

氨基酸与葡萄酒中氨基甲酸乙酯的关系研究

张颖¹, 刘国新², 朱柳杨², 张健²

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

(2. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 氨基甲酸乙酯是发酵食品中广泛存在的“2A”类致癌物, 可由氨甲酰化合物和乙醇反应生成。葡萄汁中的氨基酸经酿酒酵母的氮代谢后, 可生成氨甲酰化合物, 进而形成氨基甲酸乙酯。为了研究氨基酸与葡萄酒中氨基甲酸乙酯的关系, 本文构建了氨基酸缺失的模拟葡萄汁, 比较了他们和正常模拟葡萄汁经主发酵后的氨基甲酸乙酯和尿素含量, 并采用 N15 同位素示踪确认了氨基酸对氨基甲酸乙酯的贡献。结果表明: 磷酸氢二铵单独作为氮源发酵不会产生氨基甲酸乙酯, 用其替代缺失的氨基酸不会影响正常发酵过程; 缺失精氨酸的模拟葡萄汁发酵后, 尿素和氨基甲酸乙酯含量明显减少, 而缺失其它氨基酸对二者无显著影响。N15 同位素示踪证明精氨酸胍基的氮原子参与了氨基甲酸乙酯的合成。本文为发酵食品危害物的前体挖掘提供了新的思路, 也为气质联用仪辨识同位素提供了方法借鉴。

关键词: 氨基酸; 氨基甲酸乙酯; 尿素; 葡萄酒; 模拟葡萄汁; 同位素示踪

文章编号: 1673-9078(2015)9-296-300

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.048

Relationship between Amino Acids and Ethyl Carbamate in Wine

ZHANG Ying¹, LIU Guo-xin², ZHU Liu-yang², ZHANG Jian²

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China) (2. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Ethyl carbamate, a type 2A carcinogen, widely exists in fermented foods and is generated by the reaction of carbamyl compounds and ethanol. The amino acids in grape juice are transformed to carbamyl compounds via the nitrogen metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* and in turn form ethyl carbamate. To examine the relationship between amino acids and ethyl carbamate in wines, this study used a simulated grape juice lacking amino acids and compared its ethyl carbamate and urea content with that in normal simulative grape juice after fermentation. In addition, an N15 isotope tracer was used to confirm the contribution of amino acids in the formation of ethyl carbamate. The results showed that as the sole nitrogen fermentation source, diammonium phosphate could not generate ethyl carbamate and did not affect the normal fermentation process when it replaced the missing amino acids. Furthermore, urea and ethyl carbamate contents decreased significantly in the arginine-lacking simulated grape juice after fermentation, whereas the lack of other amino acids had no significant effect on this measure. N15 isotope tracing proved that the guanidine nitrogen atoms of arginine were involved in ethyl carbamate synthesis. The results of this study provide a new direction for mining the precursor of hazardous substances in fermented foods.

Key words: amino acid; ethyl carbamate; urea; wine; simulated grape juice; isotope tracing

葡萄汁中的氨基酸是葡萄酒酿造所需的重要氮源, 其组成和含量受葡萄品种、产地、年份、气候、成熟度和氮肥使用等因素影响, 在某种程度上决定了葡萄酒的特征^[1]。迄今为止, 已经在葡萄汁中发现了超过 32 种氨基酸^[2], 其中 L-脯氨酸和 L-精氨酸的含量占总氨基酸的 30%~65%^[3]。氨基甲酸乙酯 (EC)

收稿日期: 2014-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101275, 31201354)

作者简介: 张颖 (1978-), 女, 高级实验师, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 张健 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 发酵食品安全

是发酵酒中广泛存在的一种“2A”类致癌物^[4], 可由氨甲酰化合物和乙醇反应生成。在葡萄汁中, 氨甲酰化合物可随原料带入或由酿酒酵母的氮代谢生成。已经明确精氨酸经酿酒酵母代谢后可生成尿素, 这是一种典型的氨甲酰化合物, 对于酵母有毒害作用, 因此只要有其他易利用的氮源存在, 它就会被细胞优先排出到细胞外, 在酸性条件下, 就可以和乙醇反应生成 EC^[5]。除精氨酸外, 瓜氨酸也被认为是 EC 的前体, 它可在葡萄酒的苹果酸-乳酸发酵阶段, 由乳酸菌代谢精氨酸生成^[6]。至于其他氨基酸经酵母氮代谢后是否

会形成氨甲酰化合物, 进而形成 EC, 目前还未有明确的报道。

酿酒酵母能够利用超过 50 多种不同的含氮化合物, 但对各种氮素的优先利用顺序不同, 受氮代谢阻遏效应 (NCR) 调控。酿酒酵母氮代谢过程中各种氨基酸之间的利用和转化受多种因素影响, 非常复杂, 还远未研究透彻, 其他氨基酸很可能对 EC 的形成有间接或直接的贡献, 只是因为葡萄汁中这些氨基酸的含量太低而对 EC 的贡献不够明显而未被发现。在研究 EC 的疑似前体时, 已有的方法多采用外加疑似物, 发酵后检测这些物质与 EC 的相关性^[7-8]。鉴于酵母氮代谢的复杂性和葡萄汁中各种氨基酸种类和含量的不确定性, 此类方法还缺乏说服力。有学者用更有说服力的放射性同位素实验证明了尿素是 EC 的直接前体^[9], 但对于氨基酸和 EC 的关系, 我们还有必要进一步深入研究。为此, 本实验将采用氨基酸缺失实验来研究氨基酸与 EC 的关系, 对可能的 EC 前体氨基酸采用稳定同位素示踪实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

葡萄酒高活性干酵母购自安琪酵母股份有限公司; 尿素 (>99%)、氨基甲酸乙酯 (>99%) 均购自美国 Sigma-Aldrich 试剂公司; L-精氨酸-15N₂ (>98%) 购自意大利 Giotto Biotech 公司; 9-吨氢醇 (>99%) 购自美国 Fluka 试剂公司; 丙酮、乙腈、无水乙醇均为色谱纯, 醋酸、丙醇、醋酸钠均为分析纯, 购自德国 Merck 公司; 各种氨基酸 (分析纯) 购自吉尔生化有限公司; 其它试剂均为分析纯, 购自天津市化学试剂一厂; 纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱-质谱联用仪 Agilent 6890-5975, 美国 Agilent 公司, 配备 TR-WaxMS 极性色谱柱(30m×0.25 mm×0.25 μm, Thermo Electron Corp., Beijing, China); 自动进样装置 Gerstel Multi-Propose Sampler MPS2; 固相微萃取仪器, 纤维萃取头 (85 μmPA), 美国 Supelco 公司; 酸度计 Model 420A, Thermo Orin. 高效液相色谱仪 Agilent 1200, 配备荧光检测器 G1321A, 美国 Agilent 公司; 色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column (250mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基配制

1.3.1.1 模拟葡萄汁 (SGJ) 配置 (L⁻¹):

葡萄糖 (200 g), 柠檬酸 (6 g), L-苹果酸 (6 g), 尿嘧啶 (20 mg)。

无机盐 (L⁻¹): KH₂PO₄ (750 mg); MgSO₄·7H₂O (250 mg); MnSO₄·H₂O (4 mg); ZnSO₄·7H₂O (4 mg); CuSO₄·5H₂O (1 mg); CaCl₂·2H₂O (155 mg); KI (1 mg); CoCl₂·6H₂O (0.4 mg); NaMoO₄·2H₂O (1 mg); H₃BO₃ (1 mg), NaCl (200 mg)。

生长因子 (L⁻¹): 肌醇 (20 mg); 生物素 (0.003 mg); 硫胺素-HCl (0.25 mg); 吡哆醇-HCl (0.25 mg); 烟酸 (2 mg); 泛酸钙 (1.5 mg)。

氮源 (L⁻¹): L-天冬氨酸 (Asp) (33 mg); L-谷氨酸 (Glu) (98 mg); L-丝氨酸 (Ser) (89 mg); L-谷氨酰胺 (Gln) (125 mg); L-甘氨酸 (Gly) (7 mg); L-精氨酸 (Arg) (1000 mg); L-苏氨酸 (Thr) (72 mg); L-脯氨酸 (Pro) (4983 mg); L-缬氨酸 (Val) (31 mg); L-丙氨酸 (Ala) (3 mg); L-组氨酸 (His) (21 mg); L-异亮氨酸 (Ile) (17 mg); L-亮氨酸 (Leu) (29 mg); L-苯丙氨酸 (Phe) (21 mg); L-酪氨酸 (Tyr) (3 mg); 磷酸氢二铵 (DAP) (142 mg)。

1.3.1.2 DAP 培养基的配置 (L⁻¹):

按总同化氮含量不变的原则, 用 DAP 替代模拟葡萄汁中的氮源。

1.3.2 分析方法

尿素含量的测定: HPLC-FLD 法^[10]

EC 含量的测定: HS-SPME-GC-MS 法。85 μm PA 萃取头于 280 °C 下老化 1 h, 老化后至无干扰峰出现。发酵液离心沉淀取上清 (10000 r/min, 10 min) 7.0 mL 放入 20 mL 棕色萃取瓶中, 加入 1.75 g 氯化钠, 旋紧瓶盖, 插入萃取头, 在 55 °C 下 500 r/min 恒温搅拌萃取 30 min。样品萃取及进样由德国 Gerstel 多功能进样系统自动完成。萃取完将萃取头取出, 插入气相色谱进样口 250 °C 热解吸 10 min, 载气为高纯氦气, 流速 2 mL/min, 不分流进样。分离的程序升温条件: 起始温度 50 °C 保持 2 min, 然后以 5 °C/min 的速度升温至 230 °C, 保持 10 min。MS 条件为 EI 电离源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, SIM 模式检测。把萃取头插入萃取瓶中进行顶空萃取, 萃取 30 min 后, 迅速取出萃取头, 插入 GC/MS 的进样口热解吸 10 min 后开始进行色谱分析。

酵母菌体浓度测定: 取适量发酵液, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释 10 倍后在 600 nm 下测 OD 值, 以灭菌的培养基为参比。

葡萄糖和酒精度的测定: SBA 生物传感仪法。

1.3.3 数据分析

本实验的所有数据分析均采用 Origin 8.1 软件进行计算。

2 结果与讨论

2.1 氨基酸缺失的模拟葡萄汁构建

氨基酸缺失可能会造成酵母生长迟缓, 发酵停滞。为了保证缺失的氨基酸不影响葡萄酒的正常发酵, 排除酵母生长对 EC 的影响, 就要选择一种氮源弥补氨基酸缺失对发酵过程的影响。添加的氮源应该既不影响酵母菌的生长, 又不会生成 EC 和尿素。为此, 我们尝试将葡萄酒行业常用的氮源补充剂磷酸氢二铵 (DAP) 替代模拟葡萄汁中的氮源进行发酵实验。相同条件下, 酵母在 DAP 培养基和模拟葡萄汁中发酵不同时间生成的 EC 和尿素含量见图 1。

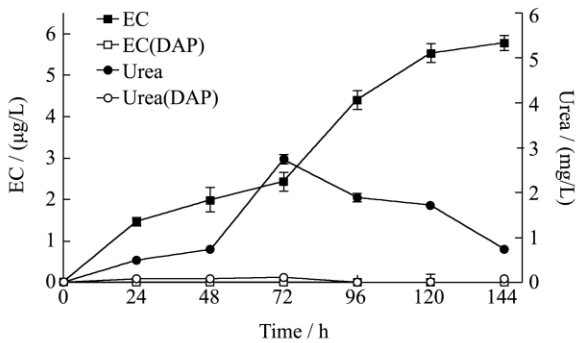


图 1 在模拟葡萄汁和 DAP 培养基中发酵 6 d 内的 EC 和尿素浓度

Fig.1 EC and urea content in simulated grape juice and DAP growth media during a six-day fermentation

可以看出, 在模拟葡萄汁中, 发酵 6 d 内 EC 含量逐渐升高, 最高接近 6 μg/L; 而尿素含量发酵 3 d 达到峰值, 最高接近 2.8 mg/L, 随后逐渐下降。在 DAP 培养基中发酵, 几乎不会生成 EC 和尿素。本实验结果证实了 DAP 作为葡萄酒行业常用的氮源补充剂是安全的。为了进一步研究 DAP 对发酵过程的影响, 按总同化氮浓度相同的原则, 用 DAP 代替缺失的氨基酸, 检测不同发酵时间菌体生长、葡萄糖消耗和酒精度的含量, 结果见图 2。

如图 2 所示, 不管采用模拟葡萄汁、DAP 培养基还是氨基酸缺失 (补充 DAP) 的模拟葡萄汁进行发酵实验, 在 6 d 的发酵周期内, 酵母都能正常生长, 在发酵两天后达到稳定期, 葡萄糖均在 6 d 后消耗殆尽, 发酵酒精度 6 d 后可达 11%~12%, 也无显著差别。这说明采用 DAP 替代缺失的氨基酸进行研究不会影响正常发酵过程。

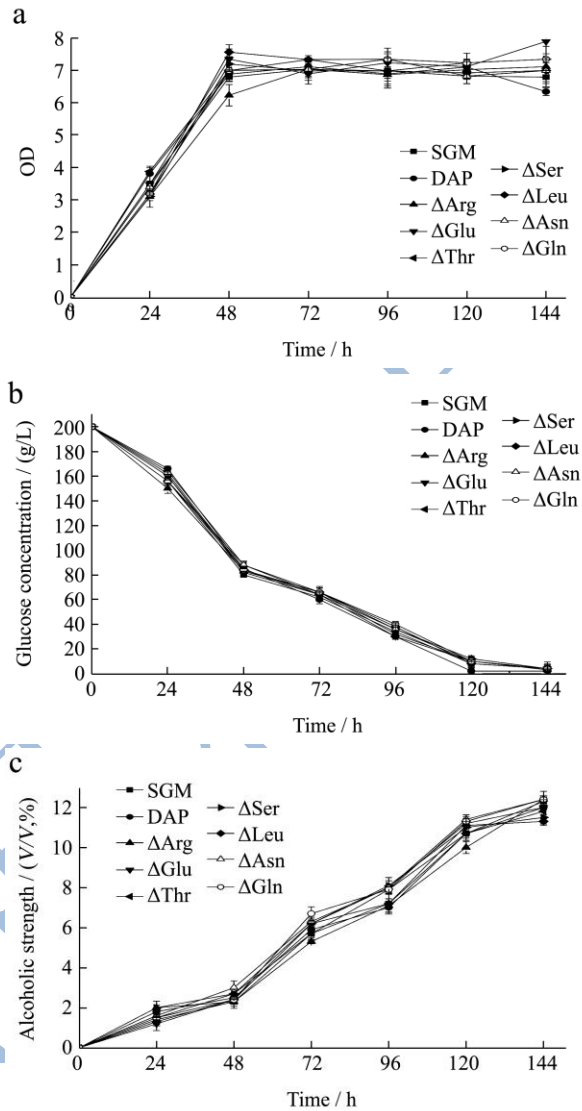


图 2 发酵过程中 OD 值 (a), 葡萄糖 (b) 和酒精度 (c) 的变化

Fig.2 Changes in OD (a), glucose levels (b), and alcohol content (c) during fermentation

综上所述, 在氨基酸缺失的模拟葡萄汁中补充相同可同化氮浓度的 DAP 进行研究是完全可行的, 利用这种模拟葡萄汁发酵既不会生成额外的 EC 和尿素, 也不会因为缺少某种氨基酸而导致发酵停滞进而影响酵母菌的生长和酒精发酵。

2.2 氨基酸缺失发酵实验

分别在 7 种氨基酸缺失的模拟葡萄汁中补充相同可同化氮浓度的 DAP, 发酵 6 d 后测定其中的 EC 和尿素浓度, 以全氨基酸模拟葡萄汁发酵后的 EC 和尿素浓度为对照, 研究氨基酸和 EC 的关系, 结果见图 3。由图 3 可知, 相比对照, DAP 替代精氨酸的模拟葡萄汁发酵后, EC 和尿素浓度大幅降低 ($P < 0.05$); 而 DAP 替代其它氨基酸发酵后, EC 和尿素浓度并无

显著变化,无机氮源DAP发酵后不会产生EC和尿素。可见精氨酸对EC和尿素的形成贡献很大,而其它氨基酸的代谢几乎对EC和尿素的形成无影响。

通常,脯氨酸是葡萄汁中含量最高的氨基酸,然而在葡萄酒酿造条件下,脯氨酸的消耗非常有限^[11],因此本实验未考虑脯氨酸,而只是研究了精氨酸和其它含量稍高的氨基酸。已有大量报道^[12-13]确认尿素是EC的直接前体,而精氨酸的含量也与EC有直接相关,本实验的结果也证明了这一点。其他氨基酸可能无法代谢生成EC,或者即使能够形成EC的某些间接前体,含量也极其有限,从而对EC的形成无显著影响。

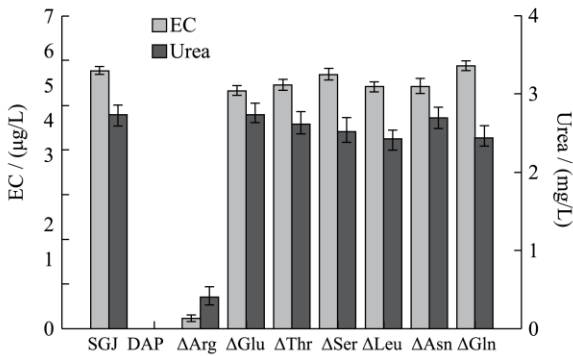


图3 不同培养基发酵后尿素和EC的浓度

Fig.3 EC and urea content in various growth media after fermentation

2.3 精氨酸的同位素示踪实验

为了确认精氨酸在酵母氮代谢过程中的EC转化途径和机制,我们分别用含有N15标记的精氨酸(位置为精氨酸胍基上的2个氮)和普通精氨酸的全氨基酸模拟葡萄汁进行发酵实验,5d后对EC进行检测。由于葡萄酒模拟汁中基质复杂,在全扫描方式下很难找到EC的离子流峰,所以一般采用选择离子流对EC进行定性,选择特征离子质核比m/z为62、74、89;其中m/z 89为分子离子,碎片离子m/z 74 (CH₂=O+ -CO-NH₂)和m/z 62 (C(OH)₂=NH₂⁺)都来自于“McLafferty+1”的重排反应。理论上,标记的精氨酸发酵后EC定性应该选择m/z为63、75、90。虽然如此,考虑到大气中N同位素是普遍存在的,本实验同时选择以上6个离子质核比m/z来检测EC。EC的选择离子流色谱图见图4,其质谱图见图5。

由图4可知,在本实验条件下,EC出峰时间为30.427 min,峰形尖锐,无其他杂峰干扰。发酵液样品成分复杂,虽然只选择了6种离子质核比m/z,但样品中仍有很多峰。

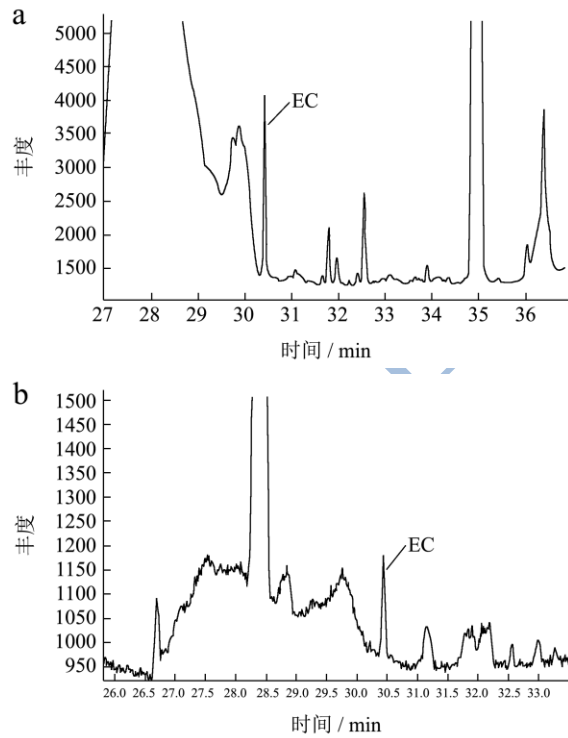


图4 普通精氨酸(a)和N15精氨酸(b)发酵后样品中EC的选择离子流色谱图

Fig.4 SIM chromatogram of EC in fermented samples with normal (a) and N15 (b) arginine

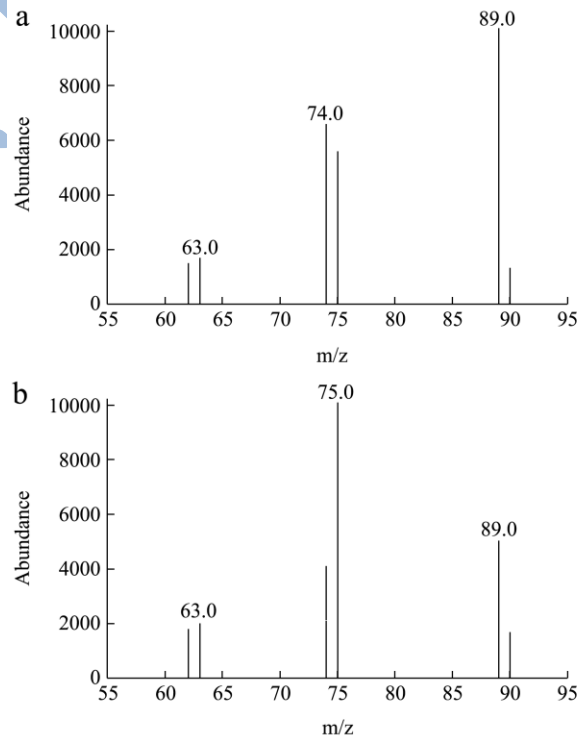


图5 普通精氨酸(a)和N15精氨酸(b)发酵后的EC质谱图

Fig.5 Mass spectra of EC in fermented samples with normal (a) and N15 (b) arginine

由图 5 可以看出两种精氨酸发酵后产生 EC 的特征碎片均含有上述 6 种离子, 区别在于 $m/z=75$ 和 $m/z=74$ 的相对强度。扫描 EC 峰尖两侧半峰宽的范围, 发现 15N 标记的精氨酸发酵后, $m/z=75$ 始终高于 $m/z=74$; 而普通精氨酸发酵后, $m/z=75$ 始终低于 $m/z=74$ 。采用 $m/z=75$ 与 $m/z=74$ 的离子强度比来定性检测 EC 和 15N EC 是完全可行的。精氨酸胍基上的氮原子确实参与合成了 EC。

3 结论

3.1 不断深入, 很多学者已经发现酿酒酵母的 NCR 效应会对 EC 的生成产生较大影响, 而已有的方法在研究 EC 的前体时, 多是外加疑似物后, 检测这些物质与 EC 的相关性。由于外加的疑似物可能会从全局影响酿酒酵母的氮代谢, 造成氨基酸利用顺序的改变而影响 EC 的合成, 所以该疑似物未必是 EC 的前体物质, 或许是转录调控因子。所以从多角度分析 EC 的前体物质是很有必要的, 本文在研究 EC 的氨基酸前体时, 采用了氨基酸缺失的发酵实验, 得到了与前人相同的结论: 即葡萄汁中精氨酸对 EC 的形成贡献很大, 而其它氨基酸的代谢对 EC 的形成无显著影响。该方法是对现有 EC 前体物质研究的有力补充, 目前, 尚未见采用该方法研究 EC 前体的同类报道, 该方法可以为同类研究提供方法借鉴。

3.2 质谱中的碎片离子的 m/z 的强度, 源于多种化合物碎片离子 m/z 的叠加, 扫描同一色谱峰的不同位置的质谱离子碎片 m/z 的强度均不相同, 且环境中稳定同位素是普遍存在的, 即使未加标记精氨酸发酵后的 EC 碎片也会有 m/z 为 63, 75, 90 的离子, 因此难以 15N EC 的理论碎片离子 m/z 为 63, 75, 90 来定性。本实验通过比较 N15 标记的精氨酸和普通精氨酸发酵后的 EC 离子碎片, 发现在 EC 半峰宽的范围内扫描, 特征离子 $m/z=75$ 与 $m/z=74$ 的强度比例是有规律, 即: 15N 精氨酸发酵后的 EC 特征离子 $m/z=75$ 与 $m/z=74$ 的强度总是大于 1, 而普通精氨酸发酵后的 EC 特征离子 $m/z=75$ 与 $m/z=74$ 的强度总是小于 1, 证明了 15N EC 的相对大量存在。本实验利用普通的 GC-MS, 达到了区别 15N EC 和普通 EC 的目的, 证明了 EC 的氮原子部分来源于精氨酸的胍基氮原子, 本研究为气质联用仪辨识同位素提供了方法借鉴。

参考文献

[1] Anc í-Azpilicueta C, Gonz ález-Marco A, Jiménez-Moreno N. Current knowledge about the presence of amines in wine [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48

(3): 257-275

- [2] Bisson L. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. [C]// *Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines*. Seattle, USA: American Society for Enology and Viticulture, 1991: 178-189
- [3] Henschke P A, Jiranek V. Hydrogen sulfide formation during fermentation: effects of nitrogen composition in model grape musts [C]// *International nitrogen symposium on grapes and wine*. Davis, Calif: American Society for Enology and Viticulture, 1991: 101-158
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC). *Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans [R]. Lyon, France, 2010
- [5] Weber J V, Sharypov V I. Ethyl carbamate in foods and beverages: A review [J]. *Environmental Chemistry Letters* 2009, 7(3), 233-247
- [6] 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
- [7] Azevedo Z, Couto JA, Hogg T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(1): 32-36
- [8] Ough C S, Crowell E A, Mooney L A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1988, 39(3), 243-249
- [9] Monteiro FF, Trousdale EK, Bisson L.F. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1989, 40(1): 1-8
- [10] Zhang J, Liu GX, Zhang Y, et al. Simultaneous determination of ethyl carbamate and urea in alcoholic beverages by HPLC-FLD [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(13): 2797-2802
- [11] Eva Valero, Carmen Millán, José M Ortega, et al. Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83(8): 830-835

- [12] Delledonne D, Rivetti F, Romano U. Developments in the production and application of dimethylcarbonate [J]. Applied Catalysis A: General, 2001, 221(1-2): 241-251
- [13] Wang D, Yang B, Zhai X, et al. Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea [J]. Fuel Process Technol., 2007, 88(8): 807-812

现代食品科技