

葡萄发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析

李成斌, 李仙*, 刘煜宇, 郑琳, 念小魁

(云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 云南 昆明 650106)

摘要: 以葡萄为原料, 经过生物发酵后制备烟用香料。采用同时蒸馏萃取装置收集挥发性成分并用气相色谱—质谱仪对该香料挥发性成分进行分析和鉴定, 经毛细管色谱分离鉴定出 29 种组分, 并用面积归一化法测定了各种成分的峰面积, 其主要成分(相对质量分数)为: 苯乙醇(23.73%)、丙二醇(15.84%)、糠醛(7.67%)、油酸乙酯(6.05%)、亚油酸乙酯(4.11%)、十六酸(3.78%)、2-甲基丁醛(3.48%)、2,3-丁二醇(3.29%)、十六酸乙酯(3.08%)、2-氨基苯甲酸甲酯(1.55%)、丁内酯(1.18%)、邻苯二甲酸二异丁酯(1.15%)、乙基 9-癸烯酸酯(1.13%)等。将该香料进行了卷烟添加实验, 结果表明该香料有降低余味、柔和烟香, 明显改善烟气质量的作用。

关键词: 葡萄; 生物发酵; 烟用香料; 同时蒸馏萃取; 挥发性成分; 气相色谱—质谱法

中图分类号: TS 45 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)08—0891—05

Preparation of Grape as Cigarette Flavor by Biological Fermentation and the Analysis of Volatile Composition

LI Cheng-bin, LI Xian*, LIU Yu-yu, ZHENG Lin, NIAN Xiao-kui

(Yunnan Reascend Tobacco technology(group) CO., LTD., Kunming 650106, China)

Abstract: In this study, the perfume use as cigarette flavor was produced from Grape through microbial fermentation. The volatile compositions in the perfume were prepared with simultaneous distillation and extraction equipment(SDE). They were isolated and indentified by capillary GC-MS method. 29 peaks were isolated and identified. The relative contents of the total peak area were determined by area normalization method. The main volatile compositions were: Phenylethyl Alcohol(23.73%), Propylene Glycol(15.84%), Furfural(7.67%), Ethyl Oleate(6.05%), Linoleic acid ethyl ester(4.11%), n-Hexadecanoic acid + Dibutyl phthalate(3.78%), Butanal, 2-methyl-(3.48%), 2,3-Butanediol(3.29%), Hexadecanoic acid, ethyl ester(3.08%), Methyl anthranilate(1.55%), Butyrolactone(1.18%), Diisobutyl phthalate(1.15%), Ethyl 9-decenoate(1.13%), etc. The experiments with the perfume were conducted. The results showed that the awful aftertastes was effectively reduced and smoking quality of cigarette was significantly improved.

Key words: Grape, biological fermentation, cigarette flavor, SDE, volatile composition, GC-MS

收稿日期: 2011—10—19

作者简介: 李成斌(1979—), 男, 云南楚雄人, 工程师, 主要从事生物发酵技术和天然香精香料研究。E-mail: lichengbin@reaced. com

* 通信作者: 李仙(1978—), 女, 山东临沂人, 工学硕士, 高级工程师, 主要从事天然香料的开发及应用研究。E-mail: lixian@reascend. com。

葡萄(*Vitis vinifera*)是当今世界上人们喜食的果品,全世界80%的葡萄都用于酿酒。中国云南的葡萄种植产区主要集中在弥勒,是云南最重要的葡萄产区,也是中国十大葡萄产区之一。以前的文献主要侧重于对葡萄原花青素等成分进行提取分离^[1-4],或葡萄酒香气成分进行分析^[5-8],但把葡萄作为一种潜在的香料资源并用于开发烟用香料的有关研究报道鲜见。作者以葡萄为原料,经微生物发酵处理后,制备烟用香料,进行了卷烟添加实验,利用同时蒸馏萃取技术(SDE)和气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术,分析了葡萄发酵香料中的挥发性成分^[9-13],为葡萄综合利用提供了参考。

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

葡萄:云南弥勒地区市售;fm-005 微生物产香菌株:实验室分离筛选;发酵液:实验室自制;马铃薯:市售;酵母膏:BR,北京奥博星生物技术责任有限公司产品;牛肉膏:BR,北京奥博星生物技术责任有限公司产品;蛋白胨:BR,上海中科昆虫生物技术开发有限公司产品;琼脂粉:福建石狮市环球琼胶工业有限公司产品。

1.2 仪器与设备

KBF 恒温恒湿箱:路易企业有限公司产品;SKY-211B 大容量恒温培养摇床:上海苏坤实业有限公司产品;HXC576 血液冷藏箱:青岛海尔特种电器有限公司产品;Centrifuge 5804R 冷冻离心机:德国 eppendorf 产品;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵:巩义市予华仪器有限责任公司产品;电热水浴锅:北京泰克仪器有限公司产品;101-0-S 电热恒温鼓风干燥箱:上海跃进医疗器械厂产品;HR1727/06/BC 飞利浦搅拌机:珠海经济特区飞利浦电器有限公司产品;隔水式电热恒温培养箱:湖北黄石医疗器械厂产品;KDM 型调温电热套:山东鄄城华鲁电热仪器有限公司产品;同时蒸馏提取器:实验室自制;BUCHIR-3000 型旋转蒸发器:瑞士 BUCHI 公司产品;6890N/5973N 气相色谱/质谱联用仪:美国 Agilent 公司产品;电子天平:上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品;超净工作台:昆明金京田科贸有限公司产品。

2 实验与方法

2.1 葡萄发酵香料的制备

葡萄灭菌后加入 fm-005 微生物产香菌株发酵液混合均匀,于 30 ℃ 恒温发酵 10 d 后,取 100 g 物料加入 200 mL 体积分数 75% 乙醇,加热回流提取 3 h,过滤,向剩余物中再加入 200 mL 体积分数 75% 乙醇(淹没)加热回流提取 3 h,过滤,再加入 200 mL 体积分数 75% 乙醇(淹没)加热回流提取 3 h,过滤。合并 3 次滤液,静置过夜,取上清液,用 BUCHIR-3000 型旋转蒸发器于 60 ℃ 蒸馏除去乙醇,所得香料再用 200 mL 体积分数 95% 乙醇进行回溶,静置过夜后,取上清液减压浓缩至膏状,制得烟用葡萄发酵香料。

2.2 同时蒸馏萃取

将葡萄发酵香料 25 g 放入同时蒸馏萃取装置一端的 500 mL 圆底烧瓶中,加入 250 mL 蒸馏水、2 mL 内标溶液(质量浓度为 100 mg/L 的萘溶液),用电热套加热;装置的另一端为盛 25 mL 二氯甲烷的 100 mL 圆底烧瓶,在 60 ℃ 下水浴加热,同时蒸馏萃取 3 h。二氯甲烷萃取液用无水硫酸钠干燥,置于 4 ℃ 过夜,过滤,滤液倒入浓缩瓶中用 Vigreux 柱浓缩至约 1 mL,浓缩液用于 GC-MS 分析。

2.3 GC/MS 分析条件

气相色谱条件:毛细管柱:HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样温度:240 ℃,载气:He,1.0 mL/min;分流比:25:1;进样体积为 2 μL;程序升温,起始温度 50 ℃ 保持 1 min,以 10 ℃/min 速度上升到 260 ℃,保持 260 ℃ 5 min 结束。GC-MS 接口温度:280 ℃。质谱条件:EI 方式,离子源温度:200 ℃,离子化电压:70 eV,扫描范围:35~455;扫描速率:1.65 scan/s。

谱图检索:采用 Wiley、Nist 谱图库进行检索。

2.4 质谱图的鉴定

通过检索 Wiley、Nist 谱图库,并结合标准质谱图和有关文献^[14-16],确定挥发性成分。并用色谱峰面积归一化法测定得各挥发性成分的峰面积。

2.5 样品的卷烟添加实验

利用葡萄发酵香料作为加料液,按质量分数 0.05% 用微量喷雾器均匀地喷加于烟丝上,经专业评吸小组对香料效果进行感官评价。

3 结果与讨论

3.1 葡萄发酵香料挥发性成分

葡萄发酵香料挥发性成分,见图1。

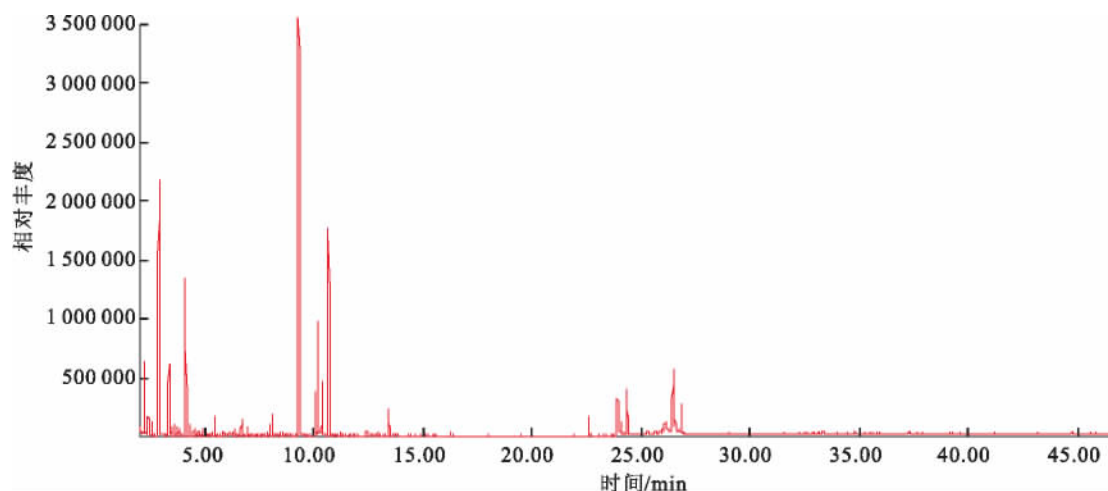


图1 葡萄发酵香料挥发性成分的总离子流图

Fig.1 Gas chromatogram of volatile compositions in the perfume of Grape as Cigarette Flavor by biological fermentation

表1 葡萄发酵香料挥发性化学成分

Tab.1 Volatile compositions in the perfume of grape as cigarette flavor by biological fermentation

序号	保留时间	化合物名称	峰面积/%
1	2.31	2-甲基丁醛 Butanal, 2-methyl-	3.48
2	2.64	3-羟基-2-丁酮 3-Hydroxy-2-butanone	0.67
3	2.93	丙二醇 Propylene Glycol	15.84
4	3.38	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	3.29
5	4.17	糠醛 Furfural	7.67
6	4.53	(S)-3-羟基丁酸甲酯 Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester	0.34
7	5.48	丁内酯 Butyrolactone	1.18
8	5.89	3-羟基丁酸乙酯 Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	0.28
9	6.42	苯甲醛 Benzaldehyde	0.00
10	6.46	5-甲基糠醛 2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	0.44
11	8.01	苯乙醛 Benzeneacetaldehyde	0.68
12	8.16	庚酸乙酯 Heptanoic acid, ethyl ester	1.27
13	9.35	苯乙醇 Phenylethyl Alcohol	23.73
14	10.13	二乙氧基甲烷 Methane, diethoxy-	2.51
15	10.21	丁酰胺 Butanamide	9.06
16	10.41	2-叔丁氧基-四氢-2H-吡喃 2H-Pyran, 2-(1,1-dimethylethoxy)tetrahydro-	1.58

续表 1

序号	保留时间	化合物名称	峰面积/%
17	10.46	己烯乙二醇 Hexylene Glycol	3.36
18	11.27	2,3-二氢苯并呋喃 Benzofuran, 2,3-dihydro-	0.30
19	12.66	吲哚 Indole	0.30
20	12.99	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-Methoxy-4-vinylphenol	0.25
21	13.48	2-氨基苯甲酸甲酯 Benzoic acid, 2-amino-, methyl ester	1.55
22	16.30	2,4-二叔丁基苯酚 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	0.36
23	22.65	邻苯二甲酸二异丁酯 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	1.15
24	23.95	十六酸 n-Hexadecanoic acid	3.78
25	24.12	乙基 9-癸烯酸酯 Ethyl 9-hexadecenoate	1.13
26	24.39	十六酸乙酯 Hexadecanoic acid, ethyl ester	3.08
27	26.49	亚油酸乙酯 Linoleic acid ethyl ester	4.11
28	26.56	油酸乙酯 Ethyl Oleate	6.05
29	26.86	十八酸乙酯 Octadecanoic acid, ethyl ester	2.56

据表 1 可知,葡萄发酵香料的成分共鉴定出 29 种化合物,所得质谱图经计算机质谱数据库检测与标准图谱核对,确认了其中的 29 种成分,利用归一化测定了各种成分的峰面积,其主要成分为(相对质量分数):苯乙醇(23.73%)、丙二醇(15.84%)、糠醛(7.67%)、油酸乙酯(6.05%)、亚油酸乙酯(4.11%)、十六酸(3.78%)、2-甲基丁醛(3.48%)、

2,3-丁二醇(3.29%)、十六酸乙酯(3.08%)、2-氨基苯甲酸甲酯(1.55%)、丁内酯(1.18%)、邻苯二甲酸二异丁酯(1.15%)、乙基 9-癸烯酸酯(1.13%)等。

3.3 试制样烟的感官评吸结果

将试制的香料样品添加到卷烟中进行感官评吸,各项得分见表 2。

表 2 葡萄发酵香料卷烟添加评吸结果

Tab. 2 The sensory appraise result compositions in the perfume of Grape as Cigarette Flavor by biological fermentation

原料叶组	光泽	香气	谐调	杂气	刺激性	余味	合计
云南某品牌卷烟叶组	5.0	30.0	5.0	11.0	18.5	22.5	92.0
河南某品牌卷烟叶组	4.5	29.0	5.0	10.5	18.0	22.0	89.0
广东某品牌卷烟叶组	4.5	27.0	4.5	10.0	17.5	21.0	84.5

评吸结果表明:葡萄发酵香料在卷烟加料中使用,具有改善烟气的潮润性和余味,柔和烟气的作用,在烟香细腻性和甜润感方面有一定的提高,对吸味品质有一定的改善。特别是葡萄发酵香料用于云南某品牌卷烟叶组在丰富烟香,柔和烟气,减少刺激等方面有一定作用,是一种较理想的烟用香料。

4 结 语

利用同时蒸馏萃取技术和气相色谱-质谱联

用技术分析鉴定生物发酵技术制备的葡萄香料的成分,共鉴定出 29 个化合物,占峰面积的 76.04%。其中,苯乙醇(Phenethyl alcohol)占峰面积的 23.73%。而苯乙醇具有浓郁优雅的玫瑰香气,作为香原料用于日化和食用香精,广泛用于调配皂用和化妆品香精。卷烟添加实验表明,葡萄发酵产物用于云南某品牌卷烟叶组在丰富烟香,柔和烟气,减少刺激等方面有一定作用,是一种较理想的烟用香料。所以,利用微生物发酵可以得到具有特殊香

气的烟用葡萄发酵香料。通过挥发性成分鉴定研究为更好地开发云南弥勒葡萄这一丰富的植物资源、综合利用葡萄提供一定的参考依据。

参考文献(References):

- [1] 吕丽爽,曹 栋.薄层层析法分离葡萄籽中的低聚原花青素[J].无锡轻工大学学报,2001(1):65—67.
LU Li-shuang,CAO Dong. Isolation of oligomeric proanthocyanidins from grape seed by TLC[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*,2001(1):65—67. (in Chinese)
- [2] 吴朝霞,孟宪军,张 红,等.超临界 CO₂ 萃取葡萄籽中低聚原花青素的初探[J].沈阳农业大学学报,2007.38(2):241—243.
WU Zhao-xia,MENG Xian-jun,ZHANG Hong,et al. Exploring studies on extracting of oligomer procyanidins (OPCs) in grape seed by supercritical fluid extract-CO₂[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*,2007,38(2):241—243. (in Chinese)
- [3] 易元芬,余 珍,丁靖坤,等.超临界 CO₂ 萃取葡萄籽油化学成分[J].云南植物研究.2001,23(2):266—268.
YI Yuan-Fen, YU Zhen, DING Jing-Kai, et al. The chemical components from vitis vinifera seeds oil by supercritical CO₂ extraction[J]. *ACTA BOTANICA YUNNANICA*,2001,23(2):266—268. (in Chinese)
- [4] 高兆建.菠萝果酒发酵的工艺[J].食品与生物技术学报,2006(3):98—103.
GAO Zhao-jian. Studies on the Pineapple Wine Fermentation Technology[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006(3):98—103. (in Chinese)
- [5] Ferreira V, Lopez R, Escudero A, et al. The aroma of grenache red wine-hierarchy and nature of its main odorants[J]. *J Sci Food Agric*, 1998,77:259—267.
- [6] Ferreira V, Hernandez-Orte P, Escudero A, et al. Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999,864:77—88.
- [7] Lopez R, Cacho J F. Quantitative determination of the odorants young red wines from different grape varieties[J]. *J Sci Food Agric*, 2000,80:1659—1667.
- [8] 李华,陶永胜,康文怀,等.葡萄酒香气成分的气相色谱分析研究进展[J].食品与生物技术学报,2006(1):99—104.
LI Hua,TAO Yong-sheng,KANG Wen-huai,YIN Chun-li. Wine Aroma Analytical Investigation Progress on GC[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*,2006(1):99—104. (in Chinese)
- [9] 李华,袁春龙,王蔚新.葡萄籽提取物(GSE)有效成分的分析[J].食品与生物技术学报,2006(3):1—4.
LI Hua,YUAN Chun-long,WANG Wei-xin. Analysis of active compounds in grape seeds extracts (GSE)[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*,2006(3):1—4. (in Chinese)
- [10] 吴昊,许时婴.牛肉风味料的香气成分[J].无锡轻工大学学报,2001(2)23—28.
WU Hao,XU Shi-ying. Volatile aroma components in beef flavoring[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*,2001(2)23—28. (in Chinese)
- [11] 张峻松,贾春晓,毛多斌,等.生物技术制备天然枣香料的香味化合物分析[J].精细化工,2003,20(2):82—84.
ZHANG Jun-song,JIA Chun-xiao,MAO Duo-bing,et al. Analysis of flavor compounds in natural chinese date perfume produced by biological technology[J]. *Fine Chemicals*,2003,20(2):82—84. (in Chinese)
- [12] 林瑜,徐若飞,李祖红,等.发酵无花果香料的挥发性成分分析[J].生物技术,2005,15(2):54—56.
LIN Yu,XU Ruo-fei,LI Zu-hong,et al. Analysis of volatile composition in the perfume of ficus carica Lam. produced by fermentation[J]. *BIOTECHNOLOGY*,2005,15(2):54—56. (in Chinese)
- [13] 段继铭,曾晓鹰,刘煜宇,等.葡萄果渣发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析[J].精细化工,2009,26(8):781—784.
DUAN Ji-ming,ZENG Xiao-ying,LIU Yu-yu,et al. Preparation of grape pomace as cigarette flavor by biological fermentation and the analysis of volatile composition[J]. *Fine Chemicals*,2009,26(8):781—784. (in Chinese)
- [14] Heller S R. Milne G W A. EPA/NIH Mass Spectral Database[C]. Washington: US Government Printing Office, 1978: 1—4.
- [15] 江苏新医学院. 中药大辞典(附编)[M]. 上海:科学技术出版社,1979.
- [16] 施钧慧,汪聪慧. 香料质谱图集[C]. 北京:中国质谱学会,1992.