

氨基甲酸乙酯降解菌株的分离鉴定及其在白酒中的应用

董乃慧¹, 薛思宇¹, 董亮¹, 陈映羲¹, 黄治国^{2*}, 张素芳^{1*}

¹大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034

²四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室 四川宜宾 644000

摘要 氨基甲酸乙酯(EC)是发酵食品和酒精饮料在生产和贮藏过程中形成的有害代谢产物,具有遗传毒性和较强的致癌性。发酵食品中 EC 含量的控制是食品安全研究领域的重点议题。本研究以醋醅、酒糟为研究对象,以 EC 为唯一碳源,从醋醅、酒糟中分离具有 EC 降解能力的菌株,共获得 48 株 EC 降解菌株,经鉴定为 14 个种属,包括乙醇假丝酵母、大仁红酵母、戴尔福特菌、耐久肠球菌、芽胞杆菌、屎肠球菌等。将分离获得的纺锤形赖氨酸芽孢杆菌和乙醇假丝酵母包埋固定后,分别应用于白酒中 EC 的去除,结果表明,两个处理组白酒中 EC 浓度在 12 h 由 230.37 $\mu\text{g/L}$ 降至 78.12 $\mu\text{g/L}$ (纺锤形赖氨酸芽孢杆菌)和 86.97 $\mu\text{g/L}$ (乙醇假丝酵母),EC 降解率分别为 66.09%和 62.25%。本研究结果可为挖掘耐酸、耐乙醇的氨基甲酸乙酯降解菌株提供参考。

关键词 氨基甲酸乙酯; 醋醅; 酒糟; 降解菌株; 白酒

文章编号 1009-7848(2023)07-0410-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.042

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, EC),又名尿烷、乌拉坦,是一种普遍存在于发酵食品和酒精饮料中的对人体存在潜在遗传毒性和较强致癌性的化学物质^[1-2]。随着 EC 的致癌性被不断证实^[3],2007 年,国际癌症研究机构(IARC)将 EC 的致癌级变更为 2A 类^[4]。

目前对发酵食品中 EC 的控制方法主要集中在以下几个方面:1)改良发酵工艺,如精制或充分清洗原料以减少尿素(EC 主要前体物质)含量,避免酒精饮料光照的几率,减少氰化物(EC 前体物质)的生成^[5];2)通过代谢工程改造酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),如敲除其精氨酸酶编码基因(*CAR1*)^[6-7]或高效表达脲基酰胺酶基因(*DUR1*、*DUR2*、*DUR3*)^[8-9]来控制黄酒和米酒中 EC 含量;3)酶法降解 EC,主要分为脲酶和氨基甲酸乙酯水解酶(Ethyl carbamate hydrolase, ECH)。脲酶是酶法降解 EC 最常见的酶,它可将尿素降解为 CO₂ 和氨。自 1976 年 Moreau 等^[10]首次从乳酸杆菌中发现 1 种酸性脲酶,国内外研究者在脲酶的筛选、酶学性质等方面进行了一系列研究。田亚平等^[11]

从雷式普罗威登斯菌(*Providencia* sp.)中获得 1 种酸性脲酶,当黄酒中加酶量达 0.2 U/mL 时,EC 去除率为 25%。周建立等^[12]发现 1 种可以同时降解尿素和 EC 的双功能酸性脲酶,将其应用于黄酒时,其降解 EC 效果不是很理想。综上所述,目前报道的绝大多数脲酶对尿素具有高特异性,对 EC 没有活性,且发酵食品体系的复杂性导致其中的 EC 形成途径多样,控制 EC 的主要前体物质只能部分降低体系中 EC 的含量,若要达到从产品中完全清除 EC 是极其困难的。反观 ECH,其能从源头将 EC 分解成乙醇和 CO₂,具有巨大的潜在应用价值。应用 ECH 去除发酵食品中的 EC,是上述方法的一个有效补充。

白酒是世界上消费量最大的酒类(2019 年超过 78 亿 L^[13])。加拿大、法国、巴西和日本规定^[14-15]蒸馏酒中 EC 含量应低于 150 $\mu\text{g/L}$,然而,卓俊纳等^[16]研究发现,中国白酒中 EC 检出率为 100%,高端浓香型白酒中 EC 平均含量为 201.3 $\mu\text{g/kg}$,高端酱香型白酒中 EC 平均含量为 195.03 $\mu\text{g/kg}$ 。黄松等^[17]研究发现白酒基酒中 EC 均有检出,最高达 544.74 $\mu\text{g/kg}$,均高于上述规定,不利于我国白酒的出口。同时,白酒酒精度数多为 50%vol 以上,相较于目前应用在黄酒、米酒等酒精饮料中去除 EC 的酶或菌株,能够耐受白酒中高浓度乙醇且具有高降解效率的几乎没有。此外,发酵食品多偏酸

收稿日期: 2022-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072185)

第一作者: 董乃慧,女,硕士生

通信作者: 黄治国 E-mail: hzgw@126.com

张素芳 E-mail: 18163080@qq.com

性,比如葡萄酒的 pH 值在 3.0~3.8 之间^[18],黄酒的 pH 值在 3.5~4.6 之间^[19],泡菜的 pH 值在 3.5~3.8 之间^[20]。ECH 因 pH 耐受范围的原因在发酵食品中的应用会受到限制^[21]。筛选能够耐受高浓度乙醇、耐偏酸性环境的 EC 降解菌株是控制 EC 含量的关键。

本文选择王村醋醅和四川成都某酒厂酒糟作为筛选来源,其中,王村醋兴于明朝,距今已有 500 年左右的历史,被认定为中华老字号、省级非物质文化遗产。其发酵采用传统的常温自然发酵法,以“色淡香醇、营养健康”的风格广受民众欢迎。醋的固态发酵工艺^[22]中含有酒精发酵过程,从中筛选出的能够降解 EC 的菌株对乙醇和酸性环境均有较好的耐受能力。

本文对醋醅、酒糟中菌株的分离纯化,基于 16S rDNA、26S rDNA 的 PCR 扩增和 Blastn 分析,多序列比对分析,对所分离菌株的种属进行鉴定,并将酒糟来源的 1 株细菌和 1 株酵母应用于商品白酒中 EC 的消减。试验结果对耐酸、耐高浓度乙醇的 EC 降解菌的筛选具有重要意义,并为 ECH 的筛选利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 样品醋醅,山东华王酿造有限公司;样品酒糟,四川省某酒厂;样品白酒(53%vol),大连当地超市。

1.1.2 试剂 氨基甲酸乙酯($\geq 99\%$)、壳聚糖、甲醇(色谱级),麦克林公司;乙酸乙酯(色谱级),斯百全化学(上海)有限公司;氯化铵、氯化钠(分析纯),国药集团化学试剂(上海)有限公司;海藻酸钠(食品级)、无水氯化钙、硼酸、氯仿、异戊醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾(分析纯)、无水乙醚(色谱级),天津市大茂化学试剂厂;正己烷(色谱级),瑞典欧普森(Oceanpak)化学公司;LB 肉汤、YPD 液体培养基,高科技工业园海博生物技术(青岛)有限公司;琼脂粉、Tris、EDTA、SDS、蛋白酶 K、RNase A 溶液(10 mg/mL)、Tris 饱和酚溶液、醋酸钠、TE 缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Taq Master Mix(Dye Plus),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DL 2000 DNA Marker,宝

生物工程(大连)有限公司;GoldView I 型核酸染色剂,索莱宝科技(北京)有限公司;Genview 原装琼脂糖,GEN-VIEW SCIENTIFIC INC.;50×TAE 缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司;Cleanert EC 氨基甲酸乙酯专用固相萃取柱,天津博纳 Agela 科技有限公司。

1.1.3 培养基 富集培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.0, KH_2PO_4 3.0, NH_4Cl 1.0, NaCl 0.5, EC 5.0, pH 7.4, 121 °C 灭菌 15 min。

筛选培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.0, KH_2PO_4 3.0, NH_4Cl 1.0, NaCl 0.5, EC 10.0, 琼脂 20.0, pH 7.4, 121 °C 灭菌 15 min。

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 琼脂 20.0(固体培养基), pH 7.0±0.1, 121 °C 灭菌 15 min。

YPD 培养基(g/L):蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 酵母浸粉 10.0, 琼脂 20.0(固体培养基), pH 6.5±0.2, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2 仪器与设备

超净工作台、高压蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司;回转式恒温调速摇床,上海知楚仪器有限公司;光学显微镜,徕卡显微系统有限公司;微量台式离心机、DNA 浓度测定仪,赛默飞世尔科技公司;PCR 仪,美国伯乐公司;水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像仪,以色列 DNR 公司;固相萃取仪,上海那艾精密仪器有限公司;气相色谱-质谱仪(GC-MS),安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株筛选

1.3.1.1 富集培养 以 EC 为唯一碳源的培养基中,由于缺乏优势碳源(葡萄糖),菌株的生长速度较慢,故先富集培养,再筛选培养。利用灭菌水重悬醋醅和酒糟制成悬液,吸取 300 μL 醋醅或酒糟重悬液于 10 mL 富集培养基,28 °C,200 r/min 培养至培养液浑浊,吸取 200 μL 接种于 10 mL 新鲜富集培养基,重复 5 代。

1.3.1.2 筛选培养 菌体富集培养后,进行倍比稀释,分别取 200 μL 不同稀释度的溶液,均匀涂布于筛选培养基平板上,置于 28 °C 静置培养,每 12 h 观察 1 次平板上的菌株形态,选取菌落数低

于300的平板,挑取不同形态的单菌落于LB平板划线分离纯化3代,直至获得纯种单菌落,随后挑取单菌落接种于LB肉汤中,200 r/min,28℃培养至菌液浑浊,添加体积分数20%的甘油后,冻存于-80℃,备用。

1.3.2 菌株基因组的提取 菌株基因组提取方法参考文献[23]的方法。

1.3.3 菌株鉴定

1.3.3.1 形态学鉴定 对筛选到的具有EC降解能力的菌株从菌落大小、形状、边缘、光泽和颜色等方面观察并采集图像。取单菌落于40倍物镜下,对菌体形态进行观察,做好记录并采集图像。

1.3.3.2 分子生物学鉴定 细菌16S rDNA PCR扩增采用通用引物27 F和1492 R^[24]。酵母26S rDNA PCR扩增采用通用引物D1/D2^[23]。PCR反应体系(50 μL):2×Taq Master Mix 25 μL,上、下游引物各1 μL,基因组模板(50 ng/μL)1 μL,灭菌水22 μL。PCR反应条件为95℃预变性3 min,95℃变性15 s,55℃退火15 s,72℃延伸1 min,30次循环,最后72℃延伸5 min。

取4 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,剩下的45 μL PCR产物进行测序。测序结果采用基本局部比对搜索工具(Basic local alignment search tool, BLASTn)进行比对分析。基于比对结果,构建系统发育树,采用MEGA 11.0软件中的邻近法(Neighbor-joining method)。

1.3.4 氨基甲酸酯降解菌株在白酒中的应用

1.3.4.1 海藻酸钠-壳聚糖法固定化菌株 固定化菌株技术是将菌株固定在载体上,使菌株高度密集并保持其生物活性,利于菌株抵抗不利环境^[25],以及实际生产后反应结束时的固液分离,提高生产效率。

挑取从酒糟中筛选得到的J29纯种菌落接种于10 mL LB肉汤,37℃,200 r/min培养至OD_{600nm}值为0.6。JY1接种于YPD液体培养基,30℃,200 r/min培养至OD_{600nm}值为0.6。菌株培养液于13 000 r/min离心8 min,10 mL灭菌水重悬菌体沉淀。固定化菌株方法参考文献[26]的方法。

1.3.4.2 白酒中氨基甲酸酯的降解能力鉴定

取1.3.4.1节制备的固定化EC降解菌,置于10 mL白酒样品中,20℃静置反应12 h。样品提取方法、标准曲线溶液配制方法参考文献[27]的方法;标准曲线绘制方法参考文献[28]的方法。样品检测方法参考文献[29]的方法,但略有不同,其中,采用HP-INNOWAX色谱柱,长度30 m,内径0.25 mm,膜厚度0.25 μm。

2 结果与分析

2.1 菌落的形态学观察结果

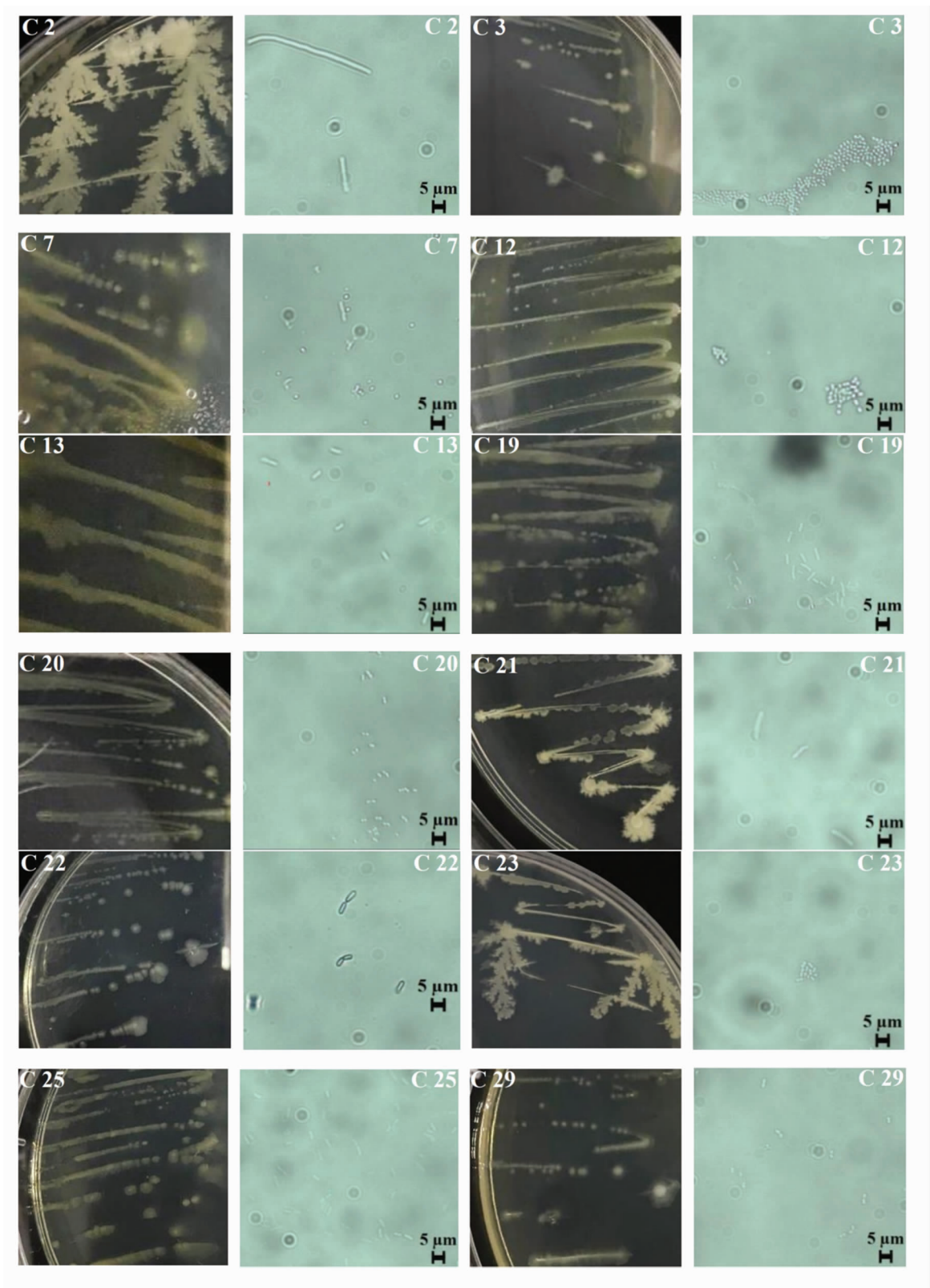
以醋醅、酒糟为原材料,通过筛选培养基分离出44株细菌和4株酵母。采用平板划线法(LB琼脂或YPD琼脂)对其进行纯化,经3次平板划线后获得纯菌落。部分菌株的平板图及镜检图见图1,具体的菌落形态学描述见表1。

通过形态学观察可知(图1),在颜色方面,44株细菌中有20株呈乳白色,20株呈浅黄色,4株呈黄色,均不透明;在表面光滑程度方面,31株表面光滑,4株表面粗糙,9株表面光滑且有同心环;在边缘形状方面,15株呈叶状边缘,6株呈锯齿状边缘,3株呈根状边缘。其中,有2株菌落形态呈雪花状,分别是C2、C22,二者表面光滑,边缘有毛边。4株酵母在室温下均呈白色,表面光滑,边缘整齐,而CY1、CY2菌落经4℃保存12 h后呈红色。

通过镜检可知,44株细菌共有21株短杆菌、21株球菌、2株弧菌,且醋醅中筛选得到的多为球菌,而酒糟中筛选得到的多为杆菌。4株酵母多为出芽状态,醋醅来源的酵母呈卵形,而酒糟来源的酵母呈椭圆形。

2.2 菌株的分子学鉴定

2.2.1 菌株基因组的提取及PCR扩增结果 提取44株细菌、4株酵母基因组,以其为模板,细菌采用引物27F和1492R,酵母采用引物D1和D2,PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图2所示。可观察到所有细菌的泳道在1 500 bp左右,所有酵母的泳道在500 bp左右出现了1条清晰条带。PCR产物经测序后获得菌株基因组序列。



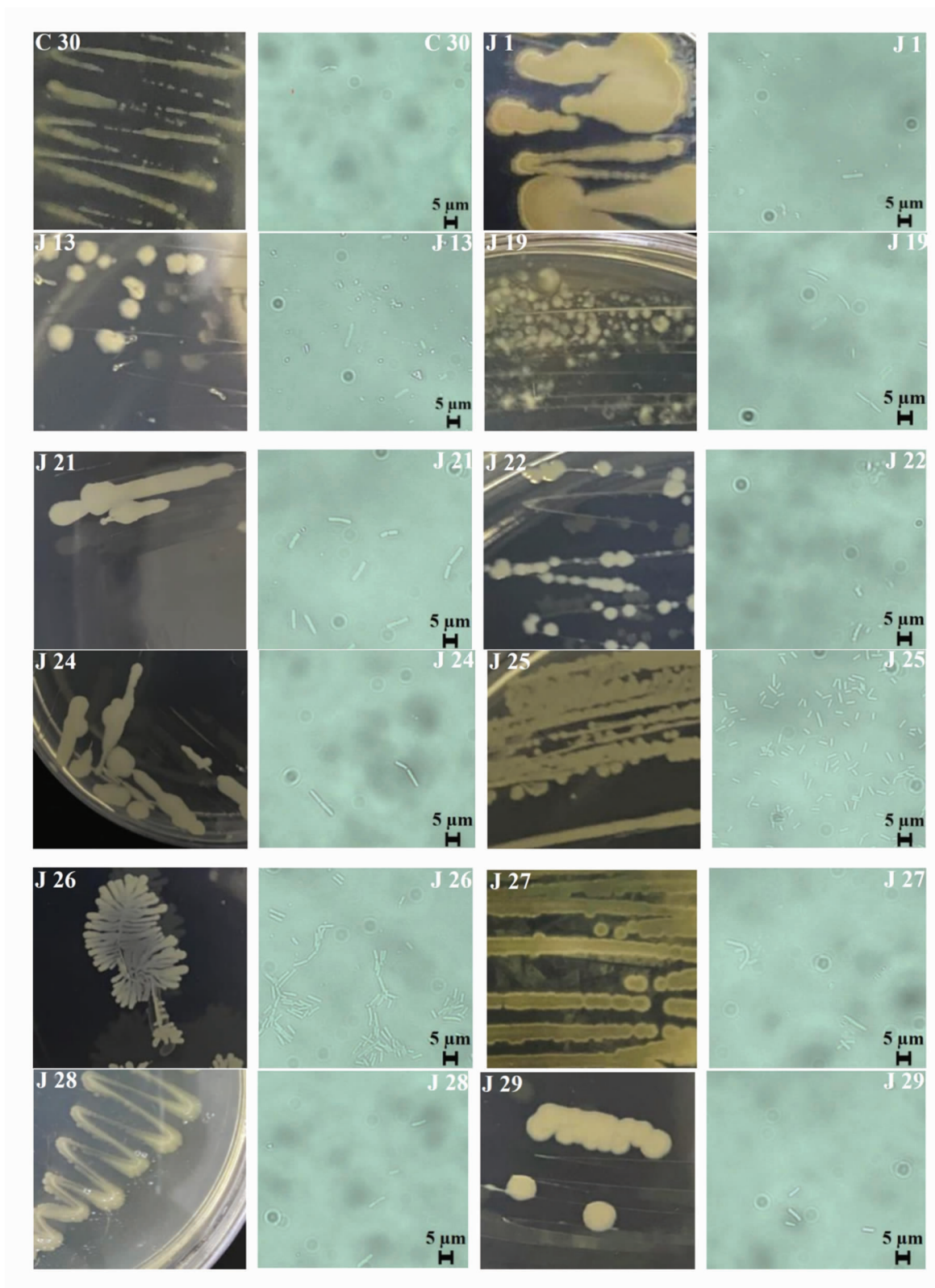
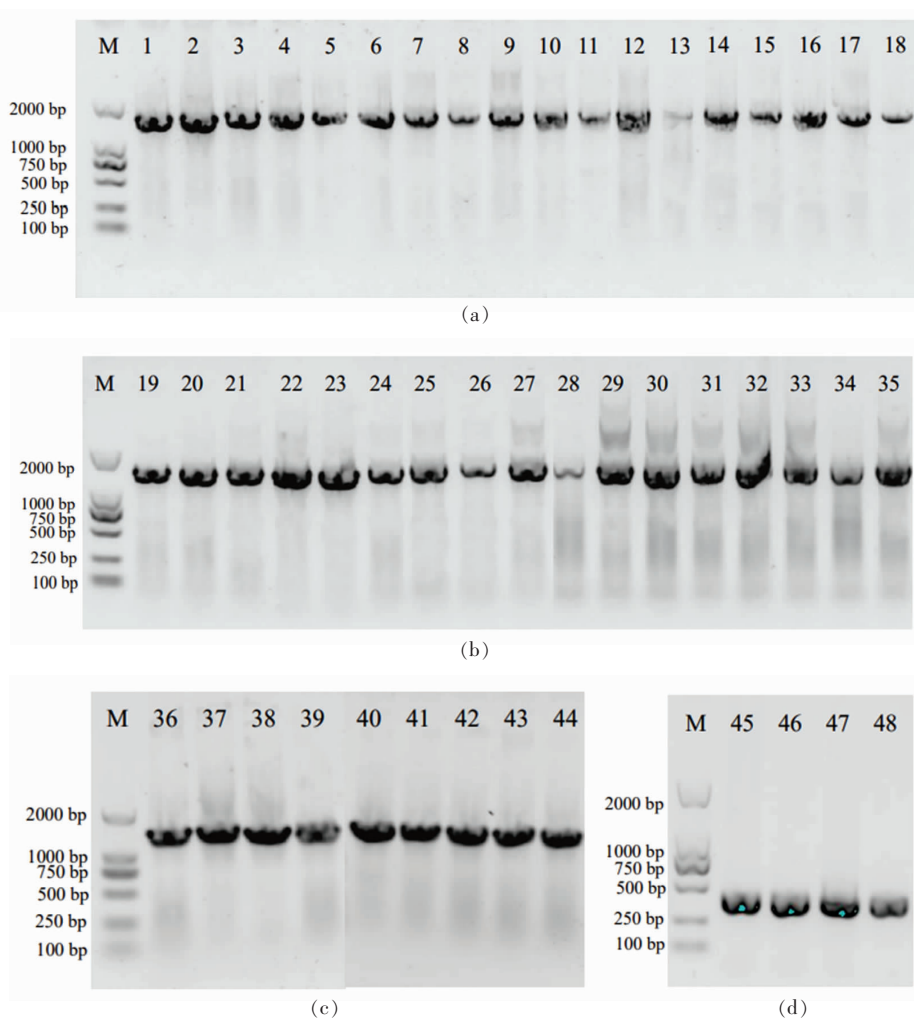


图 1 醋醅、酒糟中部分菌落形态学及细菌镜检观察(40×)

Fig.1 Colony morphology and microscopy of partial bacteria in vinegar brewing mass and fermented grains of Baijiu (40×)

表 1 醋糟、酒糟中细菌的形态学特征

序号	菌株编号	菌落形态	菌体形态
1	C1	乳白色,圆形,表面光滑,叶状边缘	短杆状,单个或 2 个存在
2	C2	乳白色,假根状,表面粗糙,锯齿状边缘	球状,单个存在
3	C3	乳白色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
4	C4	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	球状,多为 3 个存在
5	C5	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	短杆状,多为单个存在
6	C6	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,多为单个存在
7	C7	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	短杆状,单个存在
8	C8	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	球状,多为单个存在
9	C9	浅黄色,圆形,表面光滑,锯齿状边缘	球状,多为单个存在
10	C10	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
11	C11	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
12	C12	乳白色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
13	C13	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
14	C14	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	球状,单个存在
15	C15	浅黄色,圆形,表面光滑,锯齿状边缘	球状,多为单个存在
16	C16	浅黄色,圆形,表面光滑,锯齿状边缘	短杆状,单个存在
17	C17	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,多为单个存在
18	C18	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,多为单个存在
19	C19	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,多为单个存在
20	C20	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	球状,多为 2 个及以上存在
21	C21	浅黄色,圆形,表面粗糙,根状边缘	球状,多为 2 个及以上存在
22	C22	浅黄色,圆形,表面粗糙,根状边缘	短杆状,单个存在
23	C23	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	球状,多为 2 个及以上存在
24	C24	乳白色,圆形,表面光滑,表面有同心环	短杆状,多为单个或 2 个存在
25	C25	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,多为单个存在
26	C29	浅黄色,圆形,表面光滑,表面有同心环	弧状,单个存在
27	C30	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
28	C31	浅黄色,圆形,表面光滑,叶状边缘	球状,单个存在
29	J1	浅黄色,圆形,表面光滑,根状边缘	短杆状,单个存在
30	J2	浅黄色,圆形,表面光滑,锯齿状边缘	短杆状,单个存在
31	J3	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
32	J4	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
33	J6	黄色,圆形,表面光滑,表面有同心环	短杆状,单个存在
34	J12	黄色,圆形,表面光滑,表面有同心环	短杆状,单个存在
35	J13	乳白色,圆形,表面有同心环,边缘整齐	短杆状,单个存在
36	J14	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
37	J19	乳白色,圆形,表面粗糙,边缘模糊	短杆状,多为单个存在
38	J21	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,多为 2 个存在
39	J22	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
40	J24	乳白色,圆形,表面光滑,锯齿状边缘	短杆状,多为 2 个存在
41	J25	黄色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
42	J26	乳白色,圆形,表面光滑,根状边缘	短杆状,单个存在
43	J27	黄色,圆形,表面光滑,边缘整齐	弧状,单个存在
44	J29	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	短杆状,单个存在
45	CY1	红色,圆形,表面光滑,边缘整齐	卵形,多为出芽状态
46	CY2	红色,圆形,表面光滑,边缘整齐	卵形,多为出芽状态
47	JY1	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	椭圆形,多为出芽状态,易黏附
48	JY2	乳白色,圆形,表面光滑,边缘整齐	椭圆形,多为出芽状态,易黏附



注:M:DL 2000 DNA Marker;泳道1~25为C1~C25;泳道26~28为C29~C31;泳道29~32为J1~J4;泳道33为J6;泳道34~36为J12~J14;泳道37为J19;泳道38和39分别为J21和J22;泳道40~43为J24~J27;泳道44为J29;泳道45为CY1;泳道46为CY2;泳道47为JY1;泳道48为JY2。

图2 PCR产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplification result

2.2.2 序列同源性分析 利用BLAST分析菌株的测序结果,48株菌分别归属于14个种属,结果如表2所示。

耐久肠球菌有9株(均来自醋醅),是两种样品中分离数量最多的菌种,占总数的18.75%;戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*)有8株(7株来自醋醅,1株来自酒糟),占总数的16.67%;戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)有7株(均来自醋醅),占总数的14.58%;赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus* sp.)有6株(均来自酒糟),占总数的12.50%。另外,还从醋醅中分离到2株多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*),2株大仁红酵母(*Rhodotorula daire-*

nensis),1株池生戴尔福特菌(*Delftia lacustris*),1株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),1株加米那类芽孢杆菌(*Paenibacillus jamilae*);从酒糟中分离到2株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),2株纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*),2株乙醇假丝酵母(*Candida ethanolica*),2株蛋白水解芽孢杆菌(*Bacillus proteolyticus*),1株短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),1株耐硼赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus boronitolerans*),1株灿烂类芽孢杆菌(*Paenibacillus lautus*)。

Liu等^[30]从副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)中筛选能够同时降解EC和尿素的

表 2 细菌 16S rDNA 序列、酵母 26S rDNA 分析结果

菌株编号	鉴定结果	中文名称	同源性/%	参考菌株
C1	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MF326299.1
C2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	多粘芽孢杆菌	99	NR_117733.2
C3	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MT544963.1
C4	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MH111495.1
C5	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	MK336718.1
C6	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	MK823454.1
C7	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358269.1
C8	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	EU419601.1
C9	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358252.1
C10	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	MT101746.1
C11	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358252.1
C12	<i>Enterococcus faecium</i>	屎肠球菌	99	KM495940.1
C13	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	JX997845.1
C14	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MT544975.1
C15	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	KM349190.1
C16	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	MG594845.1
C17	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358269.1
C18	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	MT912949.1
C19	<i>Delftia lacustris</i>	池生戴尔福特菌	99	MT266922.1
C20	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MT545044.1
C21	<i>Paenibacillus jamilae</i>	加米那类芽孢杆菌	99	HQ844448.1
C22	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	多粘芽孢杆菌	99	HQ259963.1
C23	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MT545044.1
C24	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	KF768355.1
C25	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358269.1
C29	<i>Enterococcus durans</i>	耐久肠球菌	99	MG551242.1
C30	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	MT374262.1
C31	<i>Delftia</i> sp.	戴尔福特菌	99	MT101746.1
CY1	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	大仁红酵母	99	KT876526.1
CY2	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	大仁红酵母	99	KX385849.1
J1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	99	MT065791.1
J2	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	KP992114.1
J3	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	MT541001.1
J4	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	KF720924.1
J6	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	MT522614.1
J12	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	MT033087.1
J13	<i>Lysinibacillus</i> sp.	梭状芽孢杆菌	99	MN365107.1
J14	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	戴尔福特菌	99	KF358252.1
J19	<i>Paenibacillus lautus</i>	灿烂类芽孢杆菌	99	LC588630.1
J21	<i>Bacillus proteolyticus</i>	蛋白水解芽孢杆菌	99	OM062575.1
J22	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌	99	MW474843.1
J24	<i>Bacillus proteolyticus</i>	蛋白水解芽孢杆菌	99	OM062575.1
J25	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌	99	KU891833.1
J26	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌	99	MG388151.1
J27	<i>Lysinibacillusboronitolerans</i>	赖氨酸芽孢杆菌	99	MG892823.1
J29	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	99	MK474998.1
JY1	<i>Candida ethanolica</i>	乙醇假丝酵母	99	MW969731.1
JY2	<i>Candida ethanolica</i>	乙醇假丝酵母	99	MW969731.1

双效脲酶;Cui等^[31]通过在白酒发酵过程中接种球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)可以有效降低其中的EC和尿素含量;Jia等^[32]从赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)中获得能够降解EC的氨基甲酸酯水解酶,且该酶对尿素无作用;Mohapatra等^[33]从海绵微球菌(*Micrococcus* sp.)中获得氨基甲酸酯水解酶。本文从发酵食品来源筛选到的菌株多为球菌和芽孢杆菌,

与已报道的降解氨基甲酸酯菌株在属水平较为一致。

2.2.3 建立氨基甲酸酯降解细菌的系统发育树

利用 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature 网站(<https://psn.dsmz.de/>)检索不同种属细菌的模式菌株,测序结果与模式菌株使用本地软件 Mega 11.0,运用 N-J 法建立系统发育树,结果如图 3 所示。

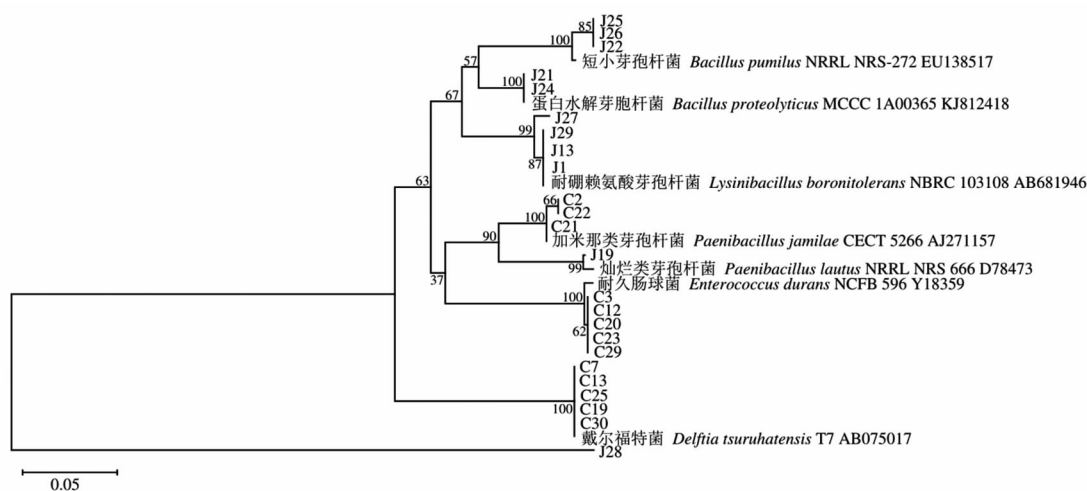


图3 醋醅、酒糟细菌分离株 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria from in vinegar brewing mass and fermented grains of Baijiu based on 16S rDNA sequence

由图3可以看出,J22、J25、J26与短小芽孢杆菌EU138517聚为一支,表明这3株菌均为短小芽孢杆菌,与分子鉴定结果较为一致,形成第1类群。J21、J24与蜡样芽孢杆菌AJ841873在同一分支,表明三者遗传距离较近,形成第2类群。J1、J13、J29与赖氨酸芽孢杆菌1031108在同一分支,并与J27聚为一支形成第3类群;C2、C21、C22与加米那类芽孢杆菌AJ271157聚为一支,形成第4类群;J19与灿烂类芽孢杆菌D78473形成第5类群;C3、C12、C20、C23、C29与耐久肠球菌Y18359聚为一支,形成第6类群;C7、C13、C19、C25、C30与戴尔福特菌AB075017形成第7类群。

2.3 氨基甲酸酯降解菌株在白酒中的应用

2.3.1 标准曲线的绘制 按照1.3.4.2节中GC-MS相关条件,测定10~1000 μg/L的标准曲线工作液,以EC定量离子峰面积对质量浓度构建标准曲线,结果如图4所示。

为考察样品提取方法的准确度,进行100 μg/L的添加回收试验,结果见表3。回收率为81.87%,在70%~110%之间,说明样品提取方法的准确度能够满足检测的需要。

2.3.2 白酒中氨基甲酸酯的消减 目前,在白酒发酵过程中,接种是去除EC或其前体物质的主要方法,比如孟庆达等^[34]通过向固态发酵的白酒酒醅中接种高于10⁷ CFU/g酒醅的罗伊氏乳杆菌,30℃发酵70 d,尿素去除率在97.3%以上。然而白酒在发酵过程中的酒精度一般在10%左右,最高达18%,本研究是将酒糟来源的J29和JY1经固定化后添加到商品白酒中(53%vol),20℃处理12 h,结果如图5所示。

商品白酒中EC质量浓度为230.37 μg/L,处理12 h后白酒中EC质量浓度显著降低,其中J29处理后EC质量浓度降低至78.12 μg/L,降解率为66.09%,JY1处理后EC质量浓度降低至86.97

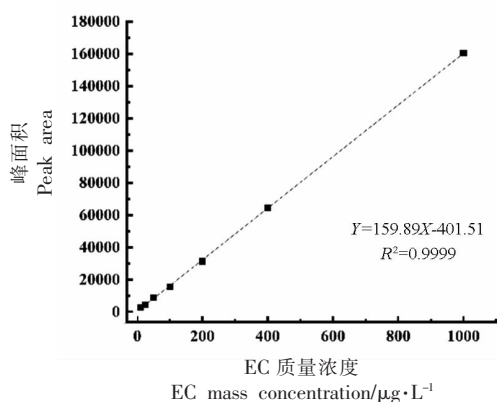


图 4 氨基甲酸乙酯标准曲线

Fig.4 Calibration curve of ethyl carbamate

表 3 预处理方法的回收率

Table 3 Spiked recoveries of the pretreatment methods

物质名称	保留时间/min	白酒回收率/%
氨基甲酸乙酯	13.786	81.71

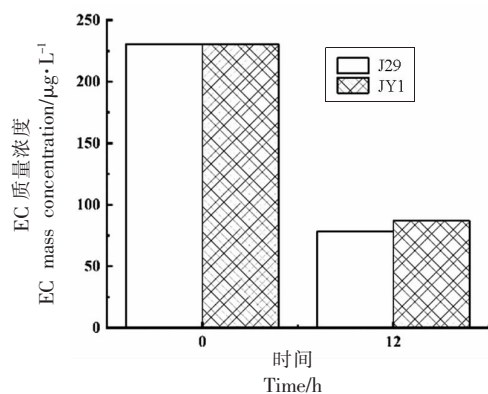


图 5 固定化菌株对白酒中氨基甲酸乙酯的去除效果

Fig.5 Removal effect of immobilized strains on EC in Baijiu

μg/L,降解率为 62.25%。

3 结论

本文从醋醅、酒糟中筛选出以 EC 为唯一碳源,可降解 EC 的细菌 44 株、酵母 4 株,经分子鉴定后发现,得到戴尔福特菌(15 株)、耐久肠球菌(9 株)、梭状芽胞杆菌(6 株)、纺锤形赖氨酸芽胞杆菌(2 株)、多粘芽胞杆菌(2 株)、芽胞杆菌(2 株)、大仁红酵母(2 株)、乙醇假丝酵母(2 株)、蛋白水解芽胞杆菌(2 株)、赖氨酸芽胞杆菌(1 株)、

灿烂类芽胞杆菌(1 株)、加米那类芽胞杆菌(1 株)、短小芽胞杆菌(1 株)、池生戴尔福特菌(1 株)、尿肠球菌(1 株)。从酒糟来源的细菌、酵母中各选 1 株,包埋后应用于降解商品白酒中的 EC,结果表明,处理 12 h 的白酒中 EC 质量浓度由 230.37 μg/L 降至 78.12 μg/L(细菌)和 86.97 μg/L(酵母),降解率均高于 60%,包埋后的两株菌株不仅能够耐受高浓度乙醇(53%vol)且降解效率高。

本研究通过分离、鉴定醋醅和酒糟中氨基甲酸乙酯降解菌株,并分析了其 EC 降解能力,为研究耐酸、耐乙醇的 ECH 奠定了基础。后续将通过分子生物学方法克隆 ECH 基因并进行表达,以期筛选出耐酸、耐乙醇的 ECH,控制白酒中的 EC。研究不同 EC 降解菌株的特性,加速 ECH 的开发,从而采取针对性措施降低发酵酒中 EC 含量,对我国发酵酒的安全性提升具有重要意义。

致谢

本文受到酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放课题(NJ2021-01)“氨基甲酸乙酯水解酶的筛选和基因工程生产”的资助。

参 考 文 献

- [1] BAAN R, STRAIF K, GROSE Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages[J]. *Lancet Oncology*, 2007, 8(4): 292-293.
 - [2] WEBER J V, SHARYPOV V I. Ethyl carbamate in foods and beverages—a review[J]. *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*, 2009, 7(3): 233-247.
 - [3] FIELD K J, LANG C M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): A review of the literature [J]. *Laboratory Animals*, 1988, 22(3): 255-262.
 - [4] LACHENMEIER D W. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control[J]. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2007, 103(7): 307-311.
 - [5] 张莹, 樊云, 孙跃鹏, 等. 浓香型白酒中氨基甲酸乙酯含量及控制方法的研究[J]. *食品工业*, 2018, 39(4): 191-194.
- ZHANG Y, FAN Y, SUN Y P, et al. Contents and control method of EC for Strong-flavour liquor[J].

- The Food Industry, 2018, 39(4): 191-194.
- [6] WU D, LI X, SHEN C, et al. Decreased ethyl carbamate generation during Chinese rice wine fermentation by disruption of CAR1 in an industrial yeast strain[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 180: 19-23.
- [7] GUO X, LI Y, GUO J, et al. Reduced production of ethyl carbamate for wine fermentation by deleting CAR1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(5): 671-679.
- [8] WU D, LI X, LU J, et al. Constitutive expression of the *DUR1,2* gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during Chinese rice wine fermentation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(1): fnv214.
- [9] WU D, XIE W, LI X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* using the CRISPR/Cas9 system to minimize ethyl carbamate accumulation during Chinese rice wine fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(10): 4435-4444.
- [10] MOREAU M C, DUCLUZEAU R, RAIBAUD P. Hydrolysis of urea in the gastrointestinal tract of 'monoxenic' rats: Effect of immunization with strains of ureolytic bacteria[J]. Infection and Immunity, 1976, 13(1): 9-15.
- [11] 田亚平, 杨广明, 查小红. 一株产酸性脲酶和EC降解酶的菌株及其应用: CN103937714 A[P]. 2014-07-23.
TIAN Y P, YANG G M, ZHA X H. A production of acid-degrading enzyme urease and EC strain and its application: CN103937714 A[P]. 2014-07-23.
- [12] 周建立, 康振, 刘庆涛, 等. 重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 74-83.
ZHOU J L, KANG Z, LIU Q T, et al. Degradation of urea and ethyl carbamate in Chinese rice wine by recombinant acid urease[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(1): 74-83.
- [13] WANG C, WANG M, ZHANG M. Ethyl carbamate in Chinese liquor (Baijiu): Presence, analysis, formation, and control[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(11): 4384-4395.
- [14] ALEXANDER J, AUDUNSSON J A, BENFORD D, et al. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages[J]. The EFSA Journal, 2007, 551(10): 1-44.
- [15] LACHENMEIER D W, LIMA M C P, NÓBREGA I C C, et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira[J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 1-15.
- [16] 卓俊纳, 吴卫宇, 陈静, 等. 三种香型白酒中氨基甲酸乙酯的研究及聚类分析[J]. 酿酒科技, 2021, 326(8): 22-27.
ZHUO J N, WU W N, CHEN J, et al. GC-MS and cluster analysis of ethyl carbamate in Baijiu of three flavor types[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021, 326(8): 22-27.
- [17] 黄松, 黄小清, 张辉, 等. 多种香型白酒中氨基甲酸乙酯残留含量的研究[J]. 酿酒科技, 2021, 328(10): 76-80.
HUANG S, HUANG X Q, ZHANG H, et al. Ethyl carbamate residues in Baijiu of different flavor types[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021, 328(10): 76-80.
- [18] 姚晓瑞宁. 降解氨基甲酸乙酯酵母菌的筛选及特性分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
YAO X R N. Screening and characterization of the yeast degrading ethyl carbamate[D]. Shihezi: Shihezi University, 2018.
- [19] 赵宇明. 黄酒 pH 测定结果的不确定度评定[J]. 酿酒, 2018, 45(2): 99-102.
ZHAO Y M. Evaluation of measurement uncertainty of pH in Chinese rice wine[J]. Liquor Making, 2018, 45(2): 99-102.
- [20] 李啸. 我国传统泡菜自然发酵与单菌发酵微生物及代谢特性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
LI X. The study on microbiological and metabolic property in natural and stater culture fermentation of Chinese sauerkraut[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [21] 刘庆涛, 康振, 堵国成. 微生物酶法消除黄酒中氨基甲酸乙酯研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 567-576.
LIU Q T, KANG Z, DU G C. Advances in microbial enzymatic elimination of ethylcarbamate in Chinese rice wine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(4): 567-576.

- [22] 张宇. 传统固态发酵小米醋风味物质的变化及工艺改良[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
ZHANG Y. Changes of flavor substances in traditional solid state fermentation of millet rice vinegar and technological improvement [D]. Hottot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [23] 徐文欢, 吴若茜, 李采婵, 等. 传统虾酱中酵母菌分离鉴定及碳源利用特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 303-309.
XU W H, WU R H, LI C C, et al. Separation and identification of yeast from traditional shrimp paste and their carbon utilization characteristics [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 303-309.
- [24] WANG J, ZHANG S, TAN H, et al. PCR-based strategy for construction of multi-site-saturation mutagenic expression library[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 225-230.
- [25] WU Q, ZHAO Y, WANG D, et al. Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa*: A novel urethanase-producing strain for degrading ethyl carbamate [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2013, 171(8): 2220-2232.
- [26] 沈海云. 微生物重组酯酶的发酵优化及其细胞固定化研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.
SHEN H Y. Fermentation optimization and cell immobilization of recombinant esterase from *Microbacterium* sp. SIT101 [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2020.
- [27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中氨基甲酸乙酯的测定: GB/T 5009.223-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1-4.
National Health and Family Planning Commission. Determination of ethyl carbamate in food: GB/T 5009.223-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014: 1-4.
- [28] 章晴, 陈士恒, 史晓梅, 等. 气相色谱-质谱检测葡萄酒中氨基甲酸乙酯预处理方法的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1137-1142.
ZHANG Q, CHEN S H, SHI X M, et al. Comparison of different pretreatment methods for determination of ethyl carbamate in wine by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(4): 1137-1142.
- [29] 天津博纳艾杰尔科技有限公司. 酒中氨基甲酸乙酯的测定-GC-MS法参照 GB 5009.223-2014 国标方法[EB/OL]. (2015-06-06)[2022-01-23]. <http://www.agela.com.cn/application/detail/254>.
Bonna-agela Technologies. Determination of ethyl carbamate in beer and Baijiu by GC-MS according to national standard GB 5009.223-2014 [EB/OL]. (2015-06-06)[2022-01-23]. <http://www.agela.com.cn/application/detail/254>.
- [30] LIU Q, CHEN Y, YUAN M, et al. A *Bacillus paradicheniformis* iron-containing urease reduces urea concentrations in rice wine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(17): e01258.
- [31] CUI K, WU Q, XU Y. Biodegradation of ethyl carbamate and urea with *Lysinibacillus sphaericus* MT33 in Chinese liquor fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1583-1590.
- [32] JIA Y, ZHOU J, DU G, et al. Identification of an urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* for degrading ethyl carbamate in fermented foods[J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100666.
- [33] MOHAPATRA B, BAPUJI M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella* species)[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25(6): 393-396.
- [34] 孟庆达, 周新虎, 陈翔, 等. 白酒酿造过程酒醅中尿素的控制与减少[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(8): 33-39.
MENG Q D, ZHOU X H, CHEN X, et al. Reduction of urea in fermented grains during Chinese liquor brewing process[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(8): 33-39.

Isolation and Identification of Strains Degrading Ethyl Carbamate and Its Application in Chinese Liquor

Dong Naihui¹, Xue Siyu¹, Dong Liang¹, Chen Yingxi¹, Huang Zhiguo^{2*}, Zhang Sufang^{1*}

(¹National Engineering Research Center of Seafood, School of Food, Dalian Polytechnic University,

Dalian 116034, Liaoning

²Liquor-making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, Sichuan)

Abstract Ethyl Carbamate (EC) is a genotoxic and highly carcinogenic metabolite produced during the fermentation and storage of fermented foods and alcoholic beverages. Therefore, the control of EC content in fermented foods is an essential topic in the field of food safety research. In this study, strains degrading ethyl carbamate in vinegar brewing mass and fermented grains of Baijiu were isolated using EC as the sole carbon source. Forty-eight ethyl carbamate degrading strains were obtained, which were identified as 14 different genera, including *Candidaethanolis*, *Rhodium magnolia*, *Delfia* sp., *Enterococcus durans*, *Bacillus* sp. and *Enterococcus faecium*, etc. The isolated *Lysinibacillus fusiformis* and *Candida ethanolica* were embedded and applied to remove EC from Chinese liquor after embedding and fixation. Strikingly, the concentration of EC in liquor decreased significantly. The results showed that the EC concentration in Chinese liquor decreased from 230.37 $\mu\text{g/L}$ to 78.12 $\mu\text{g/L}$ (*L. fusiformis*) and 86.97 $\mu\text{g/L}$ (*C. ethanolica*) in both treatment groups at 12 h, with EC degradation rates of 66.09% and 62.25%, respectively. The results of this study can provide a reference for the excavation of acid-tolerant, ethanol-tolerant, ethyl carbamate hydrolase producing strains.

Keywords ethyl carbamate; vinegar brewing mass; fermented grains; degradation strains; Chinese liquor