

传统黄酒发酵中氨基甲酸乙酯前体物质代谢规律的研究

王 宾¹, 杨 勇²

(1.石河子大学食品学院,新疆 石河子 832000;2.中国计量学院标准化学院,浙江 杭州 310018)

摘 要: 氨基甲酸乙酯是黄酒中一种主要的致癌物质。从下沙黄酒厂取得酵母和麦曲,通过模拟黄酒的发酵过程,利用分光光度法和平板计数法,详细研究了黄酒发酵过程中氨基甲酸乙酯相关前体物质的变化规律,并结合菌落生长规律,探讨其代谢机理。结果表明,黄酒酿造工艺中的浸米阶段会形成瓜氨酸积累,因此,在回加酸浆水的工艺中,浸米时间不宜过长;发现麦曲糖化阶段也有瓜氨酸的积累,需要在酿造工艺中予以重视。

关键词: 氨基甲酸乙酯; 黄酒; 代谢规律; 瓜氨酸

中图分类号:TS262.4;TS261.4;TS261.7 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)05-0026-05

Study on the Metabolic Rules of Ethyl Carbamate Precursor in the Fermentation Process of Traditional Yellow Rice Wine

WANG Bin¹ and YANG Yong²

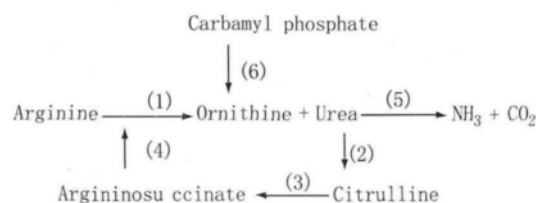
(1.Food Science College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000;2.College of Standardization, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

Abstract: EC (ethyl carbamate) is a main kind of genotoxic carcinogens in yellow rice wine. In the experiment, *saccharomyces cerevisiae* and wheat starter were obtained from Xiasha Winery, then through the simulation of yellow rice wine fermentation process, the metabolic rules of EC precursor in the fermentation process were studied by spectrophotometry and plate count method, and its metabolic mechanism was further investigated based on its metabolic rules combined with its colony growth rules. The experimental results suggested that citrulline was accumulated mainly in rice steeping stage. Accordingly, long-time rice steeping is not recommended. Besides, the accumulation of citrulline was also found in the saccharifying process of wheat starter, which should be considered in practice.

Key words: ethyl carbamate; yellow rice wine; metabolic rules; citrulline

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, EC, 又叫 Urethane)是一种基因致癌物。世界卫生组织也提议规定酒类饮料中 EC 的限量标准。美国和加拿大都已经制订了酒精饮料中氨基甲酸乙酯的限量标准^[1]。在氨基甲酸乙酯的形成过程中,瓜氨酸是其重要的前体物质,而在乳酸菌和酵母菌中精氨酸的代谢过程中都有瓜氨酸的产生^[2]。酵母降解精氨酸是通过尿素循环途径实现的^[3-7],反应见图 1。

乳酸菌降解精氨酸是通过精氨酸脱亚氨基酶途径(Arginine deiminase pathway, 简称 ADI 途径)进行^[8-11]。本实验通过对黄酒发酵过程中 3 种氨基酸的检测,研究了黄酒发酵过程中 3 种氨基酸的变化规律,为控制黄酒



注:(1)精氨酸酶;(2)鸟氨酸 氨甲酰转移酶;(3)精氨琥珀酸合成酶;(4)精氨琥珀酸裂解酶;(5)脲酶;(6)氨甲酰磷酸合成酶。

图 1 酵母降解精氨酸图

发酵过程中氨基甲酸乙酯含量提供理论依据。

收稿日期:2013-01-07

作者简介:王宾(1988-),男,山东菏泽人,石河子大学食品学院硕士,主要从事食品安全与检测方向的研究,E-mail:llll3488@163.com。

通讯作者:杨勇(1973-),男,江南大学博士,江南大学中粮屯河集团联合培养博士后,中国计量学院食品标准化研究所所长,E-mail:keviny126@126.com。

优先数字出版时间 2013-04-03;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130403.0941.006.html>。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

菌株:麦曲和酒母取自下沙黄酒厂。

试剂:精氨酸,瓜氨酸,鸟氨酸,乙酸, α -萘酚,2,3-丁二酮,NaOH,磷酸,二乙酰-肟,茚三酮,均为国产分析纯;水为桶装纯净水。

仪器设备:Boxun 洁净工作台,上海;精宏恒温培养箱,上海;精宏恒温水浴锅,上海;志威恒温磁力搅拌器,上海;721 可见分光光度计,上海;SL-N 电子天平,上海;不锈钢压力蒸汽灭菌锅,上海。

1.2 试验方法

1.2.1 测定方法

活菌计数采用平板计数法,平行实验 2 次,取平均值。发酵参数参考自下沙黄酒厂。

氨基酸测定方法:精氨酸的测定参照贺小贤等的方法^[12];瓜氨酸的测定参照李加友等的方法^[13];鸟氨酸的测定参照黄爱清等的方法^[14]。

1.2.2 氨基酸标准曲线的绘制

精氨酸标准曲线绘制:在精氨酸含量为 0~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内,得回归方程为 $Y=0.024+0.005\times X$,线性相关系数 $R=0.995$ 。

瓜氨酸标准曲线绘制:在瓜氨酸含量为 0~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内,得回归方程为 $Y=-0.05+0.0075\times X$,线性相关系数 $R=0.997$ 。

鸟氨酸标准曲线绘制:在鸟氨酸含量为 0~150 $\mu\text{g/L}$ 范围内,得回归方程为 $Y=8\times 10^{-5}+0.00959\times X$,线性相关系数 $R=0.999$ 。

2 结果与分析

2.1 先酒化后糖化发酵法

先加入酒母后加入麦曲,考察氨基酸和酵母菌浓度的变化情况。将 200 g 大米浸泡 18 h,添加适量的水,蒸煮 30 min 后加入 10 g 酒母,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,每隔 12 h 测试 1 次,3 d 后加入麦曲 20 g,继续发酵至 7 d 时即发酵结束。

由表 1 可知,本过程可以分为 2 个阶段,0~72 h 为酒化阶段,此阶段先加入了酵母菌进行酒化。由酵母菌浓度数据分析可知 0~24 h 为延迟期,此后为指数期。

在 72 h 时,加入麦曲,从而进入了糖化阶段。由于该过程加入了较多的水,并且麦曲中的微生物对酵母菌有竞争作用,因此,在糖化的初始阶段,酵母菌浓度略微下降,随后又开始增长,在 120 h 后,由于营养物质消耗殆尽,酵母菌浓度逐渐降低。因为麦曲中微生物群的竞争作用,糖化阶段酵母菌的浓度比酒化阶段要低。

表 1 先酒化后糖化流程酵母菌浓度变化

发酵时间(h)	酵母菌浓度(个/mL)
12	3×10^5
24	9×10^7
36	1.2×10^8
48	1.8×10^8
60	1.4×10^9
72(加入麦曲)	—
84	6.5×10^8
96	5.3×10^7
108	4×10^8
120	7×10^8
132	8×10^7
156	5×10^6

对发酵过程各氨基酸浓度变化情况进行分析,结果见图 2~图 4。

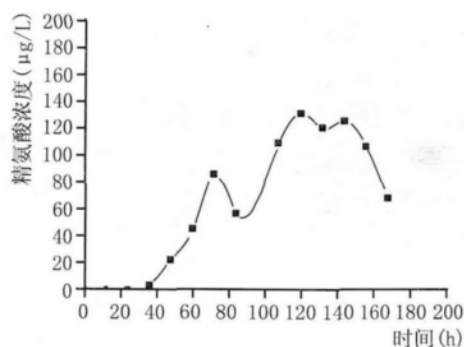


图 2 先酒化后糖化流程精氨酸的含量变化

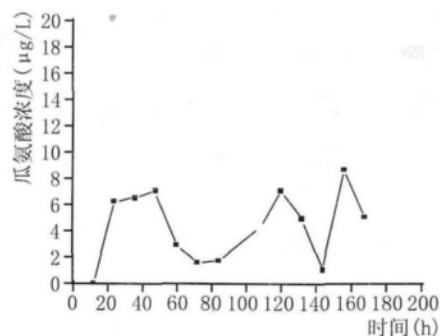


图 3 先酒化后糖化流程瓜氨酸的含量变化

由图 2~图 4 可知,精氨酸浓度在酒化阶段一直是增长的,在进入指数期后增长速度较快。瓜氨酸的浓度则在最初迅速增长到达较大的浓度,随后出现了降低;鸟氨酸浓度的变化和精氨酸类似,在进入指数期后浓度开始较快增长。在糖化阶段,精氨酸的浓度先出现了降低,这与加入了大量的水降低了精氨酸的相对浓度有关,随后开始逐渐上升,在 120 h 时达到了峰值,此时也是酵母菌稳定期的最后阶段,随后精氨酸浓度随着菌落的衰亡期逐渐下降。在酒化阶段的末尾,瓜氨酸的浓度已经开始降低,随后在加入麦曲后,瓜氨酸浓度又开始升高,但值得

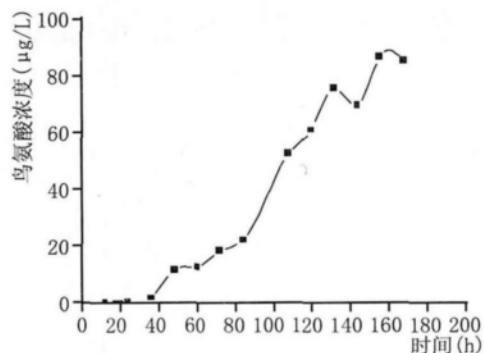


图4 先酒化后糖化流程鸟氨酸的含量变化

注意的是,在140 h时,瓜氨酸浓度突然降低,随后又升高。由于麦曲中的微生物数目较多,尚不清楚其代谢机理,有待进一步研究。

2.2 酒化糖化同时进行的影响

同时加入酒母和麦曲,观察氨基酸和酵母菌浓度的变化情况。取200 g大米,浸米18 h,然后适量加水蒸煮30 min,待冷却后,同时加入酒母10 g,麦曲27 g,凉开水300 g,发酵,每12 h测试1次氨基酸的含量并进行活菌计数。酵母菌浓度变化结果见表2;各氨基酸浓度变化结果见图5~图7。

表2 酒化糖化同时进行流程酵母菌浓度变化

时间(h)	酵母菌浓度(个/mL)
12	3.0×10^6
24	2.2×10^7
36	4.5×10^7
48	2.2×10^7
60	1.2×10^7
84	5.0×10^6

由表2可以看出,由于同时加入麦曲和酒母,微生物间竞争比较激烈,导致酵母菌浓度比试验2.1中的要低。由于同时加入了酒母和麦曲,微生物生长较快,对营养物质的消耗比较快,因此,与试验2.1相比,缩短了发酵的时间,为84 h。

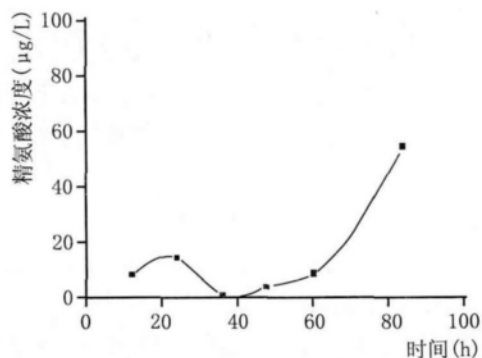


图5 酒化糖化同时进行流程精氨酸浓度变化

由图5~图7可知,精氨酸在初始阶段,有较少的生成量,但是随后开始迅速下降,在36 h时甚至降为零,然

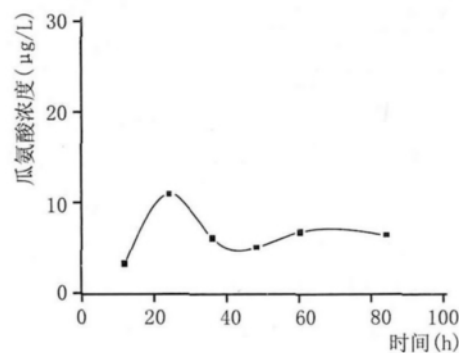


图6 酒化糖化同时进行流程瓜氨酸浓度的变化

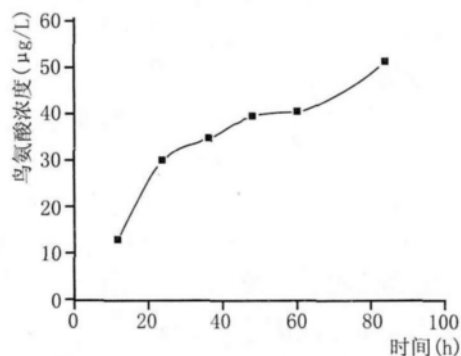


图7 酒化糖化同时进行流程鸟氨酸浓度变化

后又开始缓慢上升,但其浓度依然比试验2.1中要低。在初始阶段,瓜氨酸浓度较快升高,24 h达到顶峰,随后开始下降到5 μg/L,并且在随后的发酵过程中波动较小。在同时加入麦曲和酒母进行发酵的条件下,精氨酸的初期浓度相对于试验2.1要低得多,并且在36 h时,几乎降为零,随后又开始缓慢上升。由此表明,麦曲菌落群对于精氨酸具有较大的消耗作用,在前期,精氨酸的浓度要比试验2.1中低得多。直到发酵后期,精氨酸的浓度才开始逐渐升高。而瓜氨酸浓度则在初期迅速升高,在24 h达到最高值,随后开始降低,在2 d后其浓度变化趋于平缓。鸟氨酸浓度则一直处于上升趋势中,且在发酵初期就达到了比较高的水平。

2.3 先糖化后酒化的影响

先加入麦曲后加入酒母,观察氨基酸和酵母菌浓度的变化情况。称取200 g大米,先浸米18 h,然后适量加水蒸煮30 min,先加入麦曲20 g及300 g凉开水进行糖化,每隔12 h测试1次并进行活菌计数,在48 h后加入酵母,继续测试至结束。酵母菌浓度变化结果见表3,各氨基酸浓度的变化见图8~图10。

由表3结果所示,先加入麦曲,0~36 h属于糖化阶段,于36 h时加入酵母,进入酒化阶段。从菌落浓度对比可以看出,先加入麦曲,麦曲菌群的生长对于酵母菌的发育具有一定抑制作用,加入酵母菌后,其最高浓度也不过是 4.8×10^6 个/mL。不但比试验4中的菌落浓度低,比试

表 3 先糖化后酒化流程酵母菌浓度变化

时间(h)	酵母菌浓度(个/mL)
0(加入麦曲)	—
12	—
24	—
36(加入酵母菌)	2×10^5
48	1.5×10^5
60	5×10^5
72	4.8×10^6

验 5 中的也要低很多。可以判断,麦曲菌群与酵母菌群是竞争关系,尤其是在先进行糖化作用时,麦曲菌群一方面迅速繁殖,另一方面会大量消耗营养物质,导致加入酵母菌后,其浓度降低。

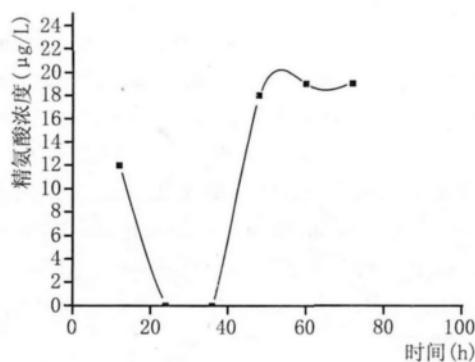


图 8 先糖化后酒化流程精氨酸浓度变化

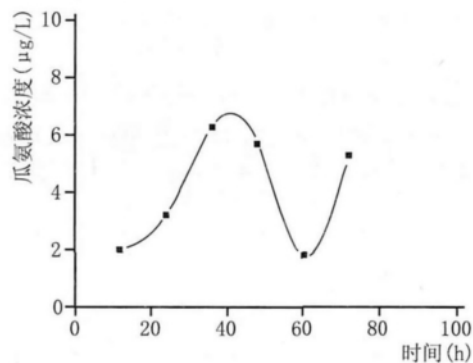


图 9 先糖化后酒化流程瓜氨酸浓度的变化

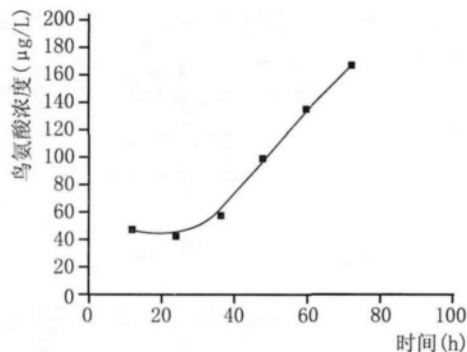


图 10 先糖化后酒化流程鸟氨酸浓度的变化

图 8~图 10 显示,精氨酸的绝对浓度比试验 2.1 中

的要低许多,可见糖化作用中精氨酸的消耗比较大。在糖化的后半阶段,甚至出现了精氨酸浓度几乎为零的情况。在 36 h 加入酵母后,精氨酸浓度迅速升高,并在 60 h 时达到峰值。但是浓度也只有 $19.2 \mu\text{g/L}$,远低于试验 2.1 和试验 2.2 中精氨酸浓度的峰值。在糖化阶段,瓜氨酸浓度稳步上升,可以判断,在糖化阶段会较稳定的积累瓜氨酸。而在加入酒母后,瓜氨酸浓度反而开始有所下降,在 60 h 后有所回升。与图 3、图 6 相比,糖化阶段的瓜氨酸积累速度都要更快,而其峰值浓度则差不多。可以印证,麦曲微生物群的活力比酵母菌要强,这几种氨基酸的消耗和积累速度都要比酒化阶段快。在糖化阶段,鸟氨酸浓度迅速达到较高值,但在 12~24 h 阶段,却略有下降,在 24 h 时即稳步上升,即使加入酒母后,其上升趋势依旧稳定,与图 7 对比可知,酒化阶段和糖化阶段都有鸟氨酸的持续积累。

结合图 2 分析,在酵母菌的尿素循环途径中,精氨酸被转化为鸟氨酸。在图 7 中,36 h 前,精氨酸浓度迅速下降,表明在糖化阶段的初始阶段,麦曲微生物群要消耗大量的精氨酸,而与之对应的是鸟氨酸浓度升高很快,推测是精氨酸转化成了鸟氨酸。在 36 h,精氨酸浓度开始升高,鸟氨酸浓度也迅速增高。此时酵母菌菌群的代谢开始显现。在 48~60 h 阶段,瓜氨酸的含量有一个较为明显的下降,由酵母的尿素循环途径可知瓜氨酸的代谢与代谢过程(2)、(3)、(5)都有关,牵涉反应较多,其具体积累机理还需要进一步的研究。而代谢过程(2)、(5)是互相竞争的,在生产中可以减少发酵过程中氨气的积累,促进代谢过程(5)的进行,从而抑制鸟氨酸的产生,并抑制瓜氨酸的积累。

3 分析与讨论

黄酒生产首先要将大米中的淀粉转化为可发酵糖,然后才能发酵,所以工艺一般为先糖化后酒化或糖化酒化同时进行。但是本实验所取下沙黄酒厂的工艺是采用了先酒化后糖化的方法,其麦曲活性比较高,利用此方法避免了先糖化对于营养物质的迅速消耗,并且保证了出酒率。3 种发酵方法相比较,以试验 2.1 中酿造酒醪质量最佳。试验 2.2 和试验 2.3 中,由于在糖化阶段麦曲菌群的代谢迅速,营养物质被迅速消耗,会影响出酒率,且容易发生酸化现象。酒化阶段,本试验所得数据与酵母的尿素循环途径可以较好的印证。糖化阶段初始会有精氨酸的迅速消耗。瓜氨酸变化较为复杂,但是亦有相当的积累。鸟氨酸浓度则一直升高,推测是精氨酸转化成了鸟氨酸。

在之前的研究中,大多关注酒化过程和酸化过程中

瓜氨酸的积累,而对于麦曲糖化过程中瓜氨酸的代谢尚缺乏详细研究。本实验证明,在麦曲的糖化过程中,也有瓜氨酸的积累。要控制黄酒生产过程中氨基甲酸乙酯含量,需要同样考虑到糖化阶段的影响。

采用加酵母后加麦曲的工艺,可以避免麦曲菌群活性太高,抑制酒化作用。在之前的研究中,大多关注酒化过程和酸化过程中瓜氨酸含量的积累,而对于麦曲糖化过程中瓜氨酸的代谢尚缺乏详细研究。本实验证明,在麦曲的糖化过程中也有瓜氨酸的积累。要控制黄酒生产过程中氨基甲酸乙酯含量,需要同样考虑到糖化阶段的影响。麦曲并不是单一微生物,其中是以根霉菌为主的微生物菌群,黄酒酿造中麦曲对于氨基甲酸乙酯的影响,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Conacher H B S, Page B D. Ethyl carbamate in alcoholic beverages: a Canadian case history [J]. Proceedings of Euro Food Tox. Zürich, 1986, 237-242.
- [2] Jauniaux J C, Urrestarazu L A, Wiame J M. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes [J]. Journal of Bacterial, 1978, 133(3): 1096-1107.
- [3] Plugg C M, Stams A J M. Arginine catabolism by *Thermanaerovibrio acidaminovorans* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 195: 259-262.
- [4] Jauniaux J C, Urrestarazu L A, Wiame J M. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes [J]. Journal of Bacterial, 1978, 133(3): 1096-1107.
- [5] Watkins S J, Hogg T A, Lewis M J. The use of yeast inoculation in fermentation for port production effect on total potential ethyl carbamate [J]. Biotechnology Letters, 1996, 18: 95-98.
- [6] Uthurry C A, Varela F, Colomo B. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 329-336.
- [7] Uthurry C A, Suárez Lepe J A. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine [J]. Food Chemistry, 2006, 94(2): 262-270.
- [8] Lau B P, Weber D, Page D. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages [J]. Journal of Chromatography, 1987, 402: 233-241.
- [9] Ma Y P, Deng F Q, Chen D Z. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary multi-dimensional gas chromatography with thermionic specific detection [J]. Journal of Chromatography A, 1995, 695: 259-265.
- [10] MacNamara K, Burke N, Mullins E, et al. Direct quantification of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages using a cold capillary injection system and optimised selected ion monitoring [J]. Chromatographia, 1989, 27: 209-215.
- [11] Matsudo T, Aoki T, Abe K, et al. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 352-356.
- [12] 贺小贤,孙莹,陈合.发酵液中L-精氨酸的检测方法[J].食品与药品, 2007, 9(1): 18-20.
- [13] 李加友,曹瑜,焦庆才.酶法转化液中L-瓜氨酸的分光光度法测定[J].分析实验室, 2005(12): 8-10.
- [14] 黄爱清,苏国成,王璋. L-鸟氨酸快速定量检测方法[J].食品与发酵工业, 2005(12): 98-101.
- [15] Zuniga M, Perez G, Gonzalez Candela F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 25: 429-444.

(上接第25页)

③高级醇类含量较多,它本身有强烈香气,又是构成酒中酯类的重要成分,特别是异戊醇含量在0.7~1.3 g/L之间,且异戊醇:异丁醇:正丙醇=1:0.38:0.18。

④β-苯乙醇含量达43.6 mg/L,仅低于豉香型白酒且高于米香型白酒和酱香型白酒。其稳定性较好,香气持久性强,它的存在给糟烧以舒适的玫瑰蜜香之幽雅感。

参考文献:

- [1] 祁传林.封闭式糟法提高白酒产量的探讨[J].酒饮料技术装备, 2006(1): 61-62.
- [2] 毛青钟.耐高温干酵母在黄酒糟烧白酒生产中的应用[J].酿酒科技, 2005(10): 105-106.
- [3] 孙细珍.CP-WAX毛细管柱在白酒香味组分分析中的应用[J].酿酒科技, 2005(12): 87-89.
- [4] 蔡心尧,尹建军,胡国栋.毛细管柱直接进样法测定白酒香味组分的研究[J].色谱, 1997, 15(5): 367-371.
- [5] 金佩璋.优质白酒梅兰春香味成分初析[J].酿酒科技, 1993(1): 62-65.
- [6] 熊子书.试论白酒中香味成分与风味的特征[J].酿酒科技, 1998(3): 82-85.
- [7] 王忠彦,尹昌树.白酒色谱骨架成分的含量及比例关系对香型和质量的影响[J].酿酒科技, 2000(6): 93-96.
- [8] 冯志强,邱晓红.豉香型白酒香型研究[J].酿酒, 1995(4): 75-82.
- [9] 胡国栋.景芝白干特征香味组分的研究[J].酿酒, 1992(1): 83-88.
- [10] 曾祖训.小曲清香型白酒的工艺特征与香型风格[J].酿酒, 1995(5): 37-41.
- [11] 许汉英.白酒中糠醛含量与香型之间关系的研究[J].酿酒, 2002, 29(5): 37-39.