

# 葡萄酒中氨基甲酸乙酯形成及质量控制

李佩璇<sup>1</sup> 王海丽<sup>2</sup> 王娜<sup>2</sup> 高雪<sup>2</sup>

1. 北京农学院 北京 100096

2. 临沂市检验检测中心 山东临沂 276000

**摘要:** 近些年我国传统发酵行业的发展十分迅速,但在行业快速发展之下,产品安全问题也成为了人们关注的焦点,若产品质量存在缺陷很可能危及人们的生命健康,也可能对附属商品的对外贸易产业链产生影响。从我国传统发酵食品角度而言,食物的发酵过程存在一定的有毒物质,在不完全发酵的情况下会残留一些氮化合物,例如  $C_3H_7NO_2$  和  $R^1N(-R^2)-N=O$  等物质,其中  $C_3H_7NO_2$  不仅具有神经毒性,而且还有较强的致癌性。对于葡萄酒生产来说,氨基甲酸乙酯这类可致癌物质控制尤为重要,而若想保证葡萄酒生产的质量与安全,便要了解  $C_3H_7NO_2$  的形成机理和影响。鉴于此实验将围绕葡萄酒制作过程中  $C_3H_7NO_2$  的形成展开分析,进而探索  $C_3H_7NO_2$  的形成与相关的影响因素,就如何控制氨基甲酸乙酯,提高葡萄酒生产质量提出了质量控制的有关对策。

**关键词:** 葡萄酒;氨基甲酸乙酯;质量控制

**Abstract:** In recent years, China's traditional fermentation industry has developed very rapidly, but under the rapid development of the industry, product safety has also become the focus of attention. If there are defects in product quality, it is likely to endanger people's life and health, and may also have an impact on the foreign trade industrial chain of ancillary goods. From the perspective of traditional fermented food in China, there are certain toxic substances in the fermentation process of food. In the case of incomplete fermentation, some nitrogen compounds will remain, such as  $C_3H_7NO_2$  and  $r^1n(-R^2)-n=O$ . among them,  $C_3H_7NO_2$  is not only neurotoxic, but also highly carcinogenic. For wine production, the control of carcinogenic substances such as ethyl carbamate is particularly important. In order to ensure the quality and safety of wine production, it is necessary to understand the formation mechanism and influence of  $C_3H_7NO_2$ . In view of this, the experiment will analyze the formation of  $C_3H_7NO_2$  in the process of wine making, then explore the formation of  $C_3H_7NO_2$  and related influencing factors, and put forward relevant countermeasures for quality control on how to control urethane and improve wine production quality.

## 引言:

在葡萄酒制作过程中尿素或瓜氨酸会和酒液中的乙醇发生反应,进而生成氨基甲酸乙酯,尿素与瓜氨酸是酵母在葡萄酒酿造过程中所产生的产物,正是尿素和瓜氨酸的出现在影响葡萄酒中精氨酸的含量。有学者曾指出,若葡萄酒中的精氨酸含量与总原液含量相比高于1000mg/L,那么酵母发酵后葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量将会达到15 $\mu$ g/L以上。而且酵母发酵的温度以及葡萄生长过程都可能影响葡萄酒酿造过程的氨基甲酸乙酯含量。所以在如今人们密切关注食品安全,以及国外频繁质疑我国葡萄酒行业的背景下,重点关注并控制氨基甲酸乙酯的形成尤为重要,这不仅是提高葡萄酒生产质量的主要手段,也是助推我国葡萄酒行业健康发展的重要措施。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与仪器选择

葡萄汁选择赤霞珠天然葡萄汁,经破碎处理后加入0.03g/L的果胶酶以及30mg/L的SO<sub>2</sub>;葡萄酒样品选择市场购买;酵母菌采取Y1、Y2、Y3、Y4、Y5共5种;乳酸菌选择MLB1、MLB2、MLB3乳酸菌;仪器选择气质联仪、安捷伦DB-FFAP毛细管色谱柱和硅酸镁固相萃取柱;化学试剂选择氨基甲酸乙酯、内标物氨基甲酸正丁酯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 工艺流程

红葡萄酒原料在进行除梗和破碎过程中加入30mg/L的SO<sub>2</sub>,之后处于25 $^{\circ}$ C的温度下进行酒精发酵,后经过分离和压榨、乳酸发酵、分离、下胶等工艺处理后进行过滤和装瓶;

白葡萄酒在除梗与破碎过程中加入50mg/L的SO<sub>2</sub>,之后进行压榨分离和澄清,酒精发酵时温度保持在18 $^{\circ}$ C左右,经过乳酸发酵和分离、下胶过程后进行稳定性处理,最后过滤和装瓶。

以单因素实验法作为实验主用方法,实验目的在于探究葡萄酒中酵母和乳酸菌的类型、接种量、发酵温度以及氨基酸脱羧酶等因素对葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的影响,为确保实验的准确性每个组均进行3次重复性实验。

### 1.2.2 实验过程

#### (1) 标准溶液配制

称量0.100g的氨基甲酸乙酯存放在瓶中,利用甲醇溶液定容,制备为1000mg/L的储备液;之后称取0.25mL储备液存放在25mL的瓶中利用甲醇定容,至北纬10mg/L的氨基甲酸乙酯工作液。称量0.1000gnBC(内标)存放在100mL容量瓶中,利用甲醇溶液定容制备为1000mg/L的储备液。称取0.25mL储备液到25mL容量瓶中,同样利用甲醇定容,制备为10mg/L的nBC工作液。

#### (2) 样品处理

称取0.25mL的nBC内标工作液,将其置于25mL容量瓶中,利用酒样进行定容,之后均匀混合。取10mL正己烷在固相萃取柱中活化。取0.5mL酒样,同样置于固相萃取柱中,经过5min以上的时间让酒样吸附并且流速在每分钟5滴时弃流出液。通过2mL正己烷洗柱,通过10mL二氯甲烷洗脱,之后将洗脱液收集下来。在洗脱液流干后,收集下来的洗脱液通过氮吹仪控制到0.5mL,最后倒进新瓶留作备用。

#### (3) 样品检测

利用氨基甲酸乙酯工作液,通过甲醇制成0.01、0.02、0.03、0.04、0.08、0.1、0.2mg/L的氨基甲酸乙酯溶液,之后加入内标且保证浓度处于0.1mg/LnBC。样品在处理好后加入内标进样分析,通过标准曲线能够了解到氨基甲酸乙酯的含量。精氨酸测定选择PITC柱前衍生高效液相色谱法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量

对于葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量来说,国际上的报道并不少,例如关于英国市场葡萄酒氨基甲酸乙酯含量的报告中显示,英国多数葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量平均在12~245 $\mu\text{g/L}$ 。巴西葡萄酒例如赤霞珠葡萄酒的氨基甲酸乙酯含量平均为10.63 $\mu\text{g/L}$ ,霞多丽则为19.53 $\mu\text{g/L}$ 。

针对我国36个葡萄酒的样品进行实验分析,包括11个白葡萄酒和25个红葡萄酒样品,结果如图1所示。

根据其结果能够了解到,国产葡萄酒中的氨基甲酸乙酯含量基本在4.165~29.349 $\mu\text{g/L}$ 之间,不同样品的差别非常大,其中红葡萄酒中的氨基甲酸乙酯平均含量在19.815 $\mu\text{g/L}$ 左右,白葡萄酒则为10.32 $\mu\text{g/L}$ 左右,从

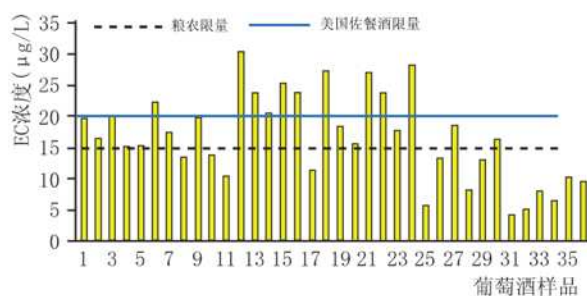


图1 葡萄酒样品中氨基甲酸乙酯含量

这一点来看MLF也就是苹果酸—乳酸发酵可以影响氨基甲酸乙酯的形成。在上述的葡萄酒样品中,所有样品的氨基甲酸乙酯含量都没有高于加大拿葡萄酒氨基甲酸乙酯限量标准,若按粮农规定食品氨基甲酸乙酯限量标准20 $\mu\text{g/L}$ 来看合格率约为69.5%;若按美国葡萄酒氨基甲酸乙酯限量标准的15 $\mu\text{g/L}$ 来看,合格率只有41.66%左右,从整体上来看,我国国产葡萄酒的氨基甲酸乙酯含量仍处于一个较低的水平,而且拥有一定的可控潜力<sup>[1]</sup>。

### 2.2 氨基甲酸乙酯含量变化规律

在葡萄酒生产过程中,氨基甲酸乙酯是随发酵而产生的一种物质,以赤霞珠和霞多丽葡萄酒为样品,分析生产工艺中酒精发酵和苹果酸—乳酸发酵(MLF)两个环节的氨基甲酸乙酯变化,白葡萄酒和红葡萄酒的氨基甲酸乙酯含量的变化过程分别为图2、图3所示。

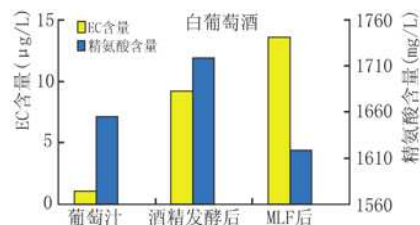


图2 白葡萄酒生产中的氨基甲酸乙酯变化

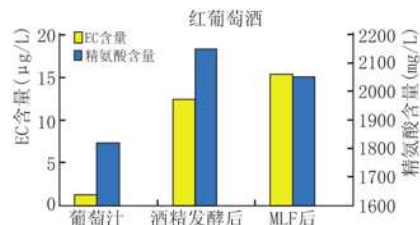


图3 红葡萄酒生产中的氨基甲酸乙酯变化

根据上图所示,在酒精发酵、苹果酸—乳酸发酵之后,红葡萄酒中的氨基甲酸乙酯含量为1.2、12.4、15.4 $\mu\text{g/L}$ ,增幅率分别为90%和19%。而白葡萄酒的氨基甲酸乙酯含量则只有1.0、9.2、13.6 $\mu\text{g/L}$ ,增幅率约为89%和32%。从中能够了解到,酒精发酵对于葡萄酒氨基甲酸乙酯含量的影响最为明显,控制葡萄酒生产中氨基甲酸乙酯含量的关键要素便是发酵的条件,包括酵母和发酵温度等。

在葡萄酒生产期间, 氨基甲酸乙酯的含量始终为上升的趋势, 但从上图中能够了解到, 精氨酸的含量则先上升后降低, 这代表着酒精发酵期间氨基甲酸乙酯前体物尿素的来源不仅仅有酵母代谢精氨酸, 同时葡萄在种植生长时使用的氮肥也能提高葡萄汁中的尿素含量, 精氨酸含量的提高原因可能为酵母自溶。在酒精开始发酵时, 白葡萄酒和红葡萄酒中的精氨酸含量都开始逐渐降低, 在苹果酸—乳酸菌发酵时氨基甲酸乙酯的含量明显提高, 原因在于乳酸菌代谢精氨酸生成了瓜氨酸, 瓜氨酸又能与乙醇发生反应并生成氨基甲酸乙酯。

### 3 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的形成

葡萄酒中的氨基甲酸乙酯是由浆液中尿素和瓜氨酸等化合物与乙醇反应所生成。因此, 在葡萄酒原液中氨基甲酸乙酯出现途径只有两种: 第一, 酵母尿素循环途径产生; 第二, 苹果酸—乳酸菌精氨酸脱亚氨基酶途径(ADI)产生。

#### 3.1 酵母尿素循环途径

在葡萄酒中, 所含有的氨基酸主要为精氨酸, 若葡萄酒原液中的精氨酸的含量相对较高, 则会对酵母氮素的代谢造成约束, 导致尿素无法有效代谢。当尿素在酵母细胞中若积累到一定程度之后, 酵母便会在自然发酵时将尿素分子释放到葡萄酒中, 进而加速尿素与乙醇发生反应, 进而生成更多的氨基甲酸乙酯。为进一步探究葡萄酒中尿素的生成路径, 很多专家和学者开始研究酵母尿素循环中酶的基因, 据有关研究表明, 大量的精氨酸不会对酵母对精氨酸的代谢产生影响, 这也会造成葡萄酒中精氨酸含量较高时, 酵母释放尿素的量更高。有关学者利用抗敏RNA技术来抑制精氨酸酶的基因, 从而限制酵母对于精氨酸的代谢, 降低尿素释放的量。还有学者直接选择将精氨酸酶的基因破坏, 建立精氨酸酶的缺陷型突变体, 将其菌株用作清酒的生产, 在尿素和氨基甲酸乙酯含量的控制上也能起到理想效果, 但当前并没有发现关于酵母精氨酸酶基因突变来控制尿素释放的方法<sup>[2]</sup>。

#### 3.2 苹果酸—乳酸精氨酸脱亚氨基酶途径

在上个世纪90年代以前, 葡萄酒酿造行业很多人都认为苹果酸—乳酸菌降解精氨酸的过程是尿素循环的途径。但后来在相关发酵实验中发现, 葡萄酒发酵细菌的培养期间并没有出现任何尿素, 并且在无细胞抽提物中也未曾检测到精氨酸酶与脲酶活力的产生。因此, 研究人员认为苹果酸—乳酸菌对于精氨酸的降解并非是尿素循环的必须途径。除该研究之外, 其他学者在对发酵乳制品和肉制品分离的发酵乳酸菌精氨酸代谢途径研究中, 首次提出葡萄酒中苹果酸—乳酸菌精氨酸代谢的新途径。

若pH值达到一定条件, 则苹果酸—乳酸菌分泌的瓜氨酸量将会决定培养基中精氨酸的初始含量, 通过苹果酸—乳酸菌精氨酸代谢途径降解精氨酸的葡萄酒中, 苹果酸—乳酸菌具有分泌瓜氨酸的特征。这一发现对于葡萄酒生产来说具有重要意义, 瓜氨酸的分泌能够与乙醇反应并生成氨基甲酸乙酯, 这也提高了葡萄酒生产中的隐患。

从当前的情况来看, 葡萄酒酿造过程中苹果酸—乳酸菌精氨酸的代谢分泌机制仍不够明确, 造成该现象的原因可能是因OTC在一定温度条件下不利于催化瓜氨酸的降解, 即精氨酸在ADI水解时会产生一定量的瓜氨酸, 并且实际产生速率与OTC相比更快。还存在一种说法, 当葡萄酒中的瓜氨酸可能会对瓜氨酸合成与分解造成一定影响, 即产生一种能量的解耦联作用, 特别是细胞在生长到稳定期之间, 其生长速度会逐渐变得缓慢, 培养基中若精氨酸含量过大, 那么由精氨酸降解反应产生的ATP无法被细胞利用而不断积累, 所以降低了OTC的活性, 瓜氨酸积累与分泌的机制仍然有待更深入的探索<sup>[3]</sup>。

### 4 葡萄酒生产中影响氨基甲酸乙酯的因素

#### 4.1 施肥

葡萄园施用的氮肥会直接影响到葡萄汁中的氮含量, 在氮肥用量提高的情况下, 葡萄的叶柄部硝基氮含量显著提高, 精氨酸和氮肥施用量为正比关系, 最终收获的葡萄用作酿酒时, 葡萄酒中的尿素含量也和氮肥用量为正比关系。通常若葡萄汁中精氨酸含量高于1000mg/L时, 就能够认定氮肥用量过高。

#### 4.2 覆盖作物

冬季时若选择豆科植物进行地面覆盖, 也会提高葡萄中的氮含量, 直接影响葡萄藤中的氮含量。而葡萄藤中氮含量增加时, 葡萄汁中的精氨酸含量也会同步提高。

#### 4.3 葡萄品种及砧木

有关学者围绕葡萄园地理位置、葡萄品类、砧木选择等因素对于葡萄中氨基酸含量的影响展开研究, 根据其结果能够了解到, 不同的葡萄品种在氮吸收效率上有所差别, 低氮品种普遍在植株根系上有所区别。砧木的不同也会影响葡萄的含氮量。砧木不同, 叶柄的硝基氮含量也会存在差别, 会对葡萄汁中的精氨酸含量带来影响。除此之外, 葡萄园地理位置、土壤酸碱性、水肥管理、收获时节、葡萄成熟程度等也会对葡萄的氮含量产生影响<sup>[4]</sup>。

#### 4.4 营养添加剂的使用

酒精发酵期间, 为保证酵母的发酵, 葡萄汁中必须要具有一定的含氮化合物, 避免酵母停止发酵的情况。若在发酵过程中加入磷酸氢二铵等氮源则可以提高发酵

的效率。但磷酸氢二铵的加入若用量把控不严格可能会提高尿素的生成量,同时也会释放到葡萄酒中。所以磷酸氢二铵用量过高也可能是影响葡萄酒氨基甲酸乙酯含量较高的一个原因。之后有关学者针对这一问题展开研究,发现酵母菌株生成氨基甲酸乙酯的量和加入磷酸氢二铵的时间具有一定关系,部分菌株在发酵期间尽早加入磷酸氢二铵能够降低氨基甲酸乙酯的生成量,还有一部分菌株不管磷酸氢二铵的加入是早是晚都不会影响氨基甲酸乙酯的形成。

## 5 控制葡萄酒生产过程中的质量控制策略

### 5.1 做好葡萄园管理工作

据上所述,由于葡萄树在生长过程中施加氮肥会提高葡萄汁中的尿素含量,所以在葡萄园管理过程中尽量要把控好氮肥的施用量,尽可能规避过量施肥的问题。而且葡萄园中的土壤、葡萄藤含氮量都要定期进行检查,及时调整葡萄生长过程的水肥管理手段。若葡萄园土壤中的含氮量相对较高,那么在冬季时尽可能避免用豆科植物覆盖。在葡萄种植过程中,尽可能选择特性已知且氮含量相对较少的砧木。

### 5.2 酵母菌株的选育

葡萄酒中酵母菌产生的尿素是氨基甲酸乙酯出现在葡萄酒中的主要因素,证明葡萄酒中酵母菌对精氨酸和尿素的代谢都存在一定影响。有学者曾对酵母菌降解精氨酸过程进行过解释,并对释放尿素过程进行实验,在该实验中有一株发酵产的葡萄酒组间中并没有出现尿素的累积,而其他几株由酵母菌发酵的葡萄酒小组中都发现尿素积累的情况。建立酵母工程菌是控制尿素释放含量的主要手段之一,但因为建立的基因在葡萄酒中难以保证能充分表达,所以选育不分泌尿素、释放尿素较少的酵母菌株成为了一条可行之路,尤其是精氨酸酶活力较低,或利用分子育种方法选育出来的精氨酸酶缺陷型酵母菌株,是目前控制葡萄酒生产中氨基甲酸乙酯含量的有效方法<sup>[5]</sup>。

### 5.3 苹果酸—乳酸菌的选育

苹果酸—乳酸菌精氨酸代谢和瓜氨酸的释放也具备菌株特异性,在降酸过程中尽量采用不具备精氨酸代谢、瓜氨酸分泌的菌株,鸟氨酸氨基甲酰转移酶活性较低的菌株不适用于葡萄酒生产,从而控制葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量。同时精氨酸脱亚氨基酶途径的苹果酸—乳酸菌发酵也能有效控制葡萄酒中的氨基甲酸乙酯含量。

### 5.4 酿造工艺的优化

在葡萄酒酿造期间,氨基甲酸乙酯的形成也可能受酿造工艺的影响,据有关研究能够了解到,酵母在温度较高的环境下开始发酵时,所释放的尿素含量相对更高。

并且酵母在发酵完成后,尿素在葡萄酒中的积累状况和陈酿同样具有密不可分的联系,处于厌氧环境下发酵时尿素积累程度更高,而在有氧或半厌氧环境中时发酵所积累的尿毒含量相对较少。所以葡萄酒在酿造过程中需要准确把握酵母发酵的机理,了解分泌尿素的基本特点,从而选择合理的酿造工艺。在酿造工艺中,不可以在葡萄汁中加入较大量的含氮的营养剂,葡萄酒陈酿和运输储存都应保持较低的温度,以免较高温度提高酵母分泌尿素,导致氨基甲酸乙酯的大量生成<sup>[6]</sup>。

### 5.5 合理使用酸性脲酶

在葡萄酒生产过程中,为有效控制氨基甲酸乙酯的生成含量,国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)允许利用发酵乳杆菌发酵产生的酸性脲酶来控制葡萄酒中尿素的释放量。之后有学者将发酵乳杆菌的脲酶基因整合至葡萄酒酵母中,从而将脲酶基因进行重组。这一基因在酵母中表达,生成的脲酶能够将细胞产生的尿素进行分解,从而降低尿素对葡萄酒生产的影响。但这种酶只在pH值为7.0左右的情况下应用,葡萄酒酸性环境下酶的活性非常低,所以含重组脲酶基因的葡萄酒酵母在葡萄酒生产中的应用在适用性上仍然有待改进。

## 6 结束语

如今我国葡萄酒不管是产量还是出口量都有了显著提高,但在葡萄酒进出口需求增长的背景下,提高葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究深度,制定属于我国的葡萄酒氨基甲酸乙酯限量标准尤为重要,同时也要在葡萄酒生产中建立标准化的生产秩序,保障我国葡萄酒行业的健康稳定发展。

### 参考文献:

- [1]王焕香,葡萄酒中氨基甲酸乙酯的影响因素及控制研究.河北省,中国长城葡萄酒有限公司,2019-09-20.
- [2]卢丕超,刘宗昭.葡萄酒中氨基甲酸乙酯控制技术的研究[J].农家参谋,2019(13):182+211.
- [3]朱亚楠,吴玉文,王焕香,商华,傅晓方,郜成军,赵晓宁,冯振亮,郑紫森.葡萄酒中氨基甲酸乙酯的变化规律及控制研究[J].中外葡萄与葡萄酒,2018(01):26-29.
- [4]董兴全,丁燕.葡萄酒中氨基甲酸乙酯的形成机理及影响因素[J].酿酒科技,2014(12):47-52.
- [5]梁萌萌.葡萄酒中氨基甲酸乙酯控制技术的研究[D].新疆农业大学,2014.
- [6]梁新红,葡萄酒中氨基甲酸乙酯测定及质量控制研究.河南省,河南科技学院,2013-12-29.
- [7]梁新红,孙俊良,曾洁.葡萄酒中氨基甲酸乙酯形成及质量控制[J].酿酒科技,2009(10):32-36.