

发酵食品中氨基甲酸乙酯的形成途径及 消减策略研究进展

李焱鑫¹, 黄晓媛¹, 白卫东^{1,2,3}, 赵文红^{1,2,3}, 董浩^{1,2,3}, 钱敏^{1,2,3*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 现代农业工程创新研究院, 广州 510225; 2. 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广州 510225; 3. 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室, 广州 510225)

摘 要: 氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)主要存在于发酵食品中, 是一种具有遗传毒性和致癌性的化合物, 长期摄入会显著增加各种癌症的发病率。研究表明, EC 形成途径主要是由相关前体物质在食品发酵或贮藏过程中反应生成; 其前体物质主要有尿素、瓜氨酸、氨甲酰磷酸、焦碳酸二乙酯、氰化物等, 这些主要的 EC 前体物通常是由酿酒酵母或乳酸菌的精氨酸代谢伴随着发酵过程而产生的。由于 EC 对人类身体健康的潜在威胁, 减少发酵食品中的 EC 显得尤为必要。本文针对发酵食品中 EC 的形成途径, 从物理法、化学法、酶法以及代谢过程法系统综述了发酵食品中 EC 的消减策略, 可为提高我国发酵食品的安全生产提供理论依据。

关键词: 氨基甲酸乙酯; 发酵食品; 形成途径; 消减策略

Research progress on formation pathway and reduction strategy of ethyl carbamate in fermented food

LI Yan-Xin¹, HUANG Xiao-Yuan¹, BAI Wei-Dong^{1,2,3}, ZHAO Wen-Hong^{1,2,3},
DONG Hao^{1,2,3}, QIAN Min^{1,2,3*}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Guangzhou 510225, China; 3. Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510225, China)

ABSTRACT: Ethyl carbamate (EC) mainly exists in fermented foods, which is a genotoxic and carcinogenic compound, and long-term ingestion significantly increases the incidence of various cancers. It has been shown in studies that formation pathway of EC is mainly formed by the reaction of related precursors during food fermentation or storage. Its precursor substances mainly include urea, citrulline, carbamyl phosphate, diethyl pyrocarbonate, cyanide and so on, and these main precursors of EC are usually produced from the arginine metabolism of *saccharomyces cerevisiae* or lactic acid bacteria accompanied by the fermentation process. It is necessary to reduce the amount of EC in fermented food due to the potential threat to human health. This article was aimed at the

基金项目: 广东省驻镇帮镇扶村农村科技特派员项目(KTP20210224)

Fund: Supported by the Rural Science and Technology Correspondent Project of Resident in the Town, Helping the Town and Assisting the Countryside in Guangdong Province (KTP20210224)

***通信作者:** 钱敏, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为食品化学。E-mail: 38854770@qq.com

***Corresponding author:** QIAN Min, Master, Senior Experimenter, College of Light Industry and Food Sciences, Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, No.24, Dongsha Street, Haizhu District, Guangzhou 510225, China. E-mail: 38854770@qq.com

formation route of EC in fermented food, and then systematically summarized the reduction strategies of EC in fermented food from physical, chemical, enzymatic and metabolic processes. This review can provide a theoretical basis for the improvement of the safe production of fermented food in China.

KEY WORDS: ethyl carbamate; fermented food; formation route; reduction strategy

0 引言

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)又名尿烷、乌来糖、乌来坦、乌拉坦^[1], 是发酵食品在生产及贮藏过程中的天然产物, 广泛存在于酱油、酒类(白酒、黄酒、葡萄酒等)、谷物或豆类发酵食品和乳酸菌发酵饮料等制品中^[2]。EC 曾作为医药和兽药使用, 后因有毒且疗效欠佳而被禁止用于人类医药领域。EC 属多位点致癌物质, 1987 年国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将 EC 归为 2B 类致癌物, 2007 年对其致癌性重新评估后改为 2A 类^[3-4]。

近年来, 随着人们对于 EC 深入的认识, 发现由于发酵食品原料的多样性、使用微生物菌种的不同, 使得 EC 在食品发酵和储存过程中的形成途径多种多样。尿素、氨甲酰磷酸、瓜氨酸、焦碳酸二乙酯、氰化物等都可与乙醇反应生成 EC。EC 具有一定的神经毒性、肺毒性、胃毒性和较强的致癌性, 可从肠道和皮肤被快速吸收, 长期摄入会显著增加各种癌症的发病率^[5]。因此, 关于 EC 的消减得到了国内外学者的广泛关注。消减发酵食品中的 EC 有多种策略, 包括物理法、化学法、酶法以及代谢过程法等; 如王金龙等^[6]采用超高效液相色谱-高分辨质谱法对浓香型基酒在不同环境条件下 EC 进行研究分析, 发现陶制容器、20℃ 以下的温度及避光等环境条件有利于降低 EC 含量; KIM 等^[7]以添加脲酶的韩国豆瓣酱为研究对象, 在含有不同前体物的发酵体系中加入此酶, 结果显示, 发酵后的豆瓣酱中 EC 含量可下降 38.4%; 而方逸群等^[8]通过基因过表达筛选获得的改良黄酒酵母菌种 JF501-B5 可使黄酒中的 EC 含量降低 63%。

尽管发酵食品中 EC 的研究得到了广泛报道, 但其形成途径并未形成系统的认识, 此外, EC 的消减技术也缺乏较为全面的总结和归纳, 这对发酵食品中 EC 的控制以及我国发酵食品的安全生产构成一定的限制。因此, 本文从 EC 的生成途径以及消减策略两个方面综述了国内外发酵食品中 EC 的研究进展及存在的问题, 并对发酵食品中消除 EC 的未来发展方向提出展望, 以期降低发酵食品中有害物质 EC 的相关研究提供参考。

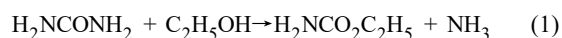
1 EC 的形成途径

由于发酵原料和微生物菌种的多样性, 食品发酵和贮藏过程中形成 EC 的途径也不尽相同。发酵食品中 EC 的前体物主要有尿素、氨甲酰磷酸、瓜氨酸、焦碳酸二乙酯、氰化物等。这些前体物可依照其来源不同, 分为两大类,

如图 1 所示^[9]: 一类是指人为的在生产过程中所添加的前体物; 另一类则是指发酵过程中自发生成或从环境带入的前体物。

1.1 尿素与乙醇反应生成 EC

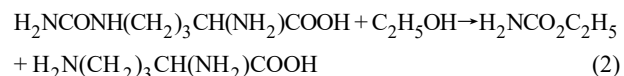
尿素是 EC 最主要的前体物, 如黄酒中 90% 的 EC 是尿素与乙醇反应产生的^[10]。其反应式如式(1)所示:



发酵食品中的尿素来源有两个方面, (1)尿素是由酿造食品的原料直接带入, 如种植过程中添加肥料使发酵原料中积累部分尿素或外加辅料引入少量尿素等^[11-12]; (2)主要来自发酵过程中酵母菌通过尿素循环途径(urea cycle pathway)降解精氨酸产生^[1]。在酵母菌的细胞内, 精氨酸被分解为尿素和鸟氨酸^[13]。通常情况下尿素可在尿素水解酶的作用下降解为二氧化碳和氨^[14], 但当发酵培养基中存在酵母偏好型氮源时, 尿素水解酶的表达会被强烈抑制。这种现象是由于酿酒酵母对氮源的利用受到氮源阻遏效应(nitrogen catabolite repression, NCR)调控^[15], 使酵母细胞优先利用环境中更为优质的氮源, 因此 NCR 调控会使产生的尿素无法及时被降解利用, 而是出于对自身的保护, 使尿素在尿素渗透酶的作用下以主动运输的方式转运至胞外发酵液中^[16], 此时发酵液中的尿素可在酸性条件下与乙醇反应生成 EC。

1.2 瓜氨酸与乙醇反应生成 EC

瓜氨酸也是 EC 的主要前体物质之一, 可与乙醇反应生成 EC, 从而造成发酵食品的安全问题。二者反应式如式(2)所示:



发酵酒的生产工艺一般包括酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵两个环节, 苹果酸-乳酸发酵能够改善发酵酒的风味以及降低酒的酸度^[17], 但是该过程会导致酵母和乳酸菌(*Lactobacillus*, LAB)精氨酸代谢生成瓜氨酸^[10]。在葡萄酒的发酵过程中, 由于葡萄中精氨酸含量较高, 在酿酒酵母发酵结束后仍有较多的精氨酸残留在发酵液中, 从而进一步被 LAB 经精氨酸脱氨酶(arginine deiminase, ADI)途径代谢为氨、鸟氨酸、腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)和二氧化碳等。但该过程常会受到盐浓度、pH 和氧胁迫等多种环境因素的抑制, 从而造成瓜氨酸的积累。而胞内积累的瓜氨酸会被 LAB 通过主动运输转运至胞外发酵液中并与乙醇自发形成 EC^[16]。

45%~47%的 EC, 并且可以较好地提高酱油的风味和色泽, 但是却会对酒的风味口感有一定的影响。而林文浩等^[25]采用自行研制开发的特种黄酒助剂, 在发酵液或成品酒中直接添加, 也可有效降低尿素和 EC 的含量。此外, 郭双丽等^[26]采用筛选获得的弱酸性阳离子交换树脂能够特异性吸附黄酒中的尿素, 该方法对于尿素浓度较低黄酒样品有较好的处理效果(尿素消减率 40%左右), 但对于尿素浓度较高(>15 mg/L)的黄酒经多次吸附处理后尿素浓度才能有明显降低的效果。

表 1 不同吸附材料消减 EC 的效果
Table 1 Effects of different adsorbents on EC removal

吸附材料	发酵食品	EC 消减率/%	参考文献
碱浸硅藻土	黄酒	77.49	[13]
树脂材料 DM301 和 DA-201 进行复配	黄酒	76.81	[23]
碳吸附	白酒	47	[24]
碳吸附	酱油	45	[24]
特种黄酒助剂	黄酒	73.4	[25]
弱酸性阳离子交换树脂	黄酒	40	[26]
特异性吸附材料 L	黄酒	80 以上	[27]
特异性功能的树脂材料	黄酒	60 以上	[28]
大孔结构吸附树脂	黄酒	70 以上	[29]
壳聚糖复配硅藻土	黄酒	77.68	[30]

物理吸附法消减 EC 可以实现大规模生产, 而且操作步骤简单、适应范围广、处理能力强。但是, 该法对产品品质风味口感等有一定的影响, 对 EC 的处理效果须提高, 并且目前仍存在着吸附材料的吸附机制尚不清楚、难以指导工业化放大等问题。

2.2 化学法

目前国内外研究者所应用的化学方法主要是指通过添加一些外源物质减少 EC 或者前体物质的含量。

氰化物为 EC 的前体物之一, 其存在形式有 3 种, 分

别为氰酸、氢氰酸和含氰基, 通常存在于酿酒原料中, 如高粱、木薯、核果类^[21]。因此可以使用氰化物催化剂来消除氰化物, 研究发现核果蒸馏酒生产过程中添加铜离子作为催化剂可以有效降低 EC 的含量^[11]。但是添加催化剂这种方法存在着一些缺陷, 催化剂的残留可能会导致食品安全、环境污染等问题, 并且降低 EC 含量的幅度并不大, 在实际的生产中的效果有限。

除了添加氰化物催化剂外, HASHIGUCHI 等^[31]在甜酒生产过程中通过添加焦亚硫酸钾作为抗氧化剂可以降低 EC 的含量, 其实验表明, 随着抗氧化剂浓度的增加可降低 EC 含量。但是这种方法只对在一定浓度范围内的 EC 有效, 一旦 EC 的浓度过高便无法继续发挥作用。并且研究者发现添加抗氧化剂含量为日本允许的最大添加剂量时, EC 仅能降低 27%。因此, 抗氧化剂在实际生产中的应用同样受到了限制。

随后, ZHOU 等^[32]发现添加没食子酸和原儿茶酸可以有效抑制 EC 的生成, 同时还发现, 通过添加多酚类物质抑制精氨酸脱亚胺酶可减少精氨酸的消耗。多酚物质的添加可使黄酒的风味基本保持不变, 并且可很大程度上减少 EC 的生成, 但是目前对没食子酸和原儿茶酸抑制 EC 的机制仍缺乏深入的了解, 需要在今后的研究中进行探讨。

2.3 酶 法

应用于发酵食品中 EC 消除的酶主要有两种, 其一是酸性脲酶, 通过消除发酵食品中的尿素来减少 EC 的形成; 另外一种就是氨基甲酸乙酯水解酶, 它可以直接降解 EC 生成氨、乙醇和二氧化碳^[33]。

2.3.1 酸性脲酶消减 EC

酸性脲酶均发现于微生物中, 最早由日本学者从小鼠粪便中的一种柠檬酸杆菌里被分离出来, 后因其能在酸性条件下发挥作用, 能够应用于酒精饮料中降解尿素而引起了人们的关注^[33]。目前, 提高酸性脲酶降低 EC 浓度的途径主要有两种。(1)不断筛选脲酶活性、使用效率及脲酶产量高的产酶菌株^[12]。如表 2 所示, 多名研究者发现发酵乳杆菌^[34]、肠杆菌^[35]、地衣芽孢杆菌^[36]、罗伊氏乳杆菌^[37]、

表 2 不同来源的酸性脲酶消减尿素效果
Table 2 Effects of acid urease from different sources on reducing urea

来源	条件	尿素消减率/%	参考文献
发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	酒体 pH>4.0, 温度 15~20℃, 酶用量 30 mg/L 左右	80	[34]
肠杆菌属 R-SYB082 (<i>Enterobacter</i> sp. R-SYB082)	加 0.05 U/mL 纯化后的酸性脲酶后, 在 35℃条件下保温 4 d	83	[35]
地衣芽孢杆菌 ATCC 9945a (<i>B. paralicheniformis</i> ATCC 9945a)	在米酒中加入 6 U/mL 脲酶, 在 37℃下反应 50 h	92	[36]
罗伊氏乳杆菌(<i>L. reuteri</i>)	添加 50 U/L 酶液 1 d 内	100	[37]
腐生葡萄球菌 M39 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i> M39)	适润料条件为酶浓度 2×10 ³ U/kg 原料、温度 40℃、时间 2 h	97.1	[38]

腐生葡萄球菌^[38]等均可被用作产酶菌株, 其产物添加到发酵食品中, 使尿素的消减率都得到了一定的提高。但目前可以商业化使用的仍然只有发酵乳杆菌所分离出来的酸性脲酶^[12], 其他产酶菌株的研究仍停留在实验阶段; (2)使用固定化酶技术, 刘小锋^[39]采用氧化石墨烯和壳聚糖复合微球固定化酸性脲酶, 并对主要条件进行优化, 其结果表明, 该方法可以提高酸性脲酶的活性, 也有利于反应后脲酶从酒液中的分离及重复使用。固定化酶技术可提高酶的稳定性和生产效率、实现酶的重复利用、降低生产成本^[40], 为酸性脲酶的大规模产业化提供了可能。

使用酸性脲酶可以在不改变发酵食品风味的条件下, 极大程度上降低发酵食品中尿素的含量, 目前美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)所推荐的有关抑制 EC 的消减策略中, 添加酸性脲酶是最为方便的一种方式^[10]。

2.3.2 氨基甲酸乙酯水解酶消减 EC

酸性脲酶虽然可以有效地消除发酵食品中的尿素, 但是却无法降解食物中已经形成的 EC, 所以国内外研究者越来越关注可以直接降解 EC 的氨基甲酸乙酯水解酶。如表 3 所示, 目前人们已从多种菌株中筛选出氨基甲酸乙酯水解酶。谷晓蕾等^[41]从小鼠肠道中筛选出一株可以产氨基甲酸乙酯水解酶的变幻青霉(*Penicillium variable*), 并对该产酶条件进行了优化, 使得酶活性提高了 3.47 倍。其研究表明, 在模拟黄酒体系下, 该酶对尿素和 EC 有相对较强的降解作用。随后, 卜攀攀等^[42]通过对小鼠胃部进行筛选得到一株产氨基甲酸乙酯水解酶的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 该酶能够耐受高浓度氯化钠, 可应用于发酵食品中 EC 的降解。

氨基甲酸乙酯水解酶虽然可以直接降解 EC, 但是其水解效果随发酵食品的种类不同而有所差异, 因此, 针对不同

的发酵食品还需要筛选酶学性质不同的氨基甲酸乙酯水解酶, 从而提高 EC 的降解率, 使其更适用于大规模的工业化应用。

2.4 代谢过程法

降低发酵食品中 EC 含量的代谢过程法包括工艺优化法和代谢工程改造法。

2.4.1 工艺优化法

发酵食品的生产过程中 EC 的形成受到多种因素的影响, 其中包括前体物质如尿素、瓜氨酸、氰化物等因素, 以及发酵过程中的一些工艺参数如 pH、温度、氧气、选用的酵母菌、乳酸菌和贮存时间等也会影响 EC 的形成。因此, 对发酵工艺进行优化可以降低某些因素对 EC 生成的影响, 从而减少 EC 的生成。杨晓婷等^[47]发现调整黄酒酿造工艺, 控制醪液中的精氨酸代谢, 可以有效降低产品中的 EC 含量。此外, 田夏琼等^[48]对浓香型白酒发酵过程中 EC 的含量、环境因子及微生物群落进行了连续追踪监测, 分析了环境因子及微生物群落与 EC 含量之间的相关性, 发现在浓香型白酒的发酵期间人为调控 pH、水分含量及上调芽孢杆菌属在发酵微生物中的比例, 同样可以达到降低 EC 含量的目的。

但是, 控制相关工艺参数虽然可降低发酵食品中的 EC 含量, 却会使部分发酵食品的风味受损、营养降低, 影响发酵产品的质量; 并且由于在实际生产过程中, 发酵工艺的环境受到诸多因素的影响, 无法做到精准把控, 因此该法虽然在模拟模式中有较好的效果, 却很难投入到实际的工厂应用中。

2.4.2 代谢工程改造法

如表 4 所示, 代谢工程改造法常指选育一株可以有效降解 EC 的酵母菌, 此方法主要通过两条途径实现: (1)促进尿素降解及转运相关酶的编码基因, 提高菌株对尿素降解的能力; (2)抑制精氨酸代谢产生尿素的相关表达, 从而减少尿素的形成和积累。

表 3 不同来源 EC 水解酶消减 EC 效果
Table 3 Effects of removing ethyl carbamate by EC hydrolases of different sources

来源	条件	EC 消减率/%	参考文献
变幻青霉 JN-A525 (<i>Penicillium variable</i> JN-A525)	EC 降解酶添加量为 0.9 U/mL 时, 温度 50℃, 热稳定范围 40~50℃, 最适 pH 6.0	35	[41]
肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	-	-	[42]
赖氨酸芽孢杆菌 SC02 (<i>Lysinibacillus fusiformis</i> SC02)	-	-	[43]
胶红酵母 (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>)	利用固定化细胞的方法将经固定化的胶红酵母添加到中国商业化的白酒中	51.6	[44]
普罗威登斯菌属 JNB815 (<i>Providencia</i> sp. JNB815)	酶量为 0.2 U/mL	25	[45]
鲁考弗梅奇酵母 G1-3 (<i>Metschnikowia reukaufii</i> G1-3)	发酵天数为 45 d、温度为 37℃、接种量 3%	65.57	[46]

注: -表示未考察此酶在发酵食品中的应用效果。

表 4 不同基因改造菌株消减 EC 效果
Table 4 EC removal efficiencies of different genetically modified strains

方法	菌株	发酵食品	EC 消减率/%	参考文献
强化 <i>DUR1,2</i> 基因编码	菌株 JF501-B5	黄酒	63	[8]
	N85 ^{<i>DUR1,2</i>}	黄酒	49.1	[49]
	N85 ^{<i>DUR1,2-c</i>}	黄酒	55.3	[49]
	K7EC-	清酒	87	[50]
	K9EC-	清酒	68	[50]
	CD1,2	葡萄酒	34.44	[51]
敲除 <i>CAR1</i> 基因	85#: Δ <i>car1</i>	黄酒	38	[52]
	S Δ <i>car1</i>	黄酒	85	[53]

尿素循环途径为 EC 形成的主要途径之一，即在较好氮源缺乏的情况下，酿酒酵母代谢精氨酸产生尿素和瓜氨酸，而此时精氨酸酶作为尿素形成的一个关键酶，主要由精氨酸酶编码基因(*CAR1*)编码^[12]，吴殿辉^[49]的研究表明，酿酒酵母的单个 *CAR1* 等位基因表达的精氨酸酶足以降解精氨酸生成大量的尿素，形成数量可观的 EC。因此通过敲除 *CAR1* 基因，是抑制酿酒酵母代谢精氨酸生成尿素的途径之一。赵然然等^[52]利用同源重组机制精确敲除 *CAR1* 基因，构建出低产尿素的酵母工程菌，该工程菌发酵后检测表明，酒液中 EC 的含量降低了约 38%。

尿素在细胞内的代谢主要是通过尿素羧化酶和脲基甲酸盐水解酶来完成，二者由脲基酰胺酶编码基因(*DUR1,2*)编码，酿酒酵母在酒精发酵阶段时，由于 *DUR1,2* 表达受到 NCR 调控，胞内脲基酰胺酶活性很低，不能及时降解由精氨酸水解所产生的大量尿素，多余尿素被分泌到胞外与乙醇反应生成 EC^[42]。故而强化由 *DUR1,2* 基因编码的尿素降解途径，可促进尿素的降解。吴殿辉^[49]分别以酿酒酵母 N85 和 N85-c2 的单倍体为出发菌株，通过高效表达 *DUR1,2* 基因，构建了纯合工程菌 N85^{*DUR1,2*} 和 N85^{*DUR1,2-c*}。实验结果表明，N85^{*DUR1,2-c*} 能够有效地降低发酵液中尿素和 EC 的含量，而且还可以减缓长期储酒过程中 EC 的形成速率，减少了黄酒中 EC 的含量，提高了其饮用安全性。

代谢工程改造法通过在细胞内抑制尿素的生成和积累，从而控制 EC 含量的增长。但由于目前国内外对于在食品生产中使用基因改造菌株的限制性，这种方法并未被广泛应用。并且研究表明^[54-55]，选育低产尿素酵母菌的方法只适用于纯种发酵或以酵母菌为主的发酵过程，面对如酱油等的混菌发酵时，对某一菌株的改造是无法实现对 EC 及其前体积累的有效控制。

3 总结与展望

近年来，随着人们对于食品安全及健康越来越关注，

通过国内外研究者对 EC 的深入研究了解到，EC 的主要前体物有尿素、瓜氨酸、氨甲酰磷酸、氰化物以及焦碳酸二乙酯等，这些主要的 EC 前体物通常是由酿酒酵母或乳酸菌的精氨酸代谢伴随着发酵过程而产生。由于 EC 对人类的身体健康造成了潜在威胁，人们分别用物理、化学、酶法以及代谢过程法来降低发酵食品中的 EC 的含量。通过对其消减策略的综述可以发现，化学法目前相关研究较少，并且存在环境污染的可能性；酶法、代谢过程法二者可以在很大程度上降低 EC 的含量，但是这两种方法都存在花费昂贵且不稳定的缺点；物理法可以减少一定量的 EC，但是对产品品质风味口感等有一定的影响。这些方法目前基本都处于理论研究阶段，在工业生产中还存在较难实现的问题。因此，在未来研究中，如何在工业化生产中既保持产品的品质又可以降低 EC 的含量仍是难点。

因此，对于未来 EC 的研究，在不影响其风味口感的前提下，应着重于以下几个方面：(1)制定 EC 的限量标准。EC 广泛存在于发酵食品中，对人类的身体健康造成了潜在的威胁，而我国目前尚无有关 EC 的限量标准，应对发酵食品中 EC 的含量严格控制，加强对发酵食品中 EC 的研究，制定我国发酵食品中 EC 的限量标准，为发酵食品安全管理提供指导依据。(2)目前所应用于消减 EC 的方法大多是采用单一的源头控制法，而发酵体系复杂，EC 的形成途径众多，这种方法只能降低 EC 的含量，很难将其全部消减，故而有必要对 EC 消除方法进行更深入的研究，从而提出适合于发酵食品中 EC 消减的最佳方案。(3)目前有关 EC 消减的研究，基本都是在实验室中进行，可以大规模应用到实际生产中技术体系尚未建立。因此应优化 EC 的消减方案，使其在影响发酵食品品质的条件下，更容易投入工厂应用。

参考文献

[1] 刘洋, 李运奎, 韩富亮, 等. 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 289-295.
LIU Y, LI YK, HAN FL, et al. Research progress on ethyl carbamate in wine [J]. Food Sci, 2019, 40(7): 289-295.
[2] 陈荣锋, 沈琳, 费鹏, 等. 发酵食品中氨基甲酸乙酯检测方法的进展[J]. 食品工业, 2018, 39(8): 263-268.
CHEN RF, SHEN L, FEI P, et al. Progress in detection methods for ethyl urethane in fermented foods [J]. Food Ind, 2018, 39(8): 263-268.
[3] BAAN R, STRAIF K, GROSSE Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages [J]. Lancet Oncol, 2007, 8(4): 292-293.
[4] 范文来, 徐岩. 白酒功能因子与品质安全问题[J]. 酿酒科技, 2012, (3): 17-22.
FAN WL, XU Y. Liquor function factor and quality and safety problems [J]. Liquor-Making Sci Technol, 2012, (3): 17-22.
[5] GOWD V, SU H, KARLOVSKY P, et al. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant [J]. Food Chem, 2018, 248: 312-321.
[6] 王金龙, 程平言, 熊晓通, 等. 存储环境对浓香型基酒中氨基甲酸乙酯的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 189-193.
WANG JL, CHENG PY, XIONG XT, et al. Effect of the storage

- environment on ethyl carbamate in the concentrated aromatic base liquor [J]. *China Brew*, 2021, 40(7): 189–193.
- [7] KIM YG, LYU JH, KIM MK, *et al.* Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system [J]. *Food Chem*, 2015, 189(189): 74–79.
- [8] 方逸群, 倪斌. 黄酒酵母的性能改良及降低其产物中氨基甲酸乙酯含量的研究[J]. *酿酒科技*, 2018, (7): 27–33.
- FANG YQ, NI B. Study of performance improvement and reduction of ethyl carbamate content in yellow rice wine yeast [J]. *Liquor-Making Sci Technol*, 2018, (7): 27–33.
- [9] 张继冉. 酱油中氨基甲酸乙酯的产生机制和消除策略研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- ZHANG JR. Production mechanism and elimination strategy of urethane in soy sauce [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [10] 周万怡. 黄酒酿造过程中食源性酚酸类物质对氨基甲酸乙酯形成的调控及作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- ZHOU WY. Study on the regulation and action mechanism of foodborne phenolic acids in yellow rice wine brewing process [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [11] 方若思. 传统黄酒发酵中氨基甲酸乙酯产生的代谢规律及抑制方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- FANG RS. Study on the metabolic law and inhibition method of ethyl carbamate production in traditional yellow rice wine fermentation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [12] 焦志华. 氮代谢调控因子 Dal80p 对黄酒酿造中氨基甲酸乙酯形成的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- JIAO ZH. Effect of the nitrogen metabolism regulator Dal80p on the formation of ethyl carbamate in yellow rice wine brewing [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [13] 白卫东. 广东客家黄酒中氨基甲酸乙酯及其控制技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- BAI WD. Study on ethyl carbamate and its control technology in Guangdong Hakka yellow wine [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [14] WEBER JV, SHARYPOV VI. Ethyl carbamate in foods and beverages: A review [J]. *Environ Chem Lett*, 2009, 7(3): 233–247.
- [15] 胡竞进. 基于比较转录组学和 ChIP-Seq 研究转录因子 Dal80p 在酿酒酵母氮代谢中的调控功能[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- HU JJ. Based on comparative transcriptomics and ChIP-Seq studies investigating the regulatory function of the transcription factor Dal80p in nitrogen metabolism in *S. cerevisiae* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [16] 赵鑫锐. 代谢工程改造酿酒酵母降低黄酒中的氨基甲酸乙酯[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- ZHAO XR. Metabolic engineering modification of *S. cerevisiae* reduces ethyl carbamate in yellow rice wine [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [17] 罗苏仅, 白卫东, 赵文红, 等. 发酵酒中氨基甲酸乙酯形成的代谢途径及控制[J]. *中国酿造*, 2013, 32(9): 9–12.
- LUO SJ, BAI WD, ZHAO WH, *et al.* Metabolic pathway and control of ethyl carbamate formation in fermented wine [J]. *China Brew*, 2013, 32(9): 9–12.
- [18] MICHELE A, MAURÍCIO BA, FRANCO DW. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(6): 2819–2824.
- [19] 杨佳, 李新生, 耿敬章, 等. 黄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(3): 7–11.
- YANG J, LI XS, GENG JZ, *et al.* Progress of ethyl carbamate in yellow rice wine [J]. *China Brew*, 2020, 39(3): 7–11.
- [20] 黄海, 苑静, 郭亮, 等. 四川浓香型原酒中氨基甲酸乙酯含量分析及减控策略的初探[J]. *轻工科技*, 2019, 35(12): 3–6.
- HUANG H, YUAN J, GUO L, *et al.* Analysis of ethyl carbamate and control strategy in Sichuan [J]. *Light Ind Sci Technol*, 2019, 35(12): 3–6.
- [21] 陈丽叶. 饮料酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. *食品工业*, 2020, 41(8): 235–239.
- CHEN LY. Progress of ethyl urethane in beverage liquor [J]. *Food Ind*, 2020, 41(8): 235–239.
- [22] 宝菊花. 氨基甲酸乙酯在葡萄酒中的含量的变化及研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2008.
- BAO JH. Changes of ethyl carbamate in wine [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2008.
- [23] 高雅. 黄酒中氨基甲酸乙酯降低措施研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.
- GAO Y. Study on the reduction measures of ethyl carbamate in yellow rice wine [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [24] PARK SR, HA SD, YOON JH, *et al.* Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration [J]. *Food Control*, 2009, 20(10): 946–952.
- [25] 林文浩, 林峰, 周建弟. 黄酒中氨基甲酸乙酯和尿素的处理方法与工艺条件[J]. *酿酒科技*, 2013, (8): 40–43.
- LIN WH, LIN F, ZHOU JD. Treatment methods and process conditions of ethyl carbamate and urea in yellow rice wine [J]. *Liquor-Making Sci Technol*, 2013, (8): 40–43.
- [26] 郭双丽, 王栋, 徐岩. 黄酒中尿素的吸附去除技术研究[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(8): 1–7.
- GUO SL, WANG D, XU Y. Study on the adsorption and removal technology of urea in yellow rice wine [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(8): 1–7.
- [27] 刘俊. 中国黄酒中氨基甲酸乙酯控制策略及机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- LIU J. The control strategy and mechanism of ethyl carbamate in Chinese yellow wine [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [28] 刘俊, 赵光鳌, 徐岩. 黄酒中氨基甲酸乙酯直接减除技术的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(2): 171–176.
- LIU J, ZHAO GAO, XU Y. Study on the direct subtraction technique of ethyl carbamate in yellow wine [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2012, 31(2): 171–176.
- [29] 王翼玮, 王栋, 徐岩, 等. 黄酒中氨基甲酸乙酯吸附去除的动力学和热力学研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(1): 130–134.
- WANG YW, WANG D, XU Y, *et al.* Kinetics and thermodynamics of adsorption removal of ethyl carbamate in yellow rice wine [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(1): 130–134.
- [30] 曹甜. 广东黄酒中氨基甲酸乙酯的减除技术及机理研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2019.
- CAO T. Reduction technology and mechanism of ethyl carbamate in Guangdong Yellow Wine [D]. Guangzhou: Zhongkai College of Agricultural Engineering, 2019.
- [31] HASHIGUCHI T, HORII S, IZU H, *et al.* The concentration of ethyl carbamate in commercial ume (*Prunus mume*) liqueur products and a method of reducing it [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2010, 74(10): 2060–2066.
- [32] ZHOU W, FANG R, CHEN Q. 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.
- [33] 刘庆涛, 康振, 堵国成. 微生物酶法消除黄酒中氨基甲酸乙酯研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 567–576.
- LIU QT, KANG Z, DU GC. Progress in the elimination of ethyl carbamate in yellow rice wine by microbial enzyme method [J]. *Chin J Biotechnol*,

- 2019, 35(4): 567–576.
- [34] 周建弟, 丁关海, 郑志强. 酸性脲酶分解黄酒中尿素特性的研究[J]. 中国酿造, 2006, (11): 45–46.
- ZHOU JD, DING GH, ZHENG ZQ. Study on urea properties in rice wine by acidic urease [J]. China Brew, 2006, (11): 45–46.
- [35] 杨鲁强, 王松华, 田亚平, 等. 酒用酸性脲酶的纯化及其N端序列的测定[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(6): 93–97.
- YANG LQ, WANG SH, TIAN YP, *et al.* Purification of acidic urease in alcohol use and determination of its N terminal sequence [J]. J Food Sci Biotechnol, 2008, 27(6): 93–97.
- [36] LIU QT, CHEN YQ, YUAN ML, *et al.* A *Bacillus paralicheniformis* iron-containing urease reduces urea concentrations in rice wine [J]. Appl Environ Microb, 2017. DOI: 10.1128/AEM.01258–17
- [37] 周建立, 康振, 刘庆涛, 等. 重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 74–83.
- ZHOU JL, KANG Z, LIU QT, *et al.* Application of urea and urethane in Yellow Rice Wine [J]. Chin J Biotechnol, 2016, 32(1): 74–83.
- [38] 孟庆达. 微生物法减少白酒生产中氨基甲酸乙酯前体物质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- MENG QD. Reduction of ethyl carbamate precursor substances in liquor production by microbial method [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [39] 刘小峰. 双功能酸性脲酶的全基因表达与复性及固定化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- LIU XF. Study on whole gene expression and renaturation and immobilization of bifunctional acidic urease [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [40] 王琳琳, 高兴明, 韦海涛, 等. 固定化酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 轻工学报, 2021, 36(2): 25–33.
- WANG LL, GAO XM, WEI HT, *et al.* Progress in the application of immobilized enzymes in the food industry [J]. J Light Ind, 2021, 36(2): 25–33.
- [41] 谷晓蕾, 田亚平. 变构青霉氨基甲酸乙酯降解酶产酶条件优化及酶的底物特异性[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(6): 603–607.
- GU XL, TIAN YP. Optimization of enzyme production conditions and substrate specificity of enzymes [J]. J Food Sci Biotechnol, 2013, 32(6): 603–607.
- [42] 卜攀攀, 陈坚, 堵国成. 耐盐氨基甲酸乙酯水解酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 404–411.
- BU PP, CHEN J, DU GC. Purification and characterization of a halophilic urethanase from *Klebsiella pneumonia* [J]. Chin J Biotechnol, 2014, 30(3): 404–411.
- [43] 王伟高, 陈坚, 周景文. 赖氨酸芽孢杆菌产氨基甲酸乙酯水解酶的发醇条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(3): 259–265.
- WANG WG, CHEN J, ZHOU JW. Optimization of fermentation conditions for ethylcarbamate hydrolyase production in *Bacillus lysine* [J]. J Food Sci Biotechnol, 2017, 36(3): 259–265.
- [44] WU Q, ZHAO Y, WANG D, *et al.* Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa*: A novel urethanase-producing strain for degrading ethyl carbamate [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 171(8): 2220–2232.
- [45] 杨广明. 酸性脲酶与氨基甲酸乙酯降解酶产生菌的筛选及酶的特性[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- YANG GM. Screening of bacteria produced by acidic urease and urethane-degrading enzymes and the characteristics of enzymes [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [46] 姚晓瑞宁, 史学伟, 周雪艳, 等. 可降解氨基甲酸乙酯酵母菌的筛选及降解条件优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 155–161.
- YAO XRN, SHI XW, ZHOU XY, *et al.* Screening and degradation condition optimization [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(13): 155–161.
- [47] 杨晓婷, 陆筑凤, 赵可及, 等. 不同酿造条件对黄酒中精氨酸代谢的影响研究[J]. 酿酒科技, 2019, (10): 41–45.
- YANG XT, LU ZF, ZHAO KJ, *et al.* Effects of different brewing conditions on arginine metabolism in yellow rice wine [J]. Liquor- Making Sci Technol, 2019, (10): 41–45.
- [48] 田夏琼, 江华明, 关统伟, 等. 浓香型白酒发酵过程中氨基甲酸乙酯形成的关联因子探究[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 59–63.
- TIAN XQ, JIANG HM, GUAN TW, *et al.* Study on the association factors of urethane formation during fermentation of fragrant liquor [J]. China Brew, 2022, 41(1): 59–63.
- [49] 吴殿辉. 代谢工程改造黄酒酿造用酵母低产氨基甲酸乙酯的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- WU DH. Study on low urethane production of yeast for yellow rice wine [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [50] DAHABIEH MS, HUSNIK JI, VAN VH. Functional enhancement of sake yeast strains to minimize the production of ethyl carbamate in Sake wine [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(3): 963–973.
- [51] 李园子. 低产尿素葡萄酒酵母菌株的构建[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- LI YZ. Construction of yeast strains in low-producing urea wine [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.
- [52] 赵然然, 陆健, 谢广发. 基于 PCR 方法敲除黄酒酵母精氨酸酶基因的工程菌构建[J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 159–162.
- ZHAO RR, LU J, XIE GF. Construction of engineered bacteria based on knockdown of rice yeast arginase gene based on PCR [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(17): 159–162.
- [53] ZHANG X, CHEN Z, CHEN F. Construction of CAR1 deletion mutant from *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of its fermentation ability [J]. Food Biotechnol, 2015, 29(3): 237–247.
- [54] 雷庆子, 王博, 堵国成, 等. 诱变育种提高嗜盐四联球菌精氨酸和瓜氨酸利用能力[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(6): 30–36.
- LEI QZ, WANG B, DU GC, *et al.* Mutagenesis breeding improves the arginine and citrulline utilization capacity of *Tetradococcus halophilus* [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(6): 30–36.
- [55] 丁霞. 酒醅中氨基甲酸乙酯及其前体的控制与消除[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- DING X. Control and elimination of ethyl urethane and its precursors in fermented grains [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



李焱鑫, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。
E-mail: 969645531@qq.com

钱敏, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为食品化学。
E-mail: 38854770@qq.com