

基于超临界 CO₂ 萃取和旋转锥体柱法的啤酒花提取物香气特征比较

欧泽洁^{1,2}, 孔凡玉², 周月南³, 杨朝霞³, 庞雪莉^{2*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109; 2. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101;
3. 青岛啤酒股份有限公司, 啤酒生物发酵工程国家重点实验室, 青岛 266100)

摘要: **目的** 比较两种冷萃取啤酒花香气提取物的香气特征差异及其物质基础。**方法** 采用超临界 CO₂ 萃取和旋转锥体柱(spinning cone column, SCC)法分别制备了酒花提取物, 利用风味剖面定量描述分析对比研究两种酒花提取物的香气特征; 采用溶剂辅助风味蒸发-气相色谱-嗅闻-质谱法结合香气提取物稀释分析两种提取物中关键香气物质构成。**结果** 超临界 CO₂ 萃取的浸膏草药香、木香突出, SCC 提取物橘香、果香明显。芳樟醇、 β -月桂烯、顺-3-己烯-1-醇为两种酒花提取物的共有关键香气化合物。邻伞花烃、辛酸甲酯、2-壬酮是超临界 CO₂ 萃取浸膏的特有关键香气化合物, 2-甲基丁醇、 γ -戊醇和壬醛为 SCC 提取物的特征香气物质。超临界 CO₂ 萃取擅长提取萜烯化合物, SCC 对醇类、酯类、萜烯醇类化合物的富集率较高。**结论** 两种酒花提取物的香气风格特征相差较大, 研究结果可为酒花拓展应用研究提供参考。

关键词: 啤酒花; 风味剖面定量描述分析; 超临界 CO₂ 萃取; 旋转锥体柱; 气相色谱-嗅闻-质谱法; 溶剂辅助风味蒸发; 香气提取物稀释分析

Comparison of aroma characteristics of hop extracts based on supercritical CO₂ extraction and spinning cone column method

OU Ze-Jie^{1,2}, KONG Fan-Yu², ZHOU Yue-Nan³, YANG Zhao-Xia³, PANG Xue-Li^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;
2. Institute of Tobacco Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 3. State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer, Tsingtao Brewery Co., Ltd., Qingdao 266100, China)

ABSTRACT: **Objective** To compare the differences in aroma characteristics of 2 kinds of cold-extracted hop aroma extracts and their material basis. **Methods** The hop extracts were prepared by supercritical CO₂ extract and spinning cone column (SCC) methods, respectively. The aroma characteristics of the 2 kinds of extracts were comparatively studied using quantitative descriptive analysis; solvent-assisted flavor evaporation-gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry combined with aroma extract dilution analysis was also used to resolve and comparatively study the composition of key aroma components in the 2 kinds of extracts. **Results** The supercritical CO₂ extract herbal and woody aroma is prominent. SCC extract orange and fruity aromas were evident. Linalool, β -myrcene, and *cis*-3-hexen-1-ol were the common key aroma compounds of 2 kinds of extracts. The *o*-cymene, methyl 2-octynoate, and 2-nonanone were the specialty key

基金项目: 啤酒生物发酵工程国家重点实验室开放课题项目(K202106)

Fund: Supported by the Open Project of State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer (K202106)

*通信作者: 庞雪莉, 博士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬加工和食品风味化学。E-mail: pangxueli@caas.cn

*Corresponding author: PANG Xue-Li, Ph.D, Associate Professor, Institute of Tobacco Research of CAAS, No.11, Keyuanjing 4th Road, Laoshan District, Qingdao 266101, China. E-mail: pangxueli@caas.cn

aroma compounds of the supercritical CO₂ extract, and 2-methylbutan-1-ol, nonanal, and benzyl alcohol were the characteristic aroma compounds of the SCC extract. And supercritical CO₂ extract was good at extracting monoterpenes, while SCC had high enrichment efficiency for alcohols, ketones, and monoterpene alcohols.

Conclusion The aroma style characteristics of the 2 kinds of hop extracts are quite different, and the research results can provide references for the expanded application research of hop.

KEY WORDS: hop; quantitative descriptive analysis; supercritical CO₂ extraction; spinning cone column; gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry; solvent-assisted flavor evaporation; aroma extract dilution analysis

0 引言

啤酒花, 简称酒花, 又称蛇麻花、忽布, 是桑科葎草属多年生草质蔓生藤本植物^[1]。啤酒花作为啤酒酿造中必不可少的原料之一, 已经在酿造中应用了数千年, 被誉为“啤酒的灵魂”^[2]。啤酒花的主产地在美国和德国, 产量占全球的 44% 和 32%。在国内, 新疆和甘肃为啤酒花的主要种植地区, 占全球产量的 6%^[3]。作为一种有极高经济价值的特种作物, 尽管啤酒花目前主要应用在啤酒酿造方面, 但最初啤酒花是作为药用植物来使用^[4], 并且在食品行业也有一定的应用价值。啤酒花中的风味和功能成分主要有酒花树脂、酒花多酚和酒花油。酒花树脂给啤酒提供了独特的苦味, 苦酸还具有抗菌、抗炎、治疗糖尿病等作用^[5]。酒花多酚使啤酒生成了杀口感, 和酒花树脂一起提高了啤酒花的防腐和抗氧化能力^[6]。酒花多酚中的黄腐酚, 目前仅在啤酒花中发现, 具有抗菌、抗癌、抗氧化等多种功效^[7], 在医学方面有巨大的应用潜力。挥发油是啤酒花香气的来源, 也是酒花品质的重要构成因素。啤酒中独特的“酒花香”来自于啤酒花中的挥发油, 尽管它仅占酒花干重的 0.5%~3%, 但能影响消费者对啤酒的喜好程度^[8]。酒花油中的化学成分复杂, 已从中鉴定出上百种芳香化合物^[9]。不同的酒花香气化合物的浓度和比例, 可以赋予啤酒花果香、花香、橘香、草本、木质等多样的香型风格, 因此, 酒花油是酒花酿造应用中最具价值的参数之一^[10]。近几年培育的酒花新品, 即“风味啤酒花”, 香气更加浓郁, 通常更具果香味, 推动了整个精酿啤酒行业的快速发展^[11]。酒花的香气品质也是酒花在食品行业应用的一个重要因素, 可以作为调味剂将香气应用在非酒精饮料的生产中, 如酒花茶、酒花汽水和酒花咖啡^[12]。酒花油还具有良好的镇静作用, 目前已经有将啤酒花制作成枕头作为治疗失眠的药物出售^[13]。

啤酒花是酿造的主要原料之一, 给啤酒带来苦味和香气。目前, 酒花在酿造中多以颗粒形式使用, 在麦芽煮沸时加入酒花可以给啤酒增加苦味, 而在煮沸和发酵结束后加入酒花, 由于温度较低, 更容易保留酒花的香气。但苦味物质和某些与品种相关的特有花香、橘香、草药香是不稳定的, 且投放过程中酒花中的化合物并不会完全转移到啤酒中^[14-15]。近几年酒花提取物作为酒花的替代物越来

越受到人们的欢迎, 相较啤酒花颗粒形式, 添加酒花提取物的产品, 其香气品质更加可控, 酒花利用率更高, 储存过程中的产品稳定性以及不同批次啤酒花的同质性更好^[16-17]。另外, 酒花提取物的应用形式也更加多样, 可用于芳香疗法^[18]、可食性抑菌食品包装膜等^[19-20]。目前应用于啤酒花香气获取的提取技术主要有乙醇回流提取、水蒸气蒸馏、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、超临界 CO₂ 萃取法等^[17]。酒花挥发性提取物的主要成分为萜烯类化合物, 占总油含量的 90% 左右, 而萜烯类化合物易挥发和氧化, 在加热煮沸过程中会大量蒸发^[21], 因此啤酒花的提取更适合采用冷萃取技术。目前应用较多的冷萃取技术有超临界 CO₂ 萃取技术, 超临界 CO₂ 萃取法因为萃取温度低、萃取效率高、无溶剂残留且能有选择性的萃取等特点, 是获取天然纯净萃取物的最有效技术。超临界 CO₂ 有较强的渗透性和溶解力, 并且能有效地提取非极性化合物, 因此对啤酒花中的酒花软树脂和酒花油有很高的提取效率^[18]。ZEKOVIC 等^[22]用超临界 CO₂ 萃取通过两步分别在低 CO₂ 溶解度和高 CO₂ 溶解度下获得啤酒花提取物 A 和 B, 在较低的 CO₂ 溶解度下获得了以挥发油为主的萃取物 A, 而增加了 CO₂ 溶解度后则更具选择性地提取出了含苦味物质的萃取物 B。还有研究表明超临界 CO₂ 萃取的啤酒花提取物在酿造中能使啤酒产生依赖品种的风味, 同时还能增加啤酒的苦味^[15]。旋转锥体柱 (spinning cone column, SCC) 提取是近几年天然香料提取的新兴冷萃取技术, 是食品行业中用来恢复天然香气的分离技术^[23]。与传统的蒸汽蒸馏不同, 它可以在低温下运行, 具有传质效率高、耗时短、控温广、能够还原真实萃取物风味等特点, 能够降低热敏性风味物质的损伤^[24]。目前已应用在香气萃取^[25-26]、精油芳香回收^[27]和降低酒精饮料的酒精度中^[28-30]。但目前还未见 SCC 技术在啤酒花香气萃取中的应用报道, 因此有必要了解这种新兴技术与经典的超临界 CO₂ 萃取技术在酒花香气分离萃取中的差异。因此, 本研究首先采用两种冷萃取技术制备酒花挥发性提取物, 采用风味剖面感官定量分析描述两种提取物的香气轮廓, 并将仪器分析与感官分析相结合, 通过溶剂辅助风味蒸发-气相色谱-嗅闻-质谱法 (solvent assisted flavor evaporation-gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry, SAFE-GC-O-MS) 解析并比较研究两种提取物中关键香气成

分构成,为指导从事啤酒花研究的工作者们更有选择性地应用不同方式酒花提取物提供数据支撑和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

T90 西楚啤酒花颗粒(美国雅基玛啤酒花有限公司)。

乙醚、无水硫酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 2-甲基-3-庚酮、乙酸苯乙酯、正构烷烃标准品(C₆~C₃₀)(色谱纯,美国 Sigma 公司); 其他香气标准品(色谱纯,北京百灵威科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

7890B-5977A 气相色谱-质谱联用仪、DB-WAX、DB-5 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)(美国 Agilent 公司); Sniffer 9000 嗅觉检测仪(瑞士 Brechbuhler 公司); 定制 SAFE 装置(美国 ACE Glass 公司); DF-101S 加热式磁力搅拌器(河南予华仪器公司); NEVAP 24 氮吹仪(美国 Organomation 公司); CPA 225D 电子天平(精度 0.001 g, 德国赛多利斯公司); SFE 220-50-(5+1) L 超临界二氧化碳萃取仪(江苏南通科鑫超临界设备有限公司); SCC1000 旋转锥体柱提取设备(澳大利亚 Flavourtech 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 啤酒花挥发物冷萃取

SCC 提取: 啤酒花粉碎过 60 目筛后,称取 9 kg 啤酒花粉末打入 SCC 设备缓存罐中,进料温度为 76°C,以 500 L/h 的速度通过料液口打入椎体住内,真空度维持在-50 kPa,挥发性化合物冷凝流出后,低温保存备用。

超临界 CO₂ 萃取: 以 CO₂ 为萃取剂,称取 5 kg 啤酒花,在 32 MPa、42°C 下萃取 3 h,收集萃取物后低温保存备用。

1.3.2 啤酒花提取物感官评价

采用风味剖面定量描述分析(quantitative descriptive analysis, QDA)对两种啤酒花提取物的香气轮廓进行分析。感官评价小组由 10 位有丰富啤酒花感官评价经验的专家组成。首先,小组成员单独对啤酒花提取物进行气味描述,记录下香气描述词;然后,开展小组讨论筛选出认同度最高的风味描述词;最后,各取 7.2 g 超临界 CO₂ 萃取浸膏和 21 g SCC 提取物(均相当于 33 g 啤酒花颗粒)置于棕色小瓶中,将样品随机呈送给感官评价员,要求评价员根据确定的风味描述词,采用 5 点强度法(0 代表无气味,5 代表气味非常强烈),以鼻前嗅闻的方式,对两种啤酒花提取物进行香气剖面定量评价。

1.3.3 啤酒花提取物香气物质的 SAFE 提取

为使啤酒花原料的重量一致,准确称取 7.2 g 超临界 CO₂ 萃取物和 21 g SCC 提取物(均相当于 33 g 啤酒花颗粒),分别加入 50 μL 内标(2-甲基-3-庚酮, 1.400 mg/mL; 2-乙基丁酸, 2.490 mg/mL)和 30 mL 乙醚,漩涡混匀后超声提取 30 min,

重复 3 次合并乙醚萃取液,进行 SAFE 提取 1.5 h。循环水和样品孵育温度均为 35°C。得到的提取物加入无水硫酸钠放入-80°C 冰箱中过夜除水,常压过滤后用氮吹浓缩至 1 mL 于 1.5 mL 气相小瓶中冷藏备用,每个样品平行萃取两次。

1.3.4 基于 GC-O-MS 筛选酒花提取物中香气活性物质

采用 GC-O-MS 技术在两根极性不同色谱柱上(DB-5 和 DB-WAX, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm)对 SAFE 提取物中的挥发性组分和香气组分进行分离鉴定,色谱柱载气为高纯氦气(99.999%),流量为 1.6 mL/min, DB-5 和 DB-WAX 的柱箱升温程序分别为: 40°C (5 min) 10°C/min—280°C (20 min) 和 40°C (5 min)—10°C/min—225°C (20 min)。嗅闻仪和质谱分流比 1:1,进样口和传输线温度均为 250°C。电子轰击离子源能量为 70 eV,离子源温度为 230°C,四极杆温度为 150°C,质量扫描范围为 m/z 33~325 amu。

1.3.5 酒花提取物中关键香气物质的香气提取物稀释分析

采用香气提取物稀释分析(aroma extract dilution analysis, AEDA)的方法评价化合物对整体香气的贡献大小。SAFE 提取液以 1:3ⁿ 的梯度用乙醚梯度稀释,由两名经过系统训练的评价人员对每个稀释样品进行嗅闻实验,记录下气味出现的保留时间、气味属性和气味强度,直到样品中检测不到味道为止。同时被两名成员在同一保留时间下嗅闻到的气味被认为是客观存在的。实验结果用稀释因子 FD 表示,它代表两名成员都能检测到气味的最高稀释倍数,FD 因子越高,化合物的香气贡献越大。

1.3.6 香气化合物的定性定量分析

定性分析: 通过 NIST17 和 Wiley14 谱库检索以及对比待测化合物和标准化合物的 LRI、质谱图以及香气属性进行精确定性。化合物的线性保留指数 LRI 通过正构烷烃出峰时间计算。

定量分析: 采用目标化合物的峰面积与内标(2-甲基-3-庚酮, 1400 μg/mL; 2-乙基丁酸, 2490 μg/mL)峰面积之比,采用半定量的方法来计算目标化合物浓度,公式见式(1):

$$C_{\text{目标化合物}} = \frac{C_{\text{内标}} \times A_{\text{目标化合物}} \times V_{\text{样品}}}{A_{\text{内标}} \times M_{\text{啤酒花}}} \quad (1)$$

其中, C 表示内标和目标化合物的浓度,目标化合物浓度单位为 μg/g,内标浓度单位为 μg/mL, A 为内标和目标化合物的定量离子峰面积,单位为 counts, V 为样品经过 SAFE 处理后最终浓缩的体积,单位为 mL, M 为实验所取两种提取物所相当的啤酒花质量,单位为 g,均相当于 33 g 啤酒花。

1.4 数据处理

GC-MS 数据使用仪器自带的软件进行分析。使用 Qualitative Analysis 软件查看啤酒花提取物的谱图;使用未知物分析软件,利用 C₆~C₃₀ 正构烷烃计算出的线性保留指数与数据库进行比对,对化合物进行定性;使用 MS 定量软件,采用半定量法对化合物定量。采用 GraphPad Prism 和 Microsoft Office 2019 制表和绘图。

2 结果与分析

2.1 不同酒花提取物香气特征比较

专家小组成员经过讨论, 最终明确了可用于两种啤酒花提取物感官定量描述分析的 6 个风味描述词: “花香”“果香”“橘香”“木香”“草药香”和“草本”, 也是描述啤酒花时常用的基本感官描述词^[31]。由图 1 可知, 两种方式酒花提取物的香气特征差异较大, 主要体现在橘香、果香、木香和草药香的差异。具体来说 SCC 提取物橘香、果香明显, 有陈皮、西柚味, 略带花香, 超临界 CO₂ 萃取浸膏草药香、木香突出, 整体感愉悦, 清爽。为了明确两种酒花提取物感官差异的具体原因, 需要借助仪器分析从分子水平探讨造成两者之间区别的差异化化合物。

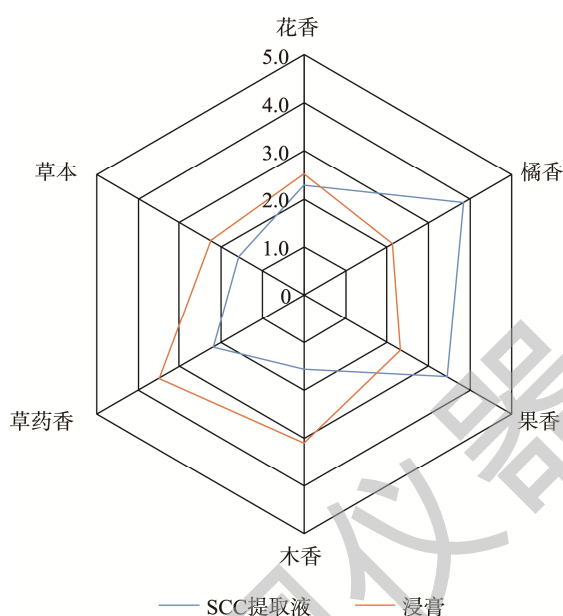


图1 两种酒花提取物感官评价得分雷达图

Fig.1 Radar chart of sensory evaluation scores of 2 kinds of hop extracts

2.2 啤酒花提取物中关键香气成分分析

如表 1 所列, 利用 SAFE-GC-O-MS 从两种方式西楚啤酒花提取物中共检出 25 种具有香气活性的化合物, 包括 7 种醇类化合物、5 种酯类化合物、4 种单萜烯化合物、3 种酮类化合物、2 种萜烯醇化合物、2 种酸类化合物、1 种醛类化合物和 1 种倍半萜烯化合物, 这些化合物赋予了酒花提取物“花香”“果香”“生青草本”“木质草药”的气味特征, 与上面感官分析明确的风味描述词一致。

在所有香气化合物中, 芳樟醇(浸膏 FD=2178, SCC 提取液 FD=729)和 β -月桂烯(浸膏 FD=729, SCC 提取液 FD=9)在两种啤酒花提取物中均表现出较高的 FD 因子, 是酒花提取物花香和草药香气味特征的主要贡献组分。在所有香气化合物种类中, 单萜烯化合物是酒花提取物中含量组丰富的组分, 单萜烯中的 β -月桂烯具有草药、木质

的气味, 但由于 β -月桂烯是疏水性的, 溶解度不高, 并且在煮沸、干燥和有氧储存时会大量的蒸发, 是热敏性高稳定性差的香气化合物, 但相反的, 它是一种很重要的前提物质, β -月桂烯能够通过氧化生成芳樟醇和香叶醇等对花香香气特征有贡献的化合物^[9,32], 或在煮沸且有氧气的存在下可能生成具有柠檬香气的紫苏烯^[33]。芳樟醇由月桂烯水合生成, 带有愉悦的佛手柑和花香的气味, 是用于区分不同品种啤酒花及其制品的重要香气成分指标^[34-35], 芳樟醇有两种对映异构体并且具有不同的香气风格, 在酒花及其制品中的芳樟醇主要由具有花香、薰衣草香的(3R)-芳樟醇构成的, 带有柑橘果香的(3S)-芳樟醇的含量较少^[36], 但在煮沸的过程中, (3R)-芳樟醇会异构成(3S)-芳樟醇^[37], 且前者的阈值更低, 因此使花香的特征降低^[38]。研究表明酒花提取物中的香气不是化合物香气单纯的叠加, 而是挥发性组分之间以及挥发性和非挥发性化合物之间的相互作用。比如芳樟醇与香叶醇同时存在时, 通常可在花香和橘香的感知方面表现出协同作用。除此之外, 芳樟醇和滋味物质还表现出跨膜态交互作用, 如研究发现芳樟醇对啤酒中的苦味有很大的影响, 且存在浓度依赖关系, 低浓度的芳樟醇会增强苦味, 高浓度下的芳樟醇则会削弱苦味的感知^[31]。

酯类化合物通常带来水果的香气, 研究发现, 甲酯在较低浓度下即可被人们感知, 对酒花提取物的香气有较大的贡献^[39]。在检出的 5 种酯类化合物中, 辛酸甲酯、2-甲基丁基乙酸酯、己酸甲酯、2-甲基丁酸戊酯都表现出了果香、甜香的气味属性, 而戊酸-2-甲基丁酯则表现出了干酪、酸臭的气味属性。辛酸甲酯对啤酒花提取物的香气有较高的贡献, 这与之前的报道一致^[32,40]。

在醇类化合物中, 顺-3-己烯-1-醇在两种提取物中也都展现了较高的 FD 因子, 给啤酒花提取物带来了绿色、青草的香气。在新鲜的啤酒花中绿色、青草的香气由顺-3-己烯醛提供, 是酒花中的亚油酸通过酶反应级联生成。而干燥或加热过程中, 醛类物质相对不稳定, 在弱酸性环境中通过酶转化成顺-3-己烯-1-醇。因此干燥的啤酒花颗粒及酒花提取物中的绿色、青草香气多由顺-3-己烯-1-醇提供^[32,41]。

醛类化合物的香气属性与链长有关, 短链的醛类具有水果、柑橘、柠檬清香, 而长链醛类则会产生腐烂、脂肪、金属等异味^[31]。啤酒花提取物中的醛类化合物含量较低, 主要在啤酒花干燥过程中损失^[42]。在两种酒花提取物仅检测到一种有香气活性的醛类化合物——壬醛, 给酒花提取物带来柑橘风味。

总的来说, 芳樟醇、 β -月桂烯、顺-3-己烯-1-醇为两种酒花提取物的共有关键香气化合物, 给酒花带来了药草香、草本、花香的啤酒花基本风味。邻异丙基苯、辛酸甲酯、2-壬酮是超临界 CO₂ 萃取浸膏的特有关键香气化合物, 2-甲基丁醇、卞醇和壬醛为 SCC 提取物的特征香气物质。

表1 基于SAFE-GC-O-MS分析的两种酒花提取物中香气化合物构成及含量
Table 1 Composition and content of aroma compounds in 2 kinds of hop extracts based on SAFE-GC-O-MS analysis

化合物*	CAS号	定性方式**	香气属性†	LRI ^Δ			FD因子*		浓度/(μg/g)	
				DB-5	DB-WAX	浸膏	SCC	提取物	浸膏	SCC
酮类 [▲]										
2,3-丁二酮	431-03-8	MS, LIR, O	果香、甜香	595	979	9	1	0.05	0.03	
4-甲基-2-戊酮	108-10-1	MS, LIR, O	果香、甜香	735	1010	27	3	0.38	0.21	
2-壬酮	821-55-6	MS, LIR, O	绿色、青草	1092	1390	243	-	10.67	0.45	
醇类 [▲]										
异丁醇	78-83-1	MS, LIR, O	可可、麦芽	625	1092	81	3	0.52	0.87	
2-甲基丁醇	137-32-6	MS, LIR, O	可可、麦芽	739	1208	3	9	19.84	19.30	
异戊烯醇	556-82-1	MS, LIR, O	果香、甜香	775	1320	9	-	3.24	1.60	
顺-3-己烯-1-醇	928-96-1	MS, LIR, O	绿色、青草	857	1382	729	243	1.23	0.60	
正庚醇	111-70-6	MS, LIR, O	果香、甜香	970	1453	27	1	1.18	1.24	
反式-4-(异丙基)-1-甲基环己-2-烯-1-醇	29803-81-4	MS, LIR, O	果香、甜香	1140	1571	9	-	0.18	0.01	
卜醇	100-51-6	MS, LIR, O	橘香	1036	1870		9	1.14	0.10	
酯类 [▲]										
2-甲基丁基乙酸酯	624-41-9	MS, LIR, O	果香、甜香	880	1125	9	1	2.06	0.50	
己酸甲酯	106-70-7	MS, LIR, O	果香、甜香	925	1184	81	-	4.40	1.06	
2-甲基丁酸戊酯	68039-26-9	MS, LIR, O	果香、甜香	1142	1325	9	-	22.69	0.17	
戊酸-2-甲基丁酯	55590-83-5	MS, LIR, O	酸臭、干酪	1367	1367	9	1	0.07	0.01	
辛酸甲酯	111-11-5	MS, LIR, O	果香、甜香	1126	1385	243		39.98	0.19	
酸类 [▲]										
乙酸	64-19-7	MS, LIR, O	酸臭、干酪	610	1449	9	1	26.40	0.02	
异戊酸	503-74-2	MS, LIR, O	酸臭、干酪	863	1666	27	1	69.04	0.31	
醛类 [▲]										
壬醛	124-19-6	MS, LIR, O	橘香	1117	1391	81	9	0.46	0.02	
单萜类*										
α-蒎烯	80-56-8	MS, LIR, O	木香、松香	937	1028	9	3	183.18	0.33	
β-月桂烯	123-35-3	MS, LIR, O	草药香	991	1161	729	9	21185.07	73.14	
邻-异丙基苯	527-84-4	MS, LIR, O	木香、松香	1025	1272	243	-	24.65	0.18	
(E,E)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯	3016-19-1	MS, LIR, O	花香	1144	1379	81	9	1.13	0.01	
倍半萜类*										
(-)-4-萜橙茄油烯	17699-14-8	MS, LIR, O	木香、松香	1351	1463	9	3	3.35	0.01	
单萜醇 [▲]										
芳樟醇	78-70-6	MS, LIR, O	花香	1099	1547	2187	729	72.68	27.09	
香叶醇	106-24-1	MS, LIR, O	花香	1255	1847	1	1	46.20	10.52	

注: *是指化合物按照DB-WAX色谱柱上的出峰时间排列; †是指嗅闻到的该物质的气味; Δ是指线性保留指数; *是指线性保留指数; †是指嗅闻到的该化合物的最大稀释倍数; ▲是指浓度以内标法(2-甲基-3-庚酮, 1.400 mg/mL)进行半定量获得; *是指浓度以内标法(2-乙基丁酸, 2.490 mg/mL)进行半定量获得; **定性方式 MS-质谱, LRI-线性保留指数, O-香气, -代表未检出。

2.3 两种酒花提取物中香气物质构成比较

由图 2 可以看出两种提取技术得到的挥发性成分差异明显, 优势提取物种类有所不同, 超临界 CO₂ 萃取浸膏中含量最高的化合物为萜烯类化合物(99.55%), 这是因为超临界 CO₂ 与正己烷溶解能力类似, 更有选择性地萃取非极性化合物。而想要获得更多的非极性化合物, 需要通过添加极性的夹带剂如乙醇实现^[35]。SCC 提取物中最具优势的化合物为萜烯类(52.03%)、萜烯醇类(29.30%)和醇类(16.15%)化合物, 这与报道中的相较于其他提取工艺, SCC 法更擅长提取的化合物种类一致^[24-25]。

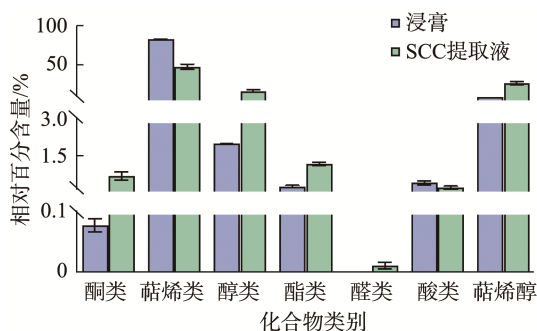


图2 两种酒花提取物中不同种类挥发性化合物相对百分含量
Fig.2 Relative percentage content of different volatile compounds in 2 kinds of hop extracts

结合图 2 和图 3 可知, 就浓度方面来看, 最具优势的提取物均为萜烯类化合物, 在萜烯类化合物中 β -月桂烯的含量最高, 如超临界 CO₂ 萃取浸膏中 β -月桂烯占 88.28%; SCC 提取物中 β -月桂烯占 51.66%, 这与文献中提到的酒花提取物中主要化学成分一致^[43-45]。就香气贡献方面而言, 超临界 CO₂ 萃取浸膏中香气贡献最大的化合物为萜烯醇类(44.98%)和萜烯类(21.83%)化合物, SCC 提取物中香气贡献最大的化合物为萜烯醇类(70.46%)和醇类(25.58%)化合物。萜烯醇中的芳樟醇为两种酒花提取物中最具香气贡献的化合物, 与之前的报道相吻合^[31]。气味的贡献不仅仅取决于化合物的浓度, 还与香气化合物的阈值

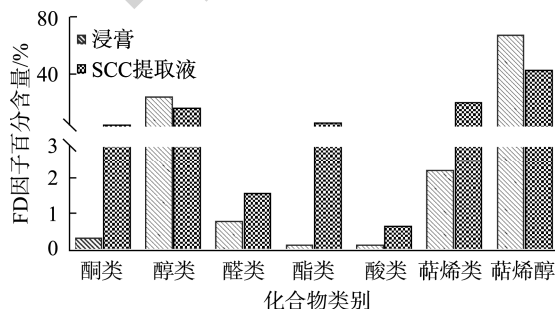


图3 两种酒花提取物中不同种类化合物FD因子百分含量
Fig.3 FD factors percentages of different kinds of compounds in 2 kinds of hop extracts

密不可分, 如萜烯醇中芳樟醇的阈值(0.00022 $\mu\text{g/g}$)较萜烯类中 β -月桂烯的阈值(0.0012 $\mu\text{g/g}$)更低, 使芳樟醇对酒花提取物的香气做出了更大的贡献。因此风味的评价只有借助 GC-O 才更加的真实可靠, 它能从大量的化合物中识别出具有香气活性的化合物。

结合各香气成分气味属性可知, 酒花提取物中萜烯醇具有花香香气特征; 草药香和木香归因于萜烯类化合物; 醇类化合物中主要有香气贡献的顺-3-己烯-1-醇带来了青草香; 酯类和醛类主要带来了果香和橘香。SCC 提取物整体风味更加偏向“果香”和“橘香”, 是由于 SCC 提取以水为媒介, 通过蒸汽蒸馏提取浆料中的香气化合物, 相较于萜烯类这种碳氢化合物, 酯类、醇类、萜烯醇类含氧化合物在水中的溶解性更好。这类化合物主要表现出果味、花香香气特征, 这之前报道中提到的 SCC 法更擅长汽提和保存果味香气成分相吻合^[24]。而超临界 CO₂ 萃取浸膏草药香、木香突出, 这是因为草药和木质的香气多来自于萜烯化合物, 除了超临界 CO₂ 萃取更擅长提取单萜类化合物外, 由于萜烯类化合物不稳定, 极易在加热过程中蒸发, 因此即使超临界 CO₂ 流体萃取和旋转锥体柱蒸馏同为低温提取, 但超临界 CO₂ 萃取拥有更低的温度, 因此提取到了更高浓度占比的萜烯类化合物, 使得“草药”和“木香”对整体风味做出了巨大的贡献, 削弱了对“橘香”和“果香”的感知^[46]。

3 讨论与结论

本研究利用 QDA 和 SAFE-GC-O-MS 分析, 分别从感官水平和分子水平对比研究了两种冷萃取技术(超临界 CO₂ 萃取和旋转锥体柱)制备的啤酒花香气提取物的感官特征与香气特征物质构成。SCC 和超临界 CO₂ 啤酒花香气提取物呈现出不同的香气轮廓, SCC 提取物橘香、果香明显, 略带花香, 超临界 CO₂ 萃取浸膏草药香、木香突出, 整体感愉悦, 清爽。在超临界 CO₂ 萃取和 SCC 提取得到的两种啤酒花提取物中检出的 24 种和 18 种香气贡献化合物中, 含量最高的均为单萜类化合物, 但两种提取方法对不同极性化合物的提取优势不同, 浸膏中单萜烯的含量在整体中占比更大, 使得浸膏整体的风味偏草药香和木质香。而 SCC 提取到相对含量更高的醇类、酯类、酮类使 SCC 提取物整体风味更具橘香果味。两种提取物的组分构成互补且具有不同的产品形态(浸膏和水提取物), 本研究可为啤酒花相关研究工作者更有选择性开展啤酒花拓展应用研究提供数据支撑和理论指导。今后研究工作可围绕不同酒花提取物在非酿造领域中的创新应用开发和效果评价开展深入研究。

参考文献

- [1] 夏天爽, 刘晓燕, 蒋益萍, 等. 啤酒花经抗氧化途径减轻 A β 损伤成骨细胞作用研究[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(6): 509-514.

- XIA TS, LIU XY, JIANG YP, *et al.* Hops extract alleviates $A\beta$ -injury to osteoblasts through antioxidant pathway [J]. *J Pharm Pract*, 2021, 39(6): 509–514.
- [2] 宋文杰, 李慧帆, 姜俊羽, 等. 基于高效液相色谱技术的啤酒花指纹图谱研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(22): 279–284.
- SONG WJ, LI HF, JIANG JY, *et al.* Analysis of hops fingerprint based on HPLC [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(22): 279–284.
- [3] Hop growers of America 2023. FY 2022 hop growers of America annual report [EB/OL]. [2023-03-16]. https://www.usahops.org/img/blog_pdf/440.pdf [2023-03-24].
- [4] BOCQUET L, RIVIÈRE C, DERMONT C, *et al.* Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 122: 290–297.
- [5] PONTICELLI M, RUSSO D, FARAONE I, *et al.* The promising ability of *Humulus lupulus* L. iso- α -acids vs. diabetes, inflammation, and metabolic syndrome: A systematic review [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 954–986.
- [6] 王茜, 孙娇娇, 侯静, 等. 不同品种啤酒花对啤酒特征香气物质的影响[J]. *农产品加工*, 2021, 9(17): 5–10.
- WANG Q, SUN JJ, HOU J, *et al.* Effect of different kinds of hops on characteristic aroma components of beer [J]. *Farm Prod Process*, 2021, 9(17): 5–10.
- [7] 艾丽娜·艾力, 努尔阿米乃·麦麦提, 曾卫军, 等. 不同光照条件对啤酒花中黄酮苷异构化影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1871–1875.
- AILINA AL, NUERAMINAI MMT, ZENG WJ, *et al.* Effect of different light conditions on the photoisomerization of xanthohumol in hops [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(6): 1871–1875.
- [8] ALMAGUER C, SCHOENBERGER C, GASTL M, *et al.* *Humulus lupulus*-a story that begs to be told. A review [J]. *J Ins Brew*, 2014, 120(4): 289–314.
- [9] RETTBERG N, BIENDL M, GARBE L. Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools-a review [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2018, 76(1): 1–20.
- [10] RUTNIK K, OCVIRK M, KOSIR IJ. Changes in hop (*Humulus lupulus* L.) oil content and composition during long-term storage under different conditions [J]. *Foods*, 2022, 11(19): 3089–3109.
- [11] KOIE K, TAKAZUMI K, HAMAGUCHI T, *et al.* Development of a flavor hop (*Humulus lupulus* L.) cultivar, ‘Furano Magical’, with cones rich in 4-methyl-4-sulfunylpentan-2-one [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(11): 4677–4684.
- [12] RODRIGUES AT, FONTES PP, IBRAHIM SP, *et al.* Exclusive raw material for beer production? addressing greener extraction techniques, the relevance, and prospects of hops (*Humulus lupulus* L.) for the food industry [J]. *Food Bioprocess Technol*, 2021, 15(2): 275–305.
- [13] ROSSINI F, VIRGA G, LORETI P, *et al.* Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the Mediterranean region of Europe: Challenges and opportunities of their cultivation [J]. *Agric-Basel*, 2021, 11(6): 484–505.
- [14] HAUSER DG, STOKHOLM A, SHELLHAMMER TH. Investigating the potential for re-using “spent” dry-hops in the brew kettle [J]. *Brew Sci*, 2019, 72(5): 125–131.
- [15] FECHIR M, DAILEY J, BUFFIN B, *et al.* The impact of whirlpool hop addition on the wort metal ion composition and on the flavor stability of American style pale ales using Citra (R) hop extract and pellets [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2022. DOI: 10.1080/03610470.2022.2081480
- [16] CANTE RC, GALLO M, D’AVINO A, *et al.* Using hydrofluorocarbon extracts of hop in a pilot scale brewing process [J]. *Appl Sci-Basel*, 2022, 12(14): 6959–6971.
- [17] SANZ V, TORRESMD, LÓPEZ VJM, *et al.* What is new on the hop extraction [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 93: 12–22.
- [18] KNEZ HM, SPANINGERE, KOSIR IJ, *et al.* Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects [J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 257–294.
- [19] ALMEIDA AD, MACIEL M, MACHADO MH, *et al.* Production of chitosan and poly (vinyl alcohol) films functionalized with hop extract (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) for food packaging application [J]. *Food Packag Shelf*, 2022, 32: 100833–100842.
- [20] DI LS, MENGHINI L, FERRANTE C, *et al.* Hop extract: An efficacious antimicrobial and anti-biofilm agent against multidrug-resistant staphylococci strains and cut bacterium acnes [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1852–1864.
- [21] 洪凯, 马长伟. 酒花与啤酒中单萜化合物的研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 328–334.
- HONG K, MA CW. Monoterpene compounds in hops and beer: A review [J]. *Food Sci*, 2019, 40(7): 328–334.
- [22] ZEKOVIC Z, PFAF-SOVLJANSKI I, GRUJIC O. Supercritical fluid extraction of hops [J]. *J Serb Chem Soc*, 2007, 72(1): 81–87.
- [23] HUERTA-PEREZ F, PEREZ-CORREA JR. Optimizing ethanol recovery in a spinning cone column [J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2018, 83: 1–9.
- [24] LUO Y, WANG K, ZHUANG HN, *et al.* Elucidation of aroma compounds in passion fruit (*Passiflora alata* ait) using a molecular sensory approach [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(9): 1–17.
- [25] 崔帅, 武晓丹, 叶田. 旋转锥体柱法及水蒸汽蒸馏法提取咖啡中的挥发性香气成分研究[J]. *饮料工业*, 2021, 24(1): 23–28.
- CUI S, WU XD, YE T. Study on coffee volatile aroma components extracted by spinning cone column and steam distillation [J]. *Beverage Ind*, 2021, 24(1): 23–28.
- [26] 高阳, 赵生, 许式强, 等. 龙井茶挥发油的旋转锥体柱提取及其应用研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(5): 120–124.
- GAO Y, ZHAO S, SU SQ, *et al.* Study on Longjing tea essential oil extracted by spinning cone column and its application [J]. *Food Ind*, 2015, 36(5): 120–124.
- [27] GRABER MF, PEREZ-CORREA JR, VERDUGO G, *et al.* Spinning cone column isolation of rosemary essential oil [J]. *Food Control*, 2010, 21(5): 615–619.
- [28] GEFFROY O, PASQUIER G, PAGES M, *et al.* Exploring the response to a new range of ethanol reductions in chardonnay and syrah wines using a consumer rejection threshold approach [J]. *Oeno One*, 2022, 56(4):

- 147–155.
- [29] DI GG, ROMANO P. Advanced fractionation process for wine-based products diversification [J]. *J Food Sci Technol Mys*, 2021, 58(12): 4685–4692.
- [30] PAREDES DAF, SANCHEZ RJ, MORERO B, *et al.* Enriching the conceptual modelling approach with environmental considerations: Application to the partial dealcoholization of wines [J]. *Sep Purif Technol*, 2023, 308: 122950–122964.
- [31] DIETZ C, COOK D, HUISMANNM, *et al.* The multisensory perception of hop essential oil: A review [J]. *J Inst Brew*, 2020, 126(4): 320–342.
- [32] SU X, YIN Y. Aroma characterization of regional cascade and chinook hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. *Food Chem*, 2021, 364: 130410–130421.
- [33] VAN OF, DE CB, AERTS G, *et al.* Characterization of novel varietal floral hop aromas by headspace solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry/olfactometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(50): 12270–12281.
- [34] STERBA K, CEJKA P, CULIK J, *et al.* Determination of linalool in different hop varieties using a new method based on fluidized-bed extraction with gas chromatographic-mass spectrometric detection [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2015, 73(2): 151–158.
- [35] BIZAJ K, SKERGET M, KOSIR IJ, *et al.* Hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils and Xanthohumol derived from extraction process using solvents of different polarity [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(5): 368–380.
- [36] NEIENS SD, STEINHAUS M. Odor-active compounds in the special flavor hops Huellmelon and Polaris [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1452–1460.
- [37] GAHR A, FORSTER A, DE J, *et al.* Reproducibility trials in a research brewery and effects on the evaluation of hop substances in beer [J]. *Brew Sci*, 2019, 72(11): 217–227.
- [38] LIU ZC, LIU YM, WANGLP. Investigation of stereoisomer distribution and thermochemical conversion of eight terpene alcohols derived from different varieties of Chinese hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2020, 78(3): 185–194.
- [39] EYRES G, DUFOUR JP. *Beer in health and disease prevention* [M]. London: Academic Press, 2009.
- [40] SU XQ, HURLEY K, XU ZY, *et al.* Performance of alternative drying techniques on hop (*Humulus lupulus* L.) aroma quality: An HS-SPME-GC-MS-O and chemometrics combined approach [J]. *Food Chem*, 2022, 381: 130410–130421.
- [41] STEINHAUS M, SCHIEBERLE P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety spalter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1776–1783.
- [42] EYRES G, DUFOUR JP. Hop essential oil: Analysis, chemical composition and odor characteristics [J]. *Beer Health Dis Prev*, 2009. DOI: 10.1016/B978-0-12-373891-2.00022-5
- [43] SANTARELLI V, NERI L, CARBONE K, *et al.* Conventional and innovative extraction technologies to produce food-grade hop extracts: Influence on bitter acids content and volatile organic compounds profile [J]. *J Food Sci*, 2023, 88(4): 1308–1324.
- [44] DIETZ C, COOK D, WILSON C, *et al.* Sensory properties of supercritical CO₂ fractions extracted from Magnum hop essential oil [J]. *J Inst Brew*, 2020, 126(3): 263–279.
- [45] POLEC K, BRONIATOWSKI M, WYDRO P, *et al.* The impact of beta-myrcene—the main component of the hop essential oil—on the lipid films [J]. *J Mol Liq*, 2020, 308: 113028–113039.
- [46] INUI T, YONEZAWA D, ABE H. Development of supercritical CO₂ extracts for flavored beer [J]. *Brew Sci*, 2019, 72(9): 147–156.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



欧泽洁, 硕士研究生, 主要研究方向为食品风味化学。

E-mail: ouzejie67@163.com



庞雪莉, 博士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬加工和食品风味化学。

E-mail: pangxueli@caas.cn