

Određivanje hlapivih komponenata arome kulena

Marušić Radovčić¹, N., A. Brekalo¹, T. Jančić¹, S. Vidaček¹, G. Kušec², H. Medić¹

Originalni znanstveni rad

SAŽETAK

Kulen je tradicionalni mesni proizvod s područja istočne Hrvatske koji se ubraja u fermentirane trajne kobasice. Tijekom procesiranja fermentiranih proizvoda odvijaju se brojne enzimске i neenzimске reakcije koje dovode do povećanja koncentracije hlapivih komponenata arome. Te komponente su odgovorne za specifične okusne i mirisne osobine ovog proizvoda koje su najzaslužnije za percepciju kvalitete kod potrošača. Za ekstrakciju tih spojeva iz uzoraka korištena je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine. Plinsko-kromatografsko-masenom spektrometrijskom analizom uzoraka identificirana su 104 hlapiva spoja arome. Identificirani spojevi su pripadali sljedećim kemijskim grupama: terpenima, aldehidima, organosumpornim spojevima, ketonima, aromatskim ugljikovodicima, kiselinama, esterima i laktovima, furanima, benzofuranima i pirazinima, alkoholima, terpenima i alkanima i alkenima. Fenoli, aldehidi, ketoni i organosumporni spojevi su najzastupljeniji spojevi u kulenu.

Ključne riječi: kulen, plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS), aroma, hlapive komponente

UVOD

Kulen je poznati tradicionalni mesni proizvod s područja istočne Hrvatske koji se ubraja u trajne fermentirane kobasice. Proizvodi se po tradicionalnoj recepturi od usitnjenog svinjskog mesa uz dodatak čvrstog masnog tkiva, soli i začina (crvena slatka paprika, ljuta paprika, češnjak i papar). Nadjeva se u slijepo svinjsko crijevo. Nadjeveno crijevo se tijekom najmanje 90 dana podvrgava sukcesivnim procesima fermentacije, hladnog dimljenja, sušenja i zrenja. Specifična aroma ovog proizvoda jedna je od najbitnijih parametara kvalitete. Tijekom proizvodnje fermentiranih kobasica odvijaju se brojne enzimске i neenzimске reakcije poput razgradnje proteina, razgradnje i oksidacije lipida, Maillardove reakcije i reakcije Streckerove razgradnje. Te reakcije dovode do povećanja koncentracije hlapivih komponenata – aldehida, karboksilnih kiselina, alkohola, ketona, estera kao i sumpora, dušika i ostalih komponenata koje utječu na samu aromu proizvoda. Aroma je izuzetno važna za prihvatljivost menih proizvoda. U aromi fermentiranih kobasica nađeno je oko 400 hlapivih spojeva. Sastav i kvantiteta hlapivih spojeva ovisi o tipu upotrebljenog

mesa, dodanim začinima, primjenjenom tretmanu dimljenja, dužini procesa zrenja i drugim čimbenicima.

Cilj ovog istraživanja je odrediti hlapive spojeve plinsko kromatografsko-masenom spektrometrijskom (GC-MS) analizom uzoraka tradicionalnog hrvatskog proizvoda-kulena.

MATERIJAL I METODE

Uzorak

U ovom istraživanju ispitivana su 24 uzoraka kulena koji su proizvedeni na području Baranje i Slavonije te su sudjelovali na kulenijadi u Jagodnjaku.

Analiza hlapivih spojeva

Uzorci kulena homogenizirani su u komercijalnom procesoru hrane uz dodatak zasićene otopine NaCl-a. 10 mL uzorka kvantitativno je preneseno u stakleni vial od 20 mL u koji je prethodno postavljen magnet za miješanje i zatvoreno sa PTEF septumom. SPME vlakno korišteno u ispitivanjima, obloženo je DVB/Carboxen/PDMS punilom (divinilbenzen/karboksen/poli-dimetilsiloksan) debljine 50/30µm, 2 cm duljine. Prije same ekstrakcije kon-

¹ Dr. sc. Nives Marušić Radovčić; Ana Brekalo, dipl.ing.; Tibor Jančić, dipl.ing., dr. sc. Sanja Vidaček, dr. sc. Helga Medić, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

² Prof.dr.sc. Goran Kušec, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera, Kralja Petra Svačića 1d, 31 000 Osijek

Autor za korespondenciju: zycxvxxvxx FALI!!

dicionirano je 2 minute na 240°C. Uzorci su stavljeni u vodenu kupelj na 40°C te je ekstrakcija provedena kroz 60 minuta uz konstantno miješanje. Odmah po završetku ekstrakcije SPME vlakno izvađeno iz uzorka, injektirano je u 6890N plinski kromatograf (GC) povezan sa 5975i masenim spektrometrom (MS). Prethodno adsorbirani analiti, pod utjecajem visoke temperature, desorbirani su sa vlakana.

Temperatura injektora u splitless modu bila je 230°C, a vrijeme desorpcije 2 minute. Plin nosilac je bio helij s protokom 1,5 mL/min. Separacija hlapivih spojeva izvršena je na ZB-5MS, 30m X 0,25 mm ID x 0,25µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) koloni ovim temperaturnim programom: početna temperatura 40°C – 10°C min; 200°C, 5°C/min; 250°C, 20°C/min- 5 min. Energija elektrona za ionizaciju molekula uzoraka bila je 70 eV. Parametri masenog spektrometra postavljeni su na brzinu očitavanja od 1 očitak/s (scan/s) i opseg razdvajanja mase i naboja (m/z) u rasponu od 50-450 (Marušić i sur., 2011).

Kako bi se izračunala retencijska vremena izdvojenih hlapivih spojeva prethodno je pripremljena smjesa C8-C20 n-alkana i analizirana pod istim kromatografskim uvjetima kao i uzorci pršuta. Identifikacija hlapivih spojeva provedena je usporedbom dobivenih masenih spektara sa onima sadržanima u NIST 2005 bazi podataka, verzija 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, USA), te usporedbom dobivenih retencijskih indeksa sa vrijednostima u literaturi (Adams, 2001 i in-house library) i pomoću AMDIS 32 kompjuterskog programa (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

REZULTATI I RASPRAVA

Analiza hlapivih spojeva

Iz tablice 1. vidljivo je da je plinsko kromatografsko-masenom spektrometrijskom (GC-MS) analizom uzoraka kulena nađena 104 hlapiva spoja arome: 31 fenol, 10 aldehida, 10 alkana i alkena, 9 kiselina, 9 estera i laktona, 9 ketona, 9 aromatskih ugljikovodika, 6 furana, benzofurana i pirazina, 5 terpena, 3 alkohola i 3 organosumporna spoja. Identificirani spojevi pripadaju slijedećim kemijskim grupama spojeva: fenoli (49%), aldehidi (14%), organosumporni spojevi (7%), ketoni (7%), aromatski ugljikovodici (4%), kiseline (4%), esteri i laktoni (3%), furani, benzofurani i pirazini (3%), alkoholi (3%), terpeni (3%) i alkani i alkeni (3%) (slika 1). Fenoli, aldehidi, ketoni i organosumporni spojevi su najzastupljeniji spojevi u kulenu.

Proteolitički i lipolitički enzimi igraju važnu ulogu u formiranju hlapivih spojeva. Hlapive tvari arome nastaju reakcijama kemijske ili enzimске oksidacije nezasićenih masnih kiselina i te daljnjim interakcijama s proteinima, peptidima i slobodnim aminokiselinama (Krvavica i sur., 2010). Također hlapivi spojevi nastaju i Streckerovom razgradnjom slobodnih aminokiselina.

Po broju spojeva, najzastupljenija kemijska skupina spojeva u analiziranim uzorcima su fenoli. Identificiran je 31 fenol, a zauzimaju 49% ukupne površine identificiranih spojeva. S obzirom da je kulen proizvod u čiju je proizvodnju uključen i proces dimljenja, onda je očekivana identifikacija fenolnih spojeva kao i derivata furana i 2-ciklopenten-1-ona jer su to spojevi koji su karakteristični za dim od drveta nastao pirolizom celuloze, hemiceluloze i lignina (Maga, 1987). U procesu dimljenja, komponente dima se apsorbiraju na površini kulena gdje reagiraju ili ostvaruju jače ili slabije veze sa komponentama kobasice. Zbog toga će prilikom analize (HS-SPME) pare iznad otopine sadržavati samo one spojeve dima koji su apsorbirani na površinu, ali koji nisu reagirali ili ostvarili jače interakcije (Guillén i sur., 2006). Najzastupljeniji od fenolnih spojeva su bili: fenol (10,20%), 2-metoksifenol (8,78%), 2-metoksi-4-metilfenol (4,81%), 4-etil-2-metoksifenol (2,74%), 2-metilfenol (2,74%), 3-metilfenol (2,70%) i 4-metilfenol (2,25%). Metoksifenoli i fenoli su aromatski spojevi sa aromom po dimu, paljevini, zagorenome („pungent“, „cresolic“, „heavy“, „burnt“ i „smoky“) (Guillén i Manzanos, 2002) i imaju antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Metoksifenoli iz dima imaju strukturu koja odgovara strukturi lignina drva (Jerković i sur., 2007). Prag detekcije je između 0,1 i 1 ng/L (Hiero i sur., 2004) i upravo te niske vrijednosti čine metoksifenole i fenole jednim od bitnijih spojeva koji utječu na aromu kulena.

Ketoni zauzimaju 7% ukupne površine identificiranih spojeva. Identificirano je 9 spojeva. 7 spojeva su derivati 2-ciklopenten-1-ona koji su najvjerojatnije nastali Maillardovim reakcijama složenih ugljikohidrata (celuloze) nastale pirolizom tijekom dimljenja (Jerković i sur., 2010). Ostali spojevi potječu od lipidne oksidacije. Najzastupljeniji spojevi su bili 2-metil-2-ciklopenten-1-on (1,67%), 3-etil-2-ciklopenten-1-on (1,62%) koji je nositelj snažnog mirisa i okusa (Cutzach i sur., 1997) te acetofenon (1,30%).

Furani, benzofurani i pirazini zauzimaju 3% ukupne površine identificiranih spojeva. Furani potječu od dima i Maillardovih reakcija. Najzastupljeniji su bili benzofuran (0,77%), 2-pentilfuran (0,59%) i 2,3-dihydrobenzofuran (0,48%). Derivati furana daju note arome po karameli, slatkome, zagorenome i šećerne note (Viani i Horman, 1974). Od pirazina je najzastupljeniji bio trimetilpirazin (0,69%).

Oksidacija lipida je glavni faktor koji ima utjecaja na kvalitetu i prihvatljivost mesnih proizvoda (Morrissey i sur., 1998). Aldehidi su glavni sekundarni produkti oksidacije lipida i druga su najzastupljenija grupa spojeva u analiziranim uzorcima. Zauzeli su 14% ukupne površine identificiranih uzoraka. Najzastupljeniji među njima bili su benzenacetaldehid (5,90%), benzaldehid (3,42%), nonanal (1,60%) i heksanal (1,57%). Heksanal je u literaturi opisan kao glavni produkt oksidacije u trajnim suhomesnatim proizvodima. Aroma heksanala može se opisati kao zelena i masna

Tablica 1. Udio hlapivih spojeva u uzorcima slavonskog kulena (% od ukupne površine)

Table 1. The share of volatile compounds in samples of Slavonian kulen (percentage of the total area)

SPOJEVI / VOLATILES	RI	Min	Max	Srednja vrijednost Mean	STDEV	Identifikacija Identification
KISELINE / ACIDS						
2-metilbutanska kiselina 2-Methylbutanoic acid	840	0,00	0,68	0,14	0,22	MS,RI
Oktanska kiselina/Octanoic acid	1183	0,00	1,22	0,17	0,39	MS,RI
Nonanska kiselina/Nonanoic acid	1285	0,00	3,58	0,57	0,96	MS,RI
Dekanska kis./Decanoic acid	1379	0,00	1,96	0,64	0,60	MS,RI
3-hidroksi-4-metoksi benzenska k. 3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid	1447	0,00	1,47	0,32	0,34	MS,RI
Tetradekanska kiselina Tetradecanoic acid	1764	0,00	4,22	0,26	0,85	MS,RI
Pentadekanska kiselina Pentadecanoic acid	1865	0,00	1,66	0,19	0,36	MS,RI
Hekسادekanska kiselina Hexadecanoic acid	1975	0,00	2,29	0,30	0,59	MS,RI
9-Oktadekanska kiselina 9-Octadecenoic acid	2091	0,00	12,39	1,18	2,95	MS,RI
			Ukupno Total	3,77		
ALDEHIDI / ALDEHYDES						
Heksanal/Hexanal	805	0,00	7,37	1,57	2,01	MS,RI
2-heptenal / 2-Heptenal	966	0,00	2,09	0,32	0,52	MS,RI
Benzaldehid / Benzaldehyde	970	0,00	22,73	3,42	5,04	MS,RI
Benzenacetaldhid Benzeneacetaldehyde	1048	0,00	22,34	5,90	7,20	MS,RI
2,4-heptadienal/2,4-Heptadienal	1061	0,00	1,73	0,47	0,52	MS,RI
Nonanal/Nonanal	1105	0,00	4,38	1,60	1,10	MS,RI
2-nonenal/2-Nonenal	1159	0,00	1,18	0,14	0,33	MS,RI
4-hidroksi-3-metoksi benzaldehid 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	1399	0,00	1,19	0,18	0,25	MS,RI
Hekسادekanal/Hexadecanal	1815	0,00	2,24	0,60	0,74	MS,RI
(Z)-9-oktadecenal/(Z)-9-Octadecenal	1992	0,00	0,43	0,10	0,14	MS,RI
			Ukupno Total	14,3		
FURANI, BENZOFURANI, PIRAZINI/FURANS, BENZOFURANES, PYRAZINES						
2-pentilfuran/2-Pentylfuran	990	0,00	2,59	0,59	0,61	MS,RI
2-furfuril acetat/2-Furfuryl-acetate	995	0,00	2,79	0,44	0,56	MS,RI
Benzofuran/Benzofuran	1001	0,00	3,44	0,77	0,72	MS,RI
Trimetilpirazin/Trimethylpyrazine	1007	0,00	1,96	0,69	0,53	MS,RI
2,3-dihidrobenzofuran Trimethylpyrazine	1226	0,00	1,86	0,48	0,51	MS,RI
Dibenzofuran	1538	0,00	0,65	0,08	0,15	MS,RI
			Ukupno Total	3,05		
TERPENI / TERPENES						
Alfa-terpinen/ α -Terpinene	1018	0,00	1,43	0,27	0,40	MS,RI
Limonen/ Limonene	1033	0,00	3,09	0,69	0,69	MS,RI
Linalol/ Linalool	1096	0,00	8,07	1,05	1,74	MS,RI
Kopaen/ Copaene	1372	0,00	0,34	0,02	0,09	MS,RI
B-kariofilen/ β -Caryophyllene	1434	0,00	5,02	0,88	1,71	MS,RI
			Ukupno Total	2,91		
ALKOHOLI / ALCOHOLS						
2-furanmetanol/2-Furanmethanol	853	0,00	2,45	0,70	0,88	MS,RI
Benzil alkohol/ Benzyl alcohol	1036	0,00	13,00	1,60	2,78	MS,RI
2-feniletanol/ 2-Phenylethanol	1117	0,00	2,33	0,68	0,62	MS,RI
			Ukupno Total	2,98		
ESTERI I LAKTONI / ESTERS AND LACTONES						
Etil-2-metil butanoat Ethyl 2-methylbutanoate	851	0,00	2,37	0,14	0,48	MS,RI
Pantolaktan / Pantolactone	1043	0,00	3,90	0,96	0,94	MS,RI
Metil dekanat/ Methyl decanoate	1325	0,00	1,57	0,48	0,42	MS,RI
Etil dekanat/ Ethyl decanoate	1387	0,00	4,95	0,90	1,27	MS,RI
Bis (2-metilpropil) butanoat Bis(2-methylpropyl)butanoate	1477	0,00	0,43	0,11	0,13	MS,RI

SPOJEVI / VOLATILES	RI	Min	Max	Srednja vrijednost Mean	STDEV	Identifikacija Identification
Bis (2-metilpropil) heksadekanoat Bis(2-methylpropyl)hexadecanoate	1683	0,00	1,21	0,16	0,28	MS,RI
Metil heksadekanoat Methyl hexadecanoate	1926	0,00	0,61	0,10	0,17	MS,RI
Dibutil ftalat/Dibutyl phthalate	1963	0,00	1,59	0,33	0,50	MS,RI
Etil heksadekanoat Ethyl hexadecanoate	1996	0,00	0,35	0,09	0,11	MS,RI
Izopropil palmitat Isopropyl palmitate	2023	0,00	0,48	0,10	0,13	MS,RI
			Ukupno Total	3,37		
ALKANI I ALKENI / ALKANES AND ALKENES						
4-metilundekan 4-Methylundecane	1103	0,00	1,78	0,79	0,58	MS,RI
Tridekan / Tridecane	1305	0,00	2,70	0,69	0,85	MS,RI
Tetradekan/Tetradecane	1404	0,00	0,87	0,21	0,18	MS,RI
Pentadekan/Pentadecane	1502	0,00	0,50	0,15	0,12	MS,RI
Hekسادekan/Hexadecane	1600	0,00	0,70	0,09	0,15	MS,RI
Heneikozan/Heneicosane	2105	0,00	0,44	0,05	0,10	MS,RI
3,4-dimetil-2,4-heksadien 3,4-Dimethyl-2,4-hexadiene	1028	0,00	1,87	0,41	0,53	MS,RI
2,6-di(terc-butil)-4-hidroksi- 4-metil-2,5-cikloheksan 2,6-Di(tert-butyl)-4-hydroxy- 4-methyl-2,5-cyclohexane	1471	0,00	1,22	0,13	0,26	MS,RI
Ciklodekan/Cyclodecane	1680	0,00	0,58	0,12	0,17	MS,RI
Eikozan/ Eicosane	1803	0,00	1,16	0,13	0,24	MS,RI
			Ukupno Total	2,77		
KETONI / KETONES						
2-metil-2-ciklopenten-1-on 2-Methyl-2-cyclopenten-1-one	909	0,00	17,18	1,67	4,10	MS,RI
3-metil-2-ciklopenten-1-on 3-Methyl-2-cyclopenten-1-one	967	0,00	1,39	0,25	0,37	MS,RI
3,4-dimetil-2-ciklopenten-1-on 3,4-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	997	0,00	2,28	0,46	0,55	MS,RI
1-(2-furanil)-1-propanon 1-(2-Furanyl)-1-propanone	1011	0,00	0,88	0,29	0,27	MS,RI
3-metil-1,2-ciklopentadijon 3-Methyl-1,2-cyclopentadiene	1029	0,00	0,54	0,06	0,16	MS,RI
2,3-dimetil-2-ciklopenten-1-on 2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	1040	0,00	1,67	0,30	0,61	MS,RI
Acetofenon/ Acetophenone	1075	0,00	8,05	1,30	1,95	MS,RI
3-etil-2-ciklopenten-1-on 3-Ethyl-2-cyclopenten-1-one	1083	0,00	9,07	1,62	2,56	MS,RI
3-etil-2-hidroksi- 2-ciklopenten-1-on 3-Ethyl-2-hydroxy- 2-cyclopenten-1-one	1122	0,00	2,33	0,67	0,60	MS,RI
			Ukupno Total	6,62		
FENOLI / PHENOLS						
Fenol / Phenol	985	0,00	23,21	10,20	5,71	MS,RI
2-metilfenol/2-Methylphenol	1057	0,00	5,84	2,74	1,82	MS,RI
3-metilfenol/3-Methylphenol	1079	0,00	8,68	2,70	3,21	MS,RI
4-metilfenol/4-Methylphenol	1087	0,00	9,94	2,25	3,34	MS,RI
2-metoksifenol/2-Methoxyphenol	1092	0,00	23,40	8,78	5,26	MS,RI
2,6-dimetilfenol/2,6-Dimethylphe- nol	1112	0,00	1,98	0,76	0,57	MS,RI
2-etilfenol/2-Ethylphenol	1139	0,00	5,22	0,52	1,01	MS,RI
2,4-dimetilfenol 2,4-Dimethylphenol	1152	0,00	3,28	1,00	0,81	MS,RI
2,5-dimetilfenol/ 2,5-Dimethylphenol	1154	0,00	1,34	0,58	0,44	MS,RI
3,5-dimetilfenol 3,5-Dimethylphenol	1166	0,00	1,93	0,45	0,65	MS,RI

SPOJEVI / VOLATILES	RI	Min	Max	Srednja vrijednost Mean	STDEV	Identifikacija Identification
4-etilfenol/4-Ethylphenol	1169	0,00	2,76	1,15	0,76	MS,RI
3-etilfenol/3-Ethylphenol	1173	0,00	1,91	0,66	0,57	MS,RI
3,4-dimetilfenol 3,4-Dimethylphenol	1174	0,00	3,30	0,72	0,80	MS,RI
2,3-dimetilfenol 2,3-Dimethylphenol	1180	0,00	1,75	0,65	0,45	MS,RI
4-metoksi-3-metilfenol 4-Methoxy-3-methylphenol	1182	0,00	1,55	0,38	0,44	MS,RI
2-metoksi-5-metilfenol 2-Methoxy-5-methylphenol	1190	0,00	9,01	0,60	1,93	MS,RI
2-metoksi-4-metilfenol 2-Methoxy-4-methylphenol	1196	0,00	10,40	4,81	3,36	MS,RI
2,4,6-trimetilfenol 2,4,6-Trimethylphenol	1203	0,00	1,59	0,53	0,38	MS,RI
2-etil-6-metilfenol 2-Ethyl-6-methylphenol	1229	0,00	1,25	0,43	0,44	MS,RI
2-etil-5-metilfenol 2-Ethyl-5-methylphenol	1246	0,00	1,18	0,28	0,25	MS,RI
3-etil-5-metilfenol 3-Ethyl-5-methylphenol	1251	0,10	0,81	0,31	0,18	MS,RI
2-metil-6-propilfenol 2-Methyl-6-propylphenol	1261	0,00	1,26	0,47	0,35	MS,RI
2,3,5-trimetilfenol 2,3,5-Trimethylphenol	1268	0,00	1,78	0,63	0,51	MS,RI
4-etil-2-metoksifenol 4-ethyl-2-methoxyphenol	1282	0,00	5,95	2,74	1,75	MS,RI
4-vinil-2-metoksifenol 4-Vinyl-2-methoxyphenol	1311	0,00	1,03	0,47	0,29	MS,RI
2,6-dimetoksifenol 2,6-Dimethoxyphenol	1353	0,00	3,83	1,67	0,91	MS,RI
2-metoksi-4-(2-propenil)-fenol 2-Methoxy-4-(2-propenyl)-phenol	1360	0,00	2,98	0,80	0,70	MS,RI
Eugenol/ Eugenol	1364	0,00	1,52	0,44	0,47	MS,RI
2-metoksi-4-propilfenol 2-Methoxy-4-propylphenol	1370	0,00	1,44	0,58	0,43	MS,RI
2-metoksi-4-(1-propenil)-fenol 2-Methoxy-4-(1-propenyl)-phenol	1411	0,00	0,72	0,24	0,22	MS,RI
4-metil-2,6-bis(1,1-dimetil)-fenol 4-Methyl-2,6-bis(1,1-dimethyl)-phenol	1517	0,00	0,58	0,11	0,12	MS,RI
			Ukupno Total	48,65		
AROMATSKI UGLJIKOVODICI / AROMATIC HYDROCARBONS						
1,3-dimetilbenzen (m-ksilen) 1,4-Dimethylbenzene (m-Xylene)	873	0,00	2,90	0,62	0,86	MS,RI
1,2-dimetoksibenzen 1,2-Dimethoxybenzene	1147	0,10	1,95	0,61	0,45	MS,RI
1,4-dimetoksibenzen 1,4-Dimethoxybenzene	1186	0,00	1,05	0,42	0,37	MS,RI
Naftalen/ Naphthalene	1198	0,00	13,53	1,33	2,98	MS,RI
1-etil-4-metoksibenzen 1-Ethyl-4-methoxybenzene	1234	0,00	1,26	0,37	0,38	MS,RI
3,4-dimetoksitoluen 3,4-Dimethoxytoluene	1240	0,00	1,25	0,48	0,41	MS,RI
1,2,3-trimetoksibenzen 1,2,3-Trimethoxybenzene	1296	0,00	0,87	0,11	0,21	MS,RI
Butilirani hidroksitoluen Butylated hydroxytoluene	1511	0,00	0,87	0,23	0,22	MS,RI
2,3,5-trimetoksitoluen 3,4,5-Trimethoxytoluene	1524	0,00	0,37	0,11	0,11	MS,RI
			Ukupno Total	4,28		
ORGANOSULFURNE KOMPONENTE / ORGANOSULFUR COMPOUNDS						
Dialil disulfid / Diallyl disulfide	859	0,51	17,55	6,34	4,78	MS,RI
Metil alil disulfid Methyl allyl disulfide	921	0,10	0,98	0,42	0,27	MS,RI
Dialil trisulfid / Diallyl trisulfide	1298	0,00	0,33	0,12	0,12	MS,RI
			Ukupno Total	6,88		

(„green, grassy, fatty“) (García-Gonzalez i sur., 2008) aroma. Nonanal doprinosi ukupnom osjetu arome sa slatkom i voćnom aromom („sweet, fruity“) (Nunes i sur., 2008).

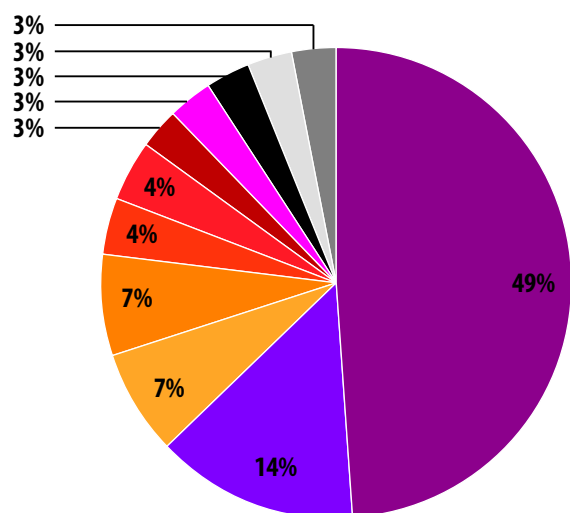
Spojevi koji također potječu od oksidacije lipida su alkani i alkoholi. Oni mogu nastati oksidacijom metil razgranatih masnih kiselina koje su u malim količinama zastupljene u animalnim tkivima (Berdagué i sur., 1991). Alkoholi zauzimaju 3% ukupne površine identificiranih uzoraka. Identificirani su benzil alkohol (1,60%), 2-furanmetanol (0,70%) i 2-feniletanol (0,68%). Oni mogu nastati lipolizom i proteolizom, ali također mogu nastati i mikrobiološkom aktivnošću. Alkoholi imaju viši prag osjetljivosti od aldehida pa je njihov utjecaj na aromu manji (Marušić, 2013). Alkani i alkeni zauzimaju 3% od ukupne površine identificiranih uzoraka. Identificirano je 11 spojeva od kojih su najzastupljeniji 4-metilundekan (0,79%), tridekan (0,69%) i 3,4-dimetil-2,4-heksadien (0,41%).

Važni spojevi koji potječu od začina dodanih kulenu su organosumporni spojevi. Oni zauzimaju 7% ukupne površine identificiranih uzoraka. Identificirani su dialil disulfid (6,34%), metilalil disulfid (0,42%) i dialil trisulfid (0,12%). Oni potječu od češnjaka. Kada se češnjak izreže ili zdrobi, enzim alinaza se aktivira i potiče proizvodnju alicina kojemu se pripisuje mirisni i okusni doživljaj svježeg češnjaka. Međutim, alicin je nestabilan i razgrađuje se kroz nekoliko putova. Dialil disulfid je tako najvjerojatnije direktni proizvod razgradnje alicina ili zamijenjuje sintezu drugih polisulfida slično kao i dialil trisulfid (Kimbaris i sur., 2006).

Drugi spojevi koji su izolirani i identificirani, a također potječu od začina su terpeni. Zauzimaju 3% ukupne površine identificiranih uzoraka. Najzastupljeniji su linalol (1,05%), β -kariofilen (0,88%) i limonen (0,69%). Očekivano je da se pojavljuju u ovako malom postotku jer nisu upotrebljavani začini sa značajnijim udjelom terpena kao što su crni papar, muškadni oraščić, klinčić i drugi.

Esteri nastaju esterifikacijom karboksilnih kiselina i alkohola (Sabio i sur., 1998). Laktoni su unutarnji ciklički esteri hidroksikarbonskih kiselina. Ove dvije grupe spojeva zajedno zauzimaju 3% ukupne površine identificiranih spojeva. Identificiran je samo jedan predstavnik laktona i to pantolakton (0,96%). Kod estera je identificirano 9 spojeva od kojih su najzastupljeniji bili: etil dekanat (0,90%), metil dekanat (0,48%) i dibutil ftalat (0,33%). Mali udio estera je rezultat antimikrobnog djelovanja NaCl tijekom dugog procesa zrenja (Gasparado i sur., 2008). Esteri imaju voćne note i to oni koji nastaju od kratkolančanih kiselina. Esteri sa dugolančanim kiselinama imaju miris na mast (Marušić, 2013).

Kiseline su zauzele 4% ukupne površine identificiranih spojeva. Najzastupljenije su bile: 9-oktadekanska kiselina (1,18%), dekanska kiselina (0,64%), nonanska kiselina (0,57%), 3-hidroksi-4-metoksi benzenska kiselina (0,32%) i heksadekanska kiselina (0,30%). Još su identificirane: tetradekanska kiselina, pentadekanska kiselina, oktan-



- fenoli/Phenols
- aldehidi/Aldehydes
- organosumporni spojevi/Organosulfur compounds
- ketoni/Ketones
- aromatski ugljikovodici/Aromatic hydrocarbons
- kiseline/Acids
- esteri i laktoni/Esters and lactones
- furani, benzofurani, pirazini/Furans, benzofuranes, pyrazines
- alkoholi/Alcohols
- terpeni/Terpenes
- alkani i alkeni/Alkanes and alkenes

Slika 1. Udio pojedinih kemijskih skupina u ukupnoj količini identificiranih hlapivih spojeva u kulenu

Figure 1. The share of respective chemical groups in the total amount of volatile compounds identified in kulen

ska kiselina i 2-metilbutanska kiselina. Slobodne masne kiseline se akumuliraju kao rezultat hidrolize triglicerida (Moltiva i sur., 1993). C2–C6 kiseline mogu nastati mikrobiološkom degradacijom piruvata (Gottschalk, 1986).

Aromatski ugljikovodici su zauzeli 4% ukupne površine identificiranih spojeva. U analiziranim uzorcima kulena nađeno je 9 spojeva: naftalen (1,33%), 1,3-dimetilbenzen (0,62%), 1,2-dimetoksibenzen (0,61%), 3,4-dimetoksitoluen (0,48%), 1,4-dimetoksibenzen (0,42%), 1-etil-4-metoksibenzen (0,37%), butilirani hidroksitoluen (0,23%), 1,2,3-trimetoksibenzen (0,11%), 2,3,5-trimetoksitoluen (0,11%).

Usporedba s drugim europskim kobasicama

Uspoređivale su se četiri salame iz Francuske „Aoste“, iz Italije „italsalumi“, iz Španjolske „gran serrano“ i iz Njemačke „Giesike“ (Schmidt i Berger, 1998) nakon lipidne ekstrakcije i molekularne destilacije koja daje dobar uvid u cijeli spektar hlapivih spojeva.

Terpeni (limonen, α -pinen, β -pinen, δ -3-karen,

β -kariofilen, γ -terpinen i ostali) i masne kiseline do C10 su bili najzastupljeniji. Slijedili su alifatski alkoholi (2,3-butandiol i ketoni (posebno 2-butanon i 2-hidroksi-2-butanon). Esteri i sumporne komponente (dialil disulfid i dialil sulfid) su bili glavni manje zastupljeni sastojci. U njemačkoj i francuskoj salami je nađena visoka koncentracija safrola i miristicina. Velike koncentracije heksanala podrijetlom iz oksidacija i etanola i acetona podrijetlom iz fermentacija su nađene u različitim talijanskim salama statičkom analizom para iznad otopine („Milano“, „Fellino“, „Filzetta“, „Soppressa“, „Cacciatorino“ i „Piccante“), dok je od organosumpornih spojeva bio prisutan samo ugljikov disulfid i fenoli uopće nisu pronađeni (Procida i sur., 1999). Dinamičkom analizom para iznad otopine kod „Milano“ salame izoliran je visok udio terpena i nizak udio alifatskih sumpornih komponenata (Meynier i sur., 1999). Dvije tajjanske salame „Salame Mantovano“ i „Salame Cremonese“ uspoređivale su se koristeći dinamičku analizu para iznad otopine nakon koje se za identifikaciju spojeva koristila plinska kromatografija – masena spektrometrija. Spojevi koji su najviše pridonosili razlikovanju ove dvije salame bili su 3-metilbutanal, 6-kamfenol, dimetil disulfid, etil propanoat, 1,4-p-metadien i 2,6-dimetil-1,3,5,7-oktatetraen (Bianchi i sur., 2007).

Ukoliko ovo usporedimo s rezultatima od kulena možemo primjetiti da njega karakteriziraju: niže koncentracije terpena (u ostalim europskim salamama terpeni su bili jedni od najzastupljenijih spojeva arome), visoka koncentracija metoksifenola i metilfenola kao i derivata 2-ciklopenten-1-on-a (ova razlika je prisutna zbog toga što se kod mnogih europskih salama ne provodi dimljenje u toku proizvodnog procesa) te velike koncentracije dialil sulfida i manje koncentracije drugih organosumpornih spojeva.

ZAKLJUČAK

Plinsko-kromatografsko-masenom spektrometrijskom (GC-MS) analizom uzoraka kulena nađena su 104 hlapiva spoja arome. Identificirani spojevi pripadaju slijedećim kemijskim grupama spojeva: fenoli (49%), aldehidi (14%), organosumporni spojevi (7%), ketoni (7%), aromatski ugljikovodici (4%), kiseline (4%), esteri i laktoni (3%), furani, benzofurani i pirazini (3%), alkoholi (3%), terpeni (3%) i alkani i alkeni (3%). Fenoli, aldehidi, ketoni i organosumporni spojevi su najzastupljeniji spojevi u kulenu. Navedeni spojevi potječu od lipolize - oksidacije masti i proteolize - razgradnje aminokiselina i imaju važnu ulogu u formaciji arome kulena. Osim hlapivih spojeva nastalih lipolizom i proteolizom u aromi kulena značajni su organosumporni spojevi koji potječu od češnjaka koji se dodaje tijekom procesa proizvodnje, i fenolni spojevi koji su karakteristični za kulen jer je jedna od faza proizvodnje dimljenje.

LITERATURA

- Adams, R. P. (2001):** Identification of essential oil components by GCMS, 3. Izdanje, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Berdagué, J.L., C. Denoyer, J.L. Le Quéré, E. Semon (1991):** Volatile components of dry cured ham. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1257–1261.
- Bianchi, F., C. Cantoni, M. Careri, L. Chiesa, M. Musci, A. Pinna (2007):** Characterisation of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*, 72, 1552-1563.
- Cutzach, I., P. Chatonnet, R. Henry, D. Dubourdiou (1997):** Identification of volatile compounds with a „toasty“ aroma in heated oak used in barrel making. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2217-2224.
- García-González, D.L., N. Tena, R. Aparicio-Ruiz, M. T. Morales (2008):** Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Sci.* 80, 315–325.
- Gasparado, B., G. Procida, B. Toso, B. Stefanon (2008):** Determination of volatile compounds in San Daniele ham using headspace GC–MS. *Meat Sci.* 80, 204–209.
- Gottschalk, G. (1986):** Bacterial Metabolism, Springer-Verlag. New York, 1986.
- Guillén, M. D., M. J. Manzano (2002):** Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chem.* 79(3), 283–292.
- Guillén, M. D., M. C. Errecalde, J. Salmerón, C. Casas (2006):** Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means and solid-phase microextraction and gas-chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 94, 151-156.
- Hierro, E., L. Hoz, JH. A. Ordóñez (2004):** Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species. *Food Chem.* 84(4), 649–657.
- Jerković, I., J. Mastelić, S. Tartaglia (2007):** A study of volatile flavour substances in Dalmatian traditional smoked ham: Impact of dry-curing and frying. *Food Chem.* 104 (3), 1030-1039.
- Jerković, I., D. Kovačević, D. Šubarić, Z. Marijanović, K. Mastanjević, K. Suman (2010):** Authentication study of volatile flavour compounds composition in Slavonian traditional dry fermented salami „kulen“. *Food Chem.* 119, 813-822.
- Kimbaris, A. C., N. G. Siatis, D. J. Daferera, P.A. Tarantilis, C. S. Pappas, M. G. Polissiou (2006):** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochem.* 13, 54-60.
- Krvavica, M., I. Babić, I. Cvitković, J. Đugum, M. Konjačić (2010):** Hlapljive tvari istarskog pršuta u različitim periodima zrenja. *Meso* 12, 276-282.
- Maga, J. A. (1987):** The flavour chemistry of wood smoke. *Food Rev. Int.* 3(1-2), 139-183.
- Marušić, N., M. Petrović, S. Vidaček, T. Petrak, H. Medić (2011):** Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds, *Meat Science*, 88, 786-790.
- Marušić, N. (2013):** Karakterizacija hlapivih spojeva i parametara kvalitete tradicionalnoga istarskoga i dalmatinskoga pršuta. Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Meynier, A., E. Novelli, R. Chizzolini, E. Zanardi, G. Gandemera (1999):** Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Sci.* 51, 175-183.
- Moltiva, M. -J., F. Toldrá, P. Nieto, J. Flores (1993):** Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chem.* 48, 121-125.
- Morrissey, P. A., P. J. A. Sheehy, K. Galvin, J. P. Kerry, D. J. Buckley (1998):** Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* 49, 73–86.
- Nunes, C., M. A. Coimbra, J. Saraiva, M. S. Rocha (2008):** Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma. *Food Chem.* 111 (4), 897-905.
- Procida, G., L. S. Conte, S. Fiorasi, G. Comi, L. Gabrielli Favretto (1999):** Study on volatile components in salami by reverse carrier gas headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 830, 175-182.
- Sabio, E., M. C. Vidal-Aragon, M. J. Bernalte, J. L. Gata (1998):** Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chem.* 61, 493–503.
- Schmidt, S., R. G. Berger (1998):** Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31, 559-567.
- Viani, R., Y. Horman (1974):** Thermal behaviour of trigonelline. *J. Food Sci.* 39, 1216–1217.

Dostavljeno: 29.5.2015.

Prihvaćeno: 24.6.2015.

Determination of volatile flavour compounds in kulen

SUMMARY

Kulen is a traditional meat product from eastern Croatia pertaining to dry fermented sausages. During the processing of dry-cured meat products numerous enzymatic and nonenzymatic reactions are carried out. This leads to an increase in the concentration of volatile aroma compounds. These compounds are responsible for the specific olfactory properties of products. These properties have a major influence on the consumer perception of quality. For extraction of such compounds from the samples, a headspace solid-phase microextraction was used. The gas chromatography-mass spectrometry analysis of samples identified 104 volatile aroma compounds. They belonged to the following chemical groups: terpenes, aldehydes, organosulfur compounds, ketones, aromatic hydrocarbons, acids, esters and lactones, furans, benzofuranes and pyrazines, alcohols, terpenes, alkanes and alkenes. Phenols, aldehydes, ketones and organosulfur compounds were the most abundant compounds in kulen.

Key words: kulen, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), aroma, volatile compounds

Bestimmung von flüchtigen Aromaverbindungen im Kulen

ZUSAMMENFASSUNG

Kulen ist ein traditionelles Fleischprodukt aus Ostkroatien, das zu den fermentierten Dauerwürsten zählt. Während der Verarbeitung von fermentierten Produkten kommt es zu zahlreichen enzymatischen und nichtenzymatischen Reaktionen, die zu einer Steigerung der Konzentration von flüchtigen Aromakomponenten führen. Diese Komponenten sind für die spezifischen Geschmacks- und Geruchseigenschaften dieses Produkts zuständig, die für die Wahrnehmung der Qualität bei den Verbrauchern am relevantesten sind. Für die Extraktion dieser Verbindungen aus den Proben wurde die Festphasen-Mikroextraktion aus den Lösungsmitteldämpfen eingesetzt. Anhand der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie wurden 104 flüchtige Aromaverbindungen identifiziert. Die identifizierten Verbindungen konnten folgenden chemischen Gruppen zugeordnet werden: Terpene, Aldehyde, Organoschwefelverbindungen, Ketone, aromatische Kohlenwasserstoffe, Säuren, Ester und Lactone, Furane, Benzofurane und Pyrazine, Alkohole, Terpene, Alkane und Alkene. Phenole, Aldehyde, Ketone und Organoschwefelverbindungen sind die im Kulen am häufigsten vorkommenden Verbindungen.

Schlüsselwörter: Kulen, Gas-Chromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS), Aroma, flüchtige Verbindungen

Determinación de los componentes volátiles del aroma del kulen

RESUMEN

El kulen es el producto cárnico tradicional de la región del este de Croacia, salchicha fermentada crudo-curada. Durante el procesamiento de los productos fermentados ocurren numerosas reacciones enzimáticas y no enzimáticas que propician el aumento de la concentración de los componentes volátiles del aroma. Estas componentes son responsables por las características específicas del sabor y del olor de este producto y tienen más méritos en la percepción de los consumidores sobre la calidad. Para extraer estos compuestos de las muestras fue usada la microextracción en fase sólida de los vapores sobre la solución. Por la espectrometría de masas y cromatografía de gases en las muestras fueron identificados 104 compuestos volátiles del aroma. Los compuestos identificados pertenecían a grupos químicos siguientes: terpenos, aldeídos, compuestos organosulfurados, cetonas, hidrocarburos aromáticos, ácidos, ésteres y lactonas, furanos, benzofuranos y pirazinas, alcoholes, terpenos y alcanos y alquenos. Los fenoles, aldeídos, cetonas y compuestos organosulfurados eran los compuestos más comunes en el kulen.

Palabras claves: Kulen, cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC/MS), aroma, componentes volátiles

Determinazione dei componenti volatili dell'aroma della Salsiccia kulen

SUNTO

Kulen è un prodotto di carne secondo ricette tradizionali proveniente dalle regioni della Croazia dell'est che va annoverato nella categoria di salsicce secche fermentate. Durante il processo di fermentazione del prodotto, avvengono numerose reazioni enzimatiche e non-enzimatiche che risultano in un aumento della concentrazione dei componenti volatili dell'aroma. I detti componenti sono responsabili per le caratteristiche gustative e olfattorie specifiche di questo prodotto e sono altresì i più meritevoli per quanto riguarda la percezione della qualità da parte dei consumatori. Per l'estrazione di questi componenti dai campioni è stata utilizzata la microestrazione in fase solida dai vapori sopra la soluzione. Attraverso analisi mediante la gascromatografia -spettrometria di massa sono stati identificati 104 composti volatili dell'aroma. I composti identificati appartenevano ai seguenti gruppi chimici: terpeni, aldeidi, composti organici solforati, chetoni, idrocarburi aromatici, acidi, esteri e lattoni, furani, benzofurani e pirazine, alcoli, terpeni, alcani e alcheni. I fenoli, aldeidi, chetoni e i composti organici solforati sono quelli prevalenti nei kulen.

Parole chiave: kulen, gascromatografia - spettrometria di massa (GC-MS), aroma, componenti volatili