白酒固态发酵过程中不同品种高粱原料对氨基甲酸乙酯形成的影响

曹 帅，吴 群，徐 岩*

（江南大学 生物工程学院/教育部工业生物技术重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：氨基甲酸乙酯(EC)是一种致癌物质，广泛存在于乙醇饮料中。为明确高粱原料对白酒固态发酵过程中EC形成的影响，从而为降低白酒中EC含量提供理论指导，通过模拟白酒固态发酵，分析了不同品种高粱原料发酵过程中EC及其前体物质的变化规律。结果表明，固态发酵过程中糯高粱S3对应的最终EC产量(4.27 mg/kg)高于粳高粱S1(4.06 mg/kg)和S2(4.21 mg/kg)，且其EC平均形成速率是粳高粱S1(0.22 mg/kg/d)和S2(0.24 mg/kg/d)的1.6倍。对EC前体物质研究发现，瓜氨酸和尿素是高粱固态发酵过程中EC形成的主要前体物质，其中瓜氨酸可能对S1和S2发酵产EC的贡献较大，而尿素则对S3发酵产EC的贡献较大。此外，在整个固态发酵过程中，氰化物并未参与EC的形成。研究表明，不同品种高粱原料对固态发酵过程中产EC的影响差异显著，选择合适的高粱品种，控制高粱原料所带入的EC前体物质的含量，可有效控制白酒固态发酵过程中的EC含量。

关键词：氨基甲酸乙酯；高粱；固态发酵；前体；白酒

中图分类号：Q 815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)07—0677—07

Effects of Different Sorghum Cultivars on the Formation of Ethyl Carbamate in the Solid-state Fermentation Process of Chinese Liquor

CAO Shuai，　*WU Qun*，　*XU Yan**

（School of Biotechnology / Key Lab of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Ethyl carbamate (EC) is a carcinogen which is widely found in alcoholic beverages. The changes of EC and its precursors in the solid-state fermentation process were explored to illustrate the effects of various sorghum cultivars on EC formation，which could provide a theoretical foundation to decrease the content of EC in Chinese liquor. The results showed that the final EC yield in waxy sorghum (S3) was 4.27 mg/kg and higher than that in non-waxy sorghum，which were 4.06 mg/kg for S1 and 4.21 mg/kg for S2，respectively. Moreover，the average accumulation rate of EC in S3 was 0.39 mg/kg/d which was 1.6 times as high as that in S1 (0.22 mg/kg/d) and S2 (0.24 mg/kg/d). Citrulline and urea were found to be two major precursors of EC in the solid-state

收稿日期：2015-01-09

基金项目：国家863计划项目(2013AA102108)；国家自然科学基金项目(31000806，31371822，31271921)。

* **通信作者**：徐　岩(1962—)，男，浙江慈溪人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酿造微生物学与工业酶学研究。

E-mail：yxu@jiangnan.edu.cn

fermentation process, where citrulline mainly contributed to EC formation in S1 and S2, while urea gave more contribution in S3. In addition, cyanide was not involved in EC formation during the solid-state fermentation. This study indicated that the effects of different sorghum cultivars on EC formation were significantly different. The control of EC precursors by choosing appropriate sorghum cultivars could effectively reduce the final EC yield in Chinese liquor.

Keywords: ethyl carbamate, sorghum, solid-state fermentation, precursor, Chinese liquor

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate,EC)是一种可以自然形成于发酵过程中且被划为 2 组 A 类的致癌物质。EC 广泛存在于乙醇饮料中,目前国际上多个国家和组织已经设定饮料酒中 EC 的最高限量[1-2],国际规定的蒸馏酒中 EC 的最高允许水平为 150 μg/L[3],但我国对乙醇饮料尚未制定 EC 限量标准。

饮料酒中形成 EC 的前体物质主要有氰化物、瓜氨酸、尿素及可降解生成瓜氨酸和尿素的精氨酸等[4-6],且这些前体物质广泛存在于原料中。蒸馏酒中 EC 的产生可发生在发酵、蒸馏和储存过程中。在蒸馏过程中,尿素在高温的乙醇水溶液中可经分解转化生成 EC[7-9]。但是,发酵过程同样是 EC 产生的一个重要阶段。在葡萄酒和黄酒中,尿素和乙醇反应被认为是生成 EC 的主要途径[10-11]。然而,目前关于白酒固态发酵过程中酿造原料对 EC 形成的影响和固态发酵过程中 EC 的形成规律及 EC 的主要前体物质的认识并不十分清楚。高粱是白酒生产过程中最主要的酿造原料,其同样含有氰化物和精氨酸等 EC 前体物质。因此,研究比较不同品种高粱原料对固态发酵过程中 EC 形成的影响,明确固态发酵过程中 EC 的形成规律及其主要前体物质,通过选择合适的高粱原料,有效控制发酵过程中的 EC 产量,这对我国白酒酿造的安全性具有非常重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株和高粱 酵母菌株,从白酒酒醅中筛选获得,保藏号为 CCTCC M2014463;高粱,分别由白酒厂提供,通风干燥保存,无霉变虫蛀,详细信息见表 1。

1.1.2 主要试剂 氨基甲酸乙酯(EC)和氨基甲酸丙酯(PC):上海安谱科学仪器有限公司产品;乙腈和甲醇:纯度>99.8%,Sigma-Aldrich 公司产品;氯化钠、酒石酸、氢氧化钠、三氯乙酸、乙酸锌、三水合乙酸钠和尿素:中国医药集团上海化学试剂公司产品。

表 1 不同品种高粱原料相关信息

Table 1 Relevant information of different sorghum cultivars

高粱品种编号	产地	收获时间	特征
S1	中国中部	2012 年	粳高粱,淡黄色
S2	中国东北部	2012 年	粳高粱,淡黄色
S3	中国西南部	2012 年	糯高粱,红色
S4	中国西南部	2012 年	糯高粱,红色
S5	中国东北部	2012 年	粳高粱,淡黄色
S6	中国东北部	2012 年	粳高粱,淡黄色

1.1.3 主要仪器 气相色谱质谱联用仪(GC-6890N-MSD 5975):美国 Agilent 公司产品;色谱柱 DB-FFAP:60 m×0.25 mm×0.25 μm J&W Scientific 公司产品;固相微萃取自动进样器(MPS2):德国 Gerstel 公司产品;固相微萃取头 PA:上海安谱科技仪器有限公司产品;安捷伦液相色谱仪(Ag1100)配有柱温箱、自动进样器、泵和荧光检测器:美国安捷伦公司产品;色谱柱:ODS HYPERSIL 250 mm×4.6 mm×5 μm;分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 乙酸锌溶液,质量浓度为 100 g/L;氢氧化钠溶液,质量浓度为 10 g/L;氰化钾标准贮备溶液,质量浓度为 400 mg/L;氧化剂,5 g 琥珀酰亚胺溶于 150 mL 的水中,再加入 0.5 g N-氯代琥珀酰亚胺搅拌溶解,定容至 500 mL,4 ℃保存;显色剂,3 g 巴比妥酸溶于少量水中,加入 15 mL 的吡啶,定容至 50 mL,4 ℃避光保存,溶液 pH 7~8;尿素溶液,浓度为25 mg/L,稀释得到梯度质量浓度标准溶液。

1.2.2 发酵实验 菌株活化:向 100 mL 已灭菌的

YPD 培养基中接种 3 环酵母菌苔,在 30 ℃、200 r/min 转速条件下培养 16 h。发酵实验:发酵过程按图 1 所示操作,30 ℃条件下静止培养,每个样品做 3 个平行,取样时间为发酵的第 0、5、8、11、14、17、25 d。

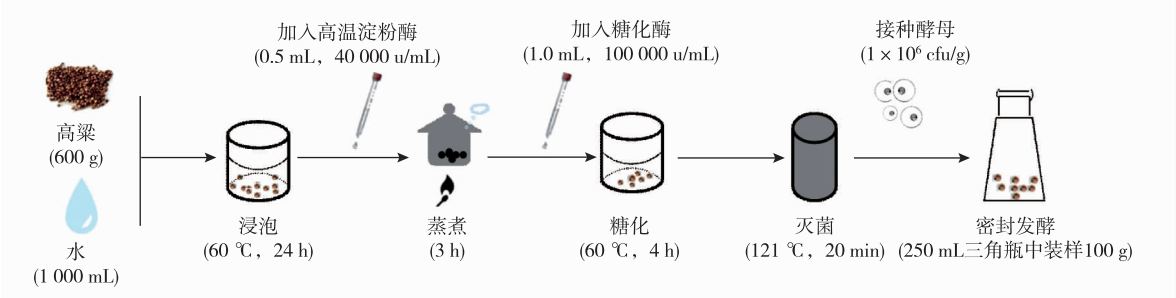


图 1 模拟白酒固态发酵操作过程

Fig. 1 Manufacturing process of solid-state fermentation of Chinese liquor.

1.2.3 水分质量分数测定 参照 GB 5497-85 中恒重法测定。

1.2.4 氰化物含量测定 采用 GB/T 13084-2006 中氰化物的测定方法,对样品中的氰化物进行蒸馏收集。参考文献[12]报道方法进行测定,取 20 mL 的蒸馏液,加 1 mL 的氧化剂和 1 mL 的显色剂在(25±0.5) ℃下反应 25 min,然后在 575 nm 下测定吸光度。以氰化钾浓度为纵坐标,吸光度值为横坐标,作氰化钾-吸光度标准曲线。

1.2.5 精氨酸和瓜氨酸含量测定 结合态氨基酸酸解条件:称取 0.3 g 高粱样品至水解管内并加入 4 mL 浓盐酸,抽真空,乙醇喷灯封口,于 110 ℃烘箱水解 22 h;水解液全部转移至 25 mL 容量瓶并定容摇匀,两层滤纸过滤,滤液抽真空 30 min,干燥过夜;加入 1 mL 0.02 mol/L HCL,静置 1 h,离心取上清备用。瓜氨酸和精氨酸含量参考文献[13]报道方法进行测定。

1.2.6 尿素含量测定 尿素含量参考文献[14]报道方法进行测定。

1.2.7 EC 含量测定 样品预处理采用文献 [15]报道方法处理。GC 条件:进样口温度 250 ℃,载气 He,流量 1 mL/min,不分流进样,色谱柱为 DB-FFAP,升温程序为:50 ℃恒温 2 min,以 5 ℃/min 的速度升温至 170 ℃,再以 10 ℃/min 的速度升温至 230 ℃,保持 5 min。MS 条件:EI 电离源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 ℃,扫描范围 35.00~350.00。MS 检测器采用 SIM 模式(特征离子 *m/z* 62),质谱分析用数据库 NIST05a1L。以标准品 EC 和 PC 进行定性,EC 和 PC 的浓度之比等于封面积之比进行半定量。

1.2.8 乙醇体积分数测定 乙醇体积分数测定参考文献[16]进行。

2 结果与讨论

2.1 不同品种高粱原料中氰化物和精氨酸质量分数的比较

高粱原料本身含有一定的氰化物和精氨酸。氰化物多以生氰糖苷(主要为蜀黍苷)的形式存在于高粱中,经降解后以氢氰酸的形式释放出来。精氨酸是高粱中含量相对较丰富的一种氨基酸,经酵母代谢分解后可产生瓜氨酸和尿素。作者对 6 种高粱原料中总的氰化物和精氨酸质量分数进行了测定,并通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行显著性差异比较,结果见表 2。

表 2 不同品种高粱原料中的氰化物和精氨酸质量分数 (以干质量计)

Table 2 Contents of cyanide and arginine in different sorghum cultivars (calculated by dry weight)

高粱品种	氰化物/(μg/kg)	精氨酸/(g/kg)
S1	1599.89^{f}	3.06^{a}
S2	652.66^{c}	3.02^{a}
S3	327.90^{a}	3.84^{c}
S4	378.29^{b}	3.36^{b}
S5	714.02^{d}	3.35^{b}
S6	1 281.64^{e}	3.06^{a}

注:同一栏中不同上标值代表具有显著性差异(p<0.05)

表 2 结果表明,6 种高粱在氰化物质量分数上相对精氨酸质量分数具有更加显著的差异,因此,作者以氰化物质量分数作为标准,分别选择粳高粱中氰化物质量分数最高和最低的 S1 和 S2 以及糯

高粱中氰化物质量分数低的 S3 作为研究对象,进行固态发酵实验。

2.2 固态发酵过程中不同品种高粱原料对 EC 形成的影响

尽管白酒酿造原料品种丰富,但是多种原料混合发酵很难详细说明固态发酵过程中原料对 EC 形成的影响。因此,作者以 S1、S2 和 S3 作为原料进行固态发酵,测定发酵过程中 EC 质量分数的变化,分析比较固态发酵过程中不同品种高粱原料对 EC 形成的影响,结果如图 2 和表 3 所示。

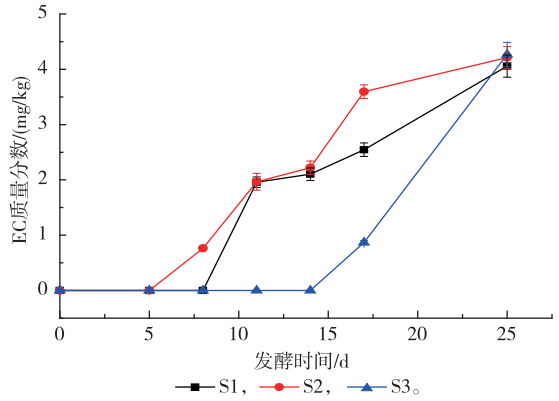


图 2 固态发酵过程中氨基甲酸乙酯质量分数的变化（以干质量计）

Fig. 2 Changes of ethyl carbamate content in the solid-state fermentation (calculated by dry weight)

图 2 表明,3 种高粱在发酵开始阶段的前 5 d 内均未检测到 EC。但从发酵第 5 d 后,3 种高粱发酵过程中的 EC 含量的变化规律存在显著的差异。在 EC 的起始形成时间上,粳高粱 S1(8 d)和 S2(5 d)中的 EC 开始产生于发酵前期,而糯高粱 S3 中的 EC 开始产生于发酵中期(14 d)。

表 3 固态发酵过程中氨基甲酸乙酯的最终产量和平均形成速率的比较

Table 3 Comparison of final yields and average formation rate of ethyl carbonate in the solid –state fermentation

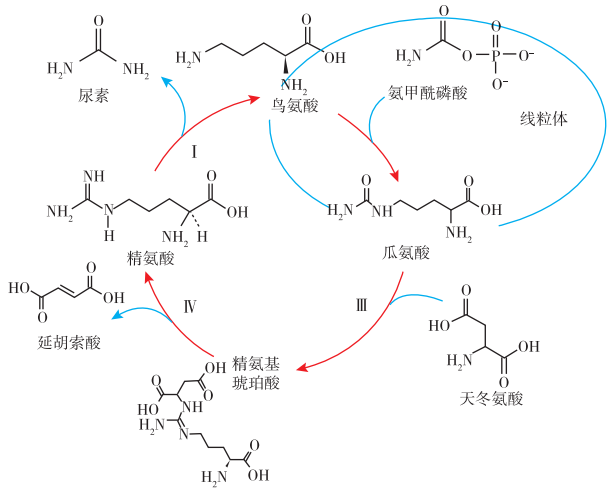
高粱品种	氨基甲酸乙酯最终产量/(mg/kg)	氨基甲酸乙酯平均形成速率/(mg/kg/d)*
S1	4.06	0.22
S2	4.21	0.24
S3	4.27	0.39

注:"*"氨基甲酸乙酯平均形成速率为氨基甲酸乙酯最终产量与其形成所需时间之比

表 3 结果表明，在发酵结束后 EC 的最终产量上,糯高粱 S3(4.27 mg/kg)的最终 EC 产量高于粳高粱 S1(4.06 mg/kg)和 S2(4.21 mg/kg)。在 EC 平均形成速率上,糯高粱 S3(0.39 mg/kg/d)的 EC 平均形成速率为粳高粱 S1(0.22 mg/kg/d)和 S2(0.24 mg/kg/d)的 EC 平均形成速率的 1.6 倍。从 EC 含量的变化规律看,S1 和 S2 呈现相近的变化规律，而 S3 的 EC 含量变化规律则明显区分于 S1 和 S2。

2.3 固态发酵过程中不同品种高粱原料中 EC 前体物质的分析比较

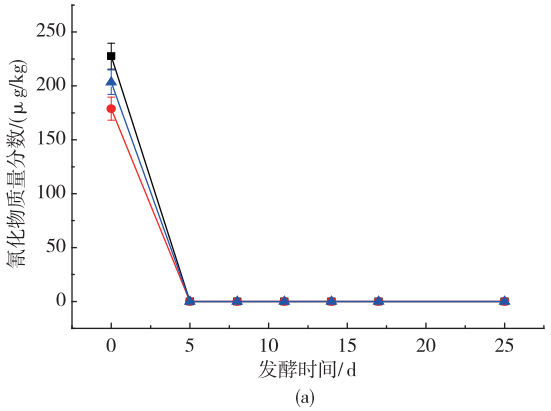
氰化物、瓜氨酸和尿素均可作为 EC 形成的前体物质。氰化物由原料本身带入,而瓜氨酸和尿素主要由酵母代谢降解原料中精氨酸产生,其代谢流程见图 3。为此,跟踪比较了 3 种高粱在整个固态发酵过程中氰化物、精氨酸、瓜氨酸和尿素含量的变化,结果如图 4 所示。



注:Ⅰ,精氨酸酶;Ⅱ,鸟氨酸转氨甲酰基酶;Ⅲ,精氨琥珀酸合成酶;Ⅳ,精氨琥珀酸裂解酶

图 3 酿酒酵母细胞中精氨酸代谢流程图

Fig. 3 Arginine metabolism in the cell of saccharomyces cerevisiae



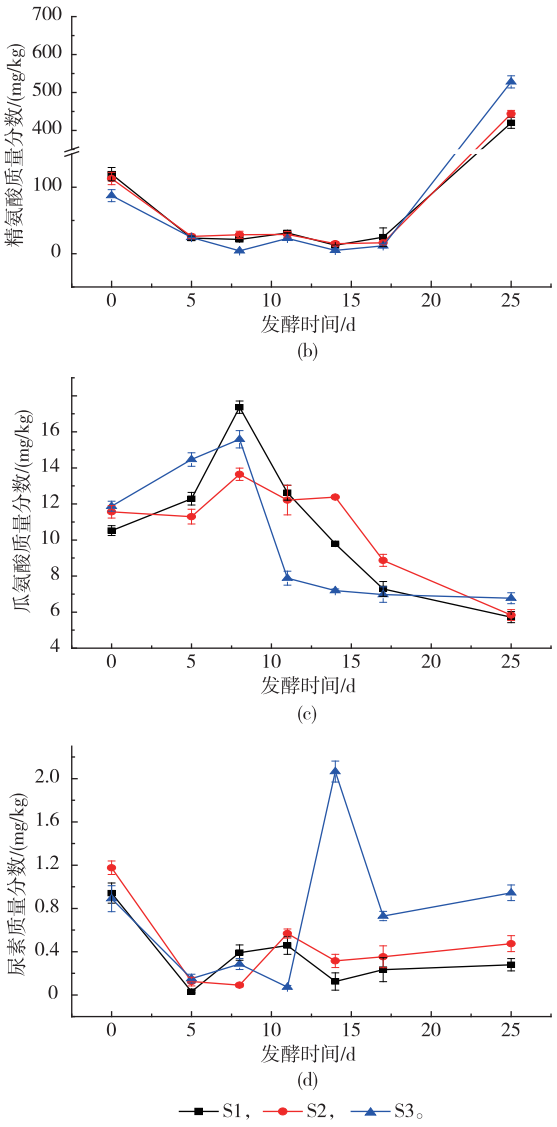


图 4 固态发酵过程中氰化物(a)、精氨酸(b)、瓜氨酸(c)和尿素(d)质量分数的变化(以干质量计)

Fig. 4 Content changes of cyanide (a), arginine (b), citrulline (c) and urea (d) in the solid –state fermentation (calculated by dry weight)

高粱中的生氰糖苷在发酵过程中经酶解或热分解后可与乙醇反应生成 EC。表 2 和图 4(a)结果表明,高粱中的氰化物含量经浸泡蒸煮处理后会显著下降。在接种酵母发酵 5 d 内氰化物含量快速下降至检测不到。而图 2 显示,发酵第 5 d 时体系中尚未检测到 EC,可能的原因是发酵开始时酵母在快速生长繁殖过程中虽降解了生氰糖苷,释放出了氢氰酸(HCN),但由于此时酵母还未进入厌氧发酵过程产生大量的乙醇,所以形成的氢氰酸没有与乙醇反应生成 EC。因此,固态发酵过程中氰化物并不是形成 EC 的重要前体物质。所以,虽然部分高粱品种中的氰化物含量远远高于其它高粱品种,但选择氰化物含量高的高粱品种作为酿造原料,并不一定会提高白酒固态发酵过程中 EC 的产量。此外,测定结果说明蒸馏后的白酒中含有的氰化物也并非来自原料,可能主要来自于生产过程中的蒸馏和储存过程尿素等物质的分解转化。

瓜氨酸和尿素被报道是葡萄酒和黄酒中重要的前体物质,精氨酸由于其能被降解生成瓜氨酸和尿素,而被认为是一种间接的前体物质。当尿素浓度过高时,酵母细胞会将多余的尿素分泌到胞外,此时尿素即可与乙醇反应产生 EC。目前,已有针对酵母通过建立工程菌和控制氮源来降低发酵过程中尿素的积累,从而达到降低 EC 的产量的目的。发酵过程中检测到的瓜氨酸同样是酵母降解精氨酸所形成的瓜氨酸分泌到胞外的部分。为此,跟踪比较了 3 种高粱固态发酵过程中精氨酸、瓜氨酸和尿素的含量变化。

图 4(b),(c)表明,3 种高粱的精氨酸和瓜氨酸虽然在变化趋势上一致,并与文献报道的模拟黄酒发酵过程中酒化糖化同时进行过程中精氨酸和瓜氨酸变化规律相符,但是分别在含量上存在一定的差异。发酵过程中 2 种粳高粱 S1 和 S2 的精氨酸含量变化趋势更加一致,糯高粱 S3 在发酵的前、中期的精氨酸含量低于粳高粱 S1 和 S2,而在发酵末期精氨酸含量达到 500 mg/kg 以上,略高于 S1(420.09 mg/kg)和 S2(443.99 mg/kg)。发酵初始阶段,瓜氨酸含量快速上升,在发酵的第 8 d 达到了最大,之后开始下降到 6 mg/kg 左右。发酵过程中尿素含量的变化如图 4(D)所示,糯高粱 S3 明显区别于 2 种粳高粱。S3 的尿素含量在发酵的第 14 d 快速上升至 2.0 mg/kg,随后又下降至 0.8 mg/kg 左右。结合图 2 分析,此时尿素含量快速下降的可能原因之一是部分尿素与乙醇反应产生了 EC。

为了进一步比较分析瓜氨酸和尿素对 3 种高粱在固态发酵过程中对 EC 形成的影响,并结合图 2 发现,3 种高粱对应的 EC 含量在发酵的第 14 d 至 17 d 内均快速增长。因此,按如下公式计算 EC、瓜氨酸和尿素在 14 d 至 17 d 发酵时间段的积累或者消耗速率(表 4)。

$$V=\frac{(C_{17\,d}-C_{14\,d})\times 1\,000}{MW\times 3}$$

V(mol/kg/d)是代谢物质的积累或消耗速率,$C_{14\,d}$和$C_{17\,d}$分别是发酵第 14 d 和 17 d 时代谢物对应的含量,MW 是代谢物对应的相对分子质量。

表 4　氨基甲酸乙酯、瓜氨酸和尿素在发酵时间 14 d 至 17 d 内的积累或者消耗速率

Table 4　Accumulating or consuming rate of ethyl carbamate, citrulline and urea from 14 d to 17 d in the solid-state fermentation

高粱品种	氨基甲酸乙酯/%	瓜氨酸/%	尿素/%
S1	1.66	-4.76	0.61
S2	5.15	-6.67	0.22
S3	3.24	-0.42	-7.41
S1-S3*	-0.49	10.33	-
S2-S3**	0.37	14.88	-

注:"*",以 S3 为对照,S1 的代谢物质增长或消耗速率相对 S3 增加或降低百分比;"**",以 S3 为对照,S2 的代谢物质增长或消耗速率相对 S3 增加或降低百分比

表 4 表明,S1 的 EC 积累速率比 S3 低 49%,S2 的 EC 积累速率比 S3 高 37%。在发酵的第 14 d 至第 17 d 内,瓜氨酸含量在 3 种高粱中均不断下降,但其在 S1(4.76 mol/kg/d)和 S2(6.67 mol/kg/d)中的消耗速率为在 S3 中的消耗速率 (0.42 mol/kg/d)的 10 倍多。由此推测,瓜氨酸可能对粳高粱 S1 和 S2 发酵产 EC 的贡献远大于对糯高粱 S3 发酵产 EC 的贡献。相反,尿素含量则在 S1(0.61 mol/kg/d)和 S2(0.22 mol/kg/d)发酵中呈正增长,在 S3(7.41 mol/kg/d)发酵中呈负增长。由此推测,尿素对糯高粱 S3 发酵产 EC 的贡献远大于对粳高粱 S1 和 S2 发酵产 EC 的贡献。瓜氨酸和尿素均是固态发酵过程中 EC 的重要前体物质,但是两者分别在粳高粱和糯高粱发酵过程中产 EC 的贡献是不同的,这为在白酒酿造过程中糯高粱和粳高粱原料的选择上提供了安全性参考指标。

2.4　固态发酵过程中不同品种高粱原料对乙醇形成的影响

对于白酒酿造来说,发酵产乙醇是最重要的生化过程。瓜氨酸和尿素也均需与乙醇反应才能形成 EC。因此,分别对 3 种高粱原料固态发酵过程中的乙醇含量进行了测定。

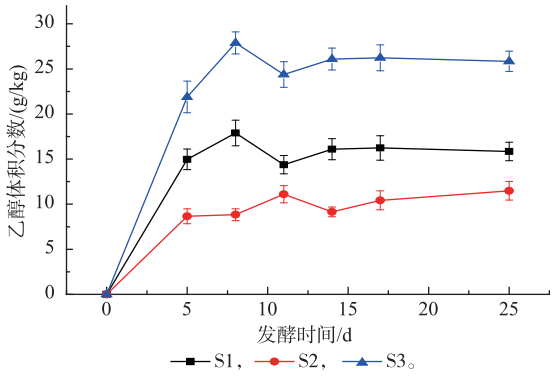


图 5　固态发酵过程中乙醇体积分数的变化(以干质量计)

Fig. 5　Changes of ethanol content in the solid-state fermentation (calculated by dry weight)

如图 5 所示,在整个固态发酵过程中,S1 和 S2 发酵产生的乙醇体积分数在第 0 d 至第 8 d 内不断上升并达到最大,随后出现略微下降后便处于一个基本平衡的水平,这与文献中报道的结果相一致[15]。S3 稍微区别于 S1 和 S2,乙醇体积分数上升至第 11 d 达到最大,随后同样出现略微下降后便处于一个相对平衡的水平。发酵结束时,S3 的乙醇体积分数分别为 S1 和 S2 的 1.6 倍和 2.5 倍。糯高粱的最终乙醇产量远高于粳高粱,主要原因可能是糯高粱的支链淀粉质量分数高于粳高粱。图 2 和图 5 表明,S3 的最终乙醇产量最高,其对应的最终 EC 产量也较高。但是由于乙醇的体积分数远远高于瓜氨酸、尿素和精氨酸的质量分数,因此,固态发酵过程中乙醇不是 EC 产量的主要限制性因素。所以,在白酒酿造过程中,如能有效控制好糯高粱原料所带入的 EC 前体物质的含量,则相对粳高粱原料来说,选择糯高粱作为酿造原料则既可控制好固态发酵过程中 EC 的产量,又可以显著提高出酒率。

3　结　语

高粱原料在固态发酵过程中可为 EC 的形成提供前体物质,包括氰化物、瓜氨酸和尿素以及可被降解生成瓜氨酸和尿素的精氨酸。选择 EC 前体物质含量少的高粱原料可以直接降低固态发酵过程中这些前体物质的含量,从而避免白酒成品酒中高 EC 含量带来的风险。作者阐明了不同品种高粱固态发酵过程中 EC 形成的基本规律。研究结果发现,糯高粱 S3 的最终乙醇产量、EC 产量和 EC 平均形成速率高于粳高粱 S1 和 S2,但其发酵过程中 EC 的起始形成时间晚于粳高粱。固态发酵过程中,氰

化物并没有参与 EC 的形成,而瓜氨酸和尿素是 EC 形成的重要前体物质,且两者在不同品种高粱中对 EC 形成的贡献具有较大差异。由结果推测,瓜氨酸对粳高粱 S1 和 S2 发酵产 EC 的贡献大于糯高粱 S3,而尿素对糯高粱 S3 发酵产 EC 的贡献大于粳高粱 S1 和 S2。因此,在白酒酿造过程中,结合自身产品的品质特征,选择合适的高粱品种,并控制由高粱原料等带入 EC 前体物质的质量分数,可以有效控制白酒固态发酵过程中 EC 的质量分数。

参考文献:

[1] WU P,PAN X,WANG L,et al. A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang,China [J]. **Food Control**,2012,23(1):286-288.

[2] 李华,冯丽丹,梁新红,等. 固相萃取结合 GC/MS 法测定葡萄酒中氨基甲酸乙酯[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(1):62-66.
LI Hua,FENG Lidan,LIANG Xinhong,et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction in combination with gas chromatography/mass spectrometry[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2008,27(1):62-66. (in Chinese)

[3] NOBREGA I C C,PEREIRA J A P,PAIVA J E,et al. Ethyl carbamate in pot still cachacas (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions[J]. **Food Chemistry**,2009,117(4):693-697.

[4] ARESTA M,BOSCOLO M,FRANCO D W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2001,49(6):2819-2824.

[5] WEBER J V,SHARYPOV V I. Ethyl carbamate in foods and beverages:a review[J]. **Environ Chem Lett**,2009,7(3):233-247.

[6] STEVENS D F,OUGH C S. Ethyl carbamate formation:reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions[J]. **American Journal of Enology and Viticulture**,1993,44(3):309-312.

[7] BRUNO S N F,VAITSMAN D S,KUNIGAMI C N,et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits[J]. **Food Chemistry**,2007,104(4):1345-1352.

[8] RIFFKIN H L,WILSON R,HOWIE D,et al. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky [J]. **Journal of the Institute of Brewing**,1989,95(2):115-119.

[9] SCHABER P M,COLSON J,HIGGINS S,et al. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel[J]. **Thermochimica Acta**,2004,424(1):131-142.

[10] 白卫东,沈棚,钱敏. 黄酒中氨基甲酸乙酯形成机理及控制方法研究进展[J]. 中国酿造,2012,31(7):6-10.
BAI Weidong,SHEN Peng,QIAN Min. Research advances in formation mechanism and controlling approach of the ethyl carbamate in rice wine[J]. **China Brewing**,2012,31(7):6-10. (in Chinese)

[11] 高年发,宝菊花. 氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 中国酿造,2006,162(9):1-4.
GAO Nianfa,BAO Juhua. Research advancement of ethyl carbamate[J]. **China Brewing**,2006,162(9):1-4. (in Chinese)

[12] LAMBERT J L,RAMASAMY J,PAUKSTELIS J V. Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified Konig reactions[J]. **Analytical Chemistry**,1975,47(6):916-918. (in Chinese)

[13] 张庄英,范文来,徐岩. 不同香型白酒中游离氨基酸比较分析[J]. 食品工业科技,2014,35(17):280-284.
ZHANG Zhuangying,FAN Wenlai,XU Yan. Comparative analysis of free amino acid content and composition in different aroma type Chinese liquors[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2014,35(17):280-284. (in Chinese)

[14] WANG R,WU H,ZHOU X,et al. Simultaneous detection of ethyl carbamate and urea in Chinese yellow rice wine by HPLC-FLD [J]. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**,2014,37(1):39-47.

[15] KONG Y,WU Q,ZHANG Y,et al. In Situ Analysis of Metabolic Characteristics Reveals the Key Yeast in the Spontaneous and Solid-State Fermentation Process of Chinese Light-Style Liquor [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2014,80(12):3667-3676.

[16] 邵明凯, 王海燕, 徐岩. 等. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响 [J]. 微生物学通报,2014,41(12):2466-2473.
SHAO Mingkai,WANG Haiyan,XU Yan,et al. Yeast community structure and its impact on flavor components during the fermentation process of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. **Microbiology China**,2014,41(12):2466-2473. (in Chinese)