

APARATURA BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Wykorzystanie mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w analizie aromatu chleba bezglutenowego

MARIUSZ PACYŃSKI, RENATA ZAWIRSKA-WOJTASIAK, AGNIESZKA STRULAK

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, INSTYTUT TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI POCHODZENIA
ROŚLINNEGO, ZAKŁAD KONCENTRATÓW SPOŻYWCZYCH

STRESZCZENIE

Dokonano doboru parametrów analizy aromatu chleba przy pomocy metody mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Na podstawie optymalnych parametrów ekstrakcji (30 min, 50°C, przy użyciu włókna CAR/PDMS), dokonano analizy jakościowej i ilościowej związków lotnych przy zastosowaniu metod chromatografii gazowej i spektrometrii masowej. Wykazano różnice zawartości wytypowanych związków lotnych zarówno pomiędzy skórką a miększem badanych chlebów jak i między obydwooma wariantami badanych prób (chleb bezglutenowy i pszenno-żytni).

Application of Solid-Phase Microextraction Method (SPME) for gluten free bread aroma analysis

ABSTRACT

Analysis parameters of bread aroma were chosen using the solid-phase microextraction method (SPME). Optimal extraction parameters (30min, 50°C, using CAR / PDMS fiber) has been successfully applied to qualitative and quantitative analysis of bread volatile compounds, using gas chromatography and mass spectrometry. During this study, differences in the contents of selected volatile compounds has been shown, between the crust and the bread crumb, as well as, between the two variants too (gluten-free bread and wheat-rye bread).

1. WSTĘP

Pieczyno a zwłaszcza tradycyjny chleb jest jednym z głównych produktów spożywczych wykorzystywanych na całym świecie, w różnych formach, uzależnionych od zwyczajów kulturowych [1]. Kojarzony ze świeżym chlebem charakterystyczny smak i zapach, to według opinii konsumentów najcenniejsze jego cechy obok tak istotnych, jak wartość odżywcza [2]. Smak i zapach zwiększając smakowitość pokarmów wpływają na ogólnie rozumianą jakość produktów, podnoszą atrakcyjność konsumencką oraz wpływają na wywołanie odpowiedzi fizjologicznej organizmu – pobudzenie apetytu, sekrecję soków trawiennych co wpływa m.in. na lepsze trawienie [3, 4, 5].

Nie dla każdego jednak aromatyczny i smakowity chleb tradycyjny (pszenno-żytni) stanowi bezpieczne pożywienie. Osoby cierpiące na celiakię (chorobę trzewną), chorobę związaną z nietolerancją glutenu, białka ziaren zbóż takich jak: pszenica, żyto, jęczmień, owies [6], zmuszone są do rygorystycznego przestrzegania diety bezglutenowej, trwającej zwykle do końca życia [6, 7]. Przemysł spożywczy oferuje produkty bezglutenowe a wśród nich również pieczywo. Różni się ono jednak istotnie pod względem smaku i zapachu od produktów typowych (pszennych, pszenno-żytnich, żytnich). Różnego rodzaju dodatki choć pozytywnie wpływają na ogólną smakowitość pieczywa, nie odtwarzają typowego aromatu i smaku charakterystycznego dla chlebów standardowych.

Aromat chleba, definiowany zwykle jako delikatny, subtelny i niepowtarzalny składa się z dużej ilości komponentów. Wśród lotnych i stałych składników zapachowych chleba znajdują się: kwasy, alkohole, aldehydy, estry, furany, węglowodory, ketony, laktony, pirazyny, pirole i związki siarkowe. Różne grupy związków powstają na drodze, m.in. reakcji Mailarda, fermentacji, utleniania lipidów [8, 9, 10, 11]. W tradycyjnych chlebach zidentyfikowano w zależności od autorów od około 190 do ponad 500 związków lotnych [8, 12, 13, 14, 15, 16].

Postęp technologii przemysłu spożywczego, który umożliwia wprowadzenie na rynek nowych produktów, może stać się dużym ułatwieniem dla chorych na celiakię. Poprawa aromatu chleba bezglutenowego, by przypominał on aromat chleba tradycyjnego i spełniał swoim profilem sensorycznym wymagania konsumentów to wyzwanie na najbliższe lata zadań badawczych. Ażeby kształtować, poprawić aromat chleba trzeba posiadać precyzyjne i szybkie metody jego oznaczania. Do

takich metod należy metoda mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Jest to technika stosunkowo młoda, nowoczesna i szybka w porównaniu z metodami konwencjonalnymi takimi jak ekstrakcja rozpuszczalnikiem czy metodami destylacyjno-ekstrakcyjnymi [16]. Klasyczna ekstrakcja rozpuszczalnikiem jest czasochłonna, wymaga stosowania dużych ilości wysokiej czystości rozpuszczalnika, co zwiększa koszty. Ekstrakcja ta nie charakteryzuje się wysoką selektywnością, a poza tym istnieje ryzyko koekstrakcji niepożądanych składników matrycy. Metody jednoczesnej destylacji-ekstrakcji charakteryzują się mniejszym stopniem rozcieńczenia analitu wodą, zniwelowaniem tzw. szumów tła i zanieczyszczeń. Pomimo tego jednak metody te posiadają szereg wad. Są to m.in. cieplna degradacja niektórych związków lotnych czy trudności w izolacji wysokolotnych związków [17, 18]. Technika SPME nie wymaga stosowania dużych ilości próby, umożliwia izolację związków z matrycy zarówno stałych jak i ciekłych bez interferencji składników matrycy, zapewnia prosty i szybki czas zarówno przygotowania próby jak i samej ekstrakcji przy stosunkowo niskich kosztach. Umożliwia zachowanie naturalnego składu i charakterystyki próbki przy zastosowaniu niskich ciśnień i temperatur. Zapewnia także liniowość wyników w szerokim zakresie stężeń [12, 16, 17, 19, 20]. Technika SPME została już wcześniej wykorzystana w oznaczeniach aromatu chleba [8, 12, 16, 21].

Celem pracy było opracowanie warunków izolacji związków lotnych chleba do metody SPME i zastosowanie ich do oznaczenia aromatu chleba typowego (tradycyjnego pszenno-żytniego) i bezglutenowego.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. Materiał do badań

Do badań wybrano cztery chleby. Dwa reprezentowały chleb pszenno-żytni zakupiony w dwóch poznańskich piekarniach. Kolejne dwa stanowiły chleby bezglutenowe, które wybrano spośród podstawowych ich wersji oferowanych przez dwie odrębne firmy, specjalizujące się w produkcji pieczywa bezglutenowego.

2.2. Standardy związków zapachowych

3-metyl-1-butanol firmy Aldrich o czystości > 99%, octan etylu firmy Aldrich o czystości 99,8%, 1-heksanol firmy Fluka o czystości > 99,5%, furfural firmy Fluka o czystości > 98%, alkohol furfurylowy

firmy Aldrich o czystości 99%, heksanal firmy Fluka o czystości > 97%.

2.3. Odczynniki

metanol firmy Aldrich o czystości > 99,9%, woda bidestylowana, skroplony azot firmy Air Products, 2.2. CE.

2.4. Włókna

100 µm polidimetylosiloksan (PDMS) firmy "Supelco"

75 µm karboksen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS) firmy "Supelco".

2.5. Metoda izolacji

Jako metodę izolacji związków lotnych chleba wybrano mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME- Solid-Phase Microextraction). Ekstrakcję prowadzono w fiolkach o pojemności 20ml z 0,5g chleba. Chleb wcześniej zamrażano w ciekłym azocie i homogenizowano blenderem osobno skórkę i mięksisz. W celu doboru parametrów ekstrakcji wybrano ujednoliczoną skórkę. Według Bianchi'ego zawiera ona więcej związków lotnych niż mięksisz [22]. Do 0,5g rozdrobnionej skórki dodawano 10ml wody bidestylowanej i fiolkę zamykano szczelnie silikonową uszczelką. Oznaczenie wykonywano w dobranych warunkach. Używano włókna CAR/PDMS, czas ekstrakcji wynosił 30min, temperatura łaźni wodnej to 50°C. Dobór wymienionych parametrów do ekstrakcji przedstawiono w części wynikowej.

2.6. Metoda analizy chromatograficznej

Analizę chromatograficzną przeprowadzono metodą chromatografii gazowej i spektrometrii masowej przy użyciu chromatografu gazowego firmy Agilent Technologies 7890A, sprzężonego ze spektrometrem masowym 5957C VLMSD. Badane próby oznaczono przy ustalonych warunkach procesu zebranych w Tabeli 1.

Tabela 1. Parametry analizy chromatograficznej

Kolumna	Temperatura pieca*	Gaz nośny	Czas analizy	Nastrzyk	Biblioteka widm masowych
Supelcowax_10 30x0,32x0,25	Początkowa temperatura pieca 45°C przez 2 min., do 50°C, 5°C/min., do 51°C, 0,5°C/min., do 170°C, 8°C/min., do 230°C, 18°C/min., 230°C przez 8 min.	Hel	31 min. 20 sek.	Split less	NIST MS Search 2.0

*[12]

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

3.1. Dobór parametrów ekstrakcji SPME

Warunki procesu ekstrakcji SPME optymalizowano w zakresie doboru włókna, temperatury oraz czasu ekstrakcji. Przebadano dwa włókna do ekstrakcji: z powłoką karboksen/polidimetylosiloksanową (CAR/PDMS) o grubości 75 µm oraz z powłoką polidimetylosiloksanową (PDMS) o grubości 100 µm. Rysunek 1 przedstawia chromatogram aromatu chleba uzyskany przy zastosowaniu obu włókien. Do dalszych badań wybrano włókno CAR/PDMS, gdyż jak wynika z Rysunku 1, uzyskano dla niego znacznie większe powierzchnie pików.

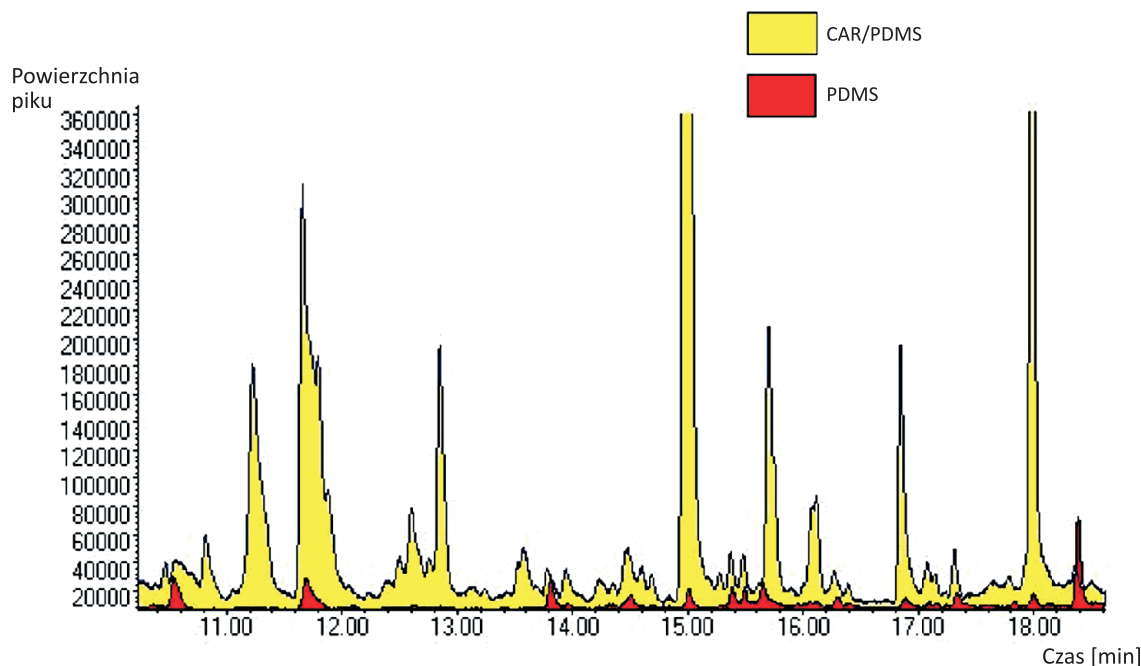
Następnie dokonano wyboru optymalnych warunków czasu i temperatury ekstrakcji. Analizowane warianty przedstawia Rysunek 2.

Rysunek 3 i Rysunek 4 przedstawiają wykresy wpływu temperatury i czasu ekspozycji włókna na wydajność ekstrakcji.

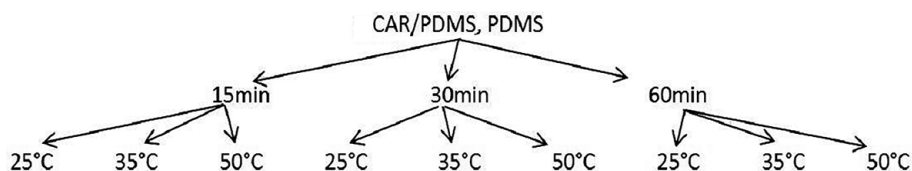
Jak wynika z przedstawionych wykresów wraz ze wzrostem czasu ekstrakcji wzrastała powierzchnia pików wybranych związków. W przedziale 30-60 minut wzrost ten był natomiast nieznaczny. Wykres na Rysunku 4 wskazuje na istotny wpływ temperatury na powierzchnie pików. Na podstawie analizy wykresów jako optymalne uznano czas 30 min i temperaturę 50°C.

3.2. Analiza jakościowa i ilościowa prób chleba

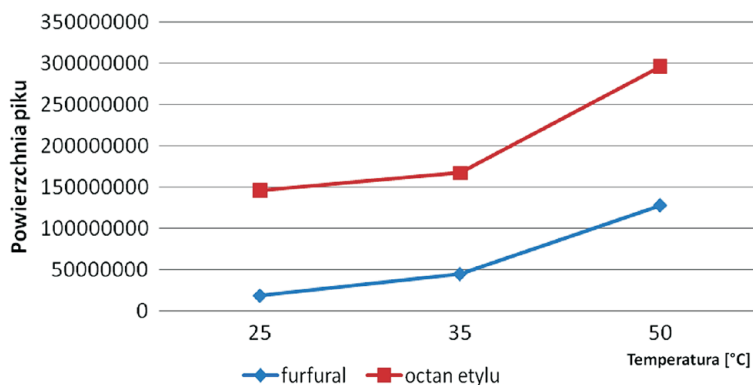
Analizę jakościową i ilościową prób chleba przeprowadzono zgodnie z parametrami ekstrakcji i analizy chromatograficznej przedstawionej w części metodycznej. Na podstawie analizy jakościowej zidentyfikowano 19 związków przedstawionych w Tabeli 2. Do analizy ilościowej wybrano 6 związków, które dominowały pod względem powierzchni pików na uzyskanych chromatogramach. Były to: furfural, heksanal, 1-heksanol, octan etylu, alkohol furfurylowy oraz 3-metyl-1-butanol.



Rysunek 1. Chromatogramy związków lotnych chleba uzyskane przy pomocy analizowanych włókien do SPME



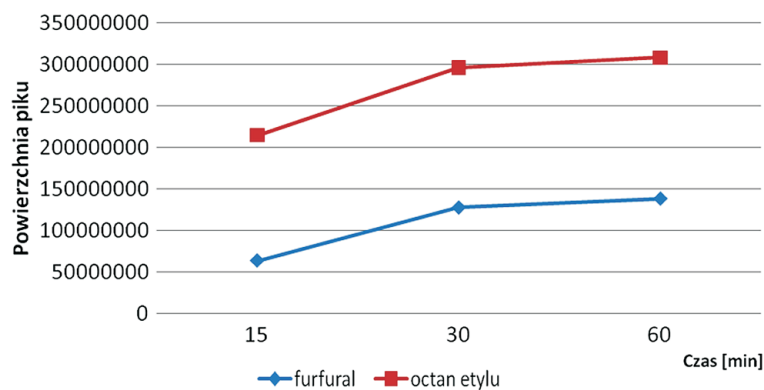
Rysunek 2. Analizowane warianty temperatury i czasu ekstrakcji



Rysunek 3. Wpływ czasu ekspozycji włókna na wydajność ekstrakcji, włókno CAR/PDMS

Analiza ilościowa wymagała przygotowania krzywych standardowych, które sporządzono stosując standardy chemiczne wymienionych związków. Korzystając z odpowiednio przygotowanych roztworów wyjściowych, otrzymano serię roztworów o różnych stężeniach. Schemat przygotowania roztworów wyjściowych oraz odpowiednie stężenia będące punktami krzywej przedstawia Rysunek 5. Dla krzywych uzyskano wysokie współczynniki regresji mieszczące się w przedziale 0,92 do 0,99. Rysunek 6 przedstawia przykładową krzywą wzorc-

wą dla 1-heksanolu o współczynniku regresji 0,99. Przy pomocy wyznaczonych krzywych wzorcowych dokonano oznaczeń ilościowych związków lotnych obecnych w badanych chlebach i porównano ich zawartość między chlebami (bezglutenowy – tradycyjny), a także w obrębie mięksiszu i skórki każdego z nich. Wyniki przedstawiono w formie wykresu z tabelą zbiorczą na Rysunku 7. Uzyskane wartości stanowią średnią z trzech powtórzeń. Jak wynika z Rysunku 7 zawartość badanych związków była znacznie wyższa w chlebie tradycyjnym



Ryunek 4. Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji, włókno CAR/PDMS

Tabela 2. Związki zidentyfikowane w analizie jakościowej chleba pszenno-żytniego

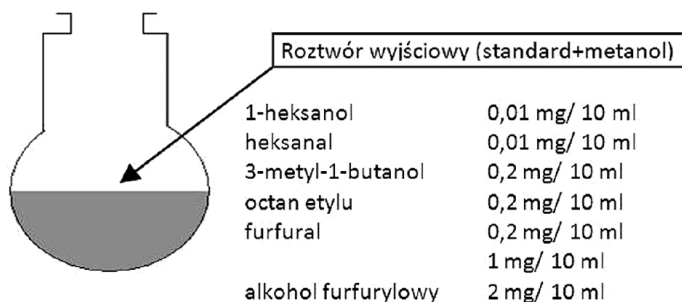
Lp.	Czas retencji	Zidentyfikowane związki
1	3,237	3-metyl-furan
2	3,393	octan etylu
3	6,588	2,3-pentanedion
4	7,087	heksanal
5	8,031	octowy 3-metyl-1-butanol
6	10,013	3-metyl-1-butanol
7	10,685	2-pentylfuran
8	11,361	metylpirazyna
9	12,540	2,6-dimetylpirazyna
10	12,730	etylpirazyna
11	12,886	1-heksanol
12	13,921	nonanal
13	14,811	heptanol
14	15,108	furfural
15	15,405	2-etyl-1-heksanol
16	16,233	benzaldehyd
17	16,419	2-nonenal (E)
18	18,109	alkohol furfurylowy
19	21,555	alkohol feniloetylowy

niż w bezglutenowym. Skórka i miększ chleba różniły się zawartością badanych składników. W miększu chleba tradycyjnego dominował 3-metyl-1-butanol, a w chlebie bezglutenowym alkohol furfurylowy. W przypadku skórki dominował alkohol furfurylowy zarówno w chlebie tradycyjnym jak i bezglutenowym.

4. PODSUMOWANIE I DISKUSJA

Wykorzystano mikroekstrakcję do fazy stałej SPME jako szybką, nowoczesną oraz coraz bardziej powszechną metodę w analizie aromatu. Niektórzy autorzy, jak Ruiz, jako optymalne warunki do analizy chleba tą techniką uznali temperaturę ekstrakcji 50°C, w czasie 60 minut z zastosowaniem włókna CAR/PDMS [16]. Inni natomiast uznali jako najbardziej optymalne temperaturę ekstrakcji 35°C, w czasie 30 lub 60 minut z zastosowaniem włókien: CAR/PDMS i CAR/PDMS/DVD [12]. W tej pracy jako optymalne wybrano warunki: temperatura ekstrakcji 50°C, w czasie 30min z zastosowaniem włókna CAR/PDMS. W tych warunkach uzyskano krzywe kalibracyjne o wysokich współczynnikach regresji dla różnych związków, występujących w największych ilościach w próbach chleba tradycyjnego, które również w literaturze uznano jako główne odoranty chleba: **octan etylu** [23,24], **3-metyl-1-butanol** [16], **heksanal** [12, 16, 23, 24, 25, 26], **1-heksanol** [12, 16, 23, 24], **furfural** [12, 16, 23, 24] oraz **alkohol furfurylowy** [12, 23]. Opracowane parametry SPME/GC/MS pozwoliły na porównanie aromatu chleba tradycyjnego z bezglutenowym.

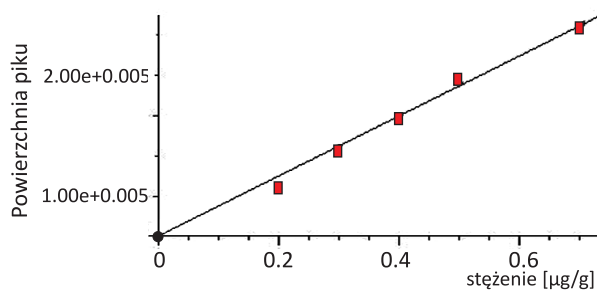
Dobór optymalnych warunków izolacji związków lotnych chleba przy pomocy SPME, ich analiza jakościowa jak i ilościowa za pomocą chromatografii gazowej i spektrometrii masowej pozwolą na identyfikację związków lotnych charakteryzujących aromat różnych wariantów chlebów bezglutenowych. Opracowana metoda i uzyskane wyniki będą wykorzystane w podjęciu próby poprawy aromatu chlebów bezglutenowych.



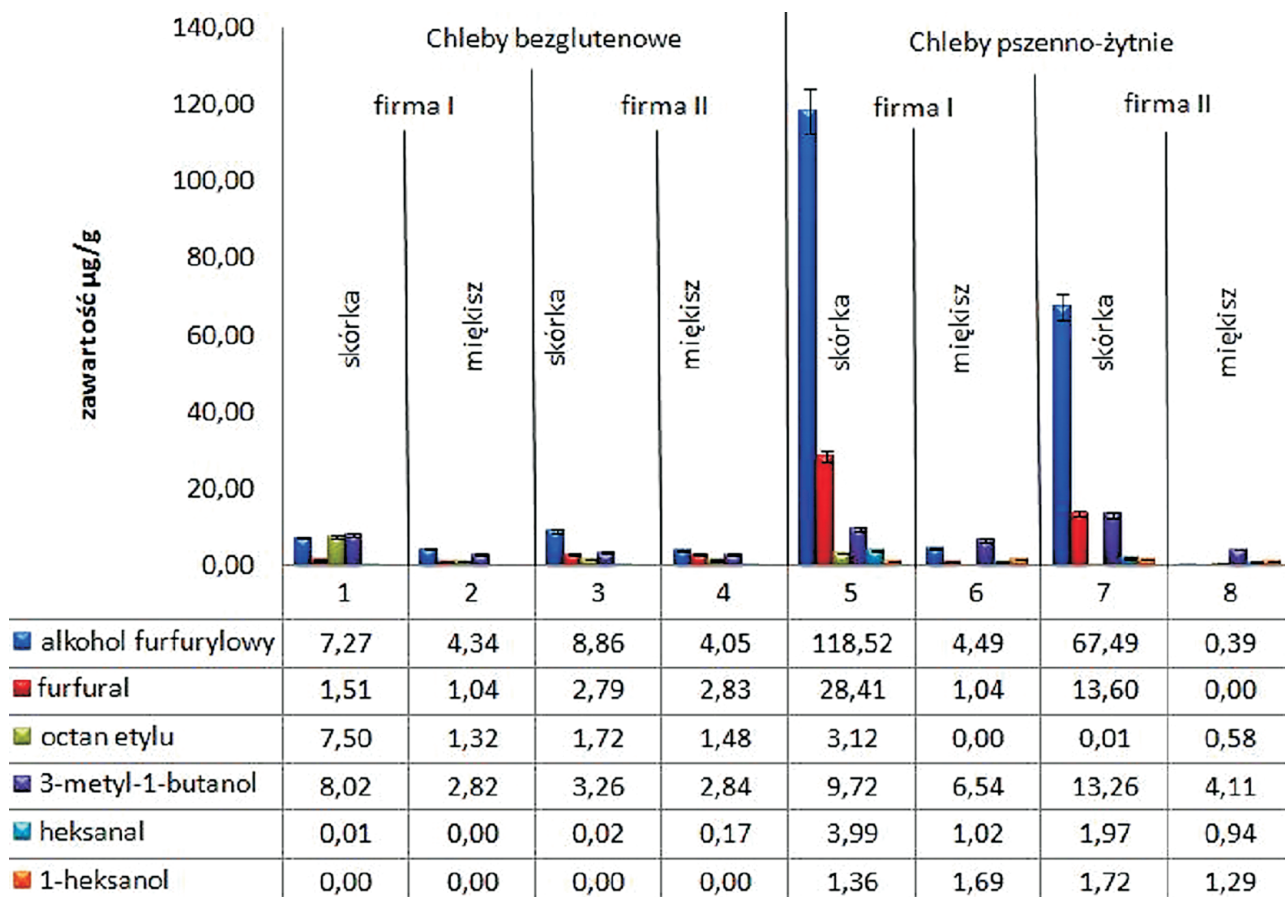
Stężenia roztworów będące punktami krzywej wzorcowej

1-heksanol	0,2 µg/g; 0,3 µg/g; 0,4 µg/g; 0,5 µg/g; 0,7 µg/g
heksanal	0,5 µg/g; 0,8 µg/g; 0,9 µg/g; 1 µg/g; 1,1 µg/g; 1,3 µg/g
3-metyl-1-butanol	2 µg/g; 4 µg/g; 6 µg/g; 8 µg/g; 10 µg/g
octan etylu	0,8 µg/g; 2 µg/g; 4 µg/g; 6 µg/g; 8 µg/g
furfural	2 µg/g; 4 µg/g; 6 µg/g; 8 µg/g; 10 µg/g; 20 µg/g; 30 µg/g
alkohol furfurylowy	20 µg/g; 40 µg/g; 60 µg/g; 80 µg/g; 120 µg/g

Rysunek 5. Schemat przygotowania krzywych wzorcowych



Rysunek 6. Krzywa standardowa dla 1-heksanolu



Rysunek 7. Zawartość wybranych związków lotnych w badanych próbach chleba

LITERATURA

- [1] Cayot N., „Sensory quality of traditional foods”, *Food Chem.*, 101, 154-162, 2007.
- [2] Gellynck X., Kuhne B., Bockstaele F., Walle D., Dewettinck K., “Consumer perception of bread quality”, *Appetite*, 53, 16-23, 2009.
- [3] Świdorski F., praca zbiorowa „Żywność wygodna i żywność funkcjonalna”, Warszawa Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1999, 74-83.
- [4] Stelmaszczyk-Kusz A., Kozłowska K., Brzozowska A., „Substancje aromatyczne do żywności, bezpieczeństwo stosowania i metody szacowania ich spożycia”, *Przem. Spoż.*, 4, 24-27, 1998.
- [5] Bal K., Nagielska A., Skąpska S., „Aromaty proszkowe przyszłość polskiego przemysłu spożywczego”, *Przem. Spoż.*, 7, 21-23, 1997.
- [6] Schuppan D., Junker Y., Barisani D., “Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies”, *Gastroenterology*, 137, 1912-1933, 2009.
- [7] Darewicz M., Dziuba J., „Dietozależny charakter enteropatii pokarmowych na przykładzie celiakii”, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (50), 5-15, 2007.
- [8] Poinot P., Arvisenet G., Grua-Priol J., Colas D., Fillonneau C., Le Bail A., Prost C., “Influence of formulation and process on the aromatic profile and physical characteristics of bread”, *J. Cereal Sci.*, 48, 686-697, 2008.
- [9] Kamiński E., Wąsowicz E., Przybylski R., „The effect of thermally treated malt additives to bread flavor”, “Characterization, production and application of food flavors”, *Proceedings of the 2nd Wartburg Aroma Symposium*, Akademie-Verlag, Berlin, listopad, 1988, 153-163.
- [10] Michalska A., Zieliński H., “Produkty reakcji Mailarda w Żywności”, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (51), 5-16, 2007.
- [11] Boekel M.A.J.S., „Formation of flavour compounds in the Maillard reaction”, *Biotechnology Advances*, 24, 230-233, 2006.
- [12] Poinot P., Grual-Priol J., Arvisenet G., Rannou C., Semenou M., Le Bail A., Prost C., “Optimalisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts”, *Food Res. Intern.*, 40, 1170-1184, 2007.
- [13] Heenan S. P., Dufour J-P., Hamid N., Harvey W., Delahunty C. M., “Characterisation of fresh bread flavor: Relationships between sensory characteristic and volatile composition”, *Food Chem.*, 116, 249-257, 2009.
- [14] Schieberle P., Grosch W., “Identification of the Volatile Flavour Compounds of Wheat Bread Crust – Comparison with Rye Bread Crust”, *Z Lebensm Unters Forsch*, 180, 474-478, 1985.
- [15] Chang Ch., Seitz L., Chambers IV E., “Volatile Flavor Components of Breads Made from Hard Red Winter Wheat and Hard White Winter Wheat”, *Cereal Chem.*, 72(3), 237-242, 1995.
- [16] Ruiz J.A., Quilez J., Mestres M., Guasch J., “Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Volatile Compounds in Bread Crumb”, *Cereal Chem.*, 80(3), 255-259, 2003.
- [17] Jeleń H., Kamiński E., Wąsowicz E., „Application of Solid Phase Microextraction (SPME) for the analysis of food volatiles”, “Flavour 2000 Perception, release, evaluation, formation, acceptance, nutrition/health”, *Proceedings of the 6th Wartburg Symposium Eisenach*, Eigenverlag Bergholz-Rehbrücke, kwiecień, 2000, 115-122.
- [18] Sides A., Robards K., Helliwell S., “Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods”, *Trends Anal. Chem.*, 19(5), 322-329, 2000.
- [19] Staschenko E., Martinez J., „Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase microextraction” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 235-242, 2007.
- [20] Jeleń H., “Związki zapachowe żywności wyzwanie dla analityka”, *Przem. Spoż.*, 5, 18-47, 2004.
- [21] Poszepczyńska T., Jeleń H., Góra J., „The effect of pomace from seed of evening primrose (*Oenothera paradoxa*) on the aroma of bread”, “Flavour 2000 Perception, release, evaluation, formation, acceptance, nutrition/health”, *Proceedings of the 6th Wartburg Symposium Eisenach*, Eigenverlag Bergholz-Rehbrücke, kwiecień, 2000, 396-399.
- [22] Bianchi F., Careri M., Chiavaro E., Musci M., Vittandini E., “Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of the Italian Protected Designation of Origin “Altamura” bread volatile profile” *Food Chem.*, 110, 787-793, 2008.
- [23] Maeda T., Kim H. J., Ubukata Y., Morita N., „Analysis of volatile compounds in polished-graded wheat flour bread using headspace sorptive extraction”, *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 457-465, 2009.
- [24] Schieberle P., Grosch W., “Bread Flavour: Qualitative and Quantitative analysis” “Characterization, production and application of food flavors”, *Proceedings of the 2nd Wartburg Aroma Symposium*, Akademie-Verlag, Berlin, listopad, 1988, 139-151.
- [25] Kirchoff E., Schieberle P., “Studies on the crumb flavour of three-stage sourdough rye bread”, “Flavour 2000 Perception, release, evaluation, formation, acceptance, nutrition/health” , *Proceedings of the 6th Wartburg Symposium Eisenach*, Eigenverlag Bergholz-Rehbrücke, kwiecień, 2001, 179-189.
- [26] Schieberle P., Czerny M., “Important Aroma Compounds in Freshly Ground Wholemeal and White Flour – Identification and Quantitative Changes during Sourdough Fermentation”, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6835-6840, 2002.