

## 外源添加乳杆菌联合双歧杆菌定向发酵对黄酒酿造品质的影响

骆佳琪<sup>1</sup>, 朱 斌<sup>2</sup>, 吴烈虎<sup>2</sup>, 陈启和<sup>1</sup>, 何国庆<sup>1</sup>, 史 瑛<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058

<sup>2</sup> 乌毡帽酒业有限公司 浙江湖州 313300)

**摘要** 为了有效降低中国传统黄酒中较高含量的氨基甲酸乙酯(EC),在黄酒酿造的后酵阶段,定向接入外源副干酪乳杆菌 FMES22、FMES56 和双歧杆菌 FMES99 进行协同发酵。使用反向高效液相色谱法、Berthelot 比色法和顶空固相微萃取气相-质谱联用法分别对黄酒酿造过程中 EC、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)及风味物质含量进行测定。结果表明,接入 FMES22、FMES56 和 FMES99 的黄酒中总氨基酸含量显著升高,且天冬氨酸、苏氨酸等与风味正相关的氨基酸含量明显高于对照组。其中 FMES22 组总氨基酸含量为 2 869.21 mg/L,而对照组仅为 1 120.8 mg/L。另外,与传统发酵黄酒相比,接入外源乳杆菌和双歧杆菌的黄酒中 GABA 含量显著升高,而 EC 含量显著降低。其中 FMES22 组 GABA 含量达到 62.04 mg/L,而 EC 含量仅有 11.39 mg/L。试验组黄酒中乙酸、2,3-丁二醇、乳酸乙酯、乙酸乙酯和丁二酸二乙酯等黄酒典型风味物质的含量均高于对照组,其特征风味物质的转变能够形成不同于传统风味的黄酒,产生清新的风味。结论:在黄酒后酵阶段外源添加乳酸菌进行定向发酵,对黄酒产品的营养性、安全性以及风味丰富度具有显著的提升作用。

**关键词** 黄酒; 乳杆菌; 氨基甲酸乙酯;  $\gamma$ -氨基丁酸; 风味物质

**文章编号** 1009-7848(2024)10-0195-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.018

黄酒是中国最古老的酒种,被誉为中国的“国粹”酒,同啤酒和葡萄酒并称为世界三大古酒<sup>[1]</sup>。黄酒是以糯米为主要原料,经蒸饭、拌曲、糖化、发酵、压榨、过滤、煎酒等步骤制作而成的酿造酒<sup>[2]</sup>。黄酒的酒体柔和、酒味醇厚,且具有丰富的营养物质,包括氨基酸、维生素、酚类、黄酮、 $\gamma$ -氨基丁酸等<sup>[3-4]</sup>。研究表明,黄酒中的活性物质具有潜在的降血糖功效,改善免疫功能,调节肠道微生态和缓解动脉粥样硬化等保健作用<sup>[3,5-6]</sup>。

作为一种具有悠久历史与浓厚文化底蕴的传统特产,黄酒有其稳定的消费市场与受众。近年来,随着人们生活水平的提高和消费理念的转变,对酒的需求由“单纯嗜好”向“营养保健”转变,即高度、烈性的不良饮酒观念日益为人们所摒弃,黄酒的低度、营养、保健的优势逐渐显现,慢慢被人们接受<sup>[2]</sup>。然而,黄酒产业也面临着产品创新性不足,市场拓展度不广等问题。为开发满足消费需求的黄酒新产品,就需对其酿造工艺进行创新性的

革新与改变。

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, EC)又名尿烷,是许多发酵食品在生产和贮藏过程中由含氮化合物不完全代谢的副产物与乙醇反应所产生的自然产物,对于人体具有潜在致癌性<sup>[7]</sup>。而中国传统黄酒中的 EC 含量显著高于其它的酒精饮料,对黄酒消费者有潜在安全隐患<sup>[8]</sup>。通过研究降低并控制黄酒中 EC 含量的方法,提高黄酒产品的安全性,促进黄酒产业的可持续发展具有重要意义。

发酵过程包括落缸、前酵、后酵。前酵阶段将淀粉糖化,此阶段的主要功能是酵母将部分糖转化为部分酒精,并在多种微生物的协同作用下产生部分风味物质。后酵期各种酶活性处于较高水平,主要是细菌,特别是乳酸菌参与使残留的糖分和淀粉继续发酵,继续形成酒精,并产生高级醇、有机酸、酯类、醛类等物质,促进酒成熟增香和提高风味。在传统工艺中细菌包括醋酸菌、丁酸菌等也参与后酵作用。本研究旨在利用外源定向添加乳杆菌和双歧杆菌对黄酒的后酵阶段进行发酵调控,探究外源菌种的定向接入是否对黄酒风味形成以及氨基甲酸乙酯含量产生影响,最终用于开发具有改良风味和高安全性的黄酒新产品。

**收稿日期:** 2023-10-17

**基金项目:** 浙江省自然科学基金重点项目(LZ23C200004);  
浙江省自然科学基金项目(LY23C200008)

**第一作者:** 骆佳琪,女,博士生

**通信作者:** 史瑛 E-mail: shiying0520@zju.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄酒,浙江省安吉县乌毡帽酒业有限公司。菌剂为副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) FMES22、副干酪乳杆菌 FMES56、双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) FMES99;盐酸、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、苯酚、亚硫酸钠、葡萄糖、氨基甲酸乙酯等均为分析纯级试剂;甲醛、甲醇、乙酸乙酯、占吨醇、正丙醇、丙酮、乙醚、乙腈为色谱纯级试剂,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

ST3100 pH计,奥豪斯仪器有限公司;RV8-HB10 真空旋转蒸发仪,美国 IKA 公司;1510 全波长酶标仪,美国 Thermo fisher 公司;LC-20AD 高效液相色谱仪,日本岛津公司;S7130 氨基酸自动检测仪,德国慕尼黑 Sykam 公司;7890B/5977A 气质质谱联用仪,美国安捷伦科技有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 菌种活化、扩培与菌悬液制备 向试管中加入 5~10 mL 德曼-罗戈萨-夏普培养基(MRS,用于副干酪乳杆菌)和双歧杆菌液体培养基(BBL),121 °C 高压灭菌 15 min。以 5%接种率分别向试管中接入 FMES22、FMES56 和 FMES99,在 37 °C 条件下静置培养 18~24 h 进行菌种活化。向 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL MRS 液体培养基,121 °C 15 min 高压灭菌。将活化后的菌液以 5%~10%接种率接入锥形瓶,在 37 °C 条件下静置培养 24~48 h 扩大培养,使活菌数达到  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL。将扩培的菌液在  $1\,000\times g$ ,4 °C 条件下离心 10 min,加入菌种保护液(10%谷氨酸钠,6%海藻糖溶液,灭菌后使用)后真空冻干,获得菌粉。将菌粉溶于无菌水,梯度稀释,根据《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》(GB 4789.35-2016),使用平板计数法进行活菌计数。结果显示 FMES22 活力为  $4.5\times 10^9$  CFU/g,FMES56 活力为  $5\times 10^9$  CFU/g,FMES99 活力为  $6\times 10^9$  CFU/g。

1.3.2 乳酸菌接种与试验分组 用无菌水将菌粉溶解,加入结束前酵的黄酒中,使 FMES22 与 FMES56 的浓度达到  $10^8$  CFU/L,FMES99 的浓度达到  $10^7$  CFU/L,详见表 1。

1.3.3 基本指标测定 参照国标 GB/T 13662-

表 1 试验分组与接种浓度(CFU/L)

Table 1 Experimental grouping and inoculation concentration (CFU/L)

组别	FMES22	FMES56	FMES99
1	$10^8$	—	—
2	—	$10^8$	—
3	$10^8$	—	$10^7$
4	—	$10^8$	$10^7$
5	—	—	—

2018 进行 pH 值、酒精度、酸度、总糖、非糖固形物、氨基酸态氮含量的测定。

1.3.4 游离氨基酸含量测定 采用全自动氨基酸检测仪测定氨基酸含量。

1.3.5 氨基甲酸乙酯含量测定 参照 Fu 等<sup>[9]</sup>的方法采用反向高效液相色谱法(HPLC-FLD)检测黄酒中的 EC 含量。用 30%甲醇配制质量浓度分别为 24.5,6.125,2.45,1.225,0.245  $\mu\text{g/mL}$  的 EC 标准溶液。取 50 mL 待测黄酒样品与 50 mL 乙酸乙酯混合萃取,取上层液体,在 60 °C 真空旋转蒸发至蒸干。加入 5 mL 30%甲醇溶解浓缩后的样品,体积浓缩至原体积的 1/10。将 1 mL 样品或标准溶液与 0.1 mL 1.5 mol/L 盐酸和 0.2 mL 0.01 mol/L 占吨醇-正丙醇溶液混合进行衍生化反应,振荡后放置 30 min,充分反应后进样测定。以甲醇和水作为流动相,荧光检测器激发波长为 233 nm,发射波长为 600 nm,梯度洗脱进样。

1.3.6  $\gamma$ -氨基丁酸含量测定 参考李杰等<sup>[10]</sup>、闫朝阳等<sup>[11]</sup>的方法,采用 Berthelot 比色法检测黄酒中的 GABA 含量。配制质量浓度分别为 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10,0.12 mg/mL 的 GABA 标准溶液。取 1 mL 标准溶液或样品加入 0.2 mL 0.2 mol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$  缓冲液(pH 9.0)、1 mL 6%重苯酚、0.4 mL 7%次氯酸钠,振荡混匀后沸水浴 10 min,迅速在冰浴中冷却 10 min,出现蓝绿色后加入 2 mL 60%乙醇,蒸馏水作空白对照。于波长 630 nm 处测 OD 值。

1.3.7 风味物质测定 参照周万怡<sup>[8]</sup>的方法,采用顶空固相微萃取气相-质谱联用(SPME-GC-MS)方法分析黄酒中的挥发性风味物质组分和相对含量。取 10 mL 黄酒在 25 °C,3 000 r/min 离心 20 min,待用。取 5 mL 离心后的样品,放入 20 mL 顶

空瓶中,加入 5  $\mu$ L 内标物(2-辛醇,质量浓度为 89.65  $\mu$ g/L),2 g 氯化钠,萃取温度 50  $^{\circ}$ C,预热 15 min,萃取时间 40 min。色谱条件:DB-5MS 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm,0.25  $\mu$ m); 进样温度 250  $^{\circ}$ C;升温程序:初始温度 40  $^{\circ}$ C,保持 5 min,以 2.5  $^{\circ}$ C/min 升到 65  $^{\circ}$ C,以 5  $^{\circ}$ C/min 升到 150  $^{\circ}$ C,以 10  $^{\circ}$ C/min 升到 230  $^{\circ}$ C,保持 10 min。载气为高纯度氮气,流速 1 mL/min;进样方式为不分流进样;质谱条件:电子电力源:电子能量 70 eV,传输线温度:280  $^{\circ}$ C;离子源温度:230  $^{\circ}$ C;质量扫描范围( $m/z$ ): 10~550  $u$ 。采用高效液相色谱法测定有机酸含量<sup>[12-13]</sup>。

2 结果与分析

2.1 黄酒发酵基本指标

各组 pH 值差距较小,组 1 和 2 单株菌株的接入导致 pH 值略有降低,而组 3 和 4 中复合菌株的接入对黄酒的 pH 值基本无影响。针对总酸检测结果,各组间差距较为明显。组 1 和组 2 中 FMES22 和 FMES56 单菌株的接入导致黄酒的酸度显著提高,分别达到 9.0 g/L 和 8.1 g/L,已超出国标范围(2.5~7.0 g/L)。而组合菌株发酵的黄酒相较于对照组虽也有较小程度的升高,但仍处于标

准范围。由此可知,FMES22 和 FMES56 单独发酵会导致酸度上升,得到过酸的风味,而 FMES99 的加入或许能够控制酸度的过度增长。氨基酸态氮是判定发酵产品发酵程度的特定指标,该指标越高,产品中的氨基酸含量越高,营养越好。根据表 1 可知,各组的氨基酸态氮均达到国家标准。而试验组的氨基酸态氮均比对照组高,其中 FMES22 组发酵得到的黄酒氨基酸态氮最高,达 0.34 g/L,FMES22 与 FMES56 分别和 FMES99 的组合发酵黄酒的氨基酸态氮也均在 0.30 g/L 以上。由此可推断,外源添加乳酸菌发酵的黄酒具有更高的营养价值。总糖指标各组间差异较为明显,FMES22 单菌种发酵黄酒的总糖高达 14.5 g/L,接近国标干型黄酒总糖上限(15 g/L),说明其中还剩余较多糖分未转化为酒精,具有偏甜的口感。推测 FMES22 菌可能在黄酒后酵阶段代谢产生糖类。此外,其它试验组的总糖含量均得到提高。黄酒中的非糖固形物是黄酒品质等级评定的一项重要指标,同类型的黄酒中非糖固形物含量越高,黄酒的品质越好,酒的口味越佳。由表 1 可知,各组黄酒的非糖固形物均远超国家标准( $\geq 5.0$  g/L),且经外源添加菌株发酵后的黄酒具有更高的非糖固形物含量。

表 2 发酵黄酒酒精度、pH 值、酸度、氨基酸态氮、总糖和非糖固形物测定结果

Table 2 Results of alcohol, pH, acidity, amino acid nitrogen, total sugar and non-sugar solids of yellow rice wine

组别	酒精度/%vol	总酸/(g/L)	氨基酸态氮/(g/L)	总糖/(g/L)	非糖固形物/(g/L)
1	16.9	9.0	0.34	14.5	22.0
2	17.8	8.1	0.28	5.2	18.3
3	18.0	6.4	0.30	3.6	19.4
4	17.5	5.5	0.31	1.7	17.4
5	16.6	5.4	0.25	1.0	16.6

2.2 游离氨基酸测定结果

黄酒中含有各种氨基酸,主要是由蛋白质水解与微生物的代谢反应产生<sup>[14]</sup>。氨基酸在发酵过程中作为氮源发挥作用,是各种风味物质的前体物,赋予黄酒丰富的味觉体验,从而使黄酒展现醇厚、浓郁和多香等特点。氨基酸味是黄酒与其它酒类的重要区别,可通过检测黄酒中游离氨基酸的变化来评判黄酒品质<sup>[15-16]</sup>。黄酒中氨基酸与口味之间存在显着的相关性,主要有 10 种氨基酸参与影

响黄酒的口味。其中与黄酒口味正相关的氨基酸有天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、异亮氨酸(Ile)和亮氨酸(Leu)<sup>[8]</sup>。据图 1 结果,从 5 组黄酒中共检出 17 种游离氨基酸,包括 6 种必需氨基酸和 11 种非必需氨基酸。黄酒中含有丰富的精氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、酪氨酸等氨基酸。试验组的总游离氨基酸量与口味正相关的氨基酸含量均高于对照组,其中第 1 组的总氨基酸含量和口味正相关的



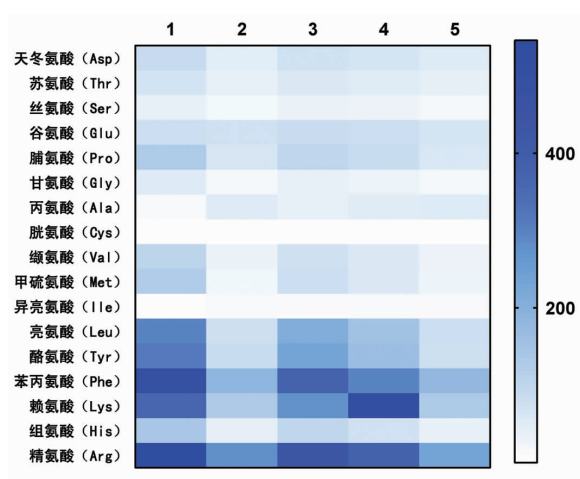


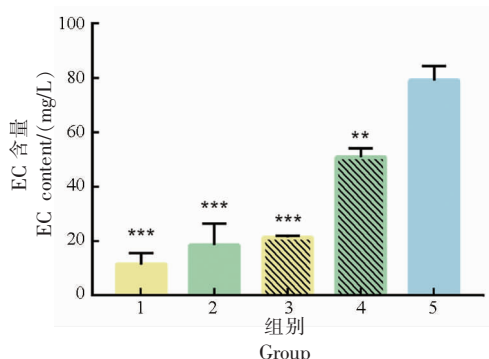
图1 黄酒中游离氨基酸的含量(mg/L)

Fig.1 Content of free amino acids in yellow rice wine (mg/L)

氨基酸含量均为最高,分别为2 869.21 mg/L和675.0 mg/L,而对照组的氨基酸总含量最低,仅为1 120.8 mg/L,口味正相关的氨基酸含量仅为288.0 mg/L。结果表明,外源添加副干酪乳杆菌和双歧杆菌定向发酵黄酒,能够丰富黄酒中各游离氨基酸的含量,尤其是口味正相关氨基酸含量,从而对黄酒风味的改善起显著的积极作用。

### 2.3 氨基甲酸乙酯测定结果

尿素是EC最主要的前体物质,黄酒中有90%的EC是由尿素与乙醇自发反应生成<sup>[17]</sup>。黄酒中尿素的主要来源是发酵原料(糯米)本身和发酵过程中酿酒酵母降解精氨酸产生。另外,发酵过程中温度、酸度以及发酵微生物特性等因素都会影响黄酒中EC及其前体物质的形成<sup>[8]</sup>。发酵食品中



注:\*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ 。

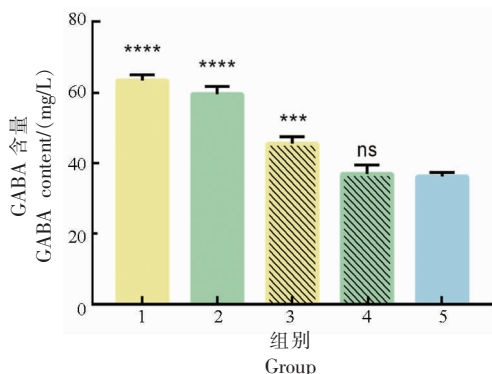
图2 黄酒中的EC含量(mg/L)

Fig.2 EC content of yellow rice wine (mg/L)

氨基甲酸乙酯的主要消减策略主要包括物理吸附、添加外源化学物质作抑制剂<sup>[8,18]</sup>,利用氨基己酸乙酯水解酶<sup>[19]</sup>,工艺优化<sup>[20]</sup>,代谢工程改造<sup>[21-22]</sup>等方法<sup>[17,23-24]</sup>。根据图2可知,外源接入乳杆菌和双歧杆菌发酵的黄酒中EC含量显著低于对照组。FMES22组的EC降低效果最为明显,仅11.39 mg/L,相较于对照组降低了85.6%。加入FMES99后,对EC形成的抑制作用略有减弱。有研究发现许多微生物均能够作为脲酶高产量菌株用于降低发酵食品中的尿素含量,从而降低EC含量<sup>[17,25-26]</sup>。来自罗伊乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)CICC6124的酸性脲酶被证明在黄酒模型体系中具有较好的尿素降解效果<sup>[27]</sup>。上述结果表明,经过外源添加菌株定向发酵,黄酒中EC减少,产品的安全性得到显著提高。

### 2.4 $\gamma$ -氨基丁酸测定结果

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA)是一种广泛存在于动物、植物和微生物体内非蛋白质氨基酸,具有降血压,抗抑郁,抗焦虑,改善脑机能等多种生理功能<sup>[28]</sup>,是由其前体物质谷氨酸或谷氨酸钠经谷氨酸脱羧酶(GAD)的催化生成<sup>[29]</sup>。黄酒的制作原料中已含有一定量的GABA,而在黄酒的酿造过程中乳酸菌、酵母菌等微生物也能够合成一定的GABA。另外,在产生GABA的微生物中,包括乳杆菌在内的乳酸菌被认为是细菌中GABA的主要生产者,外源添加乳酸菌发酵是一种有效的 $\gamma$ -氨基丁酸生产方法<sup>[30]</sup>。研究表明,GABA含量在黄酒后酵后期显著增加,且陈酿能够有效提升黄酒中的GABA含量<sup>[31]</sup>。



注:ns. 不显著; \*\*\*,  $P<0.001$ ; \*\*\*\*,  $P<0.0001$ 。

图3 黄酒中GABA的含量(mg/L)

Fig.3 GABA content of yellow rice wine (mg/L)

由图 3 可知,外源添加菌株发酵组的黄酒中 GABA 含量均高于传统发酵组,说明添加乳杆菌和双歧杆菌能够促进黄酒中活性物质 GABA 的生成,显著提升黄酒的营养价值与活性成分。尤其两个单菌株发酵组中的 GABA 含量明显高于其它组。其中 FMES22 发酵组中 GABA 含量最高,超过 60 mg/L,接近对照组的 2 倍,FMES56 发酵组中的 GABA 含量也已达到 58.81 mg/L。相比之下,混合菌种发酵对黄酒 GABA 含量的提升效果较有限。研究表明,许多细菌的 GAD 活性在 pH 4.0~5.0 时最强,且副干酪乳杆菌等乳酸杆菌属被证明是生产 GABA 的最主要种类,具备优秀的 GABA 合成能力<sup>[32-33]</sup>。而在黄酒酿造的后期加入外源菌种定向发酵,能大大提高谷氨酸的利用率和 GABA 的合成量,从而提高黄酒的营养和保健价值。

2.5 风味物质含量测定结果

由于黄酒独特的原料和复杂的酿造工艺,因此其具有甜、酸、鲜、涩、苦等多重口感与醇香、焦糖香、曲香等丰富的风味<sup>[34]</sup>。黄酒的风味是评价其

品质的重要指标之一。表 3 是黄酒中主要风味物质的相对含量,以醇类、酯类和酸类为主。醇类可以呈味、呈香,丰富口感,酯类主要呈现特殊的花香或果香<sup>[35]</sup>。外源添加菌株发酵黄酒与传统发酵黄酒的主体风味物质含量有较大差异。由表 3 可看出,乳酸、草酸、2,3-丁二醇、丙三醇、苯乙醇、丁二酸单乙酯和乳酸乙酯是黄酒的主要风味物质。外源添加联合菌株发酵黄酒中的 2,3-丁二醇、乙酸、乳酸乙酯、丁二酸二乙酯和乙酸乙酯等黄酒典型风味物质<sup>[8]</sup>的含量均高于对照发酵组。由此可知,经外源添加副干酪乳杆菌和双歧杆菌发酵与传统发酵黄酒的主要风味物质的构成产生较为明显的变化。另外,第 3 组中丙三醇、苯乙醇、丁二酸单乙酯、丁二酸和 5-甲基糖醛的含量与其它组的差异较大。与对照组相比,FMES22 组和 FMES56 组中传统黄酒的风味成分异戊醇和异丁醇含量显著降低,而丁二醇含量明显升高,其特征风味物质的转变能够形成不同于传统风味的黄酒,如形成清新的风味。

表 3 黄酒中的主要风味物质(%)  
Table 3 Main flavor substances in yellow rice wine (%)

名称	组别				
	1	2	3	4	5
2,3-丁二醇	13.74	14.90	15.6	14.51	12.82
丙三醇	12.46	13.61	3.10	9.78	10.41
苯乙醇	2.92	2.40	0.87	3.30	4.12
对羟基苯乙醇	1.45	1.57	1.45	1.70	2.20
异戊醇	0.96	0.91	1.29	1.55	1.23
1,2-丙二醇	0.95	0.81	1.02	1.11	1.11
2-甲基-1-丁醇	0.48	0.44	0.65	0.82	0.69
异丁醇	0.19	0.17	0.25	0.27	0.18
1,3-丙二醇	0.07	0.07	0.11	0.21	0.19
丁二酸单乙酯	4.10	4.24	0.48	3.71	3.69
乳酸乙酯	2.83	1.65	1.88	2.11	1.64
丁二酸二乙酯	1.98	1.33	4.68	0.45	0.40
乙酸乙酯	0.10	0.53	0.08	0.05	0.03
1-甲基乙酸乙酯	0.05	0.05	0.02	0.04	0.02
乳酸	42.89	47.19	42.41	43.69	47.25
草酸	11.75	5.86	14.46	13.96	11.64
乙酸	2.03	1.36	1.37	1.04	0.75
丁二酸	0.45	2.51	0.03	1.51	1.36
2-羟基丁酸	0.13	0.09	0.07	0.11	0.12
异戊醛	0.22	0.16	0.04	0.01	0.04
2-甲基丁醛	0.14	0.09	0.02	0.02	0.02
5-甲基糖醛	0.11	0.05	10.13	0.04	0.10

### 3 结论

本研究结果表明,在黄酒酿造后醇阶段外源添加副干酪乳杆菌和双歧杆菌,发酵后的黄酒具有更高的氨基酸态氮(提高12%~36%)、总糖(提高2~14倍)和非糖固形物(增加约5%~32%)含量,具有更高的营养价值和更丰富的酸甜风味;还能产生更多的游离氨基酸和风味正相关氨基酸,以及多样的风味物质组分。添加FMES22的黄酒的风味成分异戊醇、异丁醇含量明显降低,而乳酸含量明显增加,是形成乳酸清新风味的主要贡献者。同时,经过外源添加复合菌种发酵的黄酒中氨基甲酸乙酯含量也显著降低,FMES22和FMES99协同发酵组黄酒的EC降低至仅20 mg/L左右,使其安全性得到保障。另外,外源添加菌种发酵的黄酒中 $\gamma$ -氨基丁酸的含量也得到显著提高,FMES22发酵组黄酒的GABA含量提升至超过60 mg/L,FMES22和FMES99协同发酵组黄酒的GABA提升至44.05 mg/L,在一定程度上提高了黄酒的营养和保健价值。

综合来看,外源添加副干酪乳杆菌和双歧杆菌定向发酵对黄酒产品风味的丰富度、营养价值以及安全性有积极作用,研究结果对黄酒酿造技术优化提供一定的研究基础。

### 【致谢】

本文得到“乌毡帽酒业有限公司-浙江大学研发项目(校合-2020-KYY-513111-0011)”的支持。

### 参 考 文 献

- [1] DUAN S F, HAN P J, WANG Q M, et al. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2690.
- [2] 赵禹宗. 低产杂醇高产乙酸酯酿酒酵母的选育及黄酒发酵差异形成机制[D]. 无锡: 江南大学, 2022.  
ZHAO Y Z. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* strains with low-yield higher alcohols and high-yields acetate esters, and the differential formation mechanism in Huangjiu fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [3] 胡超凡. 古法手酿绍兴黄酒发酵微生态及功效组分

解析[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

HU C F. Study on fermentation microflora and functional components of Shaoxing traditionally handmade rice wine[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.

- [4] 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. Study on the technology and mechanism of reduction of ethyl carbamate in Guangdong rice wine [D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019.

- [5] SHI Y, FENG R X, MAO J Q, et al. Structural characterization of peptides from Huangjiu and their regulation of hepatic steatosis and gut microbiota dysbiosis in hyperlipidemia mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 689092.

- [6] 周梦洁. 黄酒肽的分离纯化、结构鉴定及其降血糖活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

ZHOU M J. Studies on the purification, identification, and hypoglycemic activity of peptides from Chinese rice wine[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.

- [7] 娄行行, 周万怡, 芦红云, 等. 黄酒酿造过程中氨基甲酸乙酯形成的细胞生物学基础及消减研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(10): 406-413.

LOU H H, ZHOU W Y, LU H Y, et al. Research progress on cell biological basis and subtraction of ethyl carbamate formation in the process of rice wine brewing[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(10): 406-413.

- [8] 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 W Y. Application of food-derived phenolic compounds to the process of Chinese yellow rice wine fermentation for ethyl carbamate regulation and its mitigation mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.

- [9] FU M L, LIU J, CHEN Q H, et al. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, 45(6): 1297-1302.

- [10] 李杰, 许彬, 罗建成, 等. 富含 $\gamma$ -氨基丁酸的红小米黄酒酿造工艺参数优化[J]. *食品研究与开发*,

- 2021, 42(17): 114–121.
- LI J, XU B, LUO J C. et al. Optimization of brewing technology parameters for GABA-rich red millet Huangjiu[J]. Food Research and Development, 2021, 42(17): 114–121.
- [11] 闫朝阳, 李旭, 马钰柯, 等. Berthelot 比色法测定  $\gamma$ -氨基丁酸含量的实验条件优化[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2020, 34(3): 306–12.
- YAN C Y, LI X, MA Y K, et al. Optimization of berthelot colorimetric method for determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid[J]. Journal of University of Jinan (Science and Technology), 2020, 34(3): 306–312.
- [12] 张陈, 郑晓敏, 马长中, 等. 高效液相色谱法对青稞酒中有机酸、醇及糖含量的测定[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 317–323.
- ZHANG C, ZHENG X M, MA C Z, et al. Determination of organic acids, alcohols and glucose content in barley wine by HPLC[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 317–323.
- [13] 姬中伟, 衡洋洋, 周志磊, 等. 超高温瞬时杀菌对苏派黄酒风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 16–21.
- JI Z W, HENG Y Y, ZHOU Z L, et al. Effect of ultra-high temperature instantaneous sterilization on flavor substances in Supai Huangjiu[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 16–21.
- [14] 朱正军, 饶建军, 张娟, 等. 黄酒中健康因子的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 26–31.
- ZHU Z J, RAO J J, ZHANG J, et al. Research progress of health factors in Huangjiu[J]. China Brewing, 2021, 40(5): 26–31.
- [15] 周建弟, 赖敏辉, 应维茂, 等. 黄酒功能性成分与保健功能研究进展[J]. 酿酒, 2021, 48(5): 24–29.
- ZHOU J D, LAI M H, YING W M, et al. Research progress on functional components and health function of Huangjiu[J]. Liquor Making, 2021, 48(5): 24–29.
- [16] 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 B B, ZENG J H, LIU X Q, et al. Study on quantitative relationships between amino acids and sensory taste of yellow rice wine[J]. Liquor-making Science & Technology, 2010(10): 23–25.
- [17] 李焱鑫, 黄晓媛, 白卫东, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4551–4558.
- LI Y X, HUANG X Y, BAI W D, et al. Research progress on formation pathway and reduction strategy of ethyl carbamate in fermented food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(14): 4551–4558.
- [18] ZHOU W Y, FANG R S, CHEN Q H. Effect of gallic and protocatechuic acids on the metabolism of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine brewing[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 174–181.
- [19] 刘庆涛. *Bacillus paralicheniformis* 酸性脲酶表达、分子改造及用于黄酒中氨基甲酸乙酯消减[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- LIU Q T. Expression and molecular engineering of *Bacillus paralicheniformis* acid urease for reducing urethane in a model rice wine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [20] 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 R S. The metabolism mechanism and inhibition method of ethyl carbamate formation during traditional Chinese rice wine fermentation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [21] ZHANG P, HU X. Metabolic engineering of arginine permeases to reduce the formation of urea in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World J Microb Biot, 2018, 34(3), 47.
- [22] WU D H, LI X M, LU J, et al. Constitutive expression of the *DURI*<sub>2</sub> gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during Chinese rice wine fermentation[J]. Fems Microbiol Lett, 2016, 363(1): fnv214.
- [23] 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 X S, GENG J Z, et al. Research progress on ethyl carbamate of Huangjiu[J]. China Brewing, 2020, 39(3): 7–11.
- [24] 林宜锦, 欧梦莹, 关统伟, 等. 酿造酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 358–364.
- LIN Y L, OU M Y, GUAN T W, et al. Research progress of ethyl carbamate in brewing wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 358–364.
- [25] 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 Z H. The effect of transcriptome repressor



- Dal80p on ethyl carbamate formation during Chinese rice wine fermentation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [26] LIU Q T, CHEN Y Q, YUAN M L, et al. A *Bacillus paralicheniformis* iron-containing urease reduces urea concentrations in rice wine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(17): e012588.
- [27] YANG Y Q, KANG Z, ZHOU J L, et al. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine[J]. Appl Microbiol Biot, 2015, 99(1): 301–308.
- [28] PANNERCHELVAN S, RIOS-SOLIS L, WONG F W F, et al. Strategies for improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) biosynthesis via lactic acid bacteria (LAB) fermentation[J]. Food & Function, 2023, 14: 3929–3948.
- [29] 陈国伟, 贾娇, 牡丹, 等. 1株产 $\gamma$ -氨基丁酸菌株的分离鉴定及发酵特性研究[J]. 福建农业科技, 2021, 52(12): 12–18.
- CHEN G W, JIA J, DU D, et al. Isolation, identification and fermentation characteristics of  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing strains[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2021, 52(12): 12–18.
- [30] ZHANG Y, ZHU M J, LU W J, et al. Optimizing *Levilactobacillus brevis* NPS-QW 145 fermentation for gamma-aminobutyric acid (GABA) production in soybean sprout yogurt-like product[J]. Foods, 2023, 12(5): 977.
- [31] GONG J Y, HUANG J, XIAO G N A, et al. Determination of gamma-aminobutyric acid in Chinese rice wines and its evolution during fermentation[J]. J I Brewing, 2017, 123(3): 417–422.
- [32] 李朔, 李潇, 张晓黎, 等. 乳酸菌产 $\gamma$ -氨基丁酸及生物合成技术研究进展[J]. 中国调味品, 2022, 47(11): 205–210.
- LI S, LI X, ZHAG X L, et al. Research progress of  $\gamma$ -aminobutyric acid produced by acid bacteria and its biosynthesis technology[J]. China Condiment, 2022, 47(11): 205–210.
- [33] 苗凯. *Lactobacillus plantarum* 产 $\gamma$ -氨基丁酸发酵条件优化及基因组分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- MIAO K. Optimization of fermentation conditions of  $\gamma$ -aminobutyric acid produced by *Lactobacillus plantarum* and genome analysis[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020.
- [34] CHEN S, XU Y, QIAN M C. Comparison of the aromatic profile of traditional and modern types of Huangjiu (Chinese rice wine) by aroma extract dilution analysis and chemical analysis[J]. Flavour Frag J, 2018, 33(3): 263–271.
- [35] 沈棚, 薛红玮. 陈酿时间对黄酒中挥发性风味物质和氨基酸含量的影响研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(1): 142–146.
- SHEN P, XUE H W. Effect of aging time on volatile flavor substances and amino acids contents in Huangjiu[J]. China Brewing, 2023, 42(1): 142–146.

### Effect of Directional Fermentation by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* on the Quality of Traditional Yellow Wine

Luo Jiaqi<sup>1</sup>, Zhu Bin<sup>2</sup>, Wu Liehu<sup>2</sup>, Chen Qihe<sup>1</sup>, He Guoqing<sup>1</sup>, Shi Ying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

<sup>2</sup>Wuzhanmao Wine Co. Ltd., Huzhou 313300, Zhejiang)

**Abstract** To effectively reduce the high content of ethyl carbamate (EC) in traditional Chinese yellow wine, exogenous *Lactobacillus paracasei* FMES22, FMES56 and *Bifidobacterium lactis* FMES99 were inoculated at the start of the post-fermentation stage for the co-fermentation. The contents of EC,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and flavor compounds in the yellow wine were determined by high performance liquid chromatography fluorescence (HPLC-FLD), Berthelot colorimetry and solid-phase microextraction-gas phase-mass spectrometry (SPME-GC-MS), respectively. The results suggested that the addition of FMES22, FMES56 and FMES99 significantly increased the total amino acid content. And the amount of flavor positively correlated amino acids, including aspartic acid, threonine and others were significantly higher than the



control group. The total content of free amino acid in FMES22 group sample reached 2 869.21 mg/L, while only 1 120.8 mg/L in control group sample. In addition, compared with traditional fermented rice wine, the content of GABA in rice wine added with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was significantly increased, while the content of EC was markedly decreased. Especially, the content of GABA in FMES22 group reached 62.04 mg/L, while the content of EC was only 11.39 mg/L. Moreover, the contents of acetic acid, 2,3-butanediol, ethyl lactate, ethyl acetate, diethyl succinate and other typical flavor substances in the experimental groups were higher than those in the control group. The transformation of characteristic flavor substances contributed to a fresh flavor that different from the traditional rice wine. In conclusion, the directionally fermented rice wine with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* added in the post-fermentation stage significantly improved the nutrition, safety and flavor richness of traditional yellow rice wine.

**Keywords** yellow rice wine; *Lactobacillus*; ethyl carbamate;  $\gamma$ -aminobutyric acid; flavor substances