

# 东山老米酒酿造过程中酵母菌的分离鉴定 及其品质分析

芦红云, 刘思宇, 娄行行, 陈启和\*  
(浙江大学食品科学与营养系, 杭州 310058)

**摘要: 目的** 对传统东山老米酒的发酵特性进行研究, 旨在探明东山老米酒的主要酵母菌株、典型风味成分及氨基甲酸乙酯变化。**方法** 首先利用 26S rDNA 序列分析法对酒曲中的酵母菌进行分离鉴定, 借助高效液相色谱法测定酒中的氨基甲酸乙酯, 利用气相色谱-质谱联用法分析老米酒中的风味物质, 同时还采用氨基酸自动分析仪测定游离氨基酸种类。**结果** 分离得到的菌株有 3 株为酿酒酵母, 1 株为白色隐球菌; 老米酒中氨基甲酸乙酯含量处于较低水平, 尤其是陈酿酒氨基甲酸乙酯含量显著低于新酿酒( $P<0.05$ ); 风味物质以醇、酯类为主, 如苯乙醇、琥珀酸二乙酯, 酯类随酒的陈化而逐渐增多; 老米酒中组氨酸和精氨酸含量较高, 导致酒中苦味氨基酸含量高于 60%, 同时氨基酸含量在陈化过程中逐渐下降。**结论** 东山老米酒的发酵以酵母发酵为主, 发酵产生的氨基甲酸乙酯的含量处于较低水平, 且随着老米酒的陈化而降低。

**关键词:** 东山老米酒; 酵母菌; 氨基甲酸乙酯; 游离氨基酸; 挥发性风味成分

## Isolation, identification and quality analysis of yeasts in the brewing process of Dongshan old rice wine

LU Hong-Yun, LIU Si-Yu, LOU Hang-Hang, CHEN Qi-He\*

(Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the main yeast strains, typical flavor components and changes of ethyl carbamate in Dongshan old rice wine by studying the fermentation characteristics of traditional Dongshan old rice wine. **Methods** Firstly, yeast of Dongshan old rice wine was isolated and identified by 26S rDNA sequence analysis, the ethyl carbamate was determined by high performance liquid chromatography, and the volatile flavor compounds were determined by gas chromatography-mass spectrometry instrument, at the same time, the free amino acids were determined by amino acid automatic detector. **Results** Three strains isolated were *Saccharomyces cerevisiae*, and one strain was *Cryptococcus albidus*; the content of urethane in rice wine was at a relatively low level, especially the content of ethyl carbamate in aged wine was significantly lower than that in new wine ( $P<0.05$ ); the flavor substances were mainly alcohols and esters, such as phenethyl alcohol and diethyl succinate, the esters were gradually increased with the aging of the wine; the content of histidine and arginine in rice wine were higher, resulting in the bitter amino acid content in the wine being higher than 60%, while the amino acid content was

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871904)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871904)

\*通信作者: 陈启和, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术与生物安全研究。E-mail: chenqh@zju.edu.cn

\*Corresponding author: CHEN Qi-He, Ph.D, Professor, Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China. E-mail: chenqh@zju.edu.cn

gradually decreased during aging. **Conclusion** The fermentation of Dongshan old rice wine is mainly by yeast fermentation, and the content of ethyl carbamate produced by fermentation is at a low level, and decreases with the aging of old rice wine.

**KEY WORDS:** Dongshan old rice wine; yeast; ethyl carbamate; free amino acids; volatile flavor compounds

## 0 引言

东山老米酒是湖北省大别山老区的传统发酵饮料, 是利用东部山区所产的糯米、矿泉水, 经发酵陈酿制成的低浓度、高营养性的米酒, 富含多种维生素及矿物质, 不含色素和防腐剂。“麻城红”老米酒色似海棠香如蜜, 甘甜可口味醇厚, 具有养颜益寿、滋阴补阳、舒筋活血等功效, 冬饮驱风去寒、夏饮提神健脑<sup>[1]</sup>。传统米酒的酿造是在特定的环境条件下, 用曲种进行发酵生产。曲种内富含多种微生物, 除酵母菌外, 还含有霉菌、细菌等。菌种质量不易稳定, 因此对东山老米酒菌种进行分离、鉴定、筛选具有一定的现实意义。传统的菌株鉴定方法一般要经过形态观察、生理生化实验等确定所测菌株的种属, 通常需要做 60~90 次实验, 不仅烦琐费时, 且因实验条件的不同重现性不好<sup>[2]</sup>。随着 DNA 序列分析技术的日趋成熟, rDNA 序列分析被越来越多地应用于酵母菌的分类学研究中。rRNA 结构既具保守性又具高变性, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变性则揭示生物物种的特征核酸序列。在 rRNA 中, 26S rRNA 是核糖体 RNA 的一个亚基, 26S rDNA 是编码该亚基的基因, 26S rDNA 在细胞内有数以百计的拷贝, 增加了扩增成功的可能性。26S rDNA 的 D1/D2 区域位于大亚基的 5' 端, 序列长度在 600 bp 左右<sup>[3]</sup>。GUTEL 等<sup>[4]</sup>研究表明这段区域具有较高的变异率, 可以用于亲缘关系较近的菌株之间的分类研究。目前这一区域序列在酵母菌分类方面的应用是所有分子学方法中应用最多的<sup>[5]</sup>。

发酵液中的各种微生物在发酵过程中产生各种代谢产物, 其中不乏一些有害物质的产生, 如氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)。氨基甲酸乙酯是一种在实验动物甚至人体内造成多位点致癌的 2A 类致癌物质<sup>[6-8]</sup>, 常常在各种发酵食品、发酵酒精饮料中检出, 如啤酒、葡萄酒等<sup>[9-10]</sup>。同时, 复杂的微生物环境通过各种反应产生一系列的代谢产物, 包括各种氨基酸以及挥发性风味物质, 赋予了东山老米酒独特的风味。

目前, 关于东山老米酒的研究报道较少, 因而本研究采用 26S rDNA 分子鉴定方法对东山老米酒酿造过程酵母菌进行分离鉴定。此外, 还采用高效液相色谱仪、气相色谱-质谱联用仪及氨基酸自动分析仪等分析手段对发酵代谢产生的有害物质 EC 以及老米酒风味相关的游离氨基酸和挥发性风味物质进行分析检测, 以期对东山老米酒的开发和评价提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 曲种

曲种采用来自湖北省麻城市的黄酒曲、金银花酒曲、甜酒曲。

#### 1.1.2 培养基

酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)培养基: 1%酵母浸出物、2%蛋白胨、2%葡萄糖、2%琼脂, 购买于杭州微生物试剂有限公司。

#### 1.1.3 试剂

正丙醇(色谱纯, 上海 Aladdin 公司); 9-羟基吨(纯度为 98%)、氨基甲酸乙酯(纯度 $\geq 99\%$ )(美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲醇(色谱纯, 天津盾牌化工有限公司); AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA marker(上海桑尼生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发器(北京亚荣生化仪器厂); VITEK2 Compact 微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司); ALS-1296 PCR 仪(美国 BioRad 公司); ABI3730-XL 测序仪(美国 Applied Biosystems 公司); ChamGel 5000 凝胶成像系统仪(北京赛智创业科技有限公司); Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱仪[配有 Shimadzu RF-20A 荧光检测器和反相对称 C<sub>18</sub> 分离柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)](日本 Shimadzu 公司); S 7130 氨基酸自动分析仪(德国 Sykam 公司); 7890B 气相色谱-5977A 质谱联用仪(配有 DVB/CAR/PDMS 萃取头, 美国安捷伦科技有限公司)。

### 1.3 老米酒的传统酿造方法

将 1 kg 糯米清洗 3 次后, 浸米 12 h 后过滤, 放入不锈钢桶蒸熟, 期间洒 2~3 次少量热水, 以防止水分因蒸发而导致减少。蒸熟后放凉, 当温度降至 25~30  $^{\circ}$ C 后, 加入 10 g 酒曲拌匀后发酵。发酵经过滤取酒, 取酒后加水继续发酵。最后放置进行陈酿处理。

### 1.4 酵母菌的分离

取黄酒曲、甜酒曲、金银花酒曲分别无菌水梯度稀释至  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  浓度后涂布 YPD 平板, 每种样品进行 2 次平行。接种后置于 28  $^{\circ}$ C 培养箱培养 1~2 d。选取其中菌落长势良好、分布均匀、个数适中的平板, 用接种环挑取特征明显的单菌落, 经稀释后涂布培养、镜检, 重复培养

2~3 次以分离纯化酵母菌。最终得到 4 株类似酵母菌的菌株, 分别为菌株 1、2、3、4。将纯化的酵母菌转接到 YPD 试管斜面上培养, 待生长完好后置于 4 °C 冰箱中保存。

## 1.5 酵母菌的鉴定

### 1.5.1 微生物镜检

取少量菌种制成涂片, 美兰染色后, 置于显微镜下镜检观察菌体形态。

### 1.5.2 生理生化鉴定

参考冯炳等<sup>[11]</sup>的实验方法, 酵母菌的生理生化实验主要包括: 氮源同化、碳源同化以及糖发酵实验。

### 1.5.3 26S rDNA 分子鉴定

#### (1) 酵母 DNA 提取

采用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒进行提取。

#### (2) PCR 扩增

扩增引物是由上海桑尼公司设计合成的 26S rDNA 通用引物(26SF: 5-GCATATCGGTAAGCGGAGGAAAAG-3; 26SR: 5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3), 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增体系包括: 基因组 DNA 1.0 μL、10×Buffer(含 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 5.0 μL、Taq 聚合酶 1.0 μL、dNTP (10 mmol/L) 1.0 μL、26SF 引物(10 μmol/L) 1.5 μL、26SR 引物(10 μmol/L) 1.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 39.0 μL。轻弹混匀, 瞬时离心收集管壁上的液滴至管底, 在 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应, PCR 反应条件为: 95 °C、5 min; 95 °C、30 s, 58 °C、45 s, 72 °C、1.5 min, 共 45 个循环; 72 °C、30 min。反应完成后, 取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认 PCR 扩增片段。

#### (3) 序列测定与分析

取各个菌种纯化后的 PCR 产物, 使用测序仪 ABI3730-XL 进行 DNA 测序。将所测细菌 26S rDNA 基因序列同 GenBank 数据库相关菌株的 26S rDNA 基因序列比对, 并进行系统发育树分析等。

## 1.6 氨基甲酸酯的高效液相色谱检测

### 1.6.1 标准溶液的配制

准确称取 3.6 mg 氨基甲酸酯标准品溶于 30% 甲醇溶液, 并定容至 200 mL, 得到 18 mg/L 的标准储备液。分别吸取 2.5、1.0、0.5、0.1 mL 标准储备液, 用 30% 甲醇定容至 10 mL, 得到质量浓度分别为 4.50、1.80、0.90、0.18 mg/L 的氨基甲酸酯标准溶液。

### 1.6.2 样品的预处理

取 20 mL 东山老米酒样品, 与等体积的乙酸乙酯混匀萃取, 重复萃取 2 次, 取萃取后的 40 mL 有机相液体在 55 °C 条件下真空旋转蒸发, 对样品进行浓缩, 蒸干后加 2 mL 30% 甲醇, 样品体积浓缩 10 倍。

### 1.6.3 样品的衍生化

取 1 mL 标样于离心管中, 并加入实验前配制的衍生剂

1.5 mol/L 的盐酸 0.1 mL 和 0.01 mol/L 的 9-羟基正丙醇溶液 0.2 mL, 于振荡器上振荡数秒使其充分混匀, 将反应液放置在暗处反应 30 min 左右, 待反应完全后进样测定<sup>[12]</sup>。

### 1.6.4 高效液相色谱的色谱条件

色谱柱: C<sub>18</sub> 反相柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测器: 荧光检测器; 流动相: 甲醇和水; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 激发波长 233 nm; 发射波长 600 nm; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 东山老米酒中氨基甲酸酯检测的色谱条件  
Table 1 Chromatographic conditions for EC determination in Dongshan old rice wine

时间/min	流速/(mL/min)	甲醇/%	水/%
0	0.8	61	39
40	0.8	61	39
42	1	100	0
50	1	100	0

## 1.7 挥发性风味化合物的测定

### 1.7.1 制样及萃取

取 4 mL 老米酒样品, 加入 1 g NaCl, 混合物在 50 °C 条件下恒温平衡 15 min。然后从瓶盖中插入萃取头, 用顶空固相微萃取方式, 不断搅拌的同时吸附 30 min (50 °C), 结束后缩回萃取头, 将萃取头插入气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪, 推出纤维头, 于 250 °C 解吸 5 min 后进行色谱柱分析。

### 1.7.2 实验条件

色谱条件: 载气高纯氮气, 不分流进样, 恒流 1 mL/min; 进样口温度 250 °C; 程序升温: 柱温初始温度 40 °C 保持 5 min, 以 5 °C/min 升温至 230 °C, 最后保持 10 min; 质谱条件: 电离方式为电喷雾电离(electrospray ionization, ESI), 电子能量 70 eV, 扫描质量 35~550 amu。

### 1.7.3 定性定量方法

用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 数据处理系统, 通过系统所带的 NIST11.L 谱图库对样品中的挥发性成分进行解析, 根据各物质峰所得质谱图与标准数据库比对的匹配度定性分析, 并用峰面积归一化进行相对定量, 得到各挥发性成分的相对含量。

## 1.8 游离氨基酸测定

老米酒中游离氨基酸含量由氨基酸自动分析仪测定得到, 参照 GB/T 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》的方法进行测定。

## 1.9 数据处理

所有实验重复测定 3 次, 结果取平均值, 并以平均值 ± 标准偏差表示。采用 SPSS 25.0 软件分析实验数据显著性, 同时利用 Origin 9.0 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 老米酒酿造曲种中酵母菌的分离鉴定

#### 2.1.1 不同菌株生理生化性能分析

本研究从东山老米酒酿造酒药中分离到 4 株微生物菌株, 经过生理生化检验, 其实验结果见表 2。从表 2 可以看出菌株 1、2、3、4 经 VITEK2 Compact 梅里埃全自动菌种鉴定仪鉴定结果为: 菌株 1、2、3 均为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 菌株 4 为白色隐球菌

(*Cryptococcus albidus*)。

#### 2.1.2 不同菌株 26S rRNA 基因序列和系统发育树分析

分子生物学方法是目前的热点, 解决了一批传统方法难以确定的菌株的检测问题, 特别是纯菌株 DNA 序列分析, 具有操作简单、客观、重复性好的优点。虽然经典分类学方法简单, 但工作量大, 结果可能也不够精确, 因此, 将多种方法综合分析所得出的结论更令人信服<sup>[13-14]</sup>。因而本研究采用 26S rDNA 序列分析法鉴定这 4 个菌株, 其菌株 1、2、3、4 的 PCR 产物电泳图如图 1 所示。

表 2 不同菌株生理生化鉴定结果  
Table 2 Identification results of physiology and biology of different strains

测定项目	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4	测定项目	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4
L-赖氨酸芳胺酶	-	-	-	+	D-山梨糖同化	-	-	-	+
L-苹果酸同化	-	-	-	-	L-鼠李糖同化	-	-	-	-
亮氨酸芳胺酶	+	+	+	+	木糖醇同化	-	-	-	-
精氨酸同化	-	-	-	-	D-山梨醇同化	-	-	-	+
赤藻糖醇同化	-	-	-	-	蔗糖同化	+	+	+	+
丙三醇同化	-	-	-	-	尿素酶	-	-	-	+
酪氨酸芳胺酶	-	-	+	+	$\alpha$ -葡萄糖苷酶	-	-	-	+
$\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶	-	-	-	-	D-羽红糖同化	+	+	+	+
杨梅酸同化	-	-	-	+	D-海藻糖同化	-	-	-	+
苦杏仁苷同化	-	-	-	+	硝酸盐同化	-	-	-	+
$\alpha$ -半乳糖同化	+	+	+	-	L-阿拉伯糖同化	-	-	-	+
龙胆二糖同化	-	-	-	+	D-半乳糖醛酸盐同化	-	-	-	+
D-葡萄糖同化	+	+	+	+	七叶灵水解	-	-	-	+
乳糖同化	-	-	-	-	L-谷氨酸盐同化	-	-	-	-
甲基葡萄糖吡喃苷同化	-	-	-	-	木糖同化	-	-	-	+
D-纤维二糖同化	-	-	-	+	DL-乳酸盐同化	+	+	+	-
$\gamma$ -谷氨酰转移酶	-	-	-	-	醋酸盐同化	+	+	+	-
D-麦芽糖同化	+	+	+	+	柠檬酸盐同化	-	-	-	-
D-棉子糖同化	+	+	+	+	葡萄糖酸盐同化	-	-	-	+
PNP-N-乙酰-BD-半乳糖胺酶	-	-	-	-	L-脯氨酸同化	-	-	-	-
D-甘露糖同化	+	+	+	-	2-酮基-葡萄糖酸盐同化	-	-	-	+
D-蜜二糖同化	+	-	-	-	N-乙酰-葡萄糖胺同化	-	-	-	-
D-松三糖同化	-	-	-	+	D-葡萄糖酸盐同化	-	-	-	-

注: +表示阳性结果, -表示阴性结果。

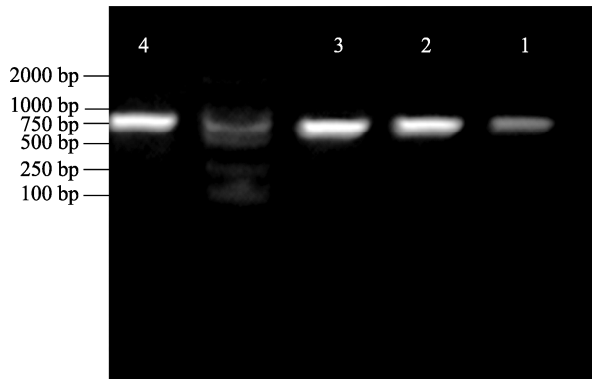


图 1 不同菌株的电泳条带

Fig.1 Electrophoretic band of different strains

菌株 1 提取出的 DNA 由于碱基缺失, 无法鉴定其基因序列。对其余 3 株菌株的 16S rRNA 基因序列同源性的

比较结果表明, 菌株 2、3 的序列同 *Saccharomyces cerevisiae* 的同源性相似性为 100%, 进化树如图 2, 可以确定为酿酒酵母; 菌株 4 的序列与 *Cryptococcus diffluens* 的同源性较高, 其系统进化树如图 2, 但结合其生理生化分析结果, 菌株 4 为 *Cryptococcus albidus* 的可能性较大。

## 2.2 东山老米酒中氨基甲酸乙酯的含量分析

本研究分别测定了新酿、陈酿东山老米酒中氨基甲酸乙酯的含量, 实验结果如图 3 所示。氨基甲酸乙酯是 2A 类致癌物, 近几年来为减少酒中的 EC 含量而使用了很多方法, 包括物理、化学、酶法和代谢工程等方法<sup>[15]</sup>。EC 是酿制传统发酵酒精饮料时产生的主要污染物, FU 等<sup>[16]</sup>从 6 种不同品种的市售黄酒中抽取 20 个样品检测氨基甲酸乙酯的含量, 发现有 15% 的黄酒中 EC 含量低于 0.05 mg/L, 有 40% 的黄酒中 EC 含量介于 0.05~0.10 mg/L 之间, 有 45% 的

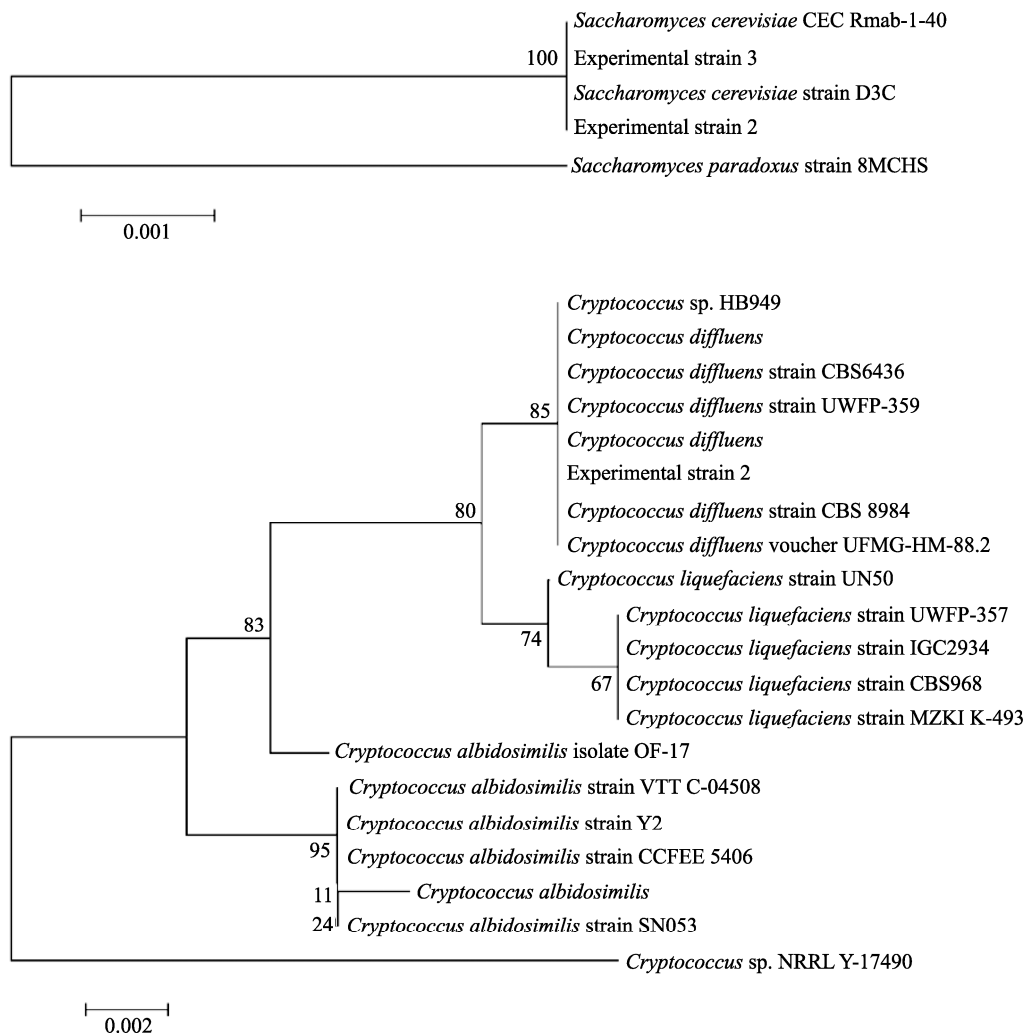


图 2 不同菌株的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of different strains

黄酒中 EC 含量高于 0.1 mg/L, 其中 EC 最高可达 0.242 mg/L。由图 3 可知, 新酿东山老米酒中 EC 含量高于 0.10 mg/L, 而陈酿东山老米酒中的 EC 含量则介于 0.05–0.10 mg/L 之间, 仅为新酿东山老米酒中 EC 含量的 58.7%, 实验结果表明, 相对于市售黄酒, 东山老米酒中的 EC 含量在可接受范围之内, 尤其是陈酿老米酒中的 EC 含量更是处于较低水平。

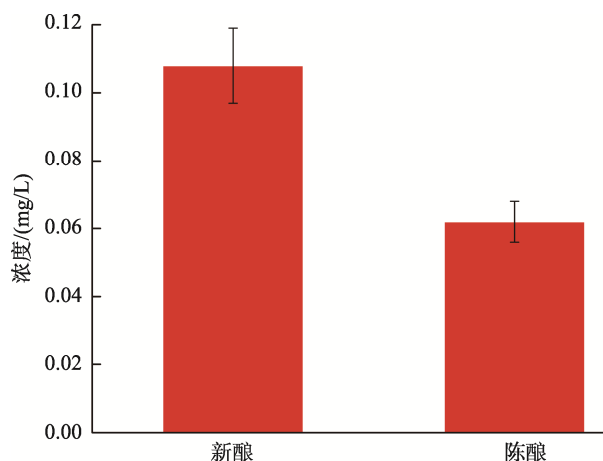


图 3 东山老米酒不同发酵状态对氨基甲酸乙酯含量的影响( $n=3$ )  
Fig.3 Effects of different fermentation state on content of ethyl carbamate in Dongshan old rice wine ( $n=3$ )

### 2.3 东山老米酒中挥发性风味物质含量分析

香味是决定酒的品质关键决定因素, 而香味的质量则依赖于发酵时产生的各种挥发性香味物质<sup>[17]</sup>。黄酒酿造过程中在酵母等多种微生物的作用下可以产生以醇酯类为主要成分的香味物质<sup>[18]</sup>, 而且不同酒龄黄酒中的风味物质在种类和数量上存在一定的差异<sup>[19–20]</sup>。根据东山老米酒样品 GC-MS 图谱可以确定的主要挥发性风味物质及其相对含量如表 3 所示, 其种类以醇酯类物质为主。新酿酒中检测出 7 种主要挥发性风味物质, 含醇类 17.58%、酯类 8.15%。陈酿中检测出了 8 种主要挥发性风味物质, 含醇类 11.19%、酯类 10.10%。新酿、陈酿老米酒中均只检出了一种醇, 即苯乙醇。苯乙醇是通过苯丙氨酸代谢或者糖的从头合成途径产生的, 具有玫瑰蜂蜜香味<sup>[21]</sup>, 赋予老米酒独特的风味。老米酒中检出种类最多的主要挥发性风味物质是酯类, 尤其是陈酿, 检出了 5 种酯类, 除辛酸乙酯外, 其他酯类含量都高于新酿酒。在发酵过程中, 酯类可以通过醇与脂肪酸之间的酯化反应合成, 也可以通过乙酰辅酶 A 和高级醇反应合成<sup>[22]</sup>。一般来说, 后者在发酵过程中对酯的形成起着重要的作用<sup>[23]</sup>, 因而陈酿会比新酿的酯类多。此外, 新酿中还检出了苯甲醛, 尽管醛类含量较低, 但也是构成老米酒独特风味的重要成分之一。

### 2.4 老米酒中游离氨基酸的含量分析

东山老米酒中, 新酿、陈酿中的游离氨基酸含量如表

4 所示。新酿和陈酿的氨基酸总含量分别为 641.65 和 574.72 mg/L, 其中必需氨基酸的总量分别为 228.91 和 190.80 mg/L。新酿的必需氨基酸含量比陈酿要高 2.48%, 且除了甲硫氨酸和苯丙氨酸略低于陈酿之外, 其余必需氨基酸含量均高于陈酿, 表明在陈化过程中, 东山老米酒中的氨基酸含量呈逐渐下降趋势。

表 3 东山老米酒中的挥发性风味物质的相对含量(%)  
Table 3 Relative content of volatile flavor compound in Dongshan old rice wine (%)

风味物质	新酿	陈酿
苯乙醇	17.58	11.19
琥珀酸二乙酯	1.33	4.90
辛酸乙酯	6.07	1.58
乙酸异戊酯	0.75	1.05
正己酸乙酯	---	1.13
乳酸乙酯	---	1.44
苯甲醛	0.61	---
2,4-二叔丁基苯酚	2.60	0.98
L-乳酸	5.18	4.52

注: ---表示未检出。

大多数氨基酸具有甜味或苦味, 少数带有鲜味或酸味, 丰富的氨基酸给黄酒带来了独特的风味, 同样的也能给东山老米酒带来独特的风味<sup>[24]</sup>。酒中苦味物质过多而产生持续性的苦味会使人不愉快, 但少量的苦味氨基酸却有利于丰富和改善其风味, 黄酒中存在约 44%的苦味氨基酸<sup>[25]</sup>。由表 4 可知, 新酿、陈酿东山老米酒中的苦味氨基酸含量分别为 68%和 64.4%, 略高于黄酒中的苦味氨基酸含量, 表明东山老米酒相对于黄酒味道要偏苦。刺激阈(stimulus threshold)是指释放一个行为反应所需的最小刺激强度, 低于阈值的刺激不能导致行为释放<sup>[26]</sup>。根据结果可以发现, 老米酒中的大部分苦味氨基酸的含量都没有超过其刺激阈, 对体系中的苦味贡献较小。但是酒样中的组氨酸、精氨酸含量远高于刺激阈值, 因此, 老米酒中的主要苦味呈味物质是组氨酸和精氨酸。

## 3 结 论

本研究利用 26S rDNA 序列分析法对从东山老米酒曲种中分离得到的 4 株菌株进行形态观察及生理生化性质测定, 随后提取 DNA, 经 PCR 扩增后, 测定其 26S rDNA 序列, 并与基因库中的基因序列进行同源性比较。经分子鉴定, 3 株为酿酒酵母, 1 株为白色隐球菌, 即东山老米酒的曲种以酿酒酵母为主。东山老米酒的发酵以酵母发酵为主, 发酵过程中有氨基甲酸乙酯检出, 但氨基甲酸乙酯的含量

处于较低水平,且随着老米酒的陈化而降低,因此对人体的危害较低。东山老米酒中检出的风味物质以醇酯类为主,随着老米酒的陈化,酒中的酯类含量增加,醇类含量降低。东山老米酒中富含各种游离氨基酸,包括 8 种必需氨基酸。其中组氨酸和精氨酸含量较高,导致酒中苦味氨基酸含量高于 60%,因而酒味较黄酒会略微偏苦,东山老米酒陈化的同时氨基酸含量逐渐下降。本研究对综合了解东山老米酒的酵母菌株和风味变化提供理论依据。

表 4 东山老米酒中的游离氨基酸含量(mg/L)  
Table 4 Content of free amino acids in Dongshan old rice wine (mg/L)

类别	氨基酸	新酿	陈酿	刺激阈
带甜味的氨基酸	天冬氨酸	39.61	38.89	100
	苏氨酸	19.89	18.08	260
	脯氨酸	49.51	42.11	300
	缬氨酸	38.68	32.61	150
	赖氨酸	7.16	6.44	50
	异亮氨酸	25.03	20.99	90
	亮氨酸	70.11	47.00	380
纯苦味氨基酸	酪氨酸	43.61	35.15	90
	苯丙氨酸	6.63	7.32	150
	组氨酸	42.32	38.99	20
	精氨酸	93.80	82.56	10
	丝氨酸	23.47	21.88	/
	谷氨酸	66.34	62.82	/
	甘氨酸	28.47	39.84	/
其他氨基酸	丙氨酸	62.82	56.08	/
	胱氨酸	5.11	4.59	/
	甲硫氨酸	19.09	19.37	/
	总氨基酸	641.65	574.72	/
总苦味氨基酸	436.34	370.13	/	
必需氨基酸	228.91	190.80	/	

注: /表示不存在。

## 参考文献

- 陈启武. “东山老米酒”的酿造[J]. 酿酒科技, 1997, (1): 61–62.  
CHEN QW. Brewing of “Dongshan old rice wine” [J]. Brew Sci Technol, 1997, (1): 61–62.
- 周春艳, 张秀玲, 王冠蕾. 酵母菌的 5 种鉴定方法[J]. 中国酿造, 2006, (8): 51–54.  
ZHOU CY, ZHANG XL, WANG GL. Five identification methods of yeast [J]. China Brew, 2006, (8): 51–54.
- 卢玲玲, 单洪波, 许育绚, 等. rDNA 测序在酵母菌和丝状真菌鉴定中的临床应用评价[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(5): 432–436.  
LU LL, SHAN HB, XU YX, *et al.* Clinical application evaluation of rDNA sequencing in the identification of yeast and filamentous fungi [J]. Chin J Antibiot, 2021, 46(5): 432–436.
- GUTEL LR, FOX GE. Compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 175–269.
- 文淑婷, 李艳. 老白干酒曲中酵母菌多样性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 175–182.  
WEN ST, LI Y. Analysis of yeast diversity in Laobaigan yeast [J]. Food Sci, 2018, 39(24): 175–182.
- SALMON AG, ZEISE L. Risks of carcinogenesis from urethane exposure [M]. Florida: CRC Press, 1991.
- WANG C, WANG M, ZHANG MP. Ethyl carbamate in Chinese liquor (Baijiu): Presence, analysis, formation, and control [J]. Appl Microbiol Biot, 2021, (7): 1–13.
- JUNG S, KIM S, KIM I, *et al.* Risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages in Korea using the margin of exposure approach and cancer risk assessment [J]. Food Control, 2021, 124(11): 107867.
- ANCHA Z, MARINDA V, HENNIE VANV. Preventing ethyl carbamate formation in wine [J]. Wine Land South Africa, 2000, 12: 83–85.
- WU PG, PAN XD, WANG LY, *et al.* A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China [J]. Food Control, 2012; 23(1): 286–288.
- 冯妍, 何凯翔, 解玉红. 葡萄酒中酵母菌的筛选及菌株鉴定[J]. 价值工程, 2020, 39(13): 270–273.  
FENG X, HE KX, XIE YH. Screening and identification of yeast strains from grape [J]. Value Eng, 2020, 39(13): 270–273.
- ZHOU WY, FANG RS, CHEN QH. Effect of gallic and protocatechuic acids on the metabolism of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine brewing [J]. Food Chem, 2017, 233: 174–181.
- 王志山, 刘晓昆, 陈文浩, 等. 芝麻香型白酒大曲中酵母菌的分离与鉴定[J]. 生物资源, 2019, 41(6): 550–556.  
WANG ZS, LIU XK, CHEN WH, *et al.* Isolation and identification of yeast in sesame flavor liquor Daqu [J]. Biol Res, 2019, 41(6): 550–556.
- 田进, 吴成, 杨金仙, 等. 葡萄酒有孢汉逊酵母分子指纹图谱分析[J]. 菌物学报, 2020, 39(4): 755–765.  
TIAN J, WU C, YANG JX, *et al.* Molecular fingerprint analysis of the genus *Saccharomyces* in wine [J]. Chin J Mycol, 2020, 39(4): 755–765.
- JIAO ZH, DONG YC, CHEN QH. Ethyl carbamate in fermented beverages: Presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals ethyl carbamate in fermented beverages [J]. Compr Rev Food Sci, 2014; 13(4): 611–626.
- FU ML, LIU J, CHEN QH, *et al.* Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Int J Food Sci Technol, 2010, 45(6): 1297–1302.
- CHEN S, XU Y, QIAN MC. Aroma characterization of Chinese rice wine by gas chromatography-olfactometry, chemical quantitative analysis, and aroma reconstitution [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(47): 11295–11302.
- ZHOU WY, HU JJ, ZHANG XL, *et al.* Application of bamboo leaves extract to Chinese yellow rice wine brewing for ethyl carbamate regulation

- and its mitigation mechanism [J]. *Food Chem*, 2020, 319. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126554
- [19] 李红蕾, 冯涛. 不同酒龄和类型黄酒中主要味觉物质的测定[J]. *中国酿造*, 2012, 31(1): 172-175.
- LI HL, FENG T. Determination of main taste substances in yellow wine of different wine age and types [J]. *China Brew*, 2012, 31(1): 172-175.
- [20] 马燕红, 张生万, 李美萍, 等. 清香型白酒酒龄鉴别的方法研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(10): 184-189.
- MA YH, ZHANG SW, LI MP, *et al.* Study on the method of identification of wine age of clear flavor liquor [J]. *Food Sci*, 2012, 33(10): 184-189.
- [21] CHEN SA, XU Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine [J]. *J Inst Brew*, 2010, 116: 190-196.
- [22] FAN WL, QIAN MC. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese “YangheDaqu” liquors [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 7931-7938.
- [23] FAN WL, QIAN MC. Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 2695-2704.
- [24] 李博斌, 曾金红, 刘兴泉, 等. 黄酒中氨基酸与感官口味的定量相关研究[J]. *酿酒科技*, 2010, (10): 23-25.
- LI BB, ZENG JH, LIU XQ, *et al.* Quantitative correlation between amino acids and sensory taste in yellow wine [J]. *Liquor-Making Sci Technol*, 2010, (10): 23-25.
- [25] 于海燕, 谢静茹, 解铜, 等. 黄酒中苦味物质形成机制研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(15): 4864-4868.
- YU HY, XIE JR, XIE T, *et al.* Research progress on formation mechanism of bitter substances in rice wine [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(15): 4864-4868.
- [26] 刘明, 徐姿静, 钟其顶, 等. 白酒中风味物质阈值测定方法的比较[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(4): 253-260.
- LIU M, XU ZJ, ZHONG QD, *et al.* Comparison of threshold determination methods for flavor substances in liquor [J]. *Chin J Food Sci*, 2018, 18(4): 253-260.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

## 作者简介



芦红云, 博士研究生, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: luhongyun@zju.edu.cn



陈启和, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术与生物安全研究。

E-mail: chenqh@zju.edu.cn