

ELŻBIETA WOJTOWICZ, RENATA ZAWIRSKA-WOJTASIAK,
KRZYSZTOF PRZYGOŃSKI

WPLYW PROCESU STERYLIZACJI PARĄ WODNĄ NA ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW LOTNYCH ZAPACHOWYCH W TYMIANKU (*THYMUS VULGARIS L.*) OCENIANY METODĄ GC/MS

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu procesu sterylizacji parą wodną na zawartość lotnych związków zapachowych w tymianku (*Thymus vulgaris L.*). Sterylizację wykonywano zgodnie z technologią stosowaną w Oddziale Koncentratów IBPRS.

W próbach produkcyjnych tymianku, przed i po sterylizacji, oznaczono zawartość związków zapachowych. Analizę ilościową i jakościową składu olejków eterycznych z tymianku, wyizolowanych w aparacie Derynga, przeprowadzono metodą GC/MS.

Zidentyfikowano i oznaczono 17 związków lotnych tymianku: sabinen, β -pinen, myrcen, α -terpinen, p-cymen, limonen, cyneol, γ -terpinen, wodzian cis-sabinenu, linalol, kamforę, borneol, 1-terpinen-4-ol, karwon, tymol, karwakrol, kariofyllen. Zawartość głównych związków lotnych w partiach surowego tymianku kształtowała się na poziomie: tymol – 4,27-10,85 mg/g, sabinen – 0,49-0,55 mg/g, p-cymen – 0,49-1,93 mg/g, γ -terpinen – 0,40-2,12 mg/g, linalol – 0,17-0,42 mg/g, karwakrol – 0,27-0,60 mg/g, kariofyllen – 0,32-0,69 mg/g. Natomiast zawartość tych związków w tymianku sterylizowanym mieściła się w granicach: tymol – 3,53-8,39 mg/g, sabinen – 0,52-0,53 mg/g, p-cymen – 0,08-0,20 mg/g, γ -terpinen – 0,06-0,15 mg/g, linalol – 0,08-0,25 mg/g, karwakrol – 0,20-0,48 mg/g, kariofyllen – 0,17-0,28 mg/g.

Stwierdzono, że proces sterylizacji tymianku spowodował straty wszystkich oznaczonych związków lotnych. Suma strat wynosiła około 44%, jednak poszczególne związki ulegały w różnym stopniu. Warto podkreślić, że stosunkowo niewielkie były straty głównego czynnego składnika aromatu – tymolu – średnio 23%.

Słowa kluczowe: tymianek (*Thymus vulgaris L.*), lotne związki zapachowe, sterylizacja, GC/MS

Wprowadzenie

Przyprawy mogą stanowić źródło zakażeń wtórnych żywności zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi, co jest konsekwencją warunków uprawy, suszenia, zbioru,

Mgr inż. E. Wojtowicz, dr inż. K. Przygoński Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie Oddział Koncentratów w Poznaniu, ul. Starołęcka 40, 61-361 Poznań, dr hab. R. Zawirska-Wojtasiak, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

transportu i przechowywania, a liczba mikroorganizmów może dochodzić nawet do kilkuset milionów w 1 g [2, 7].

Stosuje się wiele metod wyjaławiania przypraw. Prowadzono badania nad sterylizacją przypraw w skali laboratoryjnej z zastosowaniem ozonu, dwutlenku węgla, mieszaniny etanolu i metanolu, wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, jak również promieniowania ultrafioletowego, podczerwonego, mikrofalowego. Stosowane przez lata na skalę przemysłową metody sterylizacji przypraw tlenkiem etylenu i bromkiem metylu zostały wycofane ze względu na szkodliwe dla zdrowia i środowiska oddziaływanie tych substancji. Stosowane w skali przemysłowej metody wyjaławiania to sterylizacja parą wodną i radiacja. Zastosowanie promieniowania budzi obawy wśród konsumentów, dlatego obecnie często stosowaną metodą jest sterylizacja parą wodną.

Kryteria wyboru metody sterylizacji przypraw obejmują: brak zastrzeżeń natury zdrowotnej w stosunku do zastosowanej metody, opłacalność ekonomiczną procesu, akceptację konsumenta, a przede wszystkim jakość sensoryczną przypraw poddanych obróbce (zachowanie olejków eterycznych wrażliwych na działanie wysokiej temperatury).

Dekontaminacja metodą obróbki cieplnej i połączonej obróbki cieplno-ciśnieniowej powodowała zmiany w składzie substancji lotnych pieprzu czarnego, w tym zmniejszenie zawartości większości związków monoterpenowych oraz wzrost zawartości α - i γ -terpinenu i 1-terpinen-4-olu, a działanie wysokiego ciśnienia powodowało nasilenie tych zmian [13]. W badaniach kolendry i kminku najbardziej istotne pod względem ilościowym składniki, tj. linalol w kolendrze, a karwon w kminku, nie ulegały znaczącym zmianom [14]. W przypadku sterylizacji metodą radiacyjną badania wykazały nieznaczny wpływ tej metody na zmiany chemiczne przypraw [4, 6].

W Oddziale Koncentratów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego opracowano i wdrożono oryginalną technologię ciągłej sterylizacji parą wodną przypraw i innych surowców pochodzenia roślinnego [16]. Metoda ta skutecznie niszczy mikroflorę, jednak brakuje informacji dotyczących jej wpływu na zawartość aromatów w przyprawach. Zagadnienie to jest istotne z punktu widzenia tak producentów, jak konsumentów żywności.

Celem pracy było określenie wpływu procesu sterylizacji parą wodną na zawartość lotnych związków zapachowych w tymianku (*Thymus vulgaris L.*).

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły próby tymianku przed sterylizacją i po sterylizacji z trzech różnych partii produkcyjnych (P1, P2, P3).

Izolację olejków prowadzono metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga.

Analizę ilościową i jakościową składu olejków lotnych wykonano metodą chromatografii gazowej. Stosowano chromatograf gazowy Hewlett-Packard 6890 z detektorem FID. Rozdział związków przebiegał w kolumnie kapilarnej HP-5 o wymiarach 30 m, 320 μm , 0,25 μm . Warunki rozdziału: gaz nośny hel, przepływ 1 ml/min, programowana temperatura kolumny: 5 min w 35°C, wzrost 30°C/min do 60°C, następnie wzrost 6°C/min do 200°C i 30°C/min do 280°C. Nastrzyk próbki w systemie split 100, objętość nastrzyku 1 μl . Stężenie poszczególnych komponentów w olejku wyznaczano w stosunku do wzorca wewnętrznego (stosowano tetradekan) i przeliczano na mg/g badanej przyprawy.

Identyfikacji lotnych związków zapachowych dokonywano poprzez porównanie indeksów retencji rozdzielanych związków z indeksami związków standardowych oraz metodą spektrometrii masowej. W tym celu stosowano chromatograf gazowy Hewlett-Packard 5890 II sprzężony z kwadrupolowym spektrometrem masowym HP 5971 wyposażonym w kolumnę MDN-5. Uzyskane widma masowe porównywano z danymi z biblioteki NIST (68000 związków).

Przeprowadzono analizę olfaktometryczną przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett-Packard 5890 zaopatrzonego w dzielnik strumienia i port do wężowania z zastosowaniem kolumny DB-5 o wymiarach 30 m; 0,53 mm; 0,25 μm . Warunki rozdziału: gaz nośny hel, przepływ 1ml/min, programowana temperatura kolumny: 1min w 40°C, wzrost 8°C/min do 200°C, następnie wzrost 20°C/min do 280°C i 5 min w 280°C. Objętość nastrzyku 1 μl . Rozdzielone frakcje były oceniane węchem w kolejnych rozcieńczeniach badanego destylatu tymianku aż do zaniku ostatniego wyczuwalnego zapachu. W ten sposób uzyskano wskaźniki rozcieńczeń "FD" (dilution factor) poszczególnych frakcji. Zapachy odnoszono do indeksów retencji Kovatsa, a wyniki przedstawiono w formie aromagramów [3, 15].

Wyniki i dyskusja

W olejkach eterycznych z prób tymianku zidentyfikowano 17 związków aromatycznych (tab. 1), znanych z piśmiennictwa jako lotne związki zapachowe tymianku [1, 5, 8, 9, 10, 11, 12].

Przykładowy chromatogram lotnych związków tymianku przedstawiono na rys. 1. Pod względem ilościowym dominowały w tymianku: tymol 60%, γ -terpinen (10%) i p-cymen (10%) (rys. 2).

Analiza olfaktometryczna (tab. 2, rys. 3) wykazała, że tymol jest związkiem decydującym o zapachu tymianku. Z tymianku poddanego sterylizacji uzyskano niższe wartości FD wszystkich wyczuwalnych związków zapachowych z wyjątkiem kariofyllenu, jednak najwyższy wskaźnik rozcieńczenia uzyskiwał zawsze tymol.

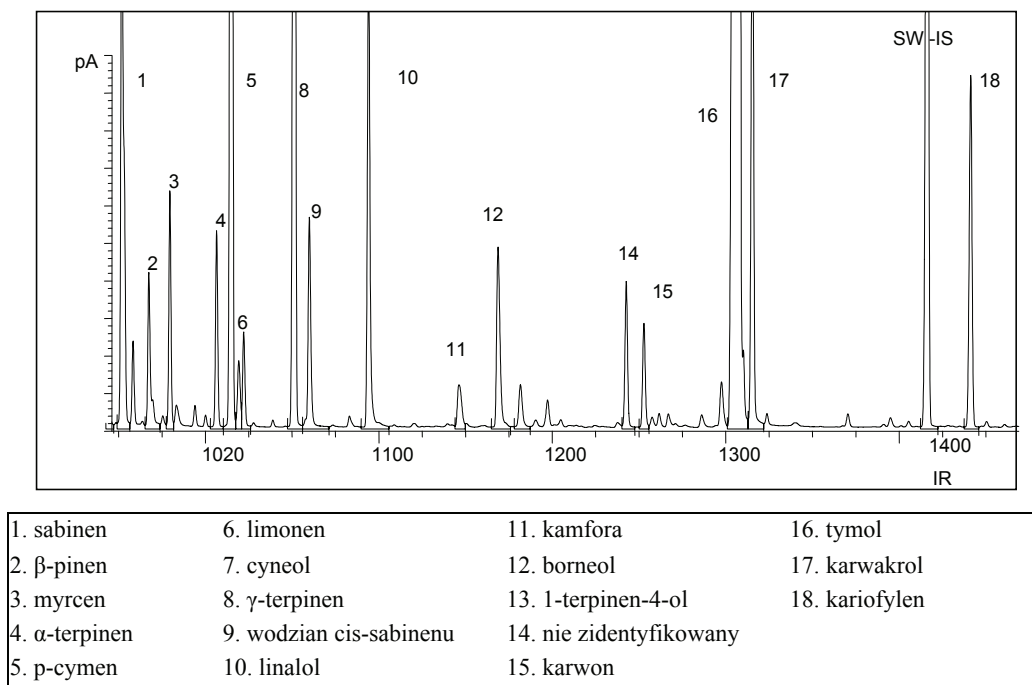
Tabela 1

Identyfikacja związków lotnych w próbach tymianku.

Identification of volatile compounds in the samples of thyme.

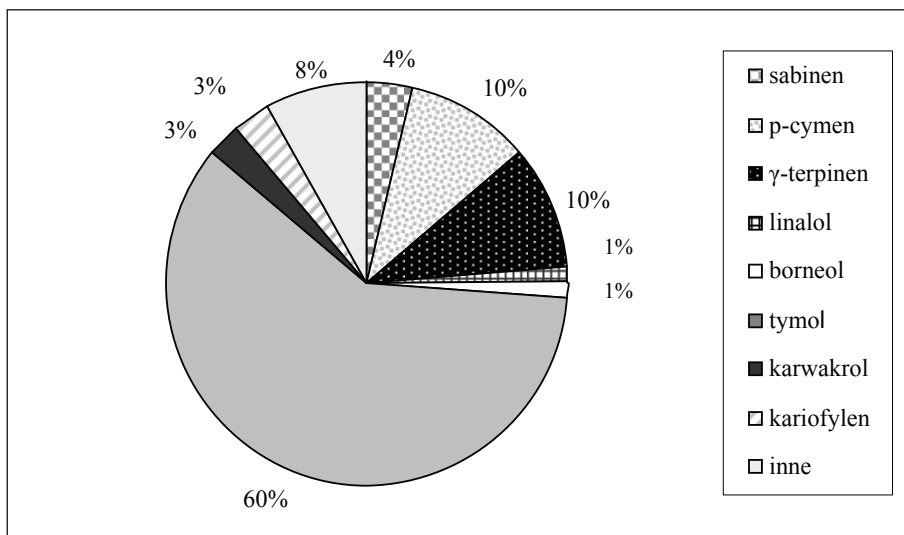
Lp.	Związki lotne Volatile compounds	Kolumna HP-5/ GC-FID HP-5/ GC-FID collumn		Kolumna MDN-5/ GC-MS HP-5/ GC-FID collumn	
		Indeks retencji Kovatsa Kovats' retention index (IR)	tak / nie* yes / no	Indeks retencji Kovats'a Kovats' retention index (IR)	tak / nie* yes / no
1.	sabinen / sabinene	970	+	988	+
2.	β -pinen / β -pinene	981	+	992	+
3.	myrcen / myrcene	1008	+	1001	+
4.	α -terpinen α -terpinene	1023	+	1027	+
5.	p-cymen / p-cymene	1033	+	1036	+
6.	limonen / limonene	1038	+	1042	+
7.	cyneol / cineole	1041	+	1050	+
8.	γ -terpinen γ -terpinene	1071	+	1074	+
9.	wodzian cis- sabinenu sabinene- cis-hydrate	1080	+	1116	+
10.	linalol / linalool	1113	+	1125	+
11.	kamfora / camphor	1156	+	1168	+
12.	borneol / borneol	1175	+	1185	+
13.	1-terpinen-4-ol 1-terpinene-4-ol	1185	+	1193	+
14.	karwon / carvone	1255	+	1268	+
15.	tymol / thymol	1304	+	1308	+
16.	karwakrol / carva- crol	1314	+	1316	+
17.	kariofyllen caryo- phyllene	1430	+	1438	+
18.	α - felandren		-	1014	+
19.	3 - karen		-	1018	+
20.	2 - karen		-	1102	+

+ zidentyfikowano / identified, - nie zidentyfikowano / not identified



Rys. 1. Rozdział związków lotnych w próbce tymianku przed sterylizacją (SW – standard wewnętrzny, IR- indeks retencji Kovatsa).

Fig. 1. Separation of volatile compounds in the sample of thyme before sterilization process (IS-internal standard, IR- Kovats' retention index).



Rys. 2. Zawartość lotnych związków zapachowych w tymianku [%].

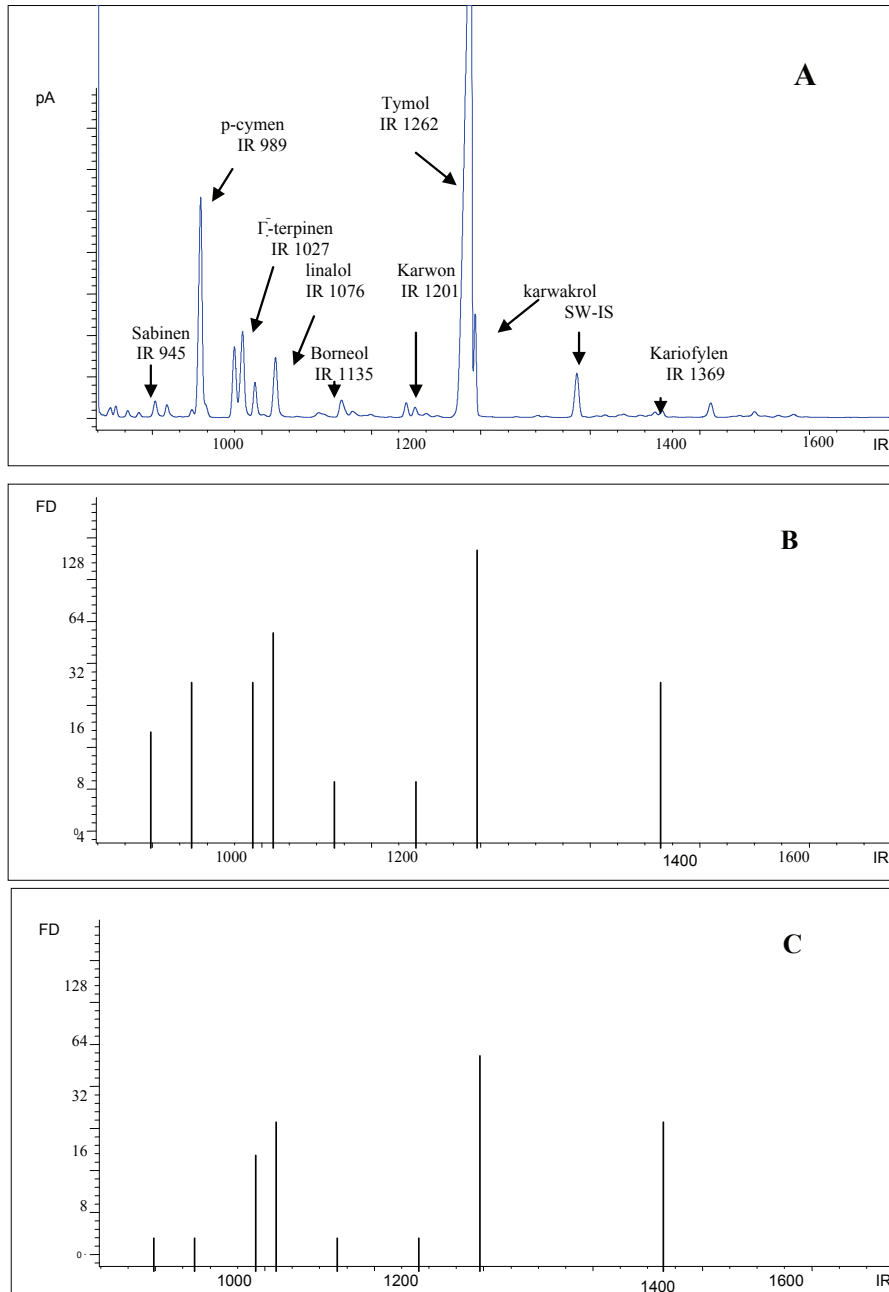
Fig. 2. The content of volatile aroma compounds in thyme.

Tabela 2

Olfaktometryczne wartości wskaźnika rozcieńczenia (FD) związków zapachowych destylatu tymianku.
Olfactometric dilution factors (FD) for aroma compounds in thyme distillate.

Lp.	Indeks retencji Kovatsa (IR) Kovats' retention index	Związki lotne Volatile compounds	Zapach Aroma	FD przed sterylizacją before sterilization	FD po sterylizacji after sterilization
1.	945	sabinen / sabinene	<i>sosnowy / pine</i>	8	4
2.	989	p-cymen / p-cymene	świeży cytrusowy fresh citrus	16	4
3.	1027	γ -terpinen γ -terpinene	słodki-ziółowy sweet-herbal	16	8
4.	1076	linalol/ linalool	kwiatowy flower	32	16
5.	1093	nie zidentyfikowany not identified	leśny forest	4	2
6.	1135	borneol / borneol	kamforowy / camphor	4	2
7.	1201	karwon / carvone	kminkowy / caraway	4	2
8.	1262	tymol / thymol	tymiankowy / thyme	128	32
9.	1369	kariofyllen caryophyllene	ziółowy herbal	16	16

W tab. 3. i 4. przedstawiono zawartość lotnych związków zapachowych w tymianku przed i po sterylizacji. Prowadzony proces sterylizacji spowodował spadek wszystkich oznaczanych związków lotnych, najmniejsze w przypadku sabinenu 4%, tymolu 22-27%, karwakrolu 19-22%. Większe straty obserwowano w pozostałych oznaczanych komponentach lotnych. Wynosiły one odpowiednio: β -pinen – 7-29%, myrcen – 59-92%, α -terpinen – 77-92%, p-cymen – 83-92%, limonen – 21-75%, cyneol – 66-86%, γ -terpinen – 84-94%, wodzian cis-sabinenu – 70-77%, linalol – 40-69%, kamfora – 15-57%, borneol – 39-59%, 1-terpinen-4-olu – 22-42%, karwon – 71-72%, kariofyllen – 46-59%. Zawartość głównych związków lotnych w próbach produkcyjnych przedstawiono na rys. 4. Suma strat związków lotnych stanowiła około 44%, warto jednak podkreślić, że stosunkowo niewielkie były straty głównego składnika aromatu – tymolu – średnio 23%.



Rys. 3. Chromatogram rozdziálu destylatu tymianku (A) oraz aromagramy: (B) tymianek przed sterylizacją, (C) tymianek po sterylizacji (SW- standard wewnętrzny, IR-indeks retencji Kovatsa).
 Fig. 3. Gas chromatogram of thyme distillate (A) and aromagrams: (B) thyme before sterilization process, (C) thyme after sterilization process (IS-internal standard, IR-Kovats' retention index).

Tabela 3

Zawartość związków lotnych w tymianku przed sterylizacją.
Volatile compounds content in thyme before sterilization process.

Lp.	Związki lotne Volatile compounds	Indeks retencji Kovatsa (IR) Kovats' retention index	Zawartość [mg/g] / Content[mg/g]*		
			Nr partii produkcyjnej / Serial number		
			P1	P2	P3
1.	sabinen / sabinene	970	0,54	0,55	0,50
2.	β -pinen/ β -pinene	981	0,17	0,14	0,03
3.	myrcen / myrcene	1008	0,24	0,16	0,05
4.	α -terpinen / α -terpinene	1023	0,28	0,13	0,05
5.	p-cymen / p-cymene	1033	1,93	1,57	0,49
6.	limonen / limonene	1038	0,09	0,06	0,04
7.	cyneol / cineole	1041	0,08	0,07	0,03
8.	γ -terpinen / γ -terpinene	1071	2,12	1,53	0,40
9.	wodzian cis- sabinenu sabinene-cis- hydrate	1080	0,20	0,19	0,07
10.	linalol / linalool	1113	0,42	0,39	0,17
11.	kamfora / camphor	1156	0,04	0,07	0,03
12.	borneol / borneol	1175	0,12	0,20	0,05
13.	1-terpinen-4-ol/ 1-terpinene-4-ol	1185	0,07	0,06	0,04
14.	nie zidentyfikowany not identified	1230	0,12	0,12	0,04
15.	karwon / carvone	1255	0,08	0,09	0,04
16.	tymol / thymol	1304	10,85	8,55	4,27
17.	karwakrol /carvacrol	1314	0,60	0,49	0,27
18.	kariofyllen /caryophyllene	1430	0,40	0,32	0,69
Suma			18,31	14,69	7,26

* podane wartości są średnimi z trzech powtórzeń / mean values from three repetitions.

T a b e l a 4

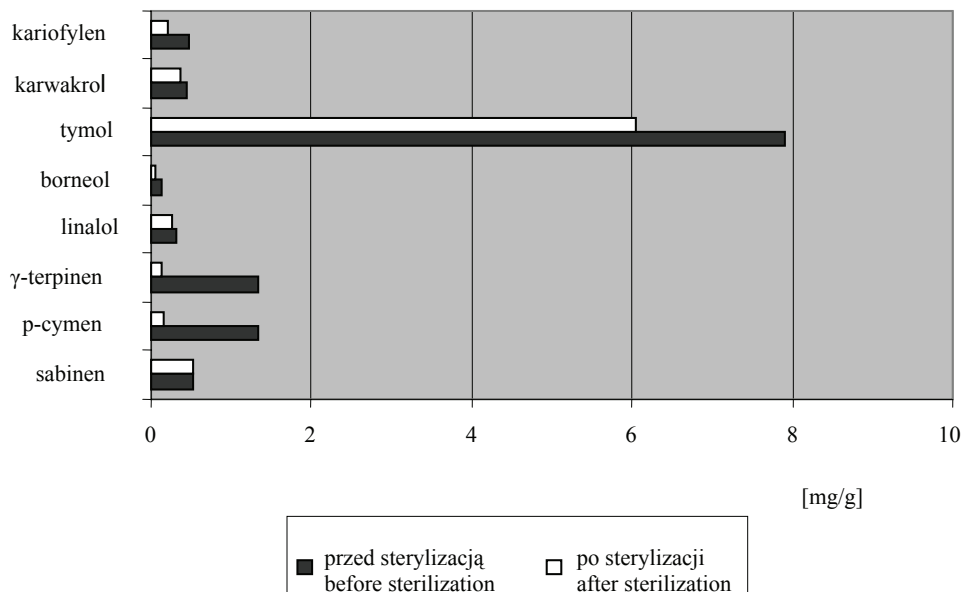
Zawartość związków lotnych w tymianku po sterylizacji.
Volatile compounds content in thyme after sterilization process.

Lp.	Związki lotne Volatile compounds	Indeks retencji Kovats'a (IR) Kovats' retention index	Zawartość [mg/g] / Content[mg/g]*		
			Nr partii produkcyjnej / Serial number		
			P1	P2	P3
1.	sabinen / sabinene	970	0,52	0,53	0,52
2.	β -pinen / β -pinene	981	0,15	0,01	0,03
3.	myrcen / myrcene	1008	0,02	0,03	0,02
4.	α -terpinen / α -terpinene	1023	0,02	0,02	0,01
5.	p-cymen / p-cymene	1033	0,15	0,20	0,08
6.	limonen / limonene	1038	0,02	0,02	0,03
7.	cyneol / cineole	1041	0,01	0,02	0,01
8.	γ -terpinen / γ -terpinene	1071	0,14	0,15	0,06
9.	wodzian cis- sabinenu sabinene-cis-hydrate	1080	0,05	0,04	0,02
10.	linalol / linalool	1113	0,25	0,12	0,08
11.	Kamfora/ camphor	1156	0,04	0,03	0,02
12.	Borneol/ borneol	1175	0,05	0,09	0,03
13.	1-terpinen-4-ol/ 1-terpinene-4-ol	1185	0,04	0,03	0,03
14.	nie zidentyfikowany/ not identified	1230	0,03	0,03	0,01
15.	karwon /carvone	1255	0,02	0,03	0,04
16.	tymol / thymol	1304	8,39	6,25	3,53
17.	karwakrol / carvacrol	1314	0,48	0,39	0,20
18.	kariofyllen / caryophyllene	1430	0,21	0,17	0,28
Suma			10,08	7,63	5,01

*podane wartości są średnimi z trzech powtórzeń / mean values from three repetitions.

Wnioski

1. Stosując analizę chromatograficzną (GC) oraz spektrometrię masową (MS) zidentyfikowano i oznaczono 17 związków zapachowych w tymianku.
2. Zawartość sumy lotnych związków zapachowych oznaczona w próbach produkcyjnych tymianku przed sterylizacją wynosiła od 7,3 do 18,3 mg/g.
3. Dominującym ilościowo związkiem w tymianku był tymol, którego zawartość stanowiła 60% sumy związków zapachowych.
4. Nie wszystkie związki lotne podlegały stratom w trakcie sterylizacji tymianku w jednakowym stopniu. Stosunkowo niewielkie były straty głównego składnika aromatu – tymolu - średnio 23%.



Rys. 4. Średnia zawartość głównych związków lotnych w tymianku przed i po sterylizacji.

Fig. 4. The average concentration of main volatile compounds in thyme before and after sterilization process.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Barazandeh M.M.: Essential oil composition of *Thymus fallax fisch.* from Iran, J. Essent. Oil Res., 2004, **16**, 101-102.
- [2] Benerjee M., Sarkar K.: Microbiological quality of some retail spices in India, Food Research International, 2003, **36**, 469-474.
- [3] Jirovetz L., Buchbauer G., Shafi P., Rosamna M., Geissler M.: Analysis of the composition and aroma of the essential leaf oil of *syzygium travancorium* from south India by GC- FID, GC-MS, and olfactometry seasonal changes of composition, Chromatographia, 2001, **53**, 372-374.
- [4] Kamiński E., Wąsowicz E., Zawirska-Wojtasiak R., Czaczyk K., Trojanowska K.: Effect of irradiation dose on sensory characteristics and microbiological contamination of chosen seasonings. 1991
- [5] Lee S.J., Umano K., Shimamoto T., Lee K.G.: Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. Food Chemistry, 2005, **91**, 131-137.
- [6] Marcotte M., Jategaonkar L.: Effect of irradiation on spices, herbs and seasonings. A Review of Selected, 1993, 1-24.
- [7] McKee L.H.: Microbial contamination of spices and herbs: a review. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, 1995, **28**, 1-11.

- [8] Miguel M.G., Duarte F., Venancio F., Taveres R: Variation in the main components of the essential oils from the leaves and flowers of Portuguese *Thymus albicans* over a single season, J. Essent. Oil Res., 2004, **16**, 169- 171.
- [9] Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R.: Analysis of the essential oils two thymus species from Iran. Food Chem. 2005, **90**, 609-611.
- [10] Raghavan S. U.: Spices, seasonings and flavorings. Technomic Publishing Company, Inc.2000
- [11] Santos-Atti A.C., Pansera M.R., Paroul N., Serafini- Atti L., Moyna P: Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*) from South Brazil. J. Essent. Oil Res., 2004, **16**, 294- 295.
- [12] Sefidkon F., Dabiri M., Mirmostafa S.A.: The composition of *Thymus serpyllum* L. oil, J. Essent. Oil Res., 2004, **16**, 184- 185.
- [13] Skapska S., Kostrzewa E., Jendrzeczak Z., Bal K., Karłowski K., Fonberg- Broczek M., Porowski S., Morawski A: Wpływ wysokiego ciśnienia UHP i temperatury na zawartość lotnych składników i piperyny w pieprzu czarnym. Herba Polonica, 2002, **XLVIII**, 3, 121-129.
- [14] Skapska S., Bal K., Jendrzeczak Z., Morawski A., Fonberg-Broczek M., Windyga B., Karłowski K.: Changes in the volatiles of coriander and caraway induced by UHP- heat treatment in helium. Herba Polonica, 2004, **3/4**, 152-159.
- [15] Zawirska-Wojtasiak R.: Charakterystyka składu enancjomerów w wybranych aromatach pochodzenia naturalnego i jej wykorzystanie w kontroli autentyczności tych aromatów. Roczn. AR, Poznań 2004, zeszyt. **352**.
- [16] P 337631 - patent zgłoszony w Urzędzie Patentowym R.P: Sposób ciągłej sterylizacji przypraw i innych surowców pochodzenia roślinnego oraz urządzenie do ciągłej sterylizacji.

INFLUENCE OF STEAM WATER STERILIZATION PROCESS ON VOLATILE AROMA COMPOUNDS CONTENT IN THYME (*THYMUS VULGARIS* L.) ESTIMATED BY GC-MS METHOD

S u m m a r y

Influence of sterilization process on volatiles aroma compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.) was a theme of this research study. The sterilization was conducted according to technology used by Institute of Agricultural and Food Biotechnology.

In the samples of thyme before and after sterilization process changes of the volatile aroma compounds were examined. GC-MS method was used to identify and to determinate of the composition of essential oils.

The seventeen aroma compounds: sabinene, β -pinene, myrcene, α -terpinene, p-cymene, limonene, cineole, γ -terpinene, sabinene-cis-hydrate, linalool, camphor, borneol, 1-terpinene-4-ol, carvone, thymol, carvacrol, caryophyllene were identified. The concentration of main volatile compounds in the samples of raw thyme were: thymol 4,27-10,85 mg/g, sabinene 0,49-0,55 mg/g, p-cymene 0,49-1,93 mg/g, γ -terpinene 0,40-2,12 mg/g, linalool 0,17-0,42 mg/g, carvacrol 0,27-0,60 mg/g, caryophyllene 0,32-0,69 mg/g. The contain in thyme after sterilization process were: thymol 3,53-8,39 mg/g, sabinene 0,52-0,53 mg/g, p-cymene 0,08-0,20 mg/g, γ -terpinene 0,06-0,15 mg/g, linalool 0,08-0,25 mg/g, carvacrol 0,20-0,48 mg/g, caryophyllene 0,17-0,28 mg/g.

Sterilization process of thyme caused the losses of all detected volatile compounds. Total loss was 44 %, however individual compounds lost in different degree. It is worth to observe that loss of main active compound – thymol were relatively not high , average 23%.

Key words: thyme (*Thymus vulgaris* L.), volatile aroma compounds, sterilization process, GC/MS 