

葡萄酒苹果酸-乳酸菌精氨酸代谢研究概况

李 华 梁新红 郭安鹊 黄德成

(西北农林科技大学葡萄酒学院 杨凌 712100)

摘 要 :葡萄酒苹果酸-乳酸菌的精氨酸代谢会导致葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的增加 ,从而严重影响葡萄酒的饮用安全性。近年来研究表明 ,葡萄酒苹果酸-乳酸菌的精氨酸代谢途径是精氨酸脱亚氨基酶途径(Arginine deiminase pathway ,简称 ADI 途径)。系统分析苹果酸-乳酸菌的 ADI 途径、精氨酸转运机制、ADI 途径酶的调节等方面的研究进展 ,阐明葡萄酒苹果酸-乳酸菌的精氨酸代谢对酿造优质葡萄酒具有重要的理论和实际意义。

关键词 :苹果酸-乳酸菌 精氨酸代谢 精氨酸脱亚氨基酶途径 氨基甲酸乙酯

中图分类号 :Q935 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2006)04-0663-05

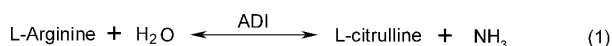
葡萄酒酿造中 ,在酒精发酵结束后 ,一般要进行苹果酸-乳酸发酵(Malolactic fermentation ,MLF)。MLF 是在苹果酸-乳酸菌(Malolactic bacteria ,MLB)的作用下 ,将双羧基的 L-苹果酸脱羧基转变成单羧基的 L-乳酸的过程。MLF 在降低葡萄酒酸度、改善葡萄酒风味和增加葡萄酒微生物稳定性等方面具有重要意义 ,是生产优质红葡萄酒和部分白葡萄酒必须进行的工艺^[1,2]。有关葡萄酒 MLB 降酸的研究虽然很多 ,但是对 MLB 降酸之外的其它生物学特性的研究却较少。近年来的研究表明 ,MLF 结束后 MLB 的精氨酸代谢对葡萄酒质量有重要影响^[2~14] ,尤其是 MLB 的精氨酸代谢会导致中间代谢物瓜氨酸的分泌 ,瓜氨酸和乙醇自发反应生成致癌物氨基甲酸乙酯 ,严重影响葡萄酒的饮用安全性。国外对葡萄酒 MLB 的精氨酸代谢研究日益重视 ,而国内在这方面的研究至今未见报道。

1 苹果酸-乳酸菌精氨酸代谢途径

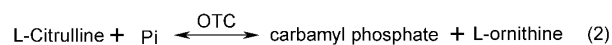
1.1 苹果酸-乳酸菌精氨酸代谢途径概况

直至 20 世纪 90 年代 ,研究者仍对 MLB 的精氨酸代谢途径存有争议。Kuensch 等^[15]提出 ,酒明串珠菌(*Leuconostoc oenos*) ,后来经重新分类 ,定名为 *Oenococcus oeni*)的精氨酸代谢途径是尿素循环途径。精氨酸在精氨酸酶(Arginase)的作用下转化成鸟氨酸和尿素 ,随后鸟氨酸在鸟氨酸转氨甲酰酶(Ornithine transcarbamylase)的作用下转化成瓜氨酸 ;尿素在脲酶(Urease)的作用下生成氨和二氧化碳。但 Liu 等^[9,10,15]在葡萄酒 MLB 的精氨酸代谢实验中发现 ,在整个细菌培养过程中并没有检测到尿素 ,并且在细菌的无细胞抽提物中也没有检测到精氨酸酶和脲酶的活力。因此 ,可以肯定 MLB 对精氨酸的降解不是尿素循环途径。在实验中 ,他们也发现 ,精氨酸经布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)降解后生成的瓜氨酸又被细胞同化 ,并且随着瓜氨酸含量的降低 ,鸟氨酸含

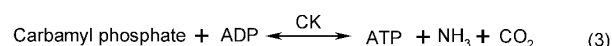
量上升。这表明 ,瓜氨酸是鸟氨酸的前体 ,而不是鸟氨酸的降解物。并且在酒类球菌(*Oenococcus oeni*) , *L. buchneri* 等的无细胞抽提物中 ,检测到了与 MLB 的精氨酸代谢有关的 3 个关键酶 :精氨酸脱亚氨基酶(Arginine deiminase ,ADI ; EC3.5.3.6) ,鸟氨酸转氨甲酰酶(Ornithine transcarbamylase ,OTC ; EC2.1.3.3)和氨基甲酰激酶(Carbamate kinase ,CK ; EC2.7.2.2)^[9,10]。根据以上实验结果 ,Liu 等结合其它研究者对发酵乳制品和发酵肉制品中分离的异型发酵乳酸菌 ,如奶酪发酵剂乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)^[16]和发酵肉制品中的清酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)^[10,17]的精氨酸代谢途径的研究 ,提出了葡萄酒 MLB 的精氨酸代谢途径 ,即精氨酸脱亚氨基酶途径(Arginine deiminase pathway ,简称 ADI 途径)(图 1)。



$$\Delta G^\circ = -37.7 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^\circ = +28.5 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^\circ = -10.8 \text{ kJ/mol}$$

图 1 葡萄酒苹果酸-乳酸菌的精氨酸代谢途径

Fig.1 The pathway of arginine metabolism by malolactic bacteria in wine. ADI-Arginine deiminase ; OTC-Ornithine transcarbamylase ; CK-Carbamate kinase ; ΔG° -Gibbs ' free energy change (obtained from [18]).

按照 ADI 途径 ,1mol 精氨酸(减去分泌的瓜氨酸)在理论上可以生成 2mol 氨、1mol 鸟氨酸、1molATP 和 1mol 二氧化碳 ,这种化学计量关系在 *O. oeni*、*L. buchneri* 和希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*)等^[5,8] MLB 的精氨酸代谢中均得到证

实。同时,该途径也解释了 Kuensch 等提出的 MLB 精氨酸代谢产生的鸟氨酸、氨和二氧化碳的原因。在其它相关研究中也发现了其它 MLB 的精氨酸降解产物中氨、鸟氨酸的相似的化学计量关系。

在精氨酸代谢中,除了形成氨和鸟氨酸外,还有少量中间代谢物瓜氨酸分泌到培养基中。Mira de Orduña 等^[8,49]研究发现,在一定 pH 值下,MLB 分泌瓜氨酸的量和培养基中精氨酸的初始量存在线性回归关系,在 pH3.6 时,*L. buchneri* CUC-3 的线性回归方程为:瓜氨酸分泌率 = $-0.003(\pm 0.008) + 0.023(\pm 0.002) \times$ 精氨酸降解率,相关系数 $r = 0.91$,斜率为精氨酸-瓜氨酸转化率。*O. oeni* MCW 和 *O. oeni* Lo111 的精氨酸-瓜氨酸转化率分别为 $3.8\% \pm 0.1\%$ 和 $3.9\% \pm 0.2\%$,相关系数均为 0.96。但有趣的是,*L. hilgardii* ATCC8290 在精氨酸降解完后,能对分泌的瓜氨酸重新吸收利用^[13]。瓜氨酸的积累和分泌机制目前尚不十分清楚,极有可能是因为 $OTC(\Delta G^{\circ} = +28.5\text{kJ/mol})$ 在热力学上不利于其催化瓜氨酸的降解,即精氨酸由 ADI 水解形成瓜氨酸(反应 1)速率比 OTC 作用于瓜氨酸形成鸟氨酸和氨基甲酰磷酸(反应 2)的速率快,也有人提出瓜氨酸分泌可能是因为瓜氨酸合成和分解反应之间能量的解偶联作用,特别是细胞生长到稳定期之后,细胞生长逐渐减慢或停止,而培养基中精氨酸过量,精氨酸降解产生的 ATP(反应 3)不被细胞利用而积累,因此抑制了 OTC 的活性。这在对 *S. lactis* 的 ADI 途径中间代谢物 ATP 对 OTC 抑制作用研究中已得到证实^[15]。精氨酸经 ADI 途径降解且分泌瓜氨酸的现象在其它来源的乳酸菌中也有报道^[18,20,21]。因此,由 ADI 途径降解精氨酸的微生物具有形成及分泌瓜氨酸的特点。这对葡萄酒酿造具有重大意义,因为分泌的瓜氨酸可以和乙醇自发反应生成氨基甲酸乙酯,而氨基甲酸乙酯是一种具有基因致癌作用的物质。

1.2 编码 ADI 途径酶的基因结构及功能

法国的 Zúñiga 等^[22]最先对从发酵肉制品中分离出来的 *L. sake* 的编码 ADI 途径酶的基因结构和功能进行了分析。最近,国外许多研究者对葡萄酒 MLB 的编码 ADI 途径酶的基因(编码 ADI、OTC、CK 的基因分别为 *arcA*、*arcB*、*arcC*)进行了克隆、测序和表达研究。其中研究比较清楚的是 *O. oeni*、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和 *L. hilgardii* 的 *arc* 基因簇,它们和 *L. sake* 的 *arc* 基因簇具有很高的同源性^[23-26]:*O. oeni* 的 *arc* 基因簇分别编码 ADI(415aa, 47.1kDa)、OTC(351aa, 39.8kDa)和 CK(313aa, 34kDa);*L. hilgardii* 的 *arc* 基因簇分别编码 ADI(418aa, 47.2kDa)、OTC(343aa, 38.3kDa)和 CK(318aa, 33.6kDa);而 *L. sake* 的 *arc* 基因簇分别编码 ADI(409aa, 46.0kDa)、OTC(337aa, 37.8kDa)和 CK(312aa, 33.2kDa)。 *L. hilgardii* 的 *arcA* 和 *O. oeni* 的 *arcA* 有 70% 的同源性和 *L. sake* 的 *arcA* 有 66% 的同源性;*L. hilgardii* 的 *arcB* 与 *O. oeni* 的 *arcB* 有 77% 的同源性;*L. hilgardii* 的 *arcC* 和 *O. oeni* 及 *L. sake* 的 *arcC* 同源性分别为 68% 和 64%。*L. plantarum* 和 *L. hilgardii* 的 *arcC* 的同源性大约为 76.5%,*L. plantarum* 和 *O. oeni* 的 *arcC* 的同源性大约为 63%。序列分

析表明,编码 ADI 途径酶的基因组都是成簇存在的,其顺序为 *arcA*、*arcB*、*arcC*。Northern blot 研究证明了这 3 个基因在同一操纵子结构中,分别是 3 个完整的开放阅读框(Open reading frame, ORF)。在 *L. hilgardii* 的 *arcABC* 基因簇中,只有一个启动子,位于第一个 ORF 的上游,转录起始位点在 -10 保守序列后的 11 个核苷酸内,每个基因的上游都有典型的核糖体结合位点,在第三个 ORF 的终止密码子处有转录终止子。

虽然 *L. sake*、*O. oeni* 和 *L. hilgardii* 等的 *arc* 基因簇存在于同一操纵子结构中,但它们所含的基因数并不完全相同。*O. oeni*^[25]具有转录调节因子家族受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)的基因 *orf229*。*orf229* 和 *arcA* 之间碱基长度为 101bp,在 *O. oeni* 的 *arcC* 基因下游有编码精氨酸转运蛋白的基因 *arcD*。在 *L. hilgardii* 中则没有发现 *arcD* 基因,但其 *arcA* 的上游有 *orf229* 基因的 ORF。*L. sake*^[22]中有编码转氨酶的 *arcT* 基因,但在 *O. oeni* 和 *L. hilgardii* 中则没有此基因。*O. oeni* 和 *L. hilgardii* 的 *arc* 基因在大肠杆菌中进行了表达,ADI、OTC 和 CK 的酶活性都相当高。利用 *arc* 基因簇的简并引物合成的特异性标记探针与 MLB 的基因进行杂交,检测到 *arc* 基因簇的菌株能降解精氨酸,而缺少 *arc* 基因簇的菌株不能降解精氨酸^[21,25]。这就从分子角度进一步证实了“MLB 的精氨酸代谢途径”是 Liu 等提出的 ADI 途径,而不是尿素循环途径。

2 精氨酸转运机制

2.1 ADI 途径中的精氨酸-鸟氨酸反向转运能量机制
精氨酸只有从胞外转运到胞内后,才能在 ADI 途径酶的作用下进行降解。MLB 对精氨酸的转运是通过精氨酸-鸟氨酸反向转运机制实现的,精氨酸的跨膜运输不消耗能量,但精氨酸-鸟氨酸反向转运的启动则需要能量^[5,10,12]。

对从鱼中分离出来的 *L. plantarum* 和从乳品中分离的 *L. buchneri* 的精氨酸代谢研究发现,在不加可发酵性糖的合成培养基中,不能通过 ADI 途径来促进细菌生长^[10]。在 *O. oeni*、*OENI* 和 *L. buchneri* CUC-3 的精氨酸代谢研究中也发现了类似的现象^[15]:只有培养基中含有一定量的葡萄糖时,细菌才能进行精氨酸代谢而产生鸟氨酸、瓜氨酸和氨。因此,推测只有在可发酵性糖提供能量的情况下,细菌细胞才可启动精氨酸-鸟氨酸反向转运机制,细胞才能吸收精氨酸。一旦细胞启动了精氨酸-鸟氨酸反向转运机制,以后的精氨酸跨膜运输则不需要额外的能量。精氨酸-鸟氨酸反向转运的驱动力是由精氨酸-鸟氨酸的浓度梯度提供的,这与其特异的透性酶有关^[12]。这是精氨酸代谢对环境适应性和细菌生长的积极效应。

2.2 编码精氨酸-鸟氨酸反向转运蛋白相关基因研究
精氨酸从胞外向胞内运输是在精氨酸-鸟氨酸反向转运蛋白的作用下进行的。Divol 等^[25]首先对 *O. oeni* 编码精氨酸转运蛋白(ArcD)的 *arcD* 基因进行了分子克隆和表达。研究表明,*O. oeni* 有编码 ArcD 蛋白的两个 *arcD* 位点(*arcD*₁ 和 *arcD*₂)。中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

arcD₂ 和 *arcD₁* 基因的 ORF 为 1395bp, 编码 464 个氨基酸残基, 分子量为 51kDa。 *O. oeni* 的 *ArcD₂* 氨基酸序列和 *L. sake* 的 *ArcD* 蛋白有很高的同源性(44% 相同性、60% 相似性)。利用 PRED-TMR2 程序序列分析发现, 此蛋白有 14 个跨膜区。*arcD₁* 基因的 ORF 为 1428bp, 编码 475 个氨基酸残基, 分子量为 52kDa。 *arcD₁* 位于 *arcD₂* 起始密码子上游区, 和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的 *arcD* 的氨基酸序列有同源性(56% 相同性, 74% 相似性)。用 PRED-TMR2 程序序列分析发现它有 12 个跨膜区。此两个基因位点的基因簇结构为 *arcABCD₁D₂*。每个 *arcD* 基因上游都有典型的核糖体结合位点。在 *arcD₁* 和 *arcD₂* 起始密码子上游没有发现精氨酸阻遏或类似 CRP 蛋白结合位点。用 RT-PCR 技术对 *arcD* 基因的表达进行了研究, 表明在 *O. oeni* 中 *arcD₁* 和 *arcD₂* 是组成型表达, 且发现了 *arcC-arcD₂*、*arcD₁-arcD₂* 的多顺反子 mRNA, 在 *arcD₁-arcD₂* 之间有发夹结构, 所以 *arcC-arcD₁* 的 mRNA 量比 *arcD₁-arcD₂* 的量多, 它们的转录不受精氨酸的调控。Arena^[24]在 *L. hilgardii* X₁B 的基因中也克隆出了 *arcD* 基因, 但该基因只有一个位点, 而不是两个。在 MLB 整个生长期 *ArcD* 蛋白都存在于膜上, 这有利于精氨酸的吸收, 使 *O. oeni* 更适应于葡萄酒的胁迫环境^[2, 27, 28]。

3 精氨酸代谢和酶合成的调节

研究发现, MLF 结束后, *O. oeni*、*L. buchneri* 和 *L. hilgardii* 等对果糖和精氨酸的代谢并不是同时进行的。果糖耗完后, MLB 才开始降解精氨酸。这表明果糖或其代谢产物抑制了精氨酸吸收或降解^[10, 15, 21]。也有研究表明, 增加培养基中葡萄糖的浓度, 瓜氨酸的分泌量增加^[19]。这说明糖代谢对精氨酸降解有抑制作用, 极有可能是糖发酵产生的 ATP 抑制了 OTC 的作用。在 *L. sake*^[17] 和 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3^[29] 的精氨酸代谢中也发现了糖对 ADI 途径酶的抑制作用。糖对 ADI 途径酶的抑制机理目前尚不十分清楚。因为 *arc* 操纵子的代谢抑制受 *arcA* 上游的 CRE 元件控制, 碳代谢抑制需要 CcpA 蛋白和磷酸烯醇式丙酮酸磷酸转移酶系(Phosphoenol pyruvate phosphotransferase system, PTS), 通过建立 *L. sake* 的 *pts I* 突变体, 证实了 *L. sake* 的精氨酸代谢受葡萄糖的抑制。

在 MLB 中, ADI 途径酶同时被精氨酸诱导, *O. oeni*、*L. buchneri* 和 *L. hilgardii* 中都发现了精氨酸对 ADI 途径酶的共诱导作用^[6, 8, 15, 23]。Tonon 等^[23]在利用 RT-PCR 技术研究 *O. oeni* 的 ADI 途径酶的转录诱导时发现, 当培养基中缺乏精氨酸时, 几乎检测不到 ADI、CK 的活性; 当培养基中加入精氨酸后, 酶活性大幅度提高, 其中 OTC 酶活性增加了 184 倍。研究同时发现, 调节蛋白 CRP 也受精氨酸的诱导。在 *L. hilgardii* 中也有类似的现象。这说明精氨酸可诱导 ADI 途径酶的合成。

精氨酸代谢操纵子调控的分子机理目前还不十分清楚。在 *O. oeni* 的 *arc* 基因簇中发现有编码 CRP 的基因 *orf229*^[23], 有点类似于乳糖操纵子的调节基因, 但葡萄糖和精

氨酸对操纵子调控的细节, 还需进一步研究。

葡萄酒是一种复杂的培养基, 其组成和环境条件(如糖、SO₂、pH、乙醇等)如何协同影响 ADI 酶的合成与表达, 还有待于进一步研究。

4 研究精氨酸代谢的意义

4.1 分类学意义

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》, *Leuc. oeni* 为精氨酸阴性, 即不分解精氨酸^[22]。但大量的研究表明, *Leuc. oeni* 能够不同程度地按 ADI 途径降解精氨酸, 只有 *Leuconostocs* 的其它种类为精氨酸阴性。这表明 *Leuc. oeni* 同该属的其它细菌在降解精氨酸方面存在着根本的差异。*Leuc. oeni* 的 ADI 途径支持了 Dicks 把 *Leuc. oeni* 重新定名为新种的提议。同时, ADI 途径也否定了 Boulton 用细菌精氨酸代谢来区分酒类酒球菌和异型发酵乳杆菌的观点^[15]。

4.2 生物学意义

精氨酸代谢是一个产能过程, 且与细菌的生长相偶联。因此 MLB 可以在胁迫环境下具有更强的生命力。另外, ADI 途径产生的氨可以提高环境的 pH 值, 使 ADI 途径有保护细菌免受高酸伤害的作用。这对于在低 pH 下细菌的生长繁殖具有重要的生理学意义。

4.3 对葡萄酒酿造的影响

精氨酸是葡萄汁和葡萄酒中主要的氨基酸, 能通过 ADI 途径降解精氨酸的菌株比不能降解的菌株更能适应葡萄酒的胁迫环境。但 MLB 对精氨酸的降解使葡萄酒的品质下降。

首先, 精氨酸的代谢会导致瓜氨酸的分泌, 而瓜氨酸是氨基甲酸乙酯的前体, 所以 MLB 的精氨酸代谢会使葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量增加, 降低了葡萄酒的饮用安全性。因为 MLB 的精氨酸代谢及瓜氨酸分泌具有菌株特异性^[5, 8, 9, 10, 26], 在进行葡萄酒 MLB 降解时, 应选择没有精氨酸代谢或代谢中没有瓜氨酸分泌的菌株, 也就是说, ADI⁺ OTC⁻ 或 ADI 酶活高、OTC 活力低的菌株不能用于生产, 以尽量降低葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量。

其次, 有一些 MLB 是腐败菌, 它们的精氨酸代谢释放大量的氨, 从而导致酒的 pH 上升 1 至 2 个单位^[6, 8, 13]。在葡萄酒经 SO₂ 处理后, 葡萄酒微生物生长受到抑制, 葡萄酒体系处于生物稳定状态。MLF 结束后, MLB 通过 ADI 途径对精氨酸的降解, 使酒液 pH 升高, 可增强其抵抗葡萄酒低酸环境的保护机制, 并通过 ADI 途径中底物水平磷酸化获得能量, 增强其在胁迫环境中的竞争力^[31], 使葡萄酒的生物稳定性受到破坏, 并且其代谢产物(如醋酸)损害葡萄酒的风味。因此, MLB 精氨酸代谢的研究对酿造高品质的葡萄酒有重要意义。

5 研究展望

目前, 我国研究者已逐渐认识到了葡萄酒 MLB 精氨酸代谢在葡萄酒工业中的重要性。作者(2001)首次分离筛选

出了我国优良的 *O. oeni* 菌株,对其进一步的研究发现,MLF 后的葡萄酒中精氨酸含量仍然很高(6~10mg/L)^[32],这无疑增加了 *O. oeni* 经 ADI 途径产生氨基甲酸乙酯的可能性。氨基甲酸乙酯是一种具有基因致癌作用的物质,国际癌症研究所(International Agency for Research on Cancer, IARC)把氨基甲酸乙酯对人类的致癌毒性归为 2B 群,已经引起了国际酿酒界的高度关注。加拿大和美国早在 20 世纪 80 年就已经对它的含量加以严格的限制,而目前我国对葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量还没有做出限定。法国和阿根廷已经完成 *O. oeni* 和 *L. hilgardii* 的 *arc* 簇基因全序列测序(Accession Nos. 分别为 AF025543 和 AJ421514)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),这将为我国 MLB 的精氨酸代谢研究提供更多的信息。

虽然对 MLB 的精氨酸代谢研究已经引起了各国的高度重视,但在葡萄酒生产中还需采取有效措施降低由 MLB 精氨酸代谢产生的氨基甲酸乙酯。因此,今后应加强对如下几个方面的研究:①研究影响 MLB 精氨酸代谢分泌瓜氨酸的环境因素,并对这些因素进行最优化控制,最大程度限制 MLB 的瓜氨酸分泌量;②研究葡萄汁和葡萄酒不同成分对 MLB 精氨酸代谢的影响;③研究 MLB 的精氨酸代谢动力学机理;④进一步研究 MLB 精氨酸代谢及其酶的调控机理;⑤利用分子育种技术选育 ADI⁻ 或 ADI 酶活低的 MLB 用于 MLF,以便于在葡萄酒酿造中有效控制 MLB 的精氨酸代谢,提高葡萄酒的质量。

参 考 文 献

- [1] 李 华. 现代葡萄酒工艺学. 第二版. 西安:陕西人民出版社,2000.
- [2] Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, **23**: 447–455.
- [3] Uthurry CA, Varela F, Colomo B. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*, 2004, **88**: 329–336.
- [4] Uthurry CA, Suárez Lepe JA. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, 2006, **94**(2): 262–270.
- [5] Arena ME, Saguir FM, Manca de Nadra MC. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, **52**: 155–161.
- [6] Arena ME, Manca de Nadra MC. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*, 2005, **156**(8): 858–864.
- [7] Mira de Orduña R, Liu SQ, Patchett ML. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS microbiology Letters*, 2000, **183**: 31–35.
- [8] Mira de Orduña R, Patchett ML, Liu SQ, et al. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(4): 1657–1662.
- [9] Liu SQ, Pritchard GG, Hardman ML, et al. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, **61**(1): 310–316.
- [10] Liu SQ, Pritchard GG, Hardman MJ, et al. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *Journal of Applied Microbiology*, 1996, **81**: 486–492.
- [11] Liu SQ. Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**: 589–601.
- [12] Tonon T, Lonvaud-Funel A. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**: 526–531.
- [13] Tonon T, Lonvaud-Funel A. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiology*, 2002, **19**: 451–461.
- [14] 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. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 32–36.
- [15] Liu SQ, Pilon GJ. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, **84**: 315–327.
- [16] Crow VL, Thomas TD. Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology*, 1982, **150**: 1024–1032.
- [17] Champomier Vergès MC, Zúñiga M, Morel-Deville F, et al. Relationship between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **180**: 297–304.
- [18] Plugg CM, Stams AJM. Arginine catabolism by *Thermanaerovibrio acidaminovorans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **195**: 259–262.
- [19] Mira de Orduña R, Liu SQ, Patchett ML, et al. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**: 547–552.
- [20] Arena ME, Saguir FM, Manca de Nadra MC. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, **47**: 203–209.
- [21] Zúñiga M, Pérez G, González-Candela F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, **25**: 429–444.
- [22] Zúñiga M, Champomier-Vergès M, Zagorec M, et al. Structure and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**: 4154–4159.
- [23] Tonon T, Bourdineaud JP, Lonvaud-Funel A. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Research in Microbiology*, 2001, **152**: 653–661.
- [24] Arena ME, Manca de Nadra MC, Muñoz R. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene*, 2002, **301**: 61–66.

- [25] Divol B , Tonon T , Morichon S , *et al.* Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *Journal of Applied Microbiology* , 2003 , **94** : 738 – 746.
- [26] Spano G , Chieppa G , Beneduce L , *et al.* Expression analysis of putative *arcA* , *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* , 2004 , **96** : 185 – 193.
- [27] Bourdineaud JP , Nehmé B , Tesse S , *et al.* A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *International Journal of Food Microbiology* , 2004 , **92** : 1 – 14.
- [28] Stuart MR , Chou LS , Weimer BC. Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 , **65** (2) : 665 – 673.
- [29] Chou LS , Weimer BC , Cutler R. Relationship of arginine and lactose utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *International Dairy Journal* , 2001 , **11** : 253 – 258.
- [30] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第二版. 北京 : 科学出版社 , 2001.
- [31] Laht TM , Kask S , Elias P , *et al.* Role of arginine in the development of secondary microflora in Swiss-type cheese. *International Dairy Journal* , 2002 , **12** : 831 – 840.
- [32] 王 华 , 刘 芳 , 李 华. 不同酒类酒球菌苹果酸-乳酸发酵对葡萄酒中氨基酸的影响. 中国食品学报 , 2003 , **3** (4) : 51 – 55.

Arginine metabolism in wine malolactic bacteria

LI Hua* , LIANG Xin-hong , GUO An-que , HUANG De-cheng

(College of Enology , Northwest University of Agriculture & Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract : Arginine metabolism in wine malolactic bacteria may increase the concentration of ethyl carbamate (EC , a known carcinogen with the potential toxicological effects) in wine , which makes a profound impact on wine hygienic quality. In fact , recent advanced studies have proved that arginine metabolism in wine malolactic bacteria is via arginine deiminase pathway (ADI pathway) , and this pathway is composed of three enzymes : arginine deiminase (ADI) , ornithine transcarbamylase (OTC) , carbamate kinase (CK). The possible mechanisms of arginine transport and the regulation of major enzymes for arginine metabolism as well as the mechanism of ADI pathway and its molecular characteristics are reviewed. The study on arginine metabolism in wine malolactic bacteria has practical and theoretical significance for the safety and high quality of wine.

Keywords : Malolactic bacteria ; Arginine metabolism ; Arginine deiminase pathway ; Ethyl carbamate

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-298-7092107 ; E-mail : putj@263.net

Received 16 September 2005 / Accepted : 10 January 2006 / Revised : 8 November 2005