



解淀粉芽孢杆菌诱变育种及其突变株在降低酱油中氨基甲酸乙酯的应用

张梦寒^{1,2}, 李巧玉^{1,2}, 周朝晖³, 卢丽玲³, 堵国成^{1,4}, 陈坚^{1,5}, 方芳^{1,2*}

¹江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

²工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

³广东珠江桥生物科技股份有限公司, 广东 中山 528415

⁴糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

⁵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】通过诱变育种提高解淀粉芽孢杆菌 JY06 利用精氨酸的能力, 并将其用于降低酱油中的氨基甲酸乙酯及前体, 从而提高酿造酱油的安全性。【方法】采用等离子诱变和紫外诱变两种诱变育种方法对解淀粉芽孢杆菌 JY06 进行突变, 应用高通量筛选手段获得具有高精氨酸利用能力的突变株, 验证突变株降低酱油中氨基甲酸乙酯的能力。【结果】获得了 12 株精氨酸利用能力提高的突变株, 与出发菌株 JY06 相比, 突变株 C12 和 E6 可使酱油中瓜氨酸含量分别降低了 15.6% 和 14.7%, EC 的含量分别降低了 19.3% 和 13.1%。【结论】通过等离子诱变和紫外诱变进一步提高了解淀粉芽孢杆菌 JY06 降低酱油中 EC 及其前体瓜氨酸的能力, 具有控制或减少酱油中生物危害物的应用潜力。

关键词: 酱油, 氨基甲酸乙酯, 瓜氨酸, 解淀粉芽孢杆菌, 诱变育种

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, 简称 EC)是一种广泛存在于发酵食品中的有害化学物质^[1], 2007 年被国际癌症研究机构(IARC)归类为 2A 级致癌物^[2]。研究表明酱油中存在着氨基甲酸乙酯^[3], 并且氨基甲酸乙酯的存在严重影响了酱油的食用安全性^[4]。由于 EC 的热稳定性很好, 形成后很难被降解, 因此, 通常采用降低或消除氨基甲酸乙

酯的前体物质的方法达到降低或消除发酵食品中 EC 的目的。

发酵食品中氨基甲酸乙酯的前体物质主要包括乙醇、尿素、焦炭酸二乙酯、氨甲酰磷酸、氰化物和瓜氨酸^[5]。酱油中氨基甲酸乙酯的前体物质有乙醇、尿素和瓜氨酸, 其中乙醇和瓜氨酸为主要前体物质。已有研究证实, 酱油发酵前期即乳

基金项目: 国家自然科学基金(31371821); 广东省科技计划项目(2015B020205002)

*通信作者。Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-12-22; 修回日期: 2017-02-15; 网络出版日期: 2017-03-02

酸发酵时期是瓜氨酸的主要积累时期^[6]。酱油中的瓜氨酸的生成和积累主要是酱醪中细菌通过精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI)途径对精氨酸的利用而形成^[7-10]。因此,降低或消除酱油中 EC 的有效措施之一是减少或消除 EC 的主要前体物质瓜氨酸^[6]。

在酱油发酵过程中,可通过强化能够利用瓜氨酸或优先利用瓜氨酸前体精氨酸且不积累瓜氨酸的菌株,达到控制酱油中瓜氨酸积累的目的。我们的前期研究结果表明,筛选自酱油酱醪的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JY06 可以利用精氨酸生成鸟氨酸并不积累瓜氨酸,将其添加至酱油发酵初期的酱醪中,发酵结束后酱油成品中 EC 及其前体瓜氨酸的含量都显著减少,并且对酱油的风味也有所改善^[11-13]。

为了进一步降低酱油中 EC 含量和提高发酵食品的安全性,本研究将采用诱变育种的方法对解淀粉芽孢杆菌 JY06 进行改造,利用高通量筛选技术获得可高效利用精氨酸的菌株,进一步减少乳酸发酵时期瓜氨酸的积累量和产品中的 EC 含量。

1 材料和方法

1.1 菌株

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) JY06, 本实验室保藏。鲁氏酵母 ZQ01 和鲁氏酵母 ZQ02, 广东珠江桥生物科技股份有限公司保藏。

1.2 试剂与培养基

1.2.1 试剂: 3,5-二硝基水杨酸试剂:称取 3,5-二硝基水杨酸 1 g,溶于 20 mL 的 2 mol/L 的 NaOH 溶液中,加入 50 mL 双蒸水,再加入 30 g 酒石酸钠,待溶解后用蒸馏水定容至 100 mL。

用于精氨酸显色反应的显色剂^[14]: (1) 40 g/L 氢氧化钠溶液; (2) 80 g/L 甲萘酚正丙醇溶液; (3) 0.5 mL/mL 的双乙酰正丙醇溶液。

1.2.2 培养基: LB 培养基(g/L): 酵母粉 5、蛋白胨 10、NaCl 10, pH 7.0±0.2。初筛培养基(g/L): 酵母膏 5、牛肉膏 5、胰蛋白胨 5、NaCl 10、葡萄糖 0.5、吐温-80 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.2、MnSO₄·H₂O 0.05、FeSO₄·7H₂O 0.4、柠檬酸三胺 2.0、CaCO₃ 0.1、5-磷酸吡哆醛 0.05、K₂HPO₄ 2、精氨酸 7、溴甲酚紫 0.06, pH 6.0±0.2。精氨酸利用培养基(g/L)^[15]: 酵母膏 5、牛肉膏 5、胰蛋白胨 5、NaCl 180、葡萄糖 0.5、吐温-80 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.2、MnSO₄·H₂O 0.05、FeSO₄·7H₂O 0.4、柠檬酸三胺 2.0、CaCO₃ 0.1、吡哆醛-5-磷酸 0.05、K₂HPO₄ 2.0、精氨酸 5.0, pH 6.0±0.2。

1.3 诱变方法

1.3.1 紫外诱变: 取 5 mL 培养至对数生长期的菌液(菌浓为 10⁷ CFU/mL),离心后弃上清,用 PBS 缓冲液(pH 7.0)清洗菌体 2-3 次后,向离心管中加入 5 mL PBS 缓冲液悬浮菌体,然后,取适量菌悬液加入无菌培养皿中,在 15 W 紫外灯 30 cm 处照射 100 s,照射完成后将菌体转入无菌试管中并立即放入冰水中;在避光条件下取适量的照射菌液加到 LB 培养基中,在 37 °C、120 r/min 摇床培养 2-4 h;避光条件下将培养后菌液稀释涂布于 LB 固体培养基中,避光培养 24-36 h。

1.3.2 等离子诱变: 将解淀粉芽孢杆菌 JY06 接种至 LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 摇床培养至对数生长期(菌浓 10⁷ CFU/mL)。取 10 μL 的菌悬液滴加在无菌载玻片上,用 ARTP (常压室温等离子体)进行等离子诱变。在 100 W 和 10 SLM 的条件下诱变 60 s,将诱变后的菌悬液转移至装有 1 mL 生理盐水的无菌管中,稀释涂布于 LB 固体

培养基, 在 37 °C 培养箱中培养 24–36 h。

1.4 突变株初筛

突变株经 ADI 途径利用精氨酸并形成氨, 氨的形成使培养基的 pH 增大, 从而导致含有 pH 指示剂溴甲酚紫的培养基变成紫色^[16–18]。利用这一原理, 用 Qpix420 自动挑菌仪(美国 Molecular Devices 公司)挑取诱变后的单菌落, 接种至含 1 mL 初筛培养基的 96 深孔板中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 24 h 后, 离心收集上清液, 采用酶标仪(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, 选择吸光值 OD_{436} 相差较大的菌株进行复筛。

1.5 突变株复筛

精氨酸的侧链胍基在碱性介质中, 可与甲萘酚和双乙酰的混合液反应生成紫红色的物质, 此物质在 OD_{540} 吸光值与精氨酸浓度呈线性关系^[19]。即反应液的吸光值越小表明精氨酸被利用越多, 依此对初筛得到的突变株进行复筛。

1.6 突变株传代稳定性考察

将经等离子和紫外诱变筛选得到的利用精氨酸能力较强的突变株接种至 LB 液体培养基, 每隔 24 h 转接 1 次, 至 20 d 传代培养 200 代后, 考察突变株高效利用精氨酸特性的传代稳定性。

1.7 酱油发酵

日式酱油成曲由广东珠江桥生物科技股份有限公司提供。酱油发酵工艺为: 将 17.1 kg 的成曲与 23% 的盐水(*W/V*)以体积比 1:1.61 的比例混合, 混合后的酱醪转入 2 L 容器后开始发酵。在发酵的第 0 天分别添加 10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌 JY06 或其突变株。发酵第 7 天向酱醪中加入 10^7 CFU/mL 鲁氏酵母(ZQ02), 发酵第 23 天加入 10^7 CFU/mL 鲁氏酵母(ZQ01)。发酵前 23 天控制发酵温度为

(15 ± 1)°C, 发酵第 23 天至发酵结束为 30 °C 恒温发酵。

1.8 分析方法

1.8.1 游离氨基酸的测定方法: 采用高效液相色谱法(HPLC 法)进行测定^[20]。测定前对样品进行前处理: 取 1 mL 发酵液, 12000 r/min 离心 10 min 后去除菌体取上清。加入 4 倍体积 5% 的三氯乙酸, 经孔径为 0.22 μ m 的滤膜过滤。处理后的样品置于 -20 °C 保存。

色谱条件: Agilent 1260 色谱仪, 色谱柱 C_{18} , 250 mm \times 4.6 mm。检测器为 VWD 紫外检测器, 检测波长 338 nm, 柱温 40 °C。

流动相 A 相(1 L): 无水乙酸钠 5 g, 四氢呋喃 5 mL, 三乙胺 200 μ L, pH 7.2。

流动相 B 相(1 L): 无水乙酸钠 5 g, 超纯水 200 mL, 甲醇 400 mL, 乙腈 400 mL, pH 7.2。

1.8.2 EC 的检测方法: 取一定量发酵结束后的酱油样品, 95 °C 加热 30 min, 采用 GC-MS 对样品中的氨基甲酸乙酯进行测定, 同时以未经加热处理的原油样品作为对照。

样品的处理: 取 10 g 液体样品于 100 mL 烧杯中, 然后添加 1 mL *n*-氨基甲酸丙酯(nPC)溶液作为内标, 再加入超纯水定容至 40.0 g, 然后将混合液转移至 Extrelut QE celite 的固相萃取柱中, 用 80 mL 二氯甲烷进行洗脱, 收集洗脱液, 用旋转蒸发器在 30 °C 水浴中将洗脱液浓缩至 2–3 mL, 再使用氮气将其浓缩至 1 mL, 将浓缩液转移至自动进样瓶中待测^[21]。

色谱柱: J&W DB-WAX 石英毛细柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); 升温程序: 40 °C 保持 0.75 min, 以 10 °C/min 升至 60 °C, 然后以 3 °C/min 升至 150 °C, 然后迅速升至 220 °C, 220 °C 保持 4.25 min; 载气(He)流速为 1 mL/min, 进样量为 1 μ L; 不分流进样。

电子轰击(EI)离子源; 电子能量 70 eV; 传输线温度为 180 °C; 离子源温度为 200 °C; 选择离子扫描(SIM), 定性离子 m/z 62、 m/z 74、 m/z 89, 定量离子 m/z 62; 激活电压为 1.5 V。

1.8.3 酱油中还原糖的含量: 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)方法测定; 氨基酸态氮和总酸的测定方法参照 Cui 所述方法^[22]; 酱醪 pH 用 pH 计测定。

2 结果和分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌诱变及高效利用精氨酸突变株的高通量筛选

前期研究证实, 分离自酱醪的解淀粉芽孢杆菌 JY06 可将酱醪中精氨酸转化生成鸟氨酸, 不积

累中间产物瓜氨酸, 从而显著减少了酱油中的 EC^[11-13]。为进一步提高酱油的食品安全性, 采用诱变育种的方法改造菌株 JY06, 提高其利用精氨酸的能力, 使其用于酱油发酵时进一步降低 EC 及其前体瓜氨酸含量。

分别用紫外诱变和等离子诱变方法对菌株 JY06 进行诱变, 运用如图 1 所示的高通量筛选策略, 通过初筛和复筛, 共筛选得到 25 株精氨酸利用能力高于出发菌株 JY06 的突变株。

2.2 突变株利用精氨酸能力的比较

酱醪发酵体系是高盐环境, 对细菌利用精氨酸有抑制作用, 并且能影响菌株 ADI 途径的代谢通量。为了获得在酱油发酵过程中精氨酸利用能

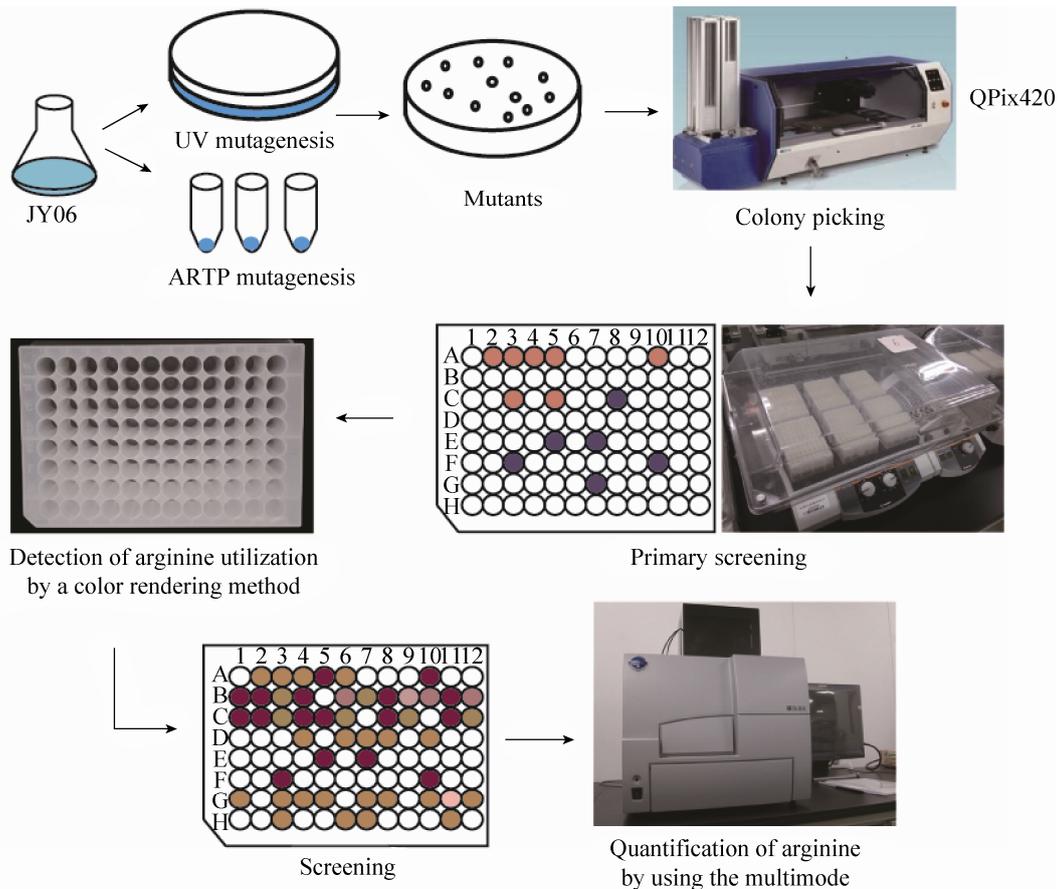


图 1. 高效利用精氨酸 JY06 突变株的高通量筛选策略

Figure 1. Strategy for high-throughput screening of JY06 mutants with higher arginine utilization capability.

力较高的菌株, 考察了 25 株突变株在 18% NaCl 的盐胁迫条件下利用精氨酸的能力。通过比较, 获得了 12 株在盐胁迫条件下具有比出发菌株 JY06 利用精氨酸能力高的突变株(表 1)。其中, 等离子诱变突变株利用精氨酸的能力与对照菌株 JY06 相比提高了 6.1%–18.0%; 紫外诱变突变株利用精氨酸的能力与对照菌株 JY06 相比提高了 5.1%–17.1%。在 12 株突变株中, 菌株 E6 和 C12 分别是紫外诱变和等离子诱变效果最好的突变株, 利用精氨酸能力分别比出发菌株 JY06 提高了 17.1%和 18.0%。对突变株利用精氨酸的能力与对照菌做显著性差异分析, 结果显示 $P_{C12}=0.007<0.05$, $P_{E6}=0.008<0.05$, 说明突变株 E6 和 C12 利用精氨酸的能力与 JY06 相比差异性显著(表 1)。因此, 选择突变株 C12 和 E6 进行后续研究。

表 1. 菌株利用精氨酸能力的比较

Table 1. Consumption of arginine by JY06 and its mutants

Strain	$\Delta\text{Arg}/(\text{g/L})$	<i>P</i> -value	$\Delta\text{Cit}/(\text{g/L})$	$\Delta\text{Orn}/(\text{g/L})$
JY06	4.90±0.03	/	0.00	2.94±0.04
ARTP-B1	5.72±0.01	0.009	0.00	4.15±0.02
ARTP-B3	5.65±0.03	0.012	0.00	4.03±0.05
ARTP-C12	5.78±0.06	0.007	0.00	4.81±0.01
ARTP-F5	5.62±0.04	0.015	0.00	3.81±0.03
ARTP-G2	5.60±0.02	0.016	0.00	4.12±0.04
ARTP-A1	5.68±0.05	0.011	0.06±0.01	3.81±0.01
ARTP-F9	5.20±0.08	0.170	0.00	4.21±0.01
ARTP-H5	5.52±0.03	0.024	0.00	4.61±0.02
UV-A4	5.56±0.02	0.019	0.00	4.48±0.06
UV-E6	5.74±0.01	0.008	0.00	4.58±0.03
UV-A10	5.57±0.05	0.018	0.00	4.21±0.08
UV-D10	5.15±0.10	0.243	0.00	4.35±0.05

ARTP: ARTP mutagenesis; UV: UV mutagenesis; ΔArg : consumption of arginine; ΔCit and ΔOrn production of citrulline and ornithine.

利用诱变技术提高菌株利用或合成某一物质的能力是一种对菌株进行非基因编辑的有效改造手段。程功等通过常压室温等离子诱变技术选育出了一株 L-精氨酸高产菌株 *C. glutamicum* ARG 3-16, 其 L-精氨酸的产量较原始菌株提高了 49.79%^[23]。郝刚等通过紫外(UV)和亚硝基胍(NTG)逐级诱变, 获得 1 株能够积累 L-精氨酸的菌株 UN100-12 (SGr, AEr), 并且突变株具有较好的遗传稳定性^[24]。本研究中通过等离子诱变和紫外诱变获得了利用精氨酸能力较好的菌株, 为符合在实际生产中的应用要求, 应考察突变株相关特性的传代稳定性。

2.3 菌株利用精氨酸的传代稳定性

为评估菌株利用精氨酸能力的传代稳定性, 考察了 JY06 和 2 个突变株传代后利用精氨酸的能力。结果表明, 传代 200 代后, JY06 和突变株 C12 与 E6 利用精氨酸能力均有所下降, 但是同 JY06 相比, 突变株 C12 与 E6 利用精氨酸能力分别是 JY06 的 1.97 倍和 1.81 倍(图 2), 说明突变株比出发菌株具有更好的利用精氨酸能力的传代稳定性。

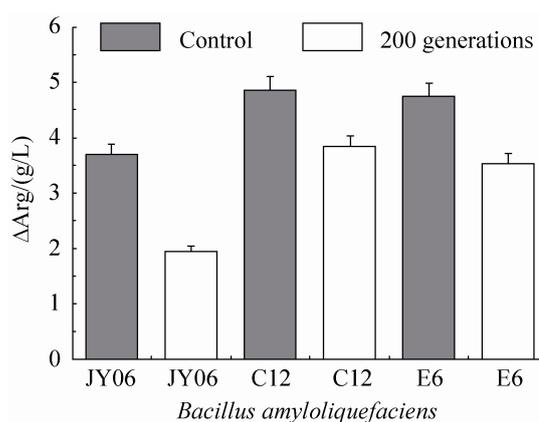


图 2. 解淀粉芽孢杆菌利用精氨酸能力的传代稳定性
Figure 2. The genetic stability of *B. amyloliquefaciens* strains in arginine utilization. ΔArg consumption of arginine.

2.4 解淀粉芽孢杆菌 JY06 突变株用于减少酱油中 EC

为了验证突变株用于减少酱油中氨基甲酸乙酯及其前体瓜氨酸的积累是否比出发菌株解淀粉芽孢杆菌 JY06 更有效, 分别考察了添加解淀粉芽孢杆菌 JY06、突变株 C12 和 E6 在酱油发酵过程中对酱醪中 EC 前体瓜氨酸生成和积累相关氨基酸(精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸)含量的影响。未添加解淀粉芽孢杆菌的对照, 发酵终点时酱醪中瓜氨酸含量为 4.5 g/L (图 3-A)。添加解淀粉芽孢杆菌 JY06 及其突变株的酱醪中瓜氨酸含量与未添加菌株的酱醪中瓜氨酸含量相比显著减少。此外, 突变株对酱醪中瓜氨酸含量的控制与减少能力高于出发菌株 JY06。由图 3-B-D 可知, 突变株 C12 和 E6 对精氨酸的利用比 JY06 提高了 21.3%和

14.8%; 酱醪中瓜氨酸的含量分别比 JY06 减少了 15.6%和 14.7%; 鸟氨酸的含量分别比 JY06 提高了 3.1%和 2.6%。以上结果说明突变株 C12 和 E6 降低酱油中 EC 前体瓜氨酸比解淀粉芽孢杆菌 JY06 更有效。此外, 发酵结束后, 添加了芽孢杆菌的酱油原油中未检测出 EC, 杀菌后酱油中添加了突变株 C12 和 E6 的酱油样品 EC 含量降低至 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下, 分别比添加 JY06 的酱油中 EC 含量降低了 19.3%和 13.1% (表 2)。

对于以单一菌株为生产菌株或是体系中有害物的产生与主要生产菌株代谢相关的发酵过程来说, 改造生产菌株的代谢特性是一种控制体系中有有害物质积累的有效方法。例如李晓敏等通过敲除编码精氨酸酶的 *CARI* 基因获得一株酿酒酵母菌株, 将其应用于黄酒发酵体系中的尿素和 EC 的

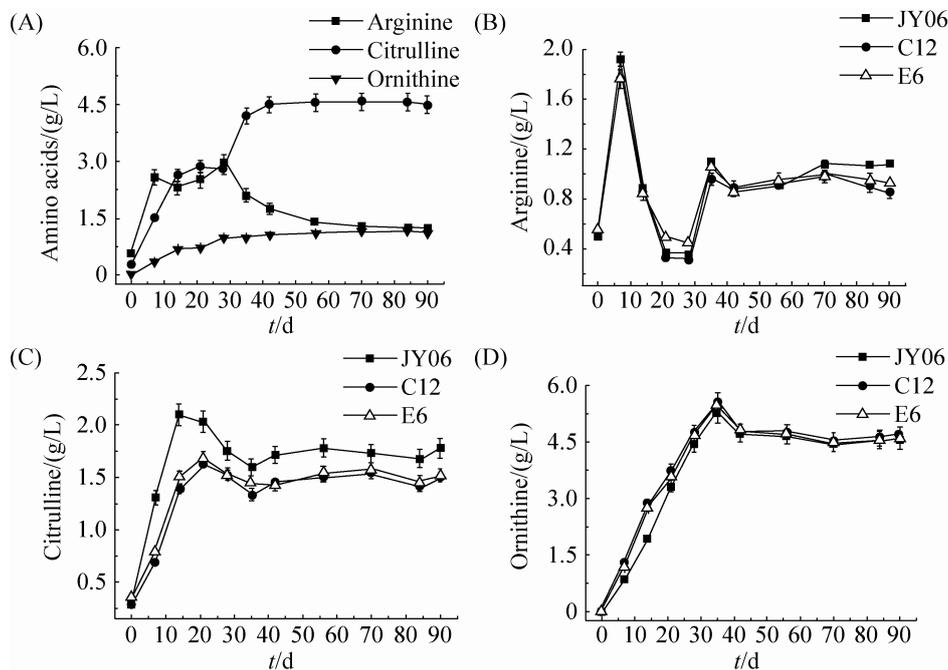


图 3. 酱油发酵过程精氨酸代谢相关氨基酸含量的变化

Figure 3. Detection of amino acids corresponding to arginine utilization in the moromi during soy sauce fermentation. A: Control, detection of amino acids corresponding to arginine utilization in the moromi during soy sauce fermentation; B-D: Add JY06, C12 and E6 in soy sauce fermentation process of arginine, citrulline and ornithine concentration change.

表 2. 酱油中氨基甲酸乙酯含量比较

Table 2. Quantification of ethyl carbamate in soy sauce

Sample	Control	JY06	C12	E6
EC*($\mu\text{g}/\text{kg}$)	11.3 \pm 0.2	ND	ND	ND
EC**($\mu\text{g}/\text{kg}$)	45.2 \pm 0.7	14.5 \pm 0.3	11.7 \pm 0.2	12.6 \pm 0.5

*: Before sterilization; **: Sterilization (heated at 95 °C for 30 min); ND: not detected.

含量分别降低了 86.9%和 50.5%^[25]。此外, 将组成型表达尿素水解酶的代谢工程菌应用于黄酒发酵体系, 分别使黄酒中 EC 的含量降低了 49.1%和 55.3%^[26]。酱油发酵是混菌发酵的复杂体系, 目前采取的降低酱油中 EC 的方法是酶法和优化工艺的方法。Kim 等添加脲酶至豆瓣酱中, 可使添加了瓜氨酸、乙醇和尿素的酱中 EC 含量分别降低了 38.5%、17.3%和 18.8%^[27]。但是酱油中 EC 的前体主要是瓜氨酸, 因此去除尿素并不是减少 EC 的有效措施。通过精炼使原料中精氨酸的含量大幅

降低, 减少瓜氨酸的积累, 从而达到降低 EC 的目的^[7,28]。但是精炼后原料的营养成分损失严重, 影响产品的风味和营养价值。

2.5 解淀粉芽孢杆菌 JY06 突变株对酱油理化性质的影响

前期研究结果表明, 在酱油发酵前期添加解淀粉芽孢杆菌 JY06 可使酱油原油中醇的浓度少量降低, 而酸和酯的含量增加, 酱油的香味和口感也有所提高^[13]。将突变株 C12 和 E6 用于酱油发酵可显著减少酱油中 EC 及其前体, 但是添加解淀粉芽孢杆菌突变株是否会影响酱油的品质, 还需进行分析和比较。分别以不添加菌株和添加菌株 JY06 进行发酵的酱油原油为对照, 考察了添加突变株 C12 和 E6 对酱油主要理化指标的影响(图 4)。结果表明, 与未添加菌株的对照相比, 添加突变

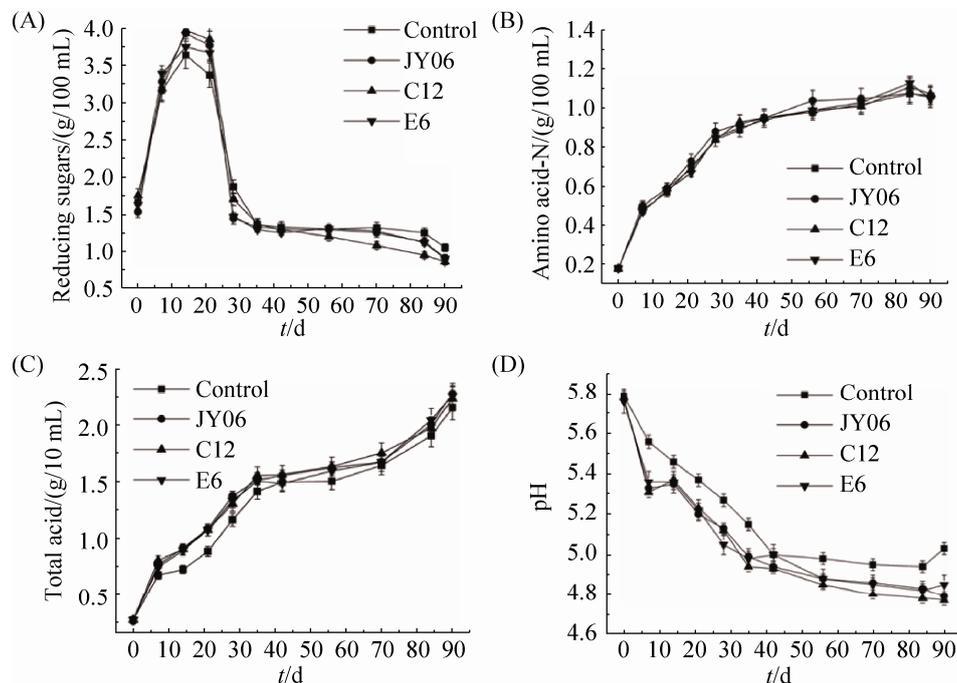


图 4. 添加解淀粉芽孢杆菌对酱油理化性质的影响

Figure 4. Effect of addition of *B. amyloliquefaciens* JY06 and its mutants on the physical and chemical properties of soy sauce.

株 C12 和 E6 进行发酵的酱油原油总酸略有增加, 氨基酸态氮和还原糖含量无显著差异; 与添加菌株 JY06 的样品相比, 添加突变株 C12 和 E6 的样品 pH 值、总酸、氨基酸态氮和还原糖浓度均无明显差异。上述结果说明, 在酱油发酵过程添加解淀粉芽孢杆菌突变株 C12 和 E6 对酱油主要理化性质无明显影响。

3 结论

本研究通过等离子诱变和紫外诱变的方法对一株可减少酱油中氨基甲酸乙酯和其前体瓜氨酸的菌株解淀粉芽孢杆菌 JY06 进行了育种, 获得了 2 株(C12 和 E6)精氨酸利用能力提高的突变株。将 C12 和 E6 用于酱油发酵(2 L 发酵体系), 进一步降低了酱油中氨基甲酸乙酯和其前体的含量, 使氨基甲酸乙酯含量降低至 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。本研究结果可为减少酱油中氨基甲酸乙酯及其前体瓜氨酸的积累提供参考, 对于寻找控制或减少混菌发酵体系中生物危害物的有效措施具有重要意义。

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] 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. *Food Chemistry*, 2014, 152: 108–112.
- [3] Liu YP, Wang SH, Hu P. A survey of levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages in 2009–2012, Hebei Province, China. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*, 2013, 6(3): 214–217.
- [4] Wang LY, Wu PG, Zhang J, Tang J, Zhao YX. Survey and analysis of ethyl carbamate and 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in soy sauce. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2012, 22(10): 2493–2495. (in Chinese)
王立媛, 吴平谷, 张晶, 汤璠, 赵永信. 酱油中氨基甲酸乙酯和氯丙醇含量调查与分析. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(10): 2493–2495.
- [5] Mira de Orduña R, Liu SQ, Patchett ML, Pilone GJ. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 183(1): 31–35.
- [6] 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. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 358(1): 91–97.
- [7] Liu SQ, Pilone GJ. A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84(3): 315–327.
- [8] Liu SQ, Pritchard GG, Hardman MJ, Pilone GJ. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1994, 45(2): 235–242.
- [9] Matsudo T, Aoki T, Abe K, Fukuta N, Higuchi T, Sasaki M, Uchida K. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(3): 352–356.
- [10] Zhao LC, Hou ZQ, Liu CZ, Wang YY, Dai LY. A catalyst-free novel synthesis of diethyl carbonate from ethyl carbamate in supercritical ethanol. *Chinese Chemical Letters*, 2014, 25(10): 1395–1398.
- [11] Fang F, Zhang JR, Hu CW, Chen J, Du GC. *Bacillus amyloliquefaciens* utilizing arginine without accumulation of citrulline. China: CN105018381A. 2015-11-04. (in Chinese)
方芳, 张继冉, 胡传旺, 陈坚, 堵国成. 一株利用精氨酸且不积累瓜氨酸的解淀粉芽孢杆菌. 中国: CN105018381A. 2015-11-04.
- [12] Fang F, Zhang JR, Yang XF, Chen J, Du GC. Method for applying *Bacillus amyloliquefaciens* to soy sauce brewage. China: CN105639590A. 2016-06-08. (in Chinese)
方芳, 张继冉, 杨希飞, 陈坚, 堵国成. 一种解淀粉芽孢杆菌在酱油酿造中的应用方法. 中国: CN105639590A. 2016-06-08.
- [13] Zhang JR, Du GC, Chen J, Fang F. Characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for reduction of citrulline

- accumulation during soy sauce fermentation. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(10): 1723–1731.
- [14] Hao G. Studies on the preparation and extraction of L-arginine. Master Dissertation of Jiangnan University, 2005. (in Chinese)
郝刚. L-精氨酸的制备及提取研究. 江南大学硕士学位论文, 2005.
- [15] 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.
- [16] de Llano DG, Cuesta P, Rodríguez A. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 26(4): 270–274.
- [17] García-Moruno E, Carrascosa AV, Muñoz R. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(3): 625–629.
- [18] 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. 中国微生态学杂志, 2009, 21(5): 427–429, 434.
- [19] Yu XP. Study of high yield L-arginine producing strain and fermentation condition. Master Dissertation of Zhejiang Normal University, 2012. (in Chinese)
于向鹏. L-精氨酸高产菌株选育与发酵工艺研究. 浙江师范大学硕士学位论文, 2012.
- [20] Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 1984, 136(1): 65–74.
- [21] Nóbrega ICC, Pereira GE, Silva M, Pereira EVS, Medeiros MM, Telles DL, Albuquerque EC Jr, Oliveira JB, Lachenmeier DW. Improved sample preparation for GC–MS–SIM analysis of ethyl carbamate in wine. *Food Chemistry*, 2015, 177: 23–28.
- [22] Feng J, Zhan XB, Zheng ZY, Wang D, Zhang LM, Lin CC. New model for flavour quality evaluation of soy sauce. *Czech Journal of Food Science*, 2013, 31(3): 292–305.
- [23] Cheng G, Xu JZ, Guo YF, Xu K, Zhang WG. Breeding and fermentation optimization of L-arginine producing strains. *Microbiology China*, 2016, 43(2): 360–369. (in Chinese)
程功, 徐建中, 郭燕凤, 徐凯, 张伟国. 常压室温等离子体诱变选育 L-精氨酸生产菌及发酵条件优化. 微生物学通报, 2016, 43(2): 360–369.
- [24] Qian H, Hao G. Study on the breeding of L-Arginine-producing strain. *Microbiology China*, 2005, 32(3): 46–50. (in Chinese)
钱和, 郝刚. L-精氨酸产生菌诱变育种的研究. 微生物学通报, 2005, 32(3): 46–50.
- [25] Wu DH, Li XM, Shen C, Lu J, Chen J, Xie GF. Decreased ethyl carbamate generation during Chinese rice wine fermentation by disruption of *CARI* in an industrial yeast strain. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 180: 19–23.
- [26] Wu DH, Li XM, Lu J, Chen J, Zhang L, Xie GF. Constitutive expression of the *DURI*₂ gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during Chinese rice wine fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(1): fnv214.
- [27] Kim YG, Lyu J, Kim MK, Lee KG. Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system. *Food Chemistry*, 2015, 189: 74–79.
- [28] Jauniaux JC, Urrestarazu LA, Wiame JM. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *Journal of Bacteriology*, 1978, 133(3): 1096–1107.

Reduction of ethyl carbamate in soy sauce by *Bacillus amyloliquefaciens* mutants

Menghan Zhang^{1,2}, Qiaoyu Li^{1,2}, Zhaohui Zhou³, Liling Lu³, Guocheng Du^{1,4}, Jian Chen^{1,5}, Fang Fang^{1,2*}

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

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

³ Guangdong Pearl River Bridge Biological Limited Corporation, Zhongshan 528415, Guangdong 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] To prepare mutants of *Bacillus amyloliquefaciens* JY06 strain with enhanced arginine consumption capability to reduce carcinogenic compound ethyl carbamate and its precursors in soy sauce. [Methods] Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and UV mutagenesis were used to mutate *Bacillus amyloliquefaciens* JY06, and a high-throughput screening approach was used to characterize mutants with high arginine utilization capability. The properties of mutants were studied following addition to soy sauce moromi during fermentation to initiate reduction of citrulline and ethyl carbamate. [Results] Twelve mutants with elevated arginine utilizing ability were obtained through ARTP and UV mutagenesis, of which C12 and E6 displayed the highest capacity for eliminating EC and citrulline. Compared with the JY06 parent strain, the addition of C12 or E6 to the moromi during soy sauce fermentation decreased citrulline content in soy sauce by 15.6% and 14.7%, and reduced ethyl carbamate by 19.3% and 13.1%, respectively. [Conclusion] Both ethyl carbamate and its precursor citrulline were significantly decreased in soy sauce by *B. amyloliquefaciens* JY06 mutants in the moromi during fermentation, demonstrating the potential of the mutants to control or eliminate toxic compounds in soy sauce and similar food products.

Keywords: soy sauce, ethyl carbamate, citrulline, *Bacillus amyloliquefaciens*, mutagenesis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371821) and by the Technology Research Program of Guangdong, China (2015B020205002)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 22 December 2016; Revised: 15 February 2017; Published online: 2 March 2017