

ANNA BZDUCHA, MIECZYŚLAW W. OBIEDZIŃSKI

**BADANIA NAD ZWIĄZKAMI LOTNYMI SERÓW Z PRZEROSTEM
PLEŚNI TECHNIKĄ ANALIZY FAZY NADPOWIERZCHNIOWEJ
(SPME) I CHROMATOGRAFII GAZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE
SPEKTROMETRIĄ MASOWĄ (GC/MS)**

Streszczenie

W pracy dokonano identyfikacji lotnych związków fazy nadpowierzchniowej - zapachowej wybranych polskich serów Rokpol oraz Lazur z przerostem pleśni *Penicillium roqueforti*. Do badań zastosowano technikę mikroekstrakcji związków lotnych z fazy nadpowierzchniowej próbki do fazy stałej (SPME) przy zastosowaniu włókien krzemowych pokrytych fazami DVB/CAR/PDMS, a następnie rozdziłu i identyfikacji związków techniką chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrem mas (GC/MS). W badanych serach zidentyfikowano ponad dwadzieścia lotnych związków, których skład jakościowy był podobny, aczkolwiek występowały różnice w ilościowych stosunkach poszczególnych komponentów zapachu.

Badania zmian związków lotnych wsparto określeniem stopnia proteolizy na podstawie stosunku zawartości azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 do azotu ogółem. W serach typu Lazur stosunek ten określono na blisko 39% - w serze Lazur perłowy i ok. 49% - w serze Lazur blue. Stopień lipolizy badano określając zawartość lotnych kwasów tłuszczowych. Zawartość lotnych kwasów tłuszczowych była największa w serze Lazur perłowy (ok. 238 mg/kg sera), zaś najmniejszą zawartością lotnych kwasów tłuszczowych charakteryzował się ser Rokpol (ok. 85 mg/kg).

Słowa kluczowe: sery pleśniowe, związki lotne, SPME-GC-MS

Wprowadzenie

Powstawanie związków lotnych kształtujących cechy sensoryczne serów związane jest z katabolicznymi przemianami białek, lipidów, laktozy oraz cytrynianów mleka podczas dojrzewania skrzepu kazeinowego [12]. Proteoliza, lipoliza i glikoliza zachodzą w wyniku procesów fermentacyjnych wywołanych mikroflorą stosowanych kultur starterowych i endogennych enzymów mleka, a także przemian nieenzymatycznych, jak na przykład autooksydacja tłuszczów i białek [4]. W serach z dodatkiem pleśni *Penicillium roqueforti* szczególne znaczenie ma intensywność procesów lipolizy i proteolizy [6]. Powstające w wyniku lipolizy i procesów utleniania wolne kwasy tłuszczowe (WKT) są prekursorami ketonów metylowych, aldehydów,

estrów aromatycznych i alifatycznych czy laktonów. Krótko- i średniołańcuchowe WKT, mające znaczący wpływ na cechy sensoryczne serów, mogą powstawać również na drodze przemian oksydatywnej deaminacji aminokwasów [3].

Bukiet zapachowy serów jest rezultatem kształtowania się pożądanej przez konsumenta relacji między związkami lotnymi fazy nadpowierzchniowej serów (ang. headspace), typowy zapach zależy również od wzajemnych stosunków ilościowych występujących związków [4, 7].

Związki lotne w żywności występują zazwyczaj w bardzo niskiej koncentracji i w badaniach ich składu niezbędne są: izolacja z matrycy produktu oraz zateżnienie, aby można było scharakteryzować ich skład i zawartość poszczególnych związków chemicznych technikami chromatograficznymi przez zastosowanie dostępnych detektorów. Od kilku lat techniką do wyodrębnienia i koncentracji związków lotnych z fazy nadpowierzchniowej produktów spożywczych stosuje się mikroekstrakcję do fazy stałej włókna krzemionkowego pokrytego fazą stacjonarną o odpowiedniej polarności (Solid Phase Microextraction), co zdecydowanie uprościło stosowane w poprzednich dziesięcioleciach uciążliwe postępowania izolacji związków zapachowych na drodze ekstrakcji czy ekstrakcji połączonej z destylacją i inne [8].

Celem pracy było wstępne określenie składu związków lotnych wybranych polskich serów wytwarzanych z przerostem pleśni *Penicillium roqueforti* oraz rozpoznanie zmian ilościowych i jakościowych podczas ich technologicznego dojrzewania, uwzględniając wybrane wskaźniki lipolizy i proteolizy zachodzących podczas dojrzewania.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły dostępne w obrocie na rynku warszawskim polskie sery z przerostem pleśni *Penicillium roqueforti* typu Lazur: „blue”, „turkusowy” i „perłowy” oraz Rokpol.

Charakterystykę procesów lipolizy i proteolizy serów prowadzono odpowiednio poprzez oznaczenie zawartości i składu lotnych kwasów tłuszczowych oraz oznaczenie zawartości azotu ogółem i azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 metodą Kjeldahla.

Analiza lotnych kwasów tłuszczowych techniką HS-SPME- GC-MS

Do badań pobierano 5 g sera i ucierano w morderzu z 10 g NaCl uprzednio odwonionego w termostacie w temp. 100°C, dodawano 20 cm³ zakwaszonej wody destylowanej i przenoszono do szklanego naczynia z zamknięciem. Tak przygotowaną próbkę termostatowano w temp. 50°C przez 15 min, po czym wprowadzano do fazy nadpowierzchniowej włókno z fazą typu DVB/CAR/PDMS (diwinylobenzen/carboksen/polidimetylosiloksan; film o grubości faz 30/50 μm), termostatowano przez dalsze 15 min w temp. 50°C. Po tym czasie związki z włókna desorbowano przez 2 min w temp. 220°C komory nastrzykowej chromatografu gazowego połączonego ze spektrometrem masowym firmy Shimadzu Model GCMS-QP 2010. Warunki analizy GCMS były następujące: kolumna kapilarna, spieczony

kwarc pokryty fazą stacjonarną ZB-WAX (30 m x 0,25 μm x 0,25 mm) zastosowana w systemie bezdzielnikowym. Temperatura pracy kolumny: początkowa 40°C przez 2 min, a następnie wzrost temp. z szybkością 4°C/min do 220°C i izoterma końcowa 5 min. Gazem nośnym był hel o przepływie 0,69 cm³/min. Stosowano następujące warunki pracy spektrometru masowego: temp. źródła jonów 190°C, temp. linii łączącej GC-MS 200°C, jonizacja elektronowa o energii 70eV, napięcie detektora 0,9 kV, zakres przemieszczenia filtra quadropulowego 40 - 300 m/z. Analizy każdego rodzaju sera wykonywano w trzech powtórzeniach. Identyfikacji kwasów dokonano na podstawie porównania czasu retencji z czasem retencji dostępnych standardów oraz widm masowych analizowanych związków z widmami w bibliotekach NIST 147 oraz Wiley 175. Do obliczeń ilościowych zastosowano technikę dodatku standardów kwasów (Sigma-Aldrich) na poziomach: kwas butanowy 600 ppm, heksanowy 200 ppm i oktanowy 160 ppm.

Badanie stopnia proteolizy

W celu oznaczenia azotu ogółem odważano 0,5 g sera i poddawano bezpośredniej mineralizacji, a do oznaczenia azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 w mózdzierzu rozcierano 2 g sera, dodając stopniowo ok. 50 cm³ wody destylowanej o temp. ok. 40°C. Emulsję przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 250 cm³ i umieszczano na 10 min w łaźni wodnej o temp. 35°C. Następnie dodawano stopniowo 4 cm³ 10% roztworu kwasu octowego i pozostawiono na 10 min, po czym dodawano 4 cm³ 1 M roztworu octanu sodu. Po schłodzeniu dopełniano do kreski wodą destylowaną i przesączało. Do mineralizacji pobierano 20 cm³ przesącza. Mineralizację próbek, a następnie destylację amoniaku, prowadzono przy użyciu aparatów firmy BÜCHI. Miareczkowanie destylatów 0,1 M roztworem HCl prowadzono w aparacie Titroline Easy Schott. Oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach. Stopień proteolizy określano wyznaczając indeks stosunku azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 do azotu ogółem.

Badania profili związków lotnych techniką SPME- GC-MS

Próbkę 5 g sera ucierano w mózdzierzu z 10 g soli kuchennej uprzednio poddanej dearomatyzacji i dodawano standard wewnętrzny (0,356 mg estru metyloвого kwasu pentanowego). Dalsze postępowanie stosowano podobnie jak podczas analizy lotnych kwasów tłuszczowych, z tą różnicą, że szklane pojemniki z próbkami termostutowano w temp. 21°C. Obliczenia zawartości wykonywano stosując technikę standardu wewnętrznego bez stosowania współczynników korekcyjnych poszczególnych związków chemicznych.

Analiza statystyczna obejmowała określenie istotności różnic między wartościami średnimi przy zastosowaniu analizy wariancji ($\alpha = 0,05$) w programie Statgraphics 4.1.

Wyniki i dyskusja

W ramach prac wstępnych dokonano charakterystyki badanych serów pod względem dojrzałości, wyznaczając indeksy proteolizy, których wartości podano w tab. 1.

Zmiany cech sensorycznych dojrzewających serów są powiązane m.in. z hydrolizą białek pod wpływem procesów życiowych mikroflory, aktywności enzymów endogennych mleka i enzymów dodawanych w czasie procesu technologicznego. W wyniku proteolizy białek uwalniane są peptydy i wolne aminokwasy, będące prekursorami związków lotnych lub bezpośrednio wpływające na aromat serów [9]. Ekstrakcja i ilościowe oznaczenie azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6, którego ilość wzrasta w czasie dojrzewania serów, jest jednym z prostych wskaźników określania stopnia proteolizy na podstawie indeksu proteolizy, który stanowi udział azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 w odniesieniu do azotu ogółem [10]. Według dostępnych danych literaturowych, w dojrzałych serach z dodatkiem *Penicillium roqueforti* zawartość azotu rozpuszczalnego najczęściej zawierała się w granicach od 38 do 73% [5]. W badanych serach pleśniowych indeks ten wynosił odpowiednio od ok. 35% w przypadku sera Rokpol i od 38 do 49% w serach Lazur. Ser Rokpol charakteryzował się niższym stopniem proteolizy w porównaniu z pozostałymi produktami, co może wskazywać na krótszy okres dojrzewania i niższy stopień proteolizy.

Kolejnym etapem charakterystyki badanych serów było oznaczenie lotnych kwasów tłuszczowych metodą SPME-GC-MS. Zawartość oznaczonych kwasów w poszczególnych serach podano w tab. 2., a rozdziały chromatograficzne przedstawiono na rys. 1.

Krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe bezpośrednio wpływają na cechy sensoryczne serów [1]. Metoda z wykorzystaniem SPME pozwoliła zidentyfikować we wszystkich badanych serach następujące kwasy: butanowy, izowalerianowy, heksanowy, oktanowy, dekanowy, dodekanowy i tetradekanowy. Stwierdzono, że łączna zawartość oznaczanych lotnych wolnych kwasów tłuszczowych była najwyższa w serze Lazur perłowy średnio 238 mg/kg sera, a następnie odpowiednio 139 mg/kg (Lazur turkusowy) i 124 mg/kg (Lazur blue). W serze Rokpol stwierdzono najniższą zawartość, tj. 85 mg/kg wolnych kwasów tłuszczowych, co w porównaniu z zawartością WKT w serach typu Lazur wskazuje na niższe zaawansowanie lipolizy tłuszczów oraz, jak uprzednio stwierdzono, proteolizy. Powyższe dane zdają się wskazywać na niższą aktywność procesów biochemicznych w serach Rokpol w porównaniu z serami Lazur, co jest obecnie przedmiotem dalszych badań. Dominującymi kwasami w składzie WKT były kwas butanowy i heksanowy.

Najwyższa koncentracja kwasu butanowego była charakterystyczna dla sera Lazur perłowy i wynosiła 119 mg/kg sera. W pozostałych serach koncentracje kwasu butanowego były zdecydowanie niższe w granicach od 27 mg/kg (Rokpol) do 32 mg/kg (Lazur blue). Podobnie kwasu heksanowego było najwięcej w serze Lazur perłowy (ponad 61 mg/kg), zaś kwasu oktanowego ponad 42 mg/kg w serach Lazur

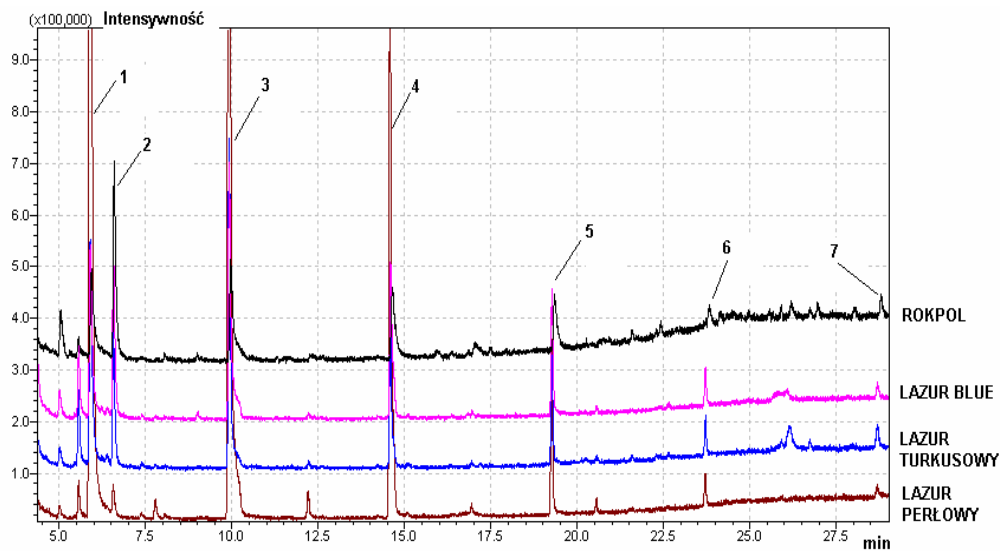
Tabela 1

Indeks proteolizy jako stosunek azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6 do azotu ogółem w serze [%].
Index of proteolysis as a ratio of the soluble nitrogen in the environment about pH 4,6 to total nitrogen in cheese.

Rodzaj sera Type of the cheese	Stosunek azotu rozpuszczalnego do azotu ogółem [%] The ratio of soluble nitrogen to total nitrogen [%] ($\bar{X} \pm s$)
Lazur blue	48,94 ± 1,64 a
Lazur turkusowy	41,15 ± 0,18 b
Lazur perłowy	38,68 ± 1,54 b, c
Rokpol	35,11 ± 1,58 c

Objaśnienia: / Explanatory notes:

x - wartość średnia / mean value, s - odchylenie standardowe / standard deviation, a, b, c, d – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / a, b, c, d – mean values indicated with the same letters do not statistically significantly differ ($p > 0,05$).



Rys. 1. SPME-GC-MS chromatogramy lotnych kwasów tłuszczowych w badanych serach (numeracja pików zgodnie z tab. 2)

Fig. 1. SPME-GC-MS chromatograms of volatile fatty acids of investigated cheeses (peak no. in accordance with no. in tab. 2).

Tabela 2

Zawartość lotnych kwasów tłuszczowych oznaczonych techniką SPME-GC-MS w badanych serach [ppm].

Content of volatile fatty acids measured by SPME-GC-MS in investigated cheeses [ppm].

Nazwa kwasu Name of the acid	Nr piku Peak no.	Rodzaj sera / Type of the cheese							
		Lazur blue		Lazur turkusowy		Lazur perłowy		Rokpol	
		$\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	$\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	$\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	$\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]
Kwas butanowy Butanoic acid	1	32,33 ± 0,98 a	3,02	30,61 ± 0,79 a	2,58	119,05 ± 9,82 b	8,25	26,75 ± 3,54 c	13,24
Kwas izo- walerianowy Isovaleric acid	2	24,26 ± 2,18 a	8,97	13,79 ± 0,36 b	2,58	1,88 ± 0,40 c	21,10	41,59 ±5,34 d	12,84
Kwas heksanowy Heksanoic acid	3	10,31 ± 1,00 a	9,68	9,81 ± 0,66 a	6,75	61,38 ± 1,04 b	18,00	4,00 ± 0,58 c	14,40
Kwas oktanowy Octanoic acid	4	30,22 ± 5,41 a	17,89	42,80 ± 0,17 b	0,41	42,41 ± 7,61 b	17,94	6,15 ± 0,21 c	3,40
Kwas dekanowy Decanoic acid	5	17,87 ± 1,42 a	7,94	26,40 ± 0,11 b	0,41	10,39 ± 0,17 c	1,65	3,97 ± 0,51 d	12,91
Kwas dodekanowy Dodecanoic acid	6	5,99 ± 0,52 a	8,73	8,58 ± 0,03 a b	0,41	1,66 ± 0,50 c	30,00	1,40 ± 0,05 d	0,39
Kwas tetradekanowy Tetradecanoic acid	7	3,40 ± 1,70 a	49,94	6,68 ± 0,03 b	0,41	nie policzon o	-	1,02 ± 0,13 c	12,46

Objaśnienia: / Explanatory notes:

x - wartość średnia / mean value; s - odchylenie standardowe / standard deviation; a, b, c, d - wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / a, b, c, d – mean values marked with the same in line indicate lack of statistical significant differences ($p > 0,05$), RSD - względne odchylenie standardowe / relative standard deviation.

Tabela 3

Zawartość związków lotnych w badanych serach [ppm].
Volatile components content in investigated cheeses [ppm].

Nr pik Peak no.	Nazwa związku Name of component	Lazur blue $\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	Lazur turkusowy $\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	Lazur perłowy $\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]	Rokpol $\bar{X} \pm s$ [ppm]	RSD [%]
1	2-butanon / 2-butanone	-	-	-	-	7,63 ± 0,95 a	12,48	75,2 ± 0,62 b	0,82
2	3-metylbutanal / 3-methylbutanal	3,57 ± 0,30 a	8,45	-	-	-	-	-	-
3	etanol / ethanol	1,68 ± 0,41 a	24,40	3,60 ± 0,70 b	19,44	-	-	-	-
3	2-pentanon / 2-pentanone	22,48 ± 0,98 a	4,35	57,89 ± 10,92 b	18,86	454,84 ± 88,69 c	19,50	13,38 ± 1,87 d	13,95
4	alpha pinen / alpha pinene	-	-	1,95 ± 0,41 a	21,03	-	-	-	-
5	2-butanol	-	-	-	-	-	-	118,82 ± 22,85 a	19,25
6	dimetylodisulfid / dimethyldisulfide	-	-	1,01 ± 0,11 a	11,29	-	-	-	-
7	2-heksanon / 2-heksanone	-	-	-	-	9,22 ± 0,57 a	6,14	-	-
9	2-pentanol	-	-	3,64 ± 1,08 a	29,62	27,97 ± 4,32 b	15,42	2,48 ± 0,02 a	0,67
10	1-metoksy, 2-propanol / 1-metoksy, 2-propanol	23,3 ± 2,64 a	11,32	29,26 ± 2,43 a	8,30	38,97 ± 26,64 b	68,35	-	-
11	2-etoksy, 1-propanol / 2-etoksy, 1-propanol	74,86 ± 21,03 a	28,09	46,83 ± 23,65 b	50,51	38,85 ± 32,04 b	71,94	-	-
12	2-heptanon / 2-heptanone	140,04 ± 8,71 a	6,22	88,68 ± 12,74 b	14,37	434,76 ± 87,61 c	20,15	20,11 ± 2,16 d	10,74
13	3-metyl, 1 butanol / 3-methyl, 1 butanol	5,82 ± 1,01 a	17,45	1,4 ± 0,13 b	9,40	-	-	27,23 ± 5,08 c	18,66
14	2- etoksypropan / 2-etoksypropane	3,63 ± 0,71 a b	19,61	5,98 ± 1,24 b	20,72	4,77 ± 0,38 b	7,92	-	-
15	3-hydroksy, 2-butanon (acetoina) 3-hydroksy, 2-butanone (acetoina)	5,79 ± 0,93 a	16,14	5,42 ± 1,29 a	23,86	-	-	56,24 ± 8,7 b	15,47
16	2- oktanon / 2- oktanone	2,84 ± 0,52 a	18,34	-	-	3,73 ± 0,02 a	0,47	-	-
17	2- heptanol	8,71 ± 1,45 a	16,67	4,68 ± 1,1 b	23,42	16,86 ± 3,03 c	17,94	5,55 ± 0,24 a b	4,24
18	2,4,6-trimetylpirydyna 2,4,6-trimethylpirydyne	1,15 ± 0,15 a	12,64	-	-	-	-	-	-
19	2-nonanon / 2-nonanone	89,94 ± 5,82 a	6,47	47,97 ± 3,97 b	8,28	102,71 ± 6,88 c	6,70	19,73 ± 2,4 d	12,18

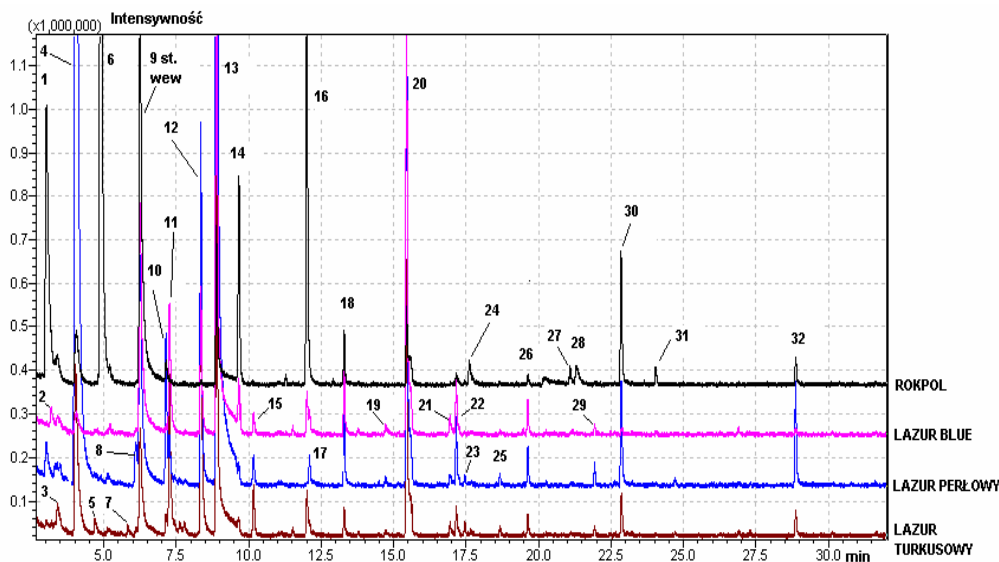
20	4- metyl, 1-metoksybenzen 4- methyl, 1-methoksybenzene	-	-	1,74 ±0,26 a	14,86	1,63 ± 0,19 a	11,40	-	-
21	8-nonen-2-on / 8-nonen-2-one	8,03 ± 0,59 a	7,32	3,28 ± 0,16 b	4,84	12,24 ± 3,01 a	24,61	1,39 ±0,54 c	38,45
23	1-okten-3-ol	-	-	1,48 ± 0,04 a	3,00	1,17 ± 0,01 a	0,75	-	-
24	kwasy octowy / acetic acid	-	-	-	-	-	-	5,53 ±2,73 a	49,25
25	2-etyln, 1-heksanol / 2-ethyl, 1-hexanol	-	-	1,28 ±0,38 a	29,75	-	-	-	-
26	2-nonanol	5,11 ± 0,14 a	2,69	2,84 ±0,09 b	3,23	4,97 ± 1,38 a	27,80	2,48 ± 0,4 b	16,05
27	kwasy 2-metylpropanowy 2-methylpropanoic acid	-	-	-	-	-	-	2,50 ± 0,68 a	27,40
28	2,3-butanediol	-	-	-	-	-	-	3,66 ± 0,72 a	19,78
29	2-undekanon	1,12 ± 0,24 a	21,58	1,18 ± 0,18 a	15,08	2,21 ± 0,73 a	32,79	-	-
30	kwasy butanowy / butanoic acid	tab.1	-	tab.1	-	tab.1	-	tab.1	-
31	kwasy 3-metylbutanowy 3-methylbutanoic acid	-	-	-	-	-	-	1,98 ± 0,29 a	14,56
32	kwasy heksanowy / heksanoic acid	tab.1	-	tab.1	-	tab.1	-	tab.1	-

Objaśnienia: / Explanatory notes:

x - wartość średnia / mean value, s - odchylenie standardowe / standard deviation, a, b, c, d - wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / the mean values in line marked with the same letter indicate lack of statistical significant differences ($p > 0,05$), RSD - względne odchylenie standardowe / relative standard deviation.

turkusowy i perłowy, różniąc się istotnie od zawartości w serze Rokpol (ok. 6,1 mg/kg). Według piśmiennictwa fachowego [12], w dojrzałych serach pleśniowych wolne kwasy tłuszczowe mogą występować w stężeniach nawet do 32000 mg/kg, jednakże autorzy nie podają zawartości poszczególnych kwasów krótko-, średnio- i długołańcuchowych uwalnianych podczas przemian lipolitycznych w serach pleśniowych. Niewątpliwie dane te należy zweryfikować w dalszych pracach.

Na rys. 2. przedstawiono typowe profile chromatograficzne badanych serów, a w tab. 3. zidentyfikowane związki oraz ich zawartość. Wśród zidentyfikowanych związków lotnych najczęściej obecne były ketony oraz alkohole, w tym alkohole drugorzędowe o rozgałęzionym łańcuchu alifatycznym. Wśród ketonów 2-pentanon, 2-nonanon i 2-heptanon zaznaczyły się przeważającym udziałem wśród zidentyfikowanych związków lotnych. Występowały one we wszystkich analizowanych serach. W serze Lazur „perłowy” związki te wykazały dominujący udział, występując odpowiednio w stężeniu ok. 455 ppm (2-pentanon), 435 ppm (2-heptanon) i ok. 103 ppm (2-nonanon). W pozostałych serach ich udział był mniejszy; 2-pentanon w granicach od 13,4 ppm do 140 ppm odpowiednio w Rokpolu i Lazurze blue; 2-heptanon występował w stężeniach od 20 ppm (Rokpol) do 89 ppm w Lazurze turkusowym, a 2-nonanon w najmniejszej ilości oznaczono w Rokpolu (ok. 20 ppm). Wydaje się wysoce prawdopodobne, że zawartość ketonów, a w szczególności wyższych homologów, jest związana ze stopniem dojrzałości sera, a więc i zaawansowaniem lipolizy oraz proteolizy. Acetoina (3-hydroksy, 2-butanon) w stężeniu powyżej 56 ppm oznaczono w serze Rokpol. Wśród pozostałych zidentyfikowanych ketonów były: 2-butanon, 2-heksanon, 2-oktanon, 8-nonen-2-on, 2-undekanon. Ketony uważane są za najważniejsze komponenty aromatu serów z przerostem pleśni [11]. Ich powstawanie jest rezultatem enzymatycznej oksydacji WKT do β -ketokwasów i ich dekarboksylacji, chociaż 2-butanon powstaje z diacetylu - produktu fermentacji laktozy i przemian cytrynianów. Alkohole występowały w znacznie mniejszych stężeniach, ale były równie liczną grupą związków. Alkohole pierwszorzędowe powstają w przemianach aminokwasów oraz WKT, etanol w przemianach laktozy lub redukcji acetaldehydu. Alkohole drugorzędowe są produktami redukcji ketonów - 2-butanol dominował wśród związków lotnych sera Rokpol (ok. 119 ppm). Związek ten w serach nadaje owocową nutę zapachową. Charakterystyczne dla serów Lazur były tylko 2-etoksy,1-propanol i 1-metoksy,2-propanol, zaś 2,3-butanediol występował w Rokpolu. Ponadto, w profilach zapachowych badanych serów z przerostem pleśni zidentyfikowano m.in. 3-metylbutanal w serze Lazur blue (ok. 3,60 ppm), alpha pinen (ok. 2 ppm) i dimetylodisulfid (ok. 1 ppm) w Lazurze turkusowym, a także kwasy octowy w Rokpolu (ok. 6 ppm) oraz uprzednio wymienione WKT.



Rys. 2. SPME-GC-MS chromatogramy lotnych związków zawartych w badanych serach (pik nr 9- standard wewnętrzny).

Fig. 2. SPME-GC-MS chromatograms of volatile components in investigated cheeses (peak no. 9- internal standard).

Wnioski

1. Zastosowana metoda badań profili zapachowych SPME wraz z chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią masową pozwala na różnicowanie profili zapachowych badanych rodzajów serów i może być stosowana do dalszych badań wyznaczenia składowych głównych charakteryzujących stopień dojrzałości serów w powiązaniu z badaniami sensorycznymi.
2. Ser Lazur charakteryzował się typową dla serów z przerostem pleśni zawartością azotu rozpuszczalnego w środowisku o pH 4,6, która wynosiła od blisko 39% w serze Lazur perłowy do ok.49% azotu ogółem w Lazurze blue. W przypadku sera Rokpol niższy indeks proteolizy może wskazywać na krótszy czas dojrzewania sera.
3. Łączna zawartość oznaczonych krótko- i średniołańcuchowych lotnych kwasów tłuszczowych w serze Lazur perłowy (ok. 238 mg/kg sera) wskazuje na bardziej rozległą lipolizę w porównaniu z badanymi serami. Najmniejszą zawartością lotnych kwasów tłuszczowych charakteryzował się ser Rokpol (ok. 85 ppm).

4. Każdy z badanych serów Lazur typu blue, turkus i perłowy oraz Rokpol charakteryzował się podobnym jakościowo składem związków zapachowych, jednak stwierdzono różnice pod względem zawartości poszczególnych związków.

Literatura

- [1] Bosset J., Gauch R.: Comparison of the volatile flavour compounds of six European AOC cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *Int. Dairy J.*, 1993, **3**, 359-377.
- [2] Collins Y. F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G.: Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 841-866.
- [3] Dahl S., Tavaría F.K, Malcata X: Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *Int. dairy. J.*, 2000, **10**, 255-262.
- [4] Engels W.J.M, Dekker R., de Jong C., Neeter R. i Visser S.: A comparative study of volatile compounds in the water- soluble fraction of various types of ripened cheese. *Int. Dairy J.*, 1997, **7**, 255-263.
- [5] Fernandez- Salguero J.: Andres Marcos Alcalá M., Esteban M.A.: Proteolysis of Cabrales cheese and other European Blue vein cheese varieties. *J. Dairy Res.*, 1989, **56**, 141-145.
- [6] Izco J. M., Torre P.: Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the "purge and trap" method and analysed by GC- MS. *Food Chemistry*, 2000, **70**, 409-417.
- [7] Jeleń H.H.: Związki zapachowe żywności - wyzwanie dla analityka. *Przem. Spoż.*, 2004, **5**, 18-22, 24-47.
- [8] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: Application of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatography*, 2000, **A 880**, 35-62.
- [9] Marilley L. i Casey M.G: Flavour of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J. Food Microbiology*, 2004, **90**, 139-159.
- [10] McSweeney P.L.H.i Fox P.F.: Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 1997, **77**, 41-76.
- [11] McSweeney P.H.L., Sousa M.J.: Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 2000, **80**, 293-324.
- [12] Yvon M., Rijnen L.: Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 185-201.

INVESTIGATION OF VOLATILE COMPONENTS OF CHOSEN MOULD CHEESES BY HEADSPACE SOLID PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY

S u m m a r y

The experiment studied the identification of volatile components of the headspace (HS) phase (flavour) of chosen Polish mould cheeses Rokpol and Lazur with *Penicillium roqueforti*. The solid phase microextraction (SPME) of volatile fraction from the sample headspace to stationary phase of silica fiber DVB/CAR/PDMS was used. Separation and identification of compounds were carried out using gas chromatograph coupled with mass spectrometry (GC/MS). Over twenty volatile components characteristic for investigated cheeses were identified which qualitative composition of volatile components for

investigated cheeses was similar, although there were differences in quantitative proportions between particular flavour components.

Investigation of the changes of volatile components was supported by determination of the proteolysis degree on the basis of the ratio of nitrogen soluble at pH 4,6 to total nitrogen in cheese. In Lazur cheeses it was about 39% in Lazur perłowy and about. 49% of total nitrogen content in Lazur blue. The content of volatile fatty acids was determined as a degree of lipolysis. The highest content of volatile fatty acids was in Lazur perłowy cheese (ok. 238 mg/kg sera), while the lowest content of volatile fatty acids was in Rokpol cheese (app. 85 mg/kg).

Key words: mould cheeses, volatile components, SPME-GC-MS ☒