



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

仇钰莹^{1,2}, 方芳^{1,2*}, 周新虎³, 陈翔³, 张龙云³, 堵国成^{1,4}, 陈坚^{1,5}

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 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

³ 江苏洋河酒厂股份有限公司, 江苏 宿迁 223800

⁴ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

⁵ 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】分析浓香型白酒酒醅发酵过程中氨基甲酸乙酯前体物质瓜氨酸含量显著增加的原因, 确定酒醅中能够利用精氨酸并积累瓜氨酸的微生物, 为解析白酒中氨基甲酸乙酯的形成机制提供研究基础和理论依据。【方法】采用高通量筛选技术, 从浓香型白酒酒醅中分离具有高精氨酸利用能力和高瓜氨酸积累特性的菌株, 并通过基因型和表现型验证以及模拟窖内发酵验证它们对瓜氨酸积累的贡献。【结果】共筛选获得20株具有高精氨酸利用能力的菌株, 其中*Lactococcus garvieae* LD3, *Bacillus amyloliquefaciens* BG5, *Pediococcus acidilactici* PH7和*Staphylococcus pasteurii* SH11具有较高的瓜氨酸生成能力, 并可使酒醅中瓜氨酸含量显著增加。【结论】筛选获得的4类微生物均能够通过ADI途径代谢积累瓜氨酸, 是导致酒醅瓜氨酸含量增加的原因。

关键词: 白酒, 氨基甲酸乙酯, 瓜氨酸, 精氨酸脱亚胺酶途径, 葡萄球菌, 芽孢杆菌, 足球菌, 乳球菌

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是存在于传统发酵食品和酿造酒类中的1种有害化学物质^[1], 具有潜在的致癌性^[2]。2007年EC被国际癌症研究机构(IARC)归类为2A类致癌物, 即可能令人类患癌的物质^[3]。近年来世界范围内很多发酵食品和酒精饮料(如酱油、黄酒、白酒等)中均检

测出氨基甲酸乙酯^[4]。因此, 各国食品、药品安全及与人类健康相关的组织已对饮料酒中EC含量设定了最高限量^[5], 很多研究机构也正在积极探索和寻找降低或消除饮料酒中的EC的方法^[6]。

白酒是中国主要的食用酿造酒之一, 其安全性和对人体的影响日益受到关注。白酒中的氨基

基金项目: 国家"973项目"(2012CB720802)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918307; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-04; 修回日期: 2016-03-16

甲酸乙酯主要由酒醅蒸馏和原酒贮藏阶段产生^[7-8]。酒醅和原酒中的EC前体物质主要在发酵阶段产生, 其中, 尿素和瓜氨酸是发酵阶段的主要EC前体物^[5]。酒醅中含有的尿素一方面来源于原料, 另一方面可由酵母的尿素循环代谢途径产生^[9-10]。瓜氨酸则是由酒醅中某些微生物通过精氨酸脱亚氨基酶途径(arginine deiminase pathway, ADI途径)将原料中的精氨酸转化生成^[11]。在白酒发酵过程中, 粮食原料中的蛋白质被微生物的蛋白酶水解生成氨基酸^[12]。精氨酸作为蛋白质主要的组成氨基酸大量存在于酒醅中, 易被微生物利用并通过ADI途径代谢生成EC的前体物质瓜氨酸。因此, 分离和筛选白酒酒醅中具有ADI途径的细菌及研究他们对酒醅中瓜氨酸积累的贡献, 将为阐释白酒中EC形成机制和控制窖内发酵过程中EC前体物质含量提供理论基础。

本研究运用高通量筛选技术从浓香型白酒的酒醅中筛选出具有高精氨酸利用能力和高瓜氨酸生成率的菌株。通过验证这些菌株中ADI途径的基因, 并进行模拟酒醅发酵的实验, 证实了其在酒醅发酵过程中积累EC前体物质瓜氨酸的能力。研究结果为阐明酒醅发酵过程EC前体物质的来源, 解析白酒生产过程中EC形成机制提供了理论依据, 为解析发酵过程中微生物的相互作用提供了借鉴意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 酒醅样品: 选取江苏洋河酒厂生产浓香型白酒的酒窖进行采样。从入窖到发酵结束, 分别于入窖当日至出窖不同时间点采样, 每次分别从酒醅的上、中、下3层采集样品, 合并混合均匀后作为该时间点的酒醅样品, 用于微生物分离和EC前体物质种类与含量的分析。

1.1.2 培养基: TJA培养基(g/L)^[13]: 番茄汁50 mL, 酵母浸膏5, 牛肉浸膏10, 葡萄糖2, 乳糖20, 乙酸钠5, 乳酸20, 磷酸氢二钾2, 吐温80 1, 琼脂15, 去离子水1 L; GM17培养基(g/L): 葡萄糖5, M17培养基(英国Oxoid公司) 47.25, 去离子水1 L。

营养肉汤培养基(上海国药集团)、MRS培养基(英国Oxoid公司)、TJA培养基和GM17培养基作为分离培养基用于初步分离酒醅中的细菌。以上分离培养基中均加入100 mg/L纳他霉素用于抑制真菌生长。

改良生物胺生成培养基(g/L)^[14]: 用于筛选具有精氨酸利用能力的菌株。其配方为: 葡萄糖0.50, 牛肉浸膏5.00, 酵母浸出物5.00, 胰蛋白胨5.00, 氯化钠10.00, 吐温80 1 mL, 硫酸镁0.20, 硫酸锰0.05, 硫酸铁0.40, 柠檬酸三铵2.00, 碳酸钙0.10, 吡哆醛-5-磷酸0.05, 磷酸氢二钾2.00, 精氨酸5.00, 去离子水1 L, 盐酸调节pH (6.2±0.2)。

粮食浸出培养基: 用于考察菌株积累瓜氨酸能力。其制备方法是: 将生产浓香型白酒用的粮食混合粉碎后, 添加4倍水(W/V)和高温淀粉酶(50 U/kg)蒸煮糊化1 h, 迅速冷却至60 °C以下后加入糖化酶(120 U/kg), 于60 °C条件下糖化2 h, 滤布过滤, 得到的上清液即为粮食浸出培养基。

1.1.3 引物: 用于扩增细菌ADI途径关键基因的引物见表1。

1.2 酒醅中菌株的分离和筛选

称取2 g酒醅, 置于装有100 mL的三角瓶中, 充分振荡混匀。稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等梯度, 分别取稀释后的样品各100 μ L涂布于分离培养基上, 分别于37 °C下厌氧培养3 d, 在30 °C下厌氧培养5 d。

运用Qpix420高通量筛选系统(美国Molecular Devices公司)挑取单菌落接种至96深孔板的精氨酸利用培养基中, 30 °C厌氧培养72 h。具有精氨酸利用能力的菌株用以下方法筛选: 离心并收集

表1. PCR扩增引物列表
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Target genes	Strains
Sta AF	CGCCAATACATACGGTTGA	<i>arcA</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
Sta AR	AAACAGTGAAATCGGCAAA		
Sta CF	TTGATTAGGCTCGTTGTAGT	<i>arcC</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
Sta CR	GACCCAAGGTATGATAGGATT		
Lac AF	GAGTTCATCACACCTTCG	<i>arcA</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
Lac AR	GTTCTCCTTCATCGTCCAG		
Lac BF	CCAAGCATCGCACCTGTTA	<i>arcB</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
Lac BR	TTCCAAGGCCGTTCAATTT		
Lac CF	GTTGCCGCACGACCAGTAC	<i>arcC</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
Lac CR	GGCCATTCTATGACGAAGC		
Ped AF	AATGGACCCAATGCCTAA	<i>arcA</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Ped AR	TACAACAACGCCAGGAGC		
Ped BF	GCAGGCACTGAAGGTAAG	<i>arcB</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Ped BF	GCTTCTTGAATACTACTGAG		
Ped CF	GGTGGCAATGCTTTAGGA	<i>arcC</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Ped CR	TTGTGCGGCTTGTCTTT		
Bac AF	ATCCATTCCCAAATCCACG	<i>arcA</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bac AR	TTGCTCTTCTTCAGGCACTTC		
Bac BF	TCAGCGGTTTTTTTGTTCATCCTGT	<i>arcB</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bac BR	ATGCACACAATAAAAGCGGAACACA		

96深孔板中200 μ L上清液于96孔板中,用96通道移液器(上海诺晶生物科技公司)在每个孔中加入2 μ L 1 mg/L的溴甲酚紫指示剂反应10 min。根据菌株利用精氨酸经ADI途径代谢产氨引起培养基pH变化导致培养基颜色变紫的原理^[15],用酶标仪(美国Thermo Fisher公司)测定436 nm可见光下的吸光值(OD_{436}),以未接种的培养基作为对照。根据与对照 OD_{436} 值的比较选择正向差值高的菌株作为高精氨酸利用能力菌株进行后续研究。

具有瓜氨酸利用能力的菌株用以下方法筛选:将筛选到的精氨酸利用能力较强的菌株,接种至装有2 mL粮食浸出培养基的48深孔板中30 $^{\circ}$ C

培养3 d。将大曲于无菌水中均质混匀,制备成大曲悬液,以大曲悬液作为对照。测定发酵液中的瓜氨酸产量并计算由精氨酸生成瓜氨酸的转化率(1摩尔精氨酸转化生成1摩尔瓜氨酸的比值),选取转化率高的菌株进行后续研究。

1.3 菌株的鉴定

采用比对16S rRNA基因序列的方法对筛选得到的菌株进行属种鉴定。用于扩增16S rRNA基因序列的引物为27F: GAGTTTGATCMTGGCTCAG和1492R: TACGGYTACCTTGTTACG。将PCR扩增后的序列进行测序,将测序结果在National Center for Biotechnology Information

(NCBI) GenBank数据库中进行BLAST比对, 利用MEGA 6.06软件进行多重序列同源性比对分析, 确定菌株种属。

1.4 ADI途径关键基因的扩增

以细菌基因组DNA提取试剂盒(美国Omega公司)提取的菌株基因组DNA为模板, 用表1引物分别进行PCR扩增。

1.5 ADI途径关键酶活性的测定

取1 mL待测菌株发酵液, 8000 r/min离心2 min, 弃上清液, 用50 mmol/L的磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤菌体2次, 用Fastprep(美国MP BIOMEDICALS公司)破碎细胞, 得到粗酶液。

1.5.1 鸟氨酸转移酶(OTC)的测定: 取50 mmol/L的PBS (pH 7.0)缓冲液80 μ L于1.5 mL的离心管中, 加入25 mmol/L的鸟氨酸溶液20 μ L、133 mmol/L的氨甲酰磷酸75 μ L、上述粗酶液(对照加双蒸水)120 μ L以及无菌水300 μ L, 37 $^{\circ}$ C反应20 min。反应结束后用二乙酰一肟法测定并计算酶活^[16-17]。一个酶活力单位(U): 在37 $^{\circ}$ C, pH 7.0条件下, 1 min催化底物生成1 mg瓜氨酸所需酶量。

1.5.2 鸟氨酸氨基甲酸激酶(CK)的测定: 取50 mmol/L的PBS (pH 7.0)缓冲液80 μ L、50 mmol/L的ADP 100 μ L、73 mmol/L的MgCl₂ 100 μ L于1.5 mL的离心管中, 混匀后静置10 min, 加入133 mmol/L的氨甲酰磷酸100 μ L, 混匀后室温放置10 min后加入50 μ L上述粗酶液(对照加双蒸水), 37 $^{\circ}$ C反应15 min后用氨反应试剂盒(德国宝灵曼公司Boehringer Mannheim GmbH)测定产物生成量。1个酶活力单位(U): 在37 $^{\circ}$ C, pH 7.0条件下, 1 min催化底物生成1 mg瓜氨酸所需酶量。

1.6 模拟酒醅发酵

将菌株培养至对数期(OD_{600} 为0.8左右), 8000 r/min离心, 用生理盐水洗涤菌体2次, 以接种量 1×10^5 CFU/g将菌体添加至入窖当日的酒醅中, 以未接种菌的入窖酒醅作为对照, 用厌氧培养箱(日本MGC三菱公司)在30 $^{\circ}$ C厌氧培养7 d。

1.7 酒醅中尿素和瓜氨酸的检测

准确称取洋河酒厂窖内发酵不同天数的酒醅样品10 g, 加入25 mL超纯水, 超声均质20 min。将超声后的混合液于8000 r/min离心5 min, 取500 μ L上清液(用于瓜氨酸测定的样品需加入等体积的三氯乙酸以沉淀蛋白质), 用0.22 μ m水系滤膜过滤后用于测定。

采用高效液相色谱法(HPLC法)测定酒醅中的尿素^[18]和游离的氨基酸^[19-20]。色谱柱采用ODS HYPERSIL (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m), 瓜氨酸采用紫外检测器, 尿素采用荧光检测器进行检测。

2 结果和分析

2.1 浓香型白酒发酵过程酒醅中EC前体物质含量变化

对于酿造酒类来说, 其发酵过程也是氨基甲酸乙酯前体物质生成的重要阶段。通过对3个不同批次窖池发酵周期为70 d的浓香型白酒酒醅中氨基甲酸乙酯前体物质含量进行测定, 发现EC前体物质尿素和瓜氨酸的含量在酒醅发酵过程呈波动状, 但同入窖时相比, 这2个前体物质的含量均有不同程度增加(图1)。窖内发酵结束时酒醅中尿素含量增加到55.73 mg/kg, 增幅为16.9%; 瓜氨酸含量增加到65.48 mg/kg, 增幅为63.9%。酒醅中瓜氨酸的含量在酒醅发酵过程中增加显著, 这可能与微生物的氮源利用和代谢有关。关注和研究与微生物代谢相关的EC前体物质的生成, 对于研究白酒中EC形成机制和控制EC前体物质生成具有重要的意义。因此, 本研究将主要对白酒发酵过程酒醅中瓜氨酸的产生和微生物进行分析。

2.2 酒醅中高精氨酸利用能力菌株的高通量筛选

为确定酒醅中与瓜氨酸含量增加相关的微生物因素, 对瓜氨酸含量呈上升趋势时间点(15 d和45 d)的酒醅样品中的微生物进行分离和验证。由于细菌中与瓜氨酸积累相关的途径主要是精氨酸

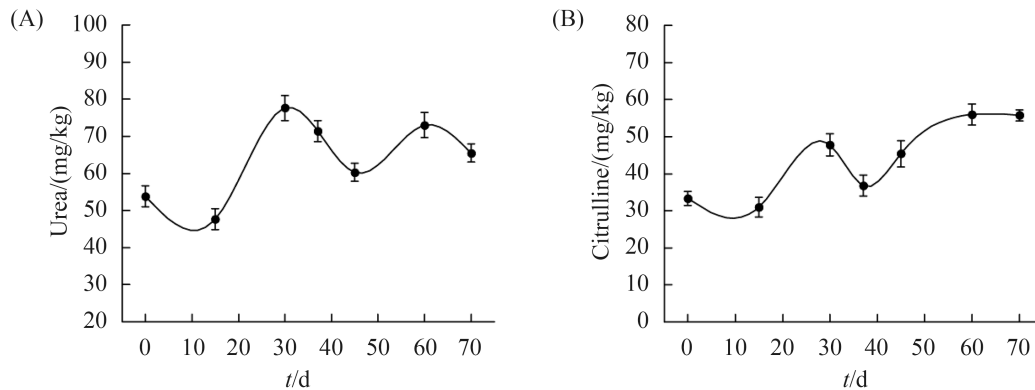


图 1. 白酒发酵过程酒醅中尿素 (A) 和瓜氨酸 (B) 含量的变化

Figure 1. Determination of urea (A) and citrulline (B) in fermented grains.

脱亚胺酶途径(ADI途径), 根据浓香型白酒酒醅中细菌丰度情况^[21], 结合NCBI数据库中具有ADI途径细菌的种类, 确定分离和筛选芽孢杆菌、乳酸菌和葡萄球菌这3大类微生物用于研究酒醅中瓜氨酸的积累。细菌中瓜氨酸主要通过精氨酸转化生成, 因而高精氨酸利用能力直接影响菌株产生和积累瓜氨酸的能力。运用高通量筛选的方法, 根据添加溴甲酚紫的改良生物胺培养基颜色变化的原理, 初步筛选得到了20株高精氨酸利用能力的菌株(图2)。通过16S rRNA基因序列鉴定, 确定他们分别属于芽孢杆菌, 乳球菌, 足球菌和葡萄球菌4个菌属。

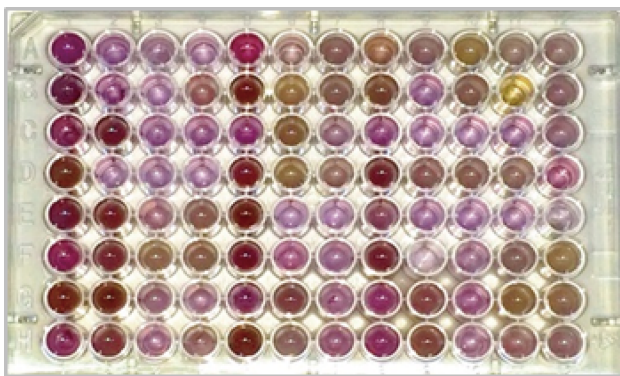


图 2. 高精氨酸利用能力菌株的筛选

Figure 2. Screening of arginine utilizing strains by a color changing method. Purple, strains with arginine utilizing ability; yellow, strain without arginine utilizing ability.

2.3 高瓜氨酸生成率菌株的确定

不同菌株中ADI途径的3种氨基酸之间转化效率不同, 通过比较瓜氨酸的生成率, 可以有效地评估菌株积累瓜氨酸的能力。将高通量筛选获得的20株高精氨酸利用能力的菌株接种到粮食浸出培养基进行发酵实验, 比较他们在相同培养条件下的瓜氨酸生成率。结果显示, 芽孢杆菌、乳球菌、足球菌和葡萄球菌属的菌株中均有瓜氨酸生成率大于酒曲的菌株(图3)。其中乳球菌菌株瓜氨酸平均生成率(约40%)明显高于其他3个属的菌株。芽孢杆菌属的*Bacillus amyloliquefaciens* BG5菌株瓜氨酸生成率是所有菌株中最高的, 达到48.21%。由于该发酵过程采用粮食浸出培养基, 其营养成分与酒醅的营养成分接近, 因而菌株在粮食浸出培养基中瓜氨酸的积累能力能够反映其在真实的窖内发酵体系中利用酒醅中游离的精氨酸转化为瓜氨酸的水平。

2.4 瓜氨酸产生菌基因组中ADI途径基因成员验证

组成原核微生物ADI途径的有3个酶: 精氨酸脱亚胺酶(ADI), 鸟氨酸转氨酶(OTC)和鸟氨酸氨基甲酸激酶(CK), 分别由*arcA*, *arcB*, *arcC*基因编码。通过对微生物是否含有这3个基因进行验证, 可以初步确定该微生物是否具有完整的ADI途径。对筛选得到4类菌株中各选取瓜氨酸转

化率最高的2个菌株进行 arc 基因簇成员验证。发现*Lactococcus garvieae*的2个菌株LD3和LF10, *Pediococcus*的2个菌株PH7和PD4均具有ADI途径的全部3个基因(图4)。由于NCBI数据库中未检索到*Staphylococcus warneri*和*Staphylococcus pasteurii*的 $arcB$ 基因序列和*Bacillus amyloliquefaciens*

BG5和*Bacillus licheniformis* BF10中的 $arcC$ 基因序列, 上述2个基因未能成功扩增, 通过测定 $arcB$ 和 $arcC$ 编码酶的活性的方法验证了这2个基因(表2)。综合基因扩增和相关酶活测定结果, 说明分别属于4个属的8株高瓜氨酸积累能力的菌株均具有完整的ADI途径基因成员。

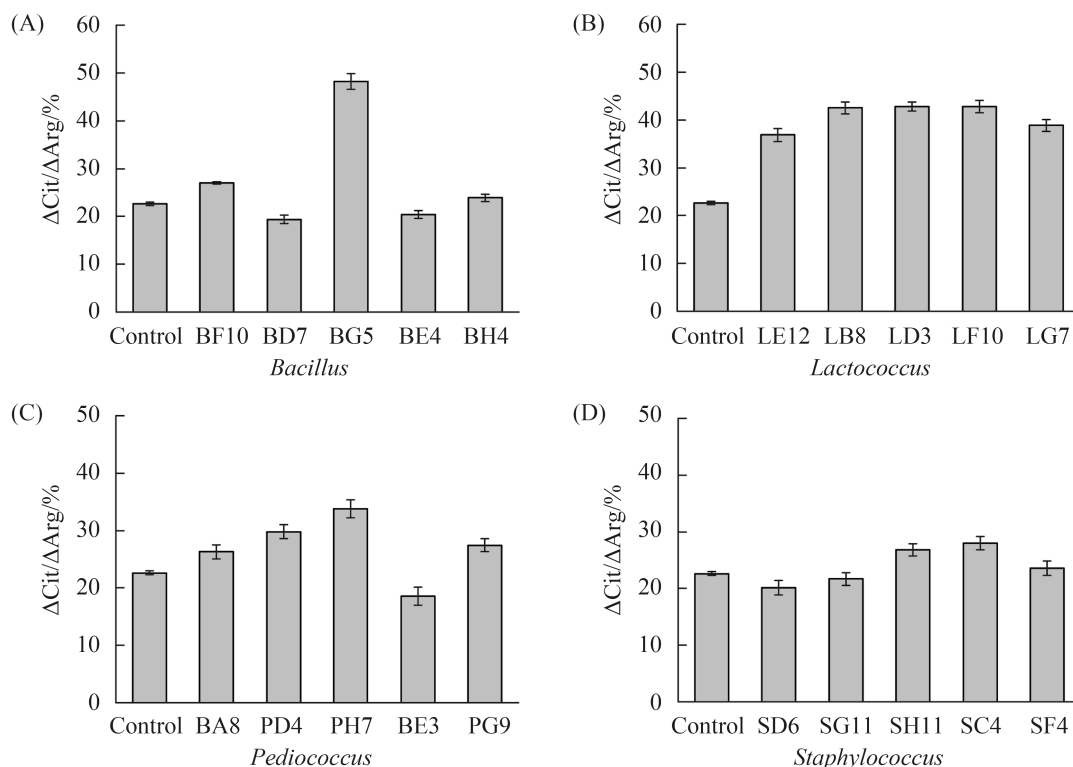


图 3. 菌株生成瓜氨酸能力的比较

Figure 3. Comparison of conversion rate of arginine to citrulline. $\Delta\text{Cit}/\Delta\text{Arg}$, citrulline formation rate, $\Delta\text{Cit}/\Delta\text{Arg} = \Delta\text{Cit}/(\Delta\text{Cit} + \Delta\text{Orn})$, calculated in molar concentration; Control, medium inoculated with Daqu.

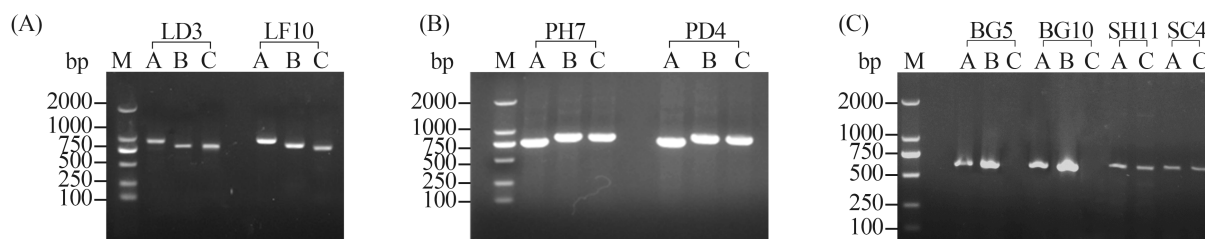


图 4. 瓜氨酸产生菌株基因组中是否含有基因 $arcA$ 、 $arcB$ 、 $arcC$ 的验证

Figure 4. Verification of the presence of $arcA$, $arcB$, $arcC$ in the genome of strains that are related to citrulline accumulation. M, marker; A, $arcA$; B, $arcB$; C, $arcC$; LD3, *Lactococcus garvieae* LD3; LF10, *Lactococcus garvieae* LF10; PH7, *Pediococcus acidilactici* PH7; PD4, *Pediococcus pentosaceus* PD4; BG5, *Bacillus amyloliquefaciens* BG5; BF10, *Bacillus licheniformis* BF10; SH11, *Staphylococcus warneri* SH11; SC4, *Staphylococcus pasteurii* SC4.

2.5 模拟窖内发酵验证菌株积累瓜氨酸能力

选取4个属的瓜氨酸生成率最高的菌株进行模拟窖内发酵的研究。(Staphylococcus warneri SC4培养周期长,故选择瓜氨酸生成率与之相近的Staphylococcus pasteurii SH11进行研究)。由图5可以看出,无论添加4类菌中哪个属的菌株酒醅中积累的瓜氨酸均比对照高。Bacillus amyloliquefaciens BG5使酒醅中瓜氨酸积累量增加至19.06 mg/kg,增幅143.11%。芽孢杆菌是酒醅发酵过程中优势的菌群,至出窖时仍保持其数量上的绝对优势^[22],

表2. 瓜氨酸产生菌CK和OTC酶活测定

Table 2. Enzyme activity of ADI pathway in strains related to citrulline accumulation

Strains	Enzyme	Enzyme activity/(U/mL)
Bacillus amyloliquefaciens BG5	CK	0.61±0.04
Bacillus licheniformis BF10	CK	0.11±0.02
Staphylococcus pasteurii SH11	OTC	0.25±0.02
Staphylococcus warneri SC4	OTC	0.19±0.01

CK, carbamate kinase; OTC, ornithine transcarbamylase.

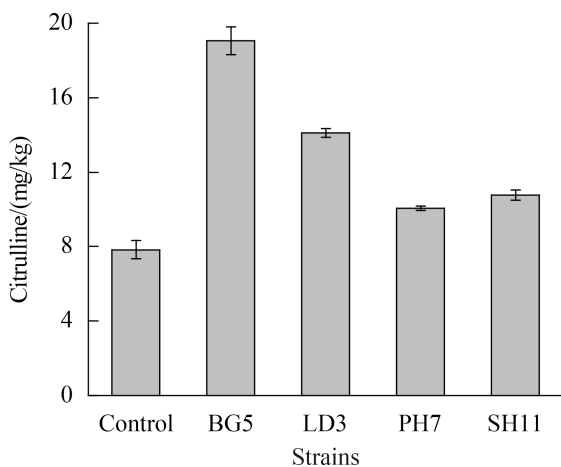


图5. 菌株在模拟酒醅发酵过程中积累瓜氨酸能力比较
Figure 5. Citrulline production in Strains during grains fermentation. Control, Daqu; BG5, Bacillus amyloliquefaciens BG5; LD3, Lactococcus garvieae LD3; PH7, Pediococcus acidilactici PH7; SH11, Staphylococcus warneri SH11.

随着发酵后期芽孢杆菌数量的增多,芽孢杆菌中具有ADI途径的菌群可能会对酒醅中瓜氨酸的积累起到一定的促进作用。Lactococcus garvieae LD3使酒醅中瓜氨酸积累量由7.84 mg/kg增加至14.09 mg/kg,增幅79.72%。由于绝大多数乳球菌都具有ADI途径,该菌属在发酵中后期的酒醅中含量较高(10^3 - 10^4 CFU/g酒醅)^[23],可能对发酵中后期瓜氨酸的积累有一定的贡献。Staphylococcus pasteurii SH11和Pediococcus acidilactici PH7分别使酒醅中瓜氨酸积累量增加了37.11%和28.18%,对酒醅瓜氨酸积累也起到了一定的贡献。以上结果表明,具有ADI途径的4类微生物在模拟窖内发酵体系中均能够通过ADI途径代谢积累瓜氨酸。

3 结论

本研究通过高通量筛选技术从白酒窖内发酵的酒醅中筛选并获得了20株高效利用精氨酸并且积累瓜氨酸能力强的菌株,分别属于芽孢杆菌属,乳球菌属,葡萄球菌属和足菌属。对每个属中的2株高瓜氨酸生成率菌株的验证表明,他们的基因组中或者存在完整的ADI途径基因成员,或者具有相关酶的活性。最后将4株代表性菌株Lactococcus garvieae LD3, Bacillus amyloliquefaciens BG5, Pediococcus acidilactici PH7和Staphylococcus pasteurii SH11用于模拟白酒部分时期的窖内发酵,考察了它们对酒醅中瓜氨酸积累的影响。研究表明,以上4类具有ADI途径的菌株在发酵过程会增加酒醅中瓜氨酸的含量,对白酒中EC含量的增加有一定的贡献。本研究明确了浓香型白酒酒醅发酵过程中与瓜氨酸积累密切相关的微生物是哪些种属的微生物,可能为今后通过改造微生物代谢途径,或调控微生物代谢途径来减少及控制白酒发酵过程中氨基甲酸乙酯前体物质的产生和积累提供研究基础。

参考文献

- [1] Zimmerli B, Schlatter J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1991, 259(3/4): 325–350.
- [2] Battaglia R, Conacher HBS, Page BD. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Additives & Contaminants*, 1990, 7(4): 477–496.
- [3] European Food Safety Authority (EFSA). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages: scientific opinion of the panel on contaminants. *The EFSA Journal*, 2007, 551: 1–44.
- [4] Liu YP, Wang SH, Hu P. A survey of levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages in 2009–2012, Hebei Province, China. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 2013, 6(3): 214–217.
- [5] Jiao ZH, Dong YH, Chen QH. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(4): 611–626.
- [6] Li XM, Wang PH, Wu DH, Lu J. Effects of sterilization temperature on the concentration of ethyl carbamate and other quality traits in Chinese rice wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 2014, 120(4): 512–515.
- [7] Aresta M, Boscolo M, Franco DW. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 2819–2824.
- [8] Aylott RI, Cochrane GC, Leonard MJ, MacDonald LS, Mackenzie WM, McNeish AS, Walker DA. Ethyl carbamate formation in grain based spirits: part I: post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. *Journal of the Institute of Brewing*, 1990, 96(4): 213–221.
- [9] Li JY, Lu ZF, Wu D, Ye XQ. The formation and control of ethyl carbamate in fermented food. *Food Science and Technology*, 2013, 38(6): 310–312. (in Chinese).
李加友, 陆筑凤, 吴丹, 叶兴乾. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的形成与控制. *食品科技*, 2013, 38(6): 310–312.
- [10] Zhao XR, Du GC, Zou HJ, Fu JW, Zhou JW, Chen J. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 32(2): 97–107.
- [11] Terrade N, de Ordua RM. Impact of wine making practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(2): 406–411.
- [12] Cheng W, Wu LH, Xu YL, Qin JZ, Xie GP, Wang MC. Research progress on brewing microbes in the production process of Luzhou-flavor liquor. *China Brewing*, 2014, 33(3): 1–4. (in Chinese).
程伟, 吴丽华, 徐亚磊, 秦俊哲, 谢国排, 王明才. 浓香型白酒酿造微生物研究进展. *中国酿造*, 2014, 33(3): 1–4.
- [13] Wang YX, Chen QS, Yan YL. Screen and application of a few culture media in isolation and identification *Lactobacillus*. *Food Science*, 2007, 28(9): 374–378. (in Chinese).
王友湘, 陈庆森, 阎亚丽. 用于乳酸菌分离鉴定的几种培养基的筛选及应用. *食品科学*, 2007, 28(9): 374–378.
- [14] Chang M, Chang HC. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp.. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(3): 269–274.
- [15] Liu C, Zhang ZY, Guo XK. Screening of biogenic amine-producing lactic acid bacteria. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21(5): 427–429, 434. (in Chinese).
刘畅, 张灼阳, 郭晓奎. 产生物胺乳酸菌的筛查与检测. *中国微生物学杂志*, 2009, 21(5): 427–429, 434.
- [16] 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* CB1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6193–6201.
- [17] Meng FJ. Fermentative production of arginine deiminase by *Pseudomonas* sp. and its activity study. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008. (in Chinese).
孟繁君. 假单胞菌精氨酸脱亚胺酶的发酵制备与活性研究. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [18] Wang RY, Wu HM, Zhou XP, Chen L. Simultaneous detection of ethyl carbamate and urea in Chinese yellow rice wine by HPLC-FLD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2014, 37(1): 39–47.
- [19] Alcarde AR, de Souza LM, Bortoletto AM. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118(1): 27–31.
- [20] 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. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, 31(4): 587–592.
- [21] Li DL. Molecular ecology research on microbial community structure in the fermented grains of Chinese Luzhou-flavour liquor. Zigong: Master's Thesis of Sichuan University of Science and Engineering, 2013. (in Chinese).

- 李德林. 浓香型白酒酒醅微生物分子生物学研究. 四川理工学院硕士学位论文, 2013.
- [22] Zhou RP, Chen YZ, Tang DY. Diversity and distribution of bacteria in Luzhou-flavor wine factory. *Food Science*, 2010, 31(13): 209–213. (in Chinese).
- 周瑞平, 陈云宗, 唐代云. 多粮浓香型白酒厂内细菌多样性及分布的研究. *食品科学*, 2010, 31(13): 209–213.
- [23] Qiao ZW. Analysis on microbial communities in Chinese Luzhou-flavor liquor pits. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2005. (in Chinese).
- 乔宗伟. 中国浓香型白酒窖池微生物区系解析. 四川大学硕士学位论文, 2005.

Characterization of arginine utilization strains from fermented grains and evaluation of their contribution to citrulline accumulation in Chinese Luzhou-flavor spirits

Yuying Qiu^{1,2}, Fang Fang^{1,2*}, Xihu Zhou³, Xiang Chen³, Longyun Zhang³, Guocheng Du^{1,4}, Jian Chen^{1,5}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ Jiangsu Yanghe Distillery Co.Ltd., Suqian 223800, Jiangsu Province, China

⁴ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁵ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to characterize microorganisms responsible for accumulation of ethyl carbamate precursor citrulline in fermented grains during Luzhou-flavor spirits fermentation process, to provide theoretical basis for clarifying mechanisms of ethyl carbamate formation. [Methods] High-throughput strain screening approach was used to isolate strains with high arginine utilization and high citrulline accumulation capability. Essential genes that comprise the arginine deiminase pathway of these isolates were verified and a modified Chinese liquor fermentation process was conducted by adding these strains. [Results] A total of 20 strains with high arginine utilizing ability were obtained. Among them, *Lactococcus garvieae* LD3, *Bacillus amyloliquefaciens* BG5, *Pediococcus acidilactici* PH7 and *Staphylococcus pasteurii* SH11 exhibited high efficacy to produce citrulline from arginine. These strains could also increase citrulline in fermented grains. [Conclusion] The accumulation of citrulline in fermented grains was confirmed to be corresponding to arginine utilization by *Lactococcus garvieae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pediococcus acidilactici* and *Staphylococcus pasteurii* through the arginine deiminase pathway.

Keywords: Chinese liquor, ethyl carbamate, citrulline, arginine deiminase pathway, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Program on Key Basic Research Project of China (973 Program, 2012CB720802)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918307; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 4 January 2016; Revised: 16 March 2016