

ANNA BEREZIŃSKA, MIECZYŚLAW W. OBIEDZIŃSKI

TECHNIKA SPME JAKO UŻYTECZNE NARZĘDZIE DO KONSTRUOWANIA AROMAGRAMÓW SERÓW Z PRZEROSTEM PLEŚNI

Streszczenie

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki HS-SPME do konstruowania aromagramów serów z przerostem pleśni. Obiektem badania były dwa sery z przerostem pleśni wyprodukowane w Polsce (Lazur i Rokpol) nabyte w lokalnych supermarketach. Do ekstrakcji związków lotnych próbek zastosowano technikę mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME). Rozdział i identyfikację wyizolowanych związków przeprowadzono metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS). Zawartość wykrytych związków wyrażono względem standardu wewnętrznego. Skonstruowano aromagramy serów. Wykazano, że technika HS-SPME-GC/MS jest użytecznym narzędziem analizy związków lotnych serów z przerostem pleśni i może być pomocna w konstruowaniu aromagramów tego typu serów.

Słowa kluczowe: sery z przerostem pleśni, aromagramy, SPME, GC/MS

Wprowadzenie

Ocena jakości żywności obejmuje m.in. badanie jej cech sensorycznych, jednak z oczywistych względów obiektem analizy sensorycznej nie może stać się produkt spożywczy o wątpliwej jakości zdrowotnej. Rozwiązaniem tego problemu byłoby stworzenie metody oceny wybranych wyróżników jakości sensorycznej artykułów żywnościowych wykorzystującej nowoczesne techniki instrumentalne, wspomagającej pracę zespołu oceniającego. W przypadku walorów zapachowych artykułów żywnościowych naturalną propozycją wydają się być techniki chromatograficzne. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas i/lub olfaktometrią wskazywana jest jako podstawowe narzędzie analizy składu frakcji lotnej mleka i jego przetworów, a jedną z podstawowych technik przygotowania próbek produktów mleczarskich do analizy chromatograficznej związków lotnych jest technika mikroekstrakcji do fazy

Mgr inż. A. Berezińska, prof. dr hab. M.W. Obiedziński; Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

stałej (SPME) [4, 8]. SPME została opracowana na początku lat 90. XX w. przez Pawliszyna i wsp. [1, 13]. Technikę tę stosowano m.in. do badań frakcji lotnej i zapachowej różnego rodzaju serów [7, 10, 11], w tym serów z przerostem pleśni [3].

W ostatnich latach opublikowano szereg prac poświęconych analizie związków lotnych i/lub zapachowych serów z przerostem pleśni [2, 3, 5, 6, 9, 12]. W polskiej literaturze przedmiotu brak jest prac o podobnej tematyce.

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki HS-SPME sprzężonej z chromatografią gazową i spektrometrią mas (GC/MS) do konstruowania aromagramów serów z przerostem pleśni produkcji polskiej.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły sery z przerostem pleśni (Lazur, Rokpol) zakupione w lokalnym supermarkecie.

Do czasu analizy próbki przechowywano owinięte w folię do żywności w warunkach chłodniczych. Do moździerza naważano 5 g sera oraz 10 g dearomatyzowanej soli kuchennej z dodatkiem 0,3 µl standardu (walerianian metylu). Ucierano, odważano 5 g uzyskanej mieszaniny do dearomatyzowanego słoika, zamykano i wstawiano do termostatu o temp. 20°C. Próbkę kondycjonowano przez 5 min. Po tym czasie w słoiku umieszczano włókno CAR/PDMS/DVB i ekstrahowano związki lotne (10 min). Po zakończonej ekstrakcji włókno przenoszono do komory nastrzykowej chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas (QP2010, Shimadzu). Warunki rozdzielu chromatograficznego: temp. komory nastrzykowej 220°C, gaz nośny hel, ciśnienie gazu nośnego 29,2 kPa, przepływ w kolumnie 0,75 cm³/min, dzielnik strumienia 3,9, kolumna ZB-WAX (długość 30,0 m, grubość filmu 0,25 µm, średnica wewnętrzna 0,25 mm), program narostu temp.: temp. początkowa 40,0°C/2 min, tempo narostu temperatury 4°C/min, temp. końcowa 180,0°C/6 min. Warunki pracy spektrometru mas: temp. źródła jonów 190°C, temp. linii łączącej 200°C, napięcie detektora 1,1 kV, tryb zbierania danych całkowity prąd jonowy (TIC), szybkość skanowania 5000, zakres zbierania danych 40,00–500,00 [m/z].

Związki zidentyfikowano porównując uzyskane widma masowe z bibliotekami widm masowych (WILEY7N2, NIST147, FFNSC Library). W przypadku każdego zidentyfikowanego związku obliczano iloraz powierzchni odpowiadającego mu piku chromatograficznego i powierzchni piku wzorca (tzw. względna powierzchnia piku). Zawartość związków wyrażano jako średnie względne powierzchnie pików tj. średnie arytmetyczne ze zrealizowanej liczby powtórzeń danego pomiaru. Pomiaru wykonywano w trzech powtórzeniach.

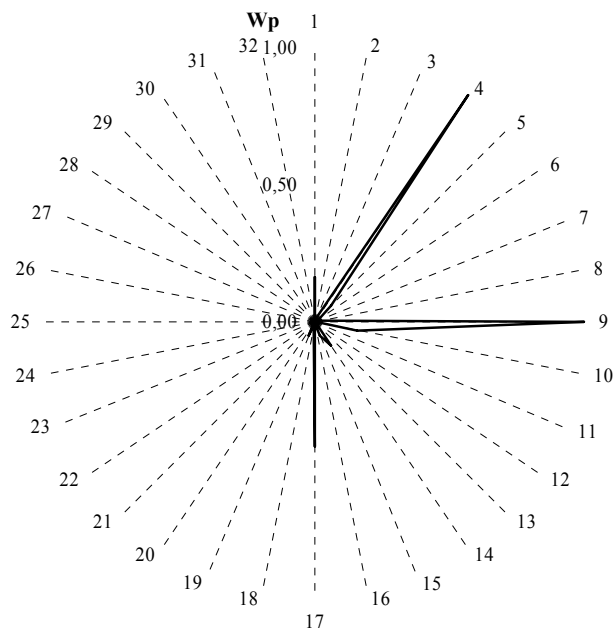
Wyniki i dyskusja

W próbkach badanych serów z przerostem pleśni zidentyfikowano ogółem 37 związków lotnych, z czego zdecydowaną większość stanowiły alkohole i ketony metylowe. Frakcję lotną sera Lazur współtworzyło 31 związków lotnych. We frakcji lotnej sera Rokpol zidentyfikowano 26 związków lotnych. Zaobserwowane różnice w składzie fazy nadpowierzchniowej badanych serów zilustrowano na rys. 1. i 2.

Próbki obu serów zawierały 2-metylopropanol, 2-pentanol, 1-etoksy-2-propanol, 3-metylo-1-butanol, 2-heptanol, 2-nonanol i 1,3- lub 2,3-butanediol (identyfikacja niejednoznaczna, czas retencji: 20,32 i 21,46). W próbce sera Rokpol nie stwierdzono obecności 1-pentanolu, 1-okten-3-olu i 2-(2-butoksyetoksy)-etanolu obecnych w serze Lazur. We frakcji lotnej sera Lazur nie wykryto 2-butanolu i 4-metylo-2-pentanolu zidentyfikowanych w Rokpolu. Frakcje lotne obu serów zawierały 2-pentanon, 2-heksanon, 2-heptanon, 3-hydrokso-2-butanon (acetoinę), 2-nonanon, 8-nonen-2-on i keton metylowo-nonylowy. Związek 2-hydrokso-3-heksanon zidentyfikowano jedynie w próbce sera Rokpol, zaś 6-metylo-5-hepten-2-on jedynie w próbce sera Lazur. Wśród składników fazy nadpowierzchniowej serów zidentyfikowano tylko jeden aldehyd – dekanal (Lazur). Spośród pięciu zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych we frakcji lotnej sera Lazur nie wykryto jedynie kwasu octowego. Frakcja lotna sera Rokpol zawierała wszystkie pięć zidentyfikowanych kwasów (oprócz octowego kwasu: izomasłowy, masłowy, izowalerianowy i kapronowy). W obu badanych serach występował maślan izopentylu i *p*-metyloanizol. Ponadto w serze Rokpol zidentyfikowano kapronian etylu i butyrolakton, zaś w serze Lazur *o*-ksylen, oksym metoksyfenylowy, disiarczek dimetylu, 2-etoksypropan i 1-(2-propenyloksy)-heptan.

Uzyskane rezultaty pozostają w zgodzie z wynikami wcześniejszych badań [2, 3, 5, 6, 9, 12], w których również wskazywano na ketony metylowe, alkohole (w tym 2-alkanole), kwasy tłuszczowe i estry jako na najliczniejsze grupy składników frakcji lotnej serów z przerostem pleśni. Stosunkowo niewielki udział aldehydów, związków siarkowych i aromatycznych oraz laktonów, a także nieobecność związków terpenowych można wytłumaczyć inną, od stosowanej przez większość autorów wspomnianych publikacji, metodą przygotowania próbek. Przykładowo, de Frutos i wsp. [2] czy Gonzalez de Llano i wsp. [5] izolowali związki lotne metodą jednoczesnej destylacji i ekstrakcji, wydobywając związki o średniej lotności. Lawlor i wsp. [6] wykorzystali aparat przypominający jamę ustną i adsorbowali związki lotne za pomocą rur z TENAX-TA. W omawianym doświadczeniu wykorzystano technikę mikroekstrakcji do fazy stałej, stosowaną już uprzednio do analizy frakcji lotnej serów z przerostem pleśni [3]. Mniejsza różnorodność zidentyfikowanych składników fazy nadpowierzchniowej może w tym przypadku wynikać z innego okresu czasu ekstrakcji – autorzy wymienionego artykułu eksponowali włókno w fazie nadpowierzchniowej próbek przez 16 godz. w temp. 22°C oraz innego rodzaju włókna – we wspomnianej publikacji

wykorzystano włókno Carboxen-PDMS. Niemniej jednak uzyskane profile składu fazy nadpowierzchniowej były wystarczająco liczne, aby umożliwić porównanie frakcji lotnych serów pod względem jakościowym.



Objaśnienia:

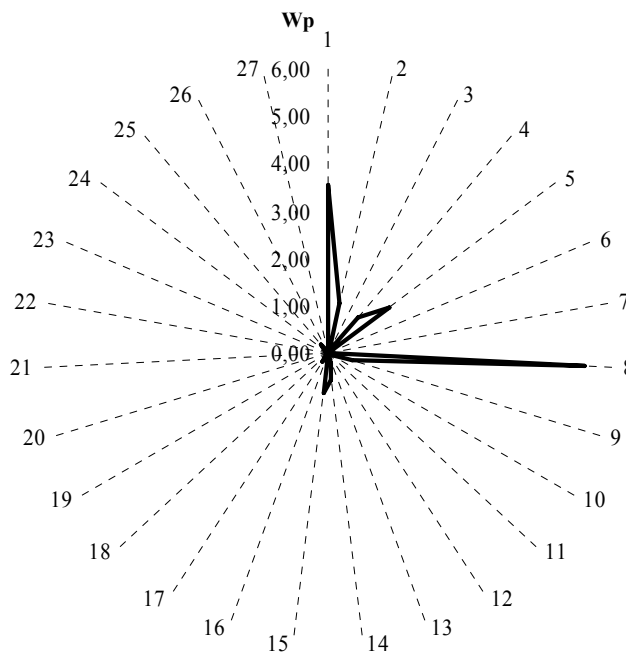
1 – 2-pentanon, 2 – disiarczek dimetylu, 3 – 2-heksanon, 4 – walerianian metylu, 5 – 2-metylopropanol, 6 – 2-pentanol, 7 – o-ksylen, 8 – 1-etoksy-2-propanol, 9 – 2-heptanon, 10 – 3-metylo-1-butanol, 11 – 2-etoksypropan, 12 – 1-pentanol, 13 – maślan izopentylu, 14 – 3-hydrokso-2-butanon, 15 – 2-heptanol, 16 – 6-metylo-5-hepten-2-on, 17 – 2-nonanon, 18 – p-metyloanizol, 19 – 8-nonen-2-on, 20 – 1-okten-3-ol, 21 – 1-(2-propenyloksy)-heptan, 22 – dekanal, 23 – 2-nonanol, 24 – 1,3-butanediol^a, 25 – kwas izomasłowy, 26 – 1,3-butanediol^a, 27 – keton metylowo-nonylowy, 28 – kwas masłowy, 29 – kwas izowalerianowy, 30 – oksym metoksyfenylowy, 31 – 2-(2-butoksyetoksy)-etanol, 32 – kwas kapronowy; ^a – identyfikacja niejednoznaczna; **Wp** – względna powierzchnia pików;

Explanatory notes:

1 – 2-pentanone, 2 – dimethyl disulphide, 3 – 2-hexanone, 4 – methyl valerate, 5 – 2-methylpropanol, 6 – 2-pentanol, 7 – o-xylene, 8 – 1-ethoxy-2-propanol, 9 – 2-heptanone, 10 – 3-methyl-1-butanol, 11 – 2-ethoxypropane, 12 – 1-pentanol, 13 – isopentyl butanoate, 14 – 3-hydroxy-2-butanone, 15 – 2-heptanol, 16 – 6-methyl-5-hepten-2-one, 17 – 2-nonanone, 18 – p-methylanisole, 19 – 8-nonen-2-one, 20 – 1-octen-3-ol, 21 – 1-(2-propenyloxy)-heptane, 22 – decanal, 23 – 2-nonanol, 24 – 1,3-butanediol^a, 25 – 2-methylpropanoic acid, 26 – 1,3-butanediol^a, 27 – 2-undecanone, 28 – butanoic acid, 29 – 3-methylbutanoic acid, 30 – methoxy-phenyloxime, 31 – 2-(2-butoxyethoxy)-ethanol, 32 – hexanoic acid; ^a – identification equivocal, **Wp** – relative peak area.

Rys. 1. Profil składu fazy nadpowierzchniowej sera Lazur.

Fig. 1. Headspace profile of the Lazur cheese.



Objaśnienia:

1 – 2-pentanone, 2 – 2-butanol, 3 – 2-heksanon, 4 – walerianian metylu, 5 – 2-pentanol, 6 – 2-hydroksy-3-heksanon, 7 – 1-etoksy-2-propanol, 8 – 2-heptanon, 9 – 3-metylo-1-butanol, 10 – 4-metylo-2-pentanol, 11 – kapronian etylu, 12 – maślan izopentyłu, 13 – 3-hydroksy-2-butanon, 14 – 2-heptanol, 15 – 2-nonanon, 16 – p-metyloanizol, 17 – 8-nonen-2-on, 18 – kwas octowy, 19 – 2-nonanol, 20 – 1,3-butanediol^a, 21 – kwas izomasłowy, 22 – 1,3-butanediol^a, 23 – keton metyloowo-nonylowy, 24 – butyrolakton, 25 – kwas masłowy, 26 – kwas izowalerianowy, 27 – kwas kapronowy; ^a – identyfikacja niejednoznaczna; **Wp** – względna powierzchnia piksu;

Explanatory notes:

1 – 2-pentanone, 2 – 2-butanol, 3 – 2-hexanone, 4 – methyl valerate, 5 – 2-pentanol, 6 – 2-hydroxy-3-hexanone, 7 – 1-ethoxy-2-propanol, 8 – 2-heptanone, 9 – 3-methyl-1-butanol, 10 – 4-methyl-2-pentanol, 11 – ethyl hexanoate, 12 – isopentyl butanoate, 13 – 3-hydroxy-2-butanone, 14 – 2-heptanol, 15 – 2-nonanone, 16 – p-methylanisole, 17 – 8-nonen-2-one, 18 – ethanoic acid, 19 – 2-nonanol, 20 – 1,3-butanediol^a, 21 – 2-methylpropanoic acid, 22 – 1,3-butanediol^a, 23 – 2-undecanone, 24 – butyrolactone, 25 – butanoic acid, 26 – 3-methylbutanoic acid, 27 – hexanoic acid; ^a – identification equivocal, **Wp** – relative peak area.

Rys. 2. Profil składu fazy nadpowierzchniowej sera Rokpol.

Fig. 2. Headspace profile of the Rokpol cheese.

Biorąc pod uwagę, że zidentyfikowane składniki fazy nadpowierzchniowej są w większości znane jako główne związki zapachotwórcze [3, 9] badanego rodzaju serów, zaprezentowane wykresy ilustrujące skład profilu fazy nadpowierzchniowej serów mogą być uznane za rodzaj aromagramów (rys. 1 i 2).

Wnioski

1. Badane sery z przerostem pleśni, polskiej produkcji, charakteryzowały się ogólnie zbliżonym jakościowo składem frakcji lotnej – dominującymi związkami lotnymi były, podobnie jak w innych tego typu serach, ketony metylowe, alkohole, estry i kwasy tłuszczowe.
2. Stwierdzenie nieznacznych różnic w składzie frakcji lotnej badanych serów może wymagać zastosowania odmiennych niż w omawianej pracy warunków przygotowania próbki, niemniej jednak te ostatnie pozwoliły na zadowalającą analizę różnic jakościowych w składzie związków lotnych serów Lazurowy i Rokokowy.
3. Zastosowanie stosunkowo krótkiego czasu kondycjonowania próbki i czasu ekstrakcji związków lotnych pozwoliło wyizolować związki uważane za kluczowe dla kształtowania zapachu serów z przerostem pleśni.
4. Technika HS-SPME-GC/MS jest narzędziem wartym zastosowania w analizie składu frakcji lotnej i konstruowaniu aromagramów serów z przerostem pleśni.

Praca była prezentowana podczas VIII Konferencji Naukowej nt. „Żywność XXI wieku – Żywność a choroby cywilizacyjne”, Kraków, 21–22 czerwca 2007 r.

Literatura

- [1] Arthur C.L., Pawliszyn J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2145-2148.
- [2] De Frutos M., Sanz J., Martinez-Castro I.: Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 524-530.
- [3] Frank D.C., Owen C.M., Patterson J.: Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2004, **37**, 139-154.
- [4] Friedrich J.E., Acree T.E.: Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *Int. Dairy J.*, 1998, **8**, 235-241.
- [5] Gonzalez de Llano D., Ramos M., Polo C., Sanz J., Martinez-Castro I.: Evolution of the volatile components of an artisanal blue cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 1676-1683.
- [6] Lawlor J.B., Delahunty C.M., Sheehan J., Wilkinson M.G.: Relationships between sensory attributes and the volatile compounds, non-volatile and gross compositional constituents of six blue-type cheeses. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 481-494.
- [7] Lecanu L., Ducruet V., Jouquand C., Gratadoux J.J., Feigenbaum A.: Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3810-3817.
- [8] Mariaca R., Bosset J.O.: Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait*, 1997, **77**, 13-40.
- [9] Moio L., Piombino P., Addeo F.: Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.*, 2000, **67**, 273-285.
- [10] Pèrès C., Viallon C., Berdagué J.-L.: Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization of cheeses. *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1030-1036.

- [11] Pinho O., Pérès C., Ferreira I.M.P.L.V.O.: Solid-phase microextraction of volatile compounds in ‘Terrincho’ ewe cheese. Comparison of different fibers. *J. Chrom. A*, 2003, **1011**, 1-9.
- [12] Trihaas J., Vognsen L., Nielsen P.V.: Electronic nose: new tool in modelling the ripening of Danish blue cheese. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 679-691.
- [13] Zhang Z., Yang M.J., Pawliszyn J.: Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation. *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 844A-853A.

THE SPME TECHNIQUE AS A USEFUL TOOL TO CONSTRUCT AROMAGRAMS OF BLUE-VEINED CHEESES

S u m m a r y

The objective of the study was to assess the applicability of HS-SPME technique to construct aromagrams of the blue-veined cheeses. The study object constituted samples of the two blue-type cheeses produced in Poland (Lazur and Rokpol) and purchased in local supermarkets. To extract volatile components of the samples, a technique of headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) was applied. The compounds isolated were separated and identified using a gas chromatography and a mass spectrometry (GC/MS) technique. The contents of compounds detected were expressed in relation to the internal standard. Aromagrams of those cheeses were constructed. It was proved that a SPME technique coupled with a GC/MS technique are a useful tool for the analysis of the volatiles contained in the blue-veined cheeses, and can be helpful when constructing aromagrams of this type of cheeses.

Key words: blue-veined cheeses, aromagrams, SPME, GC/MS 