

芝麻香型与浓香型白酒固态发酵过程中 氨基甲酸乙酯的形成研究

李拥军¹, 陈雯², 皮小弟¹, 邬婷³, 周凯³

(1. 广东江门中医药职业学院南药学院, 广东江门 529000) (2. 黄埔海关技术中心, 广东广州 510730)

(3. 九江学院江西油茶研究中心, 药学与生命科学学院, 江西九江 332005)

摘要: 氨基甲酸乙酯 (EC) 是一种具有细胞和基因毒性的 2A 级致癌物质, 我国部分白酒中 EC 检出率和含量居高不下, 引起了广泛关注。本文以浓香型和芝麻香型白酒为例, 探究了白酒固态发酵过程中 EC、前体物质含量与酸度的变化, 同时采用模拟发酵分析白酒酒醅固态发酵过程中 pH 值、尿素与瓜氨酸对 EC 形成的影响。研究表明: 发酵初期的两种酒醅中均检测到超过 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EC, 发酵过程中芝麻香型酒醅中 EC 形成速率 ($4.40 \times 10^{-7} \mu\text{mol}/\text{kg} \cdot \text{s}$) 和含量 (140.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 均显著高于浓香型酒醅, 且主要积累于发酵 2 至 4 周。两种酒醅中乙醇与尿素在发酵前三周含量分别增加了 679.31%~181.89% 和 87.54%~117.87%, 发酵三周后瓜氨酸积累更多。尽管芝麻香型酒醅发酵过程中 EC 与瓜氨酸和尿素含量相关性均不显著, 模拟实验发现添加尿素与瓜氨酸后酒醅中 EC 含量均增加了 23.70%~84.82%, 且尿素在酒醅发酵过程中形成 EC 的能力比瓜氨酸更强。此外, 酒醅 pH 值低于 4.0 有助于发酵初期 EC 的形成。以上结果可为针对性降低酒醅发酵过程中积累的大量 EC 提供依据。

关键词: 固态发酵; 白酒; 氨基甲酸乙酯; 前体物质

文章编号: 1673-9078(2021)08-67-74

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0360

Ethyl Carbamate Formation During Solid-state Fermentation of Sesame-flavored and Strongly Flavored Baijiu

LI Yong-jun¹, CHEN Wen², PI Xiao-di¹, WU Ting³, ZHOU Kai³

(1.School of Lingnan Chinese Medicine and Pharmacy, Guangdong Jiangmen Chinese Medical College, Jiangmen 529000, China) (2.Huangpu Customs Technology Center, Guangzhou 510730, China) (3.Institute of Jiangxi Oil-tea Camellia, College of Pharmacy and Life Science, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China)

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a Group 2A carcinogen and exerts cytotoxic and genotoxic effects. In China, high EC levels in baijiu have attracted extensive attention. In this study, the EC level, precursor content, and fluctuations in acidity during solid-state fermentation of strongly flavored and sesame-flavored baijius were investigated. In addition, the effects of pH, and urea and citrulline concentrations on EC formation during solid-state fermentation were analyzed through simulations. At the beginning of fermentation, the EC concentrations in the fermented grains of the two types of baijiu were $>20 \mu\text{g}/\text{kg}$. During fermentation, the fermented grains of the sesame-flavored baijiu displayed a significantly higher EC formation rate ($4.40 \times 10^{-7} \mu\text{mol}/\text{kg} \cdot \text{s}$) and a considerably higher EC content (140.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) than the grains of strongly flavored baijiu. EC accumulated in the fermented grains of the sesame-flavored baijiu during the second to fourth weeks of fermentation. During the first three weeks of fermentation, the ethanol and urea contents of the fermented grains in sesame flavored and strong flavored baijiu rose by 679.31%~181.89% and 87.54%~117.87%, respectively. Cumulative citrulline concentrations were higher after three weeks of fermentation. Although EC concentrations exhibited no significant correlations with

引文格式:

李拥军,陈雯,皮小弟,等.芝麻香型与浓香型白酒固态发酵过程中氨基甲酸乙酯的形成研究[J].现代食品科技,2021,37(8):67-74

LI Yong-jun, CHEN Wen, PI Xiao-di, et al. Ethyl carbamate formation during solid-state fermentation of sesame-flavored and strongly flavored Baijiu [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 67-74

收稿日期: 2021-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060578)

作者简介: 李拥军(1980-), 男, 博士, 高级农艺师, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 周凯(1990-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵食品安全

citrulline or urea concentrations during grain fermentation in sesame-flavored baijiu, simulation revealed that addition of urea and citrulline increased EC content by 23.70-84.82%. Furthermore, urea promoted EC formation more vigorously than citrulline. Lastly, a pH lower than 4.0 promoted EC formation during early stage fermentation. These findings provide new strategies to reduce the EC accumulation in baijiu during fermentation.

Key words: solid-state fermentation; baijiu; ethyl carbamate; precursor

白酒是“世界八大烈酒”之一，由于其独特的风味和悠久的饮酒文化，深受我国广大消费者的青睐。然而饮酒时也可能摄入一些有害物质，如氨基甲酸乙酯（EC），一种 2A 类的致癌物（国际癌症研究机构，IARC，2007），普遍存在于发酵食品与酒精饮料中^[1]。针对饮酒摄入的高风险水平的 EC，许多国家已经制定了严格的限量标准，例如加拿大和捷克规定谷物蒸馏酒中 EC 含量不得超过 150 $\mu\text{g/L}$ ^[2]。近年来发现，我国的部分地区白酒中 EC 含量超过了这一水平，最大含量高达 1680 $\mu\text{g/kg}$ ，严重影响了我国白酒的世界化进程，危害了消费者健康^[3-5]。因此，降低白酒中 EC 含量势在必行。

迄今为止，饮料酒中的 EC 形成途径已有基本定论，主要是在生产过程中通过前体物质与乙醇发生反应形成 EC，目前发现的 EC 前体有：尿素、瓜氨酸、氨甲酰磷酸、焦碳酸二乙酯和氰酸^[2,6]。不同香型白酒的生产工艺各异，但均需要经过发酵和蒸馏两个步骤，现有研究表明尿素和瓜氨酸均显著影响 EC 形成^[7,8]。在蒸馏过程中，高温显著促进了前体物质与乙醇反应形成 EC；加上白酒“越酿越香”，贮藏时间长，也会形成大量的 EC，因此许多研究集中在揭示蒸馏与贮藏过程中 EC 形成规律^[9-11]。然而，前体物质中瓜氨酸与尿素的形成在很大程度上与发酵微生物有关，其中酿酒酵母能够将精氨酸大量转化成尿素，而具有精氨酸脱亚氨基（ADI）途径的细菌则能代谢精氨酸形成瓜氨酸^[1,5,6]，二者的积累均主要发生在酒醅发酵过程中。因此，本文选取了浓香型与芝麻香型两种具有代表性的白酒，探究白酒固态发酵过程中 EC 及其主要前体物质的形成规律，以期为针对性的减少 EC 含量提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

浓香型和芝麻香型固态酒醅取自安徽某酒厂，酒醅发酵时间跨度为 2020 年 9 月至 2020 年 11 月之间，由于窖池不同部位发酵差异较大，每次取样时将窖池深度分成四等分，在中间两等分点中靠近窖池中部取样，每个深度中取样三个位置，最后将上述样品混匀，共得约 1800 g 样品。

氨基甲酸乙酯（EC）、氨基甲酸丁酯（BC）、二氯甲烷、乙腈等色谱纯试剂购买于上海阿拉丁试剂公司，占吨醇、氢氧化钠、尿素、乙醇、瓜氨酸、精氨酸等分析纯购买于天津希恩思试剂公司。

1.2 试验方法

将获取的酒醅样品均分成三份后分装入无菌的自封袋内，密封后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保藏，待所有酒醅样品收集完成后再立即进行分析。

为了探究酒醅发酵过程中尿素与瓜氨酸对 EC 形成的影响，取发酵一周后的酒醅样品平均分成 2 份，每份 600 g，一份加入 60 mg 尿素（即酒醅中尿素含量增加了 100 mg/kg ），另一份加入 24 mg 瓜氨酸（即酒醅中瓜氨酸含量增加了 40 mg/kg ）。混合均匀各自分成三份后装入棕色试剂瓶中，密封后置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至窖池样品发酵结束。为了验证酒醅发酵初期 pH 值对 EC 形成的影响，将初始发酵酒醅 pH 值调节成 5、4.5、4 和 3.5（先测定酒醅 pH 值，利用乙酸/氢氧化钠溶液调节至相应 pH 值并记录消耗的体积，然后在酒醅中加入相应体积的乙酸/氢氧化钠溶液），分别装入棕色试剂瓶中，密封后置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养一周。

1.3 分析方法

1.3.1 氨基甲酸乙酯含量测定

样品前处理参考 GB 5009.223-2014 并稍做修改。在 50 mL 离心管中加入 5 g 样品和 50 μL BC 内标（1 $\mu\text{g/mL}$ ），再加入 10 mL 蒸馏水和 1 g 氯化钠，超声溶解混匀，5000 r/min 离心 5 min，将上清液加样至 CNW BOND 固相萃取小柱（上海安谱），静置 10 min 后，先用 15 mL 正己烷淋洗后，用 20 mL 5% 的乙酸乙酯-乙醚洗脱，控制洗脱流速 1 滴/s。将洗脱液收集到离心管后加入 2 g 无水硫酸钠除水后，室温下用氮气缓缓吹至近干，二氯甲烷定容至 1 mL，经 0.22 μm 的有机滤膜过滤后供 GC-MS 分析。

采用 VF-WAX（30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$ 、0.25 μm ）色谱柱，气相色谱质谱型号为 Agilent 7890A-5975C（美国安捷伦），色谱参数设置为：氦气为载气，流速为 1.0 mL/min。进样口和传输线温度分别为 220 $^{\circ}\text{C}$ 和 250 $^{\circ}\text{C}$ ，气体洗脱程序设置为初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 1 min，以

8 °C/min 加热至 180 °C 后再以 40 °C/min 加热至 240 °C, 保持 5 min, 不分流进样, 进样量为 1.0 μL。质谱参数设定为: 采用 EI 源, 电子能量 70 eV, 离子源温度为 230 °C。采用 SIM 模式扫描, 特征离子为 62、74 和 89, 为了提高灵敏度选择 62 为定量离子。

1.3.2 乙醇含量测定

取 10 g 样品置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 40 mL 蒸馏水, 充分混合振荡后过滤, 收集滤液后离心取上清液待测。乙醇测定采用重铬酸钾比色法^[12]: 重铬酸钾 (2 mL, 4%)、浓硫酸 (2.5 mL) 和 1 mL 样品加入 25 mL 比色管中, 混合后沸水浴 10 min, 冷却至室温后利用分光光度计测定 600 nm 吸光值, 通过标准曲线计算乙醇含量。

1.3.3 尿素含量测定

尿素含量采用轻工业行业标准 QB/T 4710-2014 进行测定, 取 1.3.2 中上清液待测样品 600 μL, 加入 400 μL 的占吨醇 (0.02 mol/L, 溶于正丙醇) 衍生化试剂, 并加入 100 μL 1.5 mol/L 的盐酸溶液, 漩涡震荡 1 min, 避光在 25 °C 下反应 30 min, 反应液经 0.22 μm 有机滤膜过滤后供高效液相色谱法结合荧光检测器分离检测。以保留时间定性, 采用峰面积外标法定量。色谱柱选择 ZORBAX SB-C18 柱, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。荧光检测器激发波长为 240 nm, 发射波长为 308 nm。

1.3.4 精氨酸与瓜氨酸含量测定

瓜氨酸和精氨酸的含量测定参考 Zhou^[13]的方法利用分光光度法稍加修改。将 40 g/L NaOH、80 g/L 甲萘酚和 0.5 mL/L 双乙酰 (用正丙醇溶解) 各 1 mL 加入 10 mL 比色管中, 然后加入 100 μL 适当稀释的样品 (或标准溶液), 混匀后在 30 °C 水浴中保温 15 min, 冷却室温后测 OD₅₄₀, 对应标准曲线中计算出精氨酸含量。取 2 mL 稀释的样品 (或标准溶液), 加入 1 mL 混合酸 (V/V=1:3) 和 0.125 mL 二乙酰-一肟 (30 g/L), 混匀后避光沸水浴 30 min, 继续避光冷却至室温后利用分光光度计测定 490 nm 下的吸光值, 通过标准曲线计算瓜氨酸含量。

1.3.5 pH 值与总酸含量测定

将 40 mL 蒸馏水与 10 g 样品置于 250 mL 锥形瓶中, 在 25 °C 条件下充分混合振荡 20 min, 采用 pH 计测定样品的 pH 值。将混合振荡的样品过滤, 稀释十倍后, 吸取 50 mL 样品于 25 mL 锥形瓶中, 加入酚酞指示剂后, 用氢氧化钠标准液滴定, 以 100 g 酒醅消耗的 NaOH 的毫摩尔数记为度。

1.4 数据处理

使用 SPSS 22 进行单因素方差分析与双变量相关性分析, 确定 $p < 0.05$ 的统计学上的显著性差异与 $p < 0.01$ 的极显著差异。采用 OriginPro 8.0 进行数据作图。

2 结果与分析

2.1 白酒固态发酵过程中氨基甲酸乙酯的形成

酒醅固态发酵过程中 EC 含量如图 1 所示, 酒醅发酵初期即检测出可观的 EC 含量, 芝麻香型和浓香型酒醅中分别为 29.39 μg/kg 和 20.37 μg/kg。两种香型酒醅发酵第 1 周 EC 含量均未显著变化, 随着发酵时间的延长, 酒醅中的 EC 含量逐渐增加。其中浓香型白酒 EC 形成速率较慢, 直到发酵末期才显著增加至 76.04 μg/kg, 其含量相比于发酵初期增加了 272.93%; 芝麻香型酒醅在发酵 2~4 周内 EC 含量急剧增加, 尽管发酵时间较浓香型酒醅短, 但芝麻香型酒醅中 EC 形成速率 (4.40×10^{-7} μmol/kg·s) 和含量 (140.55 μg/kg) 均显著高于浓香型酒醅 (图 1), 也显著高于酱油酱醅与酱香型白酒酒醅^[14,15], 但与报道的浓香型白酒酒醅相当^[16]。

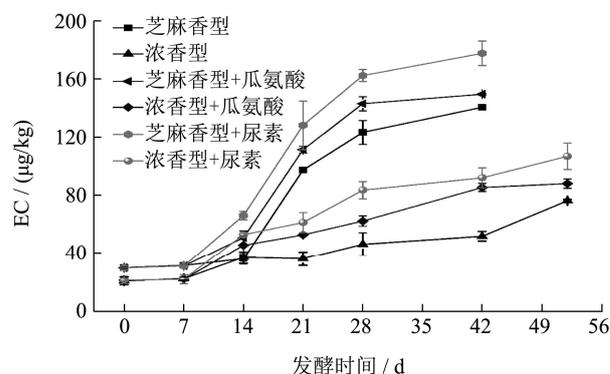


图 1 酒醅窖池发酵与模拟发酵过程中 EC 含量变化

Fig.1 Time-dependent actual and simulated variation in EC concentration of fermenting grains during Baijiu preparation

2.2 白酒固态发酵过程中氨基甲酸乙酯相关前体物质含量变化

乙醇是酒醅发酵主要产物, 也是检测酒醅发酵品质的重要指标之一。固态酒醅中乙醇含量随着发酵时间的延长逐渐增加 (图 2), 其中芝麻香型酒醅在发酵 3 周后乙醇含量达到稳定, 为 4.52%~4.66%, 浓香型酒醅发酵 1 周后乙醇含量迅速增加至 3.25%, 随着发酵时间延长缓慢增加至 4.02%。经测定, 酒醅中水分含量在 60% 左右, 根据乙醇和前体物质的摩尔质量计算, 乙醇摩尔质量浓度为瓜氨酸和尿素的 $10^2 \sim 10^3$ 倍,

即在整体发酵过程中 EC 形成阶段,乙醇含量均为过量状态。

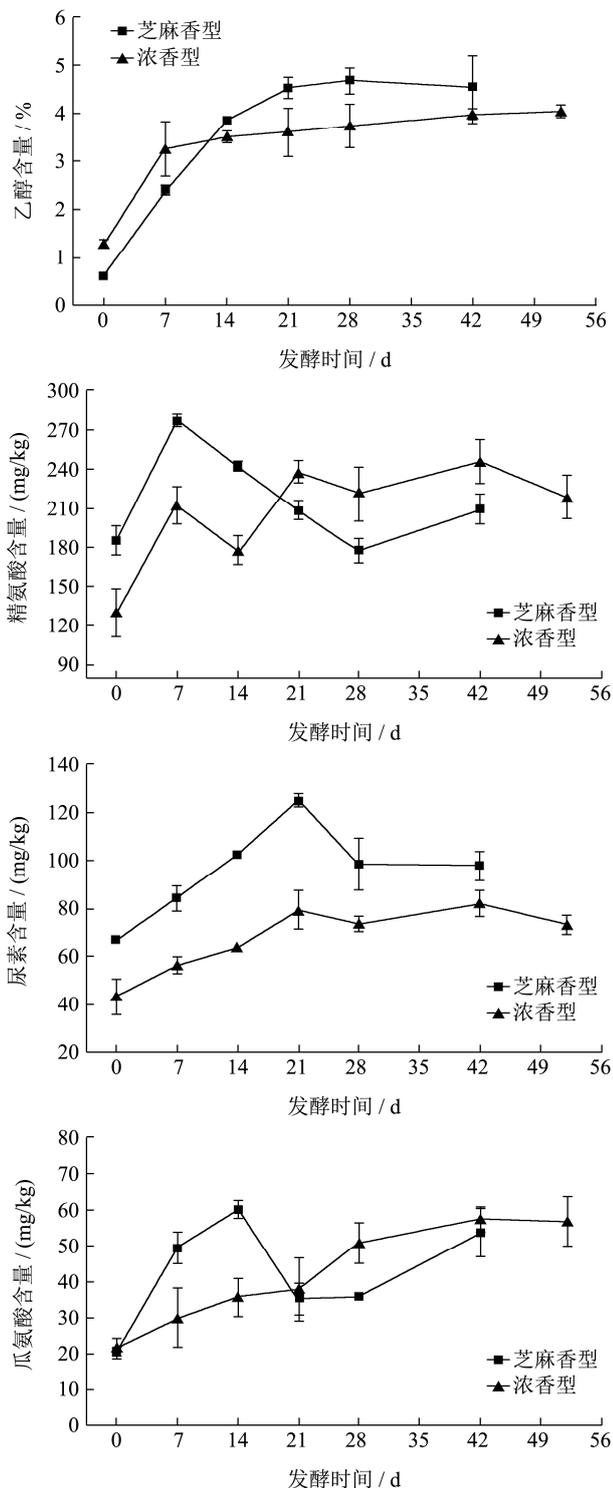


图2 白酒固态发酵过程中乙醇、精氨酸、瓜氨酸与尿素含量变化情况

Fig.2 Ethanol, arginine, citrulline, and urea concentrations over the course of solid-state Baijiu fermentation

浓香型白酒固态发酵过程中游离精氨酸含量呈现波浪式上升趋势(图2),从发酵初期的129.66 mg/kg

增加到218.69 mg/kg。而在芝麻香型酒醅中,精氨酸含量在发酵第1周增加至最高(276.98 mg/kg),发酵2~4周内精氨酸含量逐渐降低,经过最后2周发酵精氨酸含量增加至209.46 mg/kg。精氨酸是一种蛋白质氨基酸,游离的精氨酸主要通过蛋白质水解微生物转化获得,EC重要前体物质瓜氨酸与尿素则主要由微生物代谢精氨酸产生^[6]。尿素主要通过酵母的尿素循环产生,在氮代谢阻遏效应调控下造成尿素的积累^[5,6]。本研究中的两种香型的白酒酒醅中尿素在发酵前3周均显著增加,这与乙醇的积累结果一致(图1)。芝麻香型酒醅发酵末期尿素含量较浓香型酒醅高约25 mg/kg。瓜氨酸含量变化在两种香型酒醅发酵过程中表现不同:在芝麻香型酒醅中,发酵前两周内的瓜氨酸含量持续增加,但在第三周急剧下降,在发酵末期提高至53.56 mg/kg;在浓香型酒醅中,瓜氨酸含量在整个发酵过程中均持续增加,最终含量为56.67 mg/kg。发酵过程中瓜氨酸的积累主要由具有精氨酸脱亚氨基途径(ADI途径)的细菌代谢精氨酸产生^[17],两种香型酒醅的瓜氨酸在发酵中后期积累较多,研究此发酵阶段的细菌代谢精氨酸规律有利于控制瓜氨酸的积累。

2.3 白酒固态发酵过程中 pH 值及酸度指标的变化

白酒酒醅固态发酵过程中,水分含量维持在40%~60%,大量特定微生物在此环境中生长代谢,环境中的酸度和 pH 值对优势菌生长代谢影响很大,是酒醅群落演替中关键推动力^[18]。因此,监测酒醅中总酸度与 pH 值,对于了解发酵安全与品质十分必要。如图3所示,酒醅中总酸度随着发酵时间的延长而升高,pH 值则下降。其中芝麻香型酒醅初始总酸度高于浓香型,pH 值则低于浓香型酒醅。随着发酵时间延长,浓香型酒醅的总酸度增加速度和 pH 值下降速度均高于芝麻香型酒醅,但并不同步进行。浓香型酒醅的总酸度在发酵3周后才超过芝麻香型酒醅,而 pH 值则在第2周内即低于芝麻香型酒醅。值得注意的是,白酒固态发酵1周时 pH 值均升高,发酵2周后两种白酒酒醅的 pH 值均维持在4.0以下,这有助于乳酸菌生长代谢^[19],也有助于 EC 的形成^[20]。曹云刚^[21]指出酒醅总酸度的变化趋势与 pH 值大体一致,但并不完全相同,在汾酒酒醅中发酵初期的总酸度增加,pH 值反而略有上升,这与本研究中的两种酒醅一致,浓香型白酒总酸度与 pH 值变化更大。

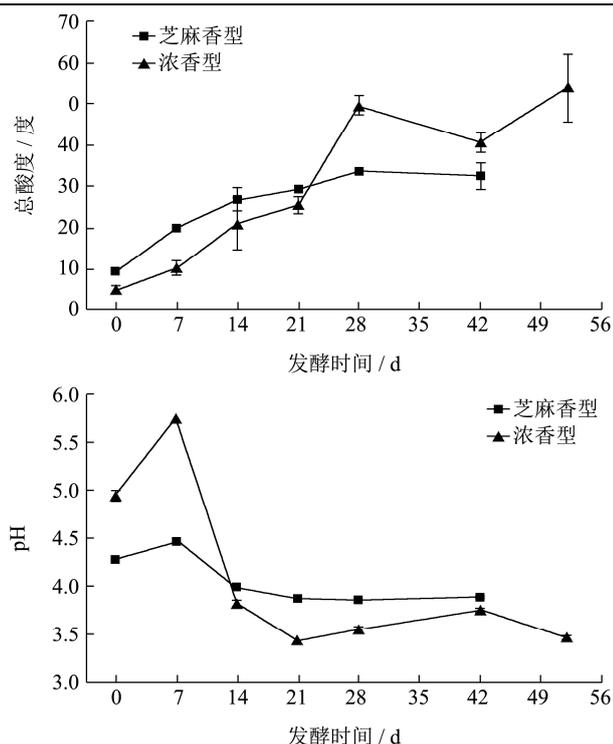


图3 白酒固态发酵过程中总酸度及pH值变化情况

Fig.3 Changes in total acidity and pH over the course of solid-state Baijiu fermentation

2.4 酒醅发酵过程中EC与主要指标相关性分析

芝麻香型和浓香型白酒酒醅固态发酵过程中 EC

表1 芝麻香型白酒固态发酵过程中 EC、乙醇、尿素、精氨酸、瓜氨酸、总酸度和 pH 值之间的相关性分析

Table 1 Correlation coefficients between EC, ethanol, urea, arginine, and citrulline contents, total acidity, and pH during grain fermentation in sesame-flavored Baijiu

项目	乙醇	尿素	瓜氨酸	精氨酸	总酸度	pH 值
EC	0.767**	0.492	0.055	-0.519	0.817**	-0.768**
乙醇		0.839**	0.442	-0.122	0.963**	-0.818**
尿素			0.343	-0.034	0.728**	-0.698*
瓜氨酸				0.723**	0.408	-0.069
精氨酸					-0.169	0.547
总酸度						-0.779**

注：其中**表示相关性在 0.01 水平上显著(双尾)。*表示相关性在 0.05 水平上显著(双尾)，下同。

表2 浓香型白酒固态发酵过程中 EC、乙醇、尿素、精氨酸、瓜氨酸、总酸度和 pH 值之间的相关性分析

Table 2 Correlation coefficients between EC, ethanol, urea, arginine, and citrulline contents, total acidity, and pH during grain fermentation in strongly flavored Baijiu

项目	乙醇	尿素	瓜氨酸	精氨酸	总酸度	pH 值
EC	0.663**	0.593*	0.875**	0.435	0.888**	-0.520
乙醇		0.819**	0.784**	0.806**	0.749**	-0.952**
尿素			0.787**	0.883**	0.727**	-0.743**
瓜氨酸				0.663**	0.924**	-0.635*
精氨酸					0.596*	-0.733**
总酸度						-0.626**

及其相关指标的相关性分析分别如表 1 和表 2 所示，两种酒醅发酵过程中乙醇与总酸度和 pH 值变化显著相关，这与固态发酵过程中优势微生物生长相关^[18]；EC 含量与乙醇含量和总酸度在两种酒醅中均呈极显著正相关；尿素与瓜氨酸在芝麻香型白酒固态发酵过程中与 EC 相关性均不显著 ($p>0.05$)；在浓香型白酒固态发酵过程中 EC 与瓜氨酸呈极显著正相关，与尿素含量显著相关。以上结果可能的原因有：1) pH 值影响瓜氨酸和尿素与乙醇反应形成 EC，本研究中发现两种酒醅 pH 值在 4.0 时 EC 开始显著积累，发酵 2 周后酒醅 pH 值接近 4.0，尽管前两周瓜氨酸和尿素含量均有增加，但 EC 积累呈现滞后趋势；2) 由于酒醅发酵温度较低（酒醅温度为 32 °C~38 °C），瓜氨酸与尿素形成 EC 的转化率极低（约 10^{-3} ），前体物质的变化并不全部形成 EC；3) 酒醅为固态发酵，水分含量约 50%，大部分只是浸润发酶基质，并不形成一个连续的溶剂环境，导致部分微生物代谢形成的前体物质并不能迅速转化成 EC。在两种酒醅发酵过程中精氨酸与瓜氨酸的含量均呈极显著相关，而与尿素相关性不显著。尿素可从发酵原料中带入，也能通过精氨酸转化形成；而瓜氨酸是一种非蛋白质氨基酸，主要通过微生物代谢产生^[5,6]。近年来随着对瓜氨酸积累关键发酵细菌的深入研究，有望通过调节精氨酸代谢来降低瓜氨酸含量，进而控制 EC 积累。

2.5 pH 值、尿素与瓜氨酸对白酒固态发酵过

程中氨基甲酸乙酯形成的影响

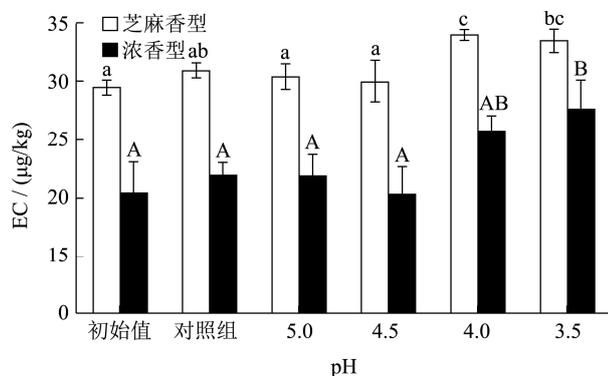


图4 pH 值对酒醅发酵初期 EC 形成的影响

Fig.4 Effects of pH on EC formation during early stage Baijiu fermentation

注: 不同上标大小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著。

为了深入验证发酵初期 pH 值对 EC 积累的影响并探究发酵过程中尿素与瓜氨酸形成 EC 的能力, 将发酵初期酒醅 pH 值调节成 3.5~5, 另在发酵 1 周的酒醅中添加尿素与瓜氨酸 (添加含量为酒醅发酵阶段尿素与瓜氨酸含量平均值的近似值, 分别为 100 mg/kg 尿素与 40 mg/kg 瓜氨酸) 后, 进行模拟发酵, 其结果见图 1 与图 4。如图 1 所示, 添加了尿素与瓜氨酸后, 两种酒醅随着发酵时间的延长, 处理组中 EC 含量均显著高于对照组。假设添加的瓜氨酸与尿素只参与 EC 形成, 则瓜氨酸与尿素在芝麻香型酒醅中转化率 (增加的 EC 物质的量/添加的尿素或瓜氨酸物质的量) 分别为 4.43×10^{-4} 和 2.50×10^{-4} , 在浓香型酒醅中转化率分别为 5.85×10^{-4} 和 2.06×10^{-4} , 即瓜氨酸在酒醅中转化成 EC 能力高于尿素。但实际上, 尿素与瓜氨酸不只参与形成 EC, 且酒醅中尿素含量远高于瓜氨酸 (图 2), 尿素处理组形成的 EC 含量均显著高于瓜氨酸添加组。在添加尿素与瓜氨酸后 3 周后, 处理组酒醅与对照组酒醅 EC 含量差值不再增加, 在浓香型酒醅中反而有所降低。以上现象表明: 1) 酒醅中尿素与瓜氨酸均能够促进 EC 的积累, 由于酒醅中尿素含量更高, 形成的 EC 更多; 2) 尿素与瓜氨酸均由酒醅中部分微生物产生, 且浓度远低于乙醇, 由于酒醅是固态发酵, 酒醅中形成的尿素和瓜氨酸与乙醇反应能力显著弱于在溶液环境中, EC 转化率很低; 3) 在酒醅发酵后期, 尿素与瓜氨酸趋于动态平衡, EC 的形成逐渐稳定。芝麻香型和浓香型酒醅发酵初始时 pH 值分别为 4.26 和 4.93, 调节酒醅 pH 值后发酵 1 周 EC 含量如图 4 所示。将两种香型酒醅 pH 值调节为 4.0 以下, EC 形

成量均高于对照组, 其中芝麻香型和浓香型酒醅 pH 值分别调节为 4.0 和 3.5 的处理组在发酵 1 周后 EC 含量显著高于初始值、对照组、pH 值为 5 和 4.5 的处理组。故推断发酵初期 pH 值可能是影响 EC 形成的重要因素之一。

3 讨论

我国白酒香型分类较多, 生产工艺各异, 本文选取了浓香型与芝麻香型两种白酒, 分析其酒醅在发酵过程中的 EC 形成情况。浓香型酒醅由白酒母糟蒸馏后拌曲制备, 而芝麻香型酒醅发酵前需要经过高温堆积^[22], 图 1 显示酒醅固态发酵初期就能检测出可观的 EC 含量, 在芝麻香型和浓香型酒醅中含量分别为 29.39 μg/kg 和 20.37 μg/kg。根据浓香型生产工艺推测, 浓香型酒醅发酵初期 EC 主要来源于母糟蒸馏后残留, 除去蒸酒后样品中的 EC 及其前体有利于降低酒醅中 EC 含量; 而芝麻香型酒醅 EC 来源于高温堆积过程 (原料蒸料摊凉后并未检出 EC), 以堆积时间约 3 d 计算, EC 形成速率为 $1.27 \times 10^{-6} \mu\text{mol/kg} \cdot \text{s}$, 显著高于窖池中芝麻香型酒醅发酵时产生 EC 的速率。尽管芝麻香型白酒酒醅堆积过程中 EC 前体物质含量均低于窖池发酵, 但酒醅在堆积过程中温度 (45~50 °C) 显著高于在窖池中的发酵温度 (一般不超过 40 °C), 说明温度对 EC 形成速率影响极大, 控制发酵温度是关键。

随着酒醅发酵时间的延长, EC 含量逐渐增加, 相比于发酵初期, 发酵末期的浓香型酒醅和芝麻香型酒醅 EC 含量分别增加了 111.16 μg/kg 和 55.65 μg/kg, 酒醅中的 EC 很容易在蒸馏过程中转移至白酒中^[9,23]。因此研究不同香型酒醅发酵过程中 EC 变化规律, 针对性的控制酒醅发酵过程中 EC 形成十分必要。本研究中芝麻香型酒醅在发酵过程中积累的 EC 含量为浓香型白酒醅的近两倍, 也普遍高于其他白酒^[4,8,21], 需要重点关注。两种酒醅发酵过程 EC 主要形成期不同, 芝麻香型酒醅 EC 含量在发酵 2~4 周增加迅速, 占总增加量的 83.02%; 而浓香型酒醅发酵最后 10 d EC 含量占总增加量的 44.06%, 为主要积累期。

在不同香型白酒及其生产工艺阶段中, EC 主要前体物质有极大差别。梁晨^[14]分析了芝麻香型白酒与酱香型白酒在发酵过程中 EC 与尿素含量变化情况, 发现尿素与 EC 含量变化显著相关, 而瓜氨酸含量变化与 EC 变化不显著, 指出尿素是两种香型白酒中 EC 形成的主要前体物质, 林建春^[7]的结果也支持该结论, 但二者均未通过发酵添加实验去验证。仇钰莹^[8]认为原酒中 EC 的主要前体物质是尿素和瓜氨酸, 且酒醅

发酵过程中瓜氨酸含量增幅达 63.90%。本研究中两种酒醅在发酵过程中瓜氨酸增加量均高于尿素含量,且浓香型白酒酒醅中瓜氨酸与 EC 含量变化呈极显著相关(图 2)。瓜氨酸沸点低于尿素,在白酒实际生产过程中,瓜氨酸对白酒蒸馏阶段与储酒阶段的 EC 含量的影响不可忽视^[10]。在模拟实验中发现,添加的瓜氨酸和尿素均能显著增加酒醅中 EC 含量,尿素处理组形成的 EC 含量均显著高于瓜氨酸添加组。

酒醅发酵 1 周时尿素、瓜氨酸与乙醇含量均显著增加,但 EC 含量直到第二周才显著增加。分析发现 EC 与酸度和 pH 值具有较高的相关性,且发酵 1 周内酒醅 pH 值均高于 4.0,推测 pH 值对发酵初期 EC 形成有影响。目前只有少数研究关注 pH 值对 EC 积累的影响,周佳^[24]发现低 pH 值环境下能够阻碍腐乳中 EC 形成,但在酱油模拟灭菌过程中 pH 值在 5.0 以下 EC 形成显著增加^[15],大多数模拟 EC 形成条件时均采用 pH 值为 4.5 左右的酸性环境^[22,23],推测低 pH 值环境有助于 EC 的形成。模拟实验结果显示,酒醅发酵一周后在 pH 值为 4.0 和 3.5 的处理组中 EC 含量相比于对照组显著增加 ($p < 0.05$),而 pH 值高于 4.0 则变化不大,故推断 pH 值可能是影响发酵初期 EC 形成的重要因素,但在酒醅 pH 值在 4.0 和 3.5 时对 EC 形成影响不大(图 4)。

4 结论

4.1 两种香型白酒酒醅在固态发酵初期均检测到 EC,芝麻香型和浓香型白酒酒醅发酵过程中 EC 积累量远高于发酵初期。酒醅发酵初期 EC 形成主要受 pH 值影响,酒醅 pH 值低于 4.0 有利于 EC 的形成。芝麻香型酒醅 EC 主要积累期为发酵 2~4 周,占整个发酵过程中 EC 形成量的 83.02%,浓香型酒醅 EC 主要积累于发酵后期。

4.2 两种香型白酒酒醅在发酵过程中瓜氨酸增加量均高于尿素。尿素在发酵前 3 周含量显著增加,而瓜氨酸主要积累于发酵后期。在模拟实验中发现,添加的瓜氨酸和尿素均能显著增加酒醅中 EC 含量,尿素在酒醅发酵环境中转化成 EC 含量更多。

参考文献

[1] 周凯,唐冰娥,徐振林,等.发酵食品中氨基甲酸乙酯形成机理和快速检测方法研究进展[J].生物加工过程,2018,16(2):31-41
ZHOU Kai, TANG Bing-e, XU Zhen-lin, et al. Research progress in formation and rapid detection of ethyl carbamate in fermentation foods [J]. Chinese Journal of Bioprocess

Engineering, 2018, 16(2): 31-41
[2] JIAO Zhi-hua, DONG Ya-chen, CHEN Qi-he. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13(4): 611-625
[3] 孙枫林.青岛市市北区居民主要饮用酒中氨基甲酸乙酯的暴露评估[D].青岛:青岛大学,2018
SUN Feng-lin. Exposure assessment of ethyl carbamate from main drinking liquor in Shibei district residents, Qingdao [D]. Qingdao: Qingdao University, 2018
[4] 姚晓洁,谷瑞丽,姬建生,等.白酒中氨基甲酸乙酯含量检测及在不同香型白酒中的含量分析[J].食品安全导刊,2019,18: 136-138
YAO Xiao-jie, GU Rui-li, JI Jian-sheng, et al. Determination of ethyl carbamate in liquor and analysis of ethyl carbamate in different flavor liquor [J]. China Food Safety Magazine, 2019, 18: 136-138
[5] CHEN Da-wen, REN Yi-ping, ZHONG Qi-ding, et al. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from China: levels, dietary intake, and risk assessment [J]. Food Control, 2017, 72: 283-288
[6] Gowd Vemana, Su Hong-ming, Karlovsky Petr, et al. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant [J]. Food Chemistry, 2018, 248: 312-321
[7] 林建春.清香型白酒固态发酵过程中酵母群体代谢尿素特征研究[D].无锡:江南大学,2017
LING Jiang-chun. Urea metabolic characteristics of yeast community in solid-state fermentation of Chinese light-aroma liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
[8] 仇钰莹.浓香型白酒中氨基甲酸乙酯形成途径解析[D].无锡:江南大学,2016
QIU Yu-ying. Analysis of ethyl carbamate formation during Luzhou-flavor spirits fermentation process [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
[9] 张庄英.白酒蒸馏和贮存过程中氨基甲酸乙酯的研究[D].无锡:江南大学,2014
ZHANG Zhuang-ying. Research of ethyl carbamate during the distillation and storage of Chinese liquors [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014
[10] FANG Fang, QIU Yu-ying, DU Guo-cheng, et al. Evaluation of ethyl carbamate formation in Luzhou-flavor spirit during distillation and storage processes [J]. Food Bioscience, 2018, 23: 137-141
[11] Nóbrega Ian C C, Pereira José A P, Paiva José E, et al. Ethyl

- carbamate in Cachaça (Brazilian sugarcane spirit): extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1243-1247
- [12] Williams M B, Reese H Darwin. Colorimetric determination of ethyl alcohol [J]. *Analytical Chemistry*, 1950, 22(12): 1556-1561
- [13] ZHOU Wan-yi, FANG Ruo-si, CHEN Qi-he. Effect of gallic and protocatechuic acids on the metabolism of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine brewing [J]. *Food Chemistry*, 2017, 233(15): 174
- [14] 梁晨. 固态白酒发酵中氨基甲酸乙酯变化规律及相关微生物代谢特征研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016
- LIANG Chen. Changes in the content of ethyl carbamate and metabolic characteristics of related microorganisms during fermentation process of solid-state Chinese liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [15] ZHOU Kai, Siroli Lorenzo, Patrignani Francesca, et al. Formation of ethyl carbamate during the production process of Cantonese soy sauce [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1747
- [16] 范文来, 徐岩, 史斌斌. 酒醅发酵过程中氨基甲酸乙酯与尿素的变化[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 171-174
- FAN Wen-lai, XU Yan, SHI Bin-bin. Evolvement of ethyl carbamate and urea from fermented grains in the fermentation process of Chinese liquor [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(23): 171-174
- [17] Azevedo Zelia, Couto José-antônio, Hogg Timothy-a. 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*, 2010, 34(1): 32-36
- [18] 李小龙, 吴群, 徐岩. 乙醇与酸度协同作用推动芝麻香型白酒固态发酵过程的微生物群落演替[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(1): 1-10
- LI Xiao-Long, WU Qun, XU Yan. Synergism between ethanol and acidity drives microbial community succession during roasted sesame-flavor liquor solid-state fermentation [J]. *Microbiology China*, 2019, 46(1): 1-10
- [19] 刘凡, 仇钰莹, 周新虎, 等. 洋河浓香型白酒酒醅中产酸细菌与有机酸合成的相关性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(12): 22-29
- LIU Fan, QIU Yu-ying, ZHOU Xin-hu, et al. The correlation between organic acid producing bacteria and organic acids biosynthesis in fermented grains of Yanghe strong-aroma spirit [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(12): 22-29
- [20] ZHOU Kai, Patrignani Francesca, SUN Yuan-ming, et al. Inhibition of ethyl carbamate accumulation in soy sauce by adding quercetin and ornithine during thermal process [J]. *Food Chemistry*, 2020, 343(5): 128528
- [21] 曹云刚, 马丽, 杜小威, 等. 汾酒酒醅发酵过程中有机酸的变化规律[J]. *食品科学*, 2011, 32(7): 229-232
- CAO Yun-gang, MA Li, DU Xiao-wei, et al. Variation of organic acids in fermented grains during fermentation of Fen liquor [J]. *Food Science*, 2011, 32(7): 229-232
- [22] LIU Hui-lin, SUN Bao-guo. Effect of fermentation processing on the flavor of baijiu [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66: 5425-5432
- [23] LI Guo-hui, ZHONG Qi-ding, WANG Dao-bing, et al. Determination and formation of ethyl carbamate in Chinese spirits [J]. *Food Control*, 2015, 56: 169-176
- [24] 周佳, 罗婷婷, 成长玉, 等. 腐乳生产及储存过程中氨基甲酸乙酯含量控制策略[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(16): 4280-4285
- ZHOU Jia, LUO Ting-ting, CHENG Chang-Yu, et al. Control strategy of ethyl carbamate during the production and storage of fermented bean curd [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(16): 4280-4285