳, 周新虎, 陈翔, 张龙云, 堵国成, 陈坚. 酒醅中精氨酸利用菌株的分离筛选及其对浓香型白酒中瓜氨酸积累的影响[J]. 微生物学报, 2016, 56(10): 1638-1646  
Qiu YY, Fang F, Zhou XH, Chen X, Zhang LY, Du GC, Chen J. Characterization of arginine utilization strains from fermented grains and evaluation of their contribution to citrulline accumulation in Chinese Luzhou-flavor spirits[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(10): 1638-1646 (in Chinese)
- [31] 程功, 徐建中, 张伟国. L-精氨酸生物合成机制及其代谢工程育种研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1379-1387  
Cheng G, Xu JZ, Zhang WG. Progress in biosynthesis and metabolic engineering of L-arginine producer[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1379-1387 (in Chinese)
- [32] 李晓敏, 王霏虹, 吴殿辉, 孙军勇, 陆健. 黄酒发酵液中产瓜氨酸乳酸菌的分离鉴定与评价[J]. 酿酒科技, 2015(6): 11-15  
Li XM, Wang PH, Wu DH, Sun JY, Lu J. Isolation, identification and characterization of citrulline-producing lactic acid bacteria from fermenting liquid of yellow rice wine[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015(6): 11-15 (in Chinese)
- [33] Xue J, Fu F, Liang M, Zhao C, Wang D, Wu Y. Ethyl carbamate production kinetics during wine storage[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2015, 30(2): 277-284
- [34] 刘洋, 李运奎, 韩富亮, 王婉妮, 刘亮. 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 289-295  
Liu Y, Li YK, Han FL, Wang WN, Liu L. Ethyl carbamate in wine: a review[J]. Food Science, 2019, 40(7): 289-295 (in Chinese)
- [35] Kakimoto T, Shibata T, Nishimura N, Chibata I. Enzymatic production of L-citrulline by *Pseudomonas putida*[J]. Applied Microbiology, 1971, 22(6): 992-999
- [36] Wan SP, Wu YX, Wang C, Wang CL, Hou LH. The development of soy sauce from organic soy bean[J]. Agricultural Sciences, 2013, 4(5): 116-121