

MICHAŁ GOŚLIŃSKI, RENATA ZAWIRSKA-WOJTASIAK,
JANINA GAJC-WOLSKA

OPTIMALIZACJA PARAMETRÓW TECHNIKI SPME DO OCENY AROMATU OWOCÓW LINII TRANSGENICZNYCH OGÓRKA EKSPRYMUJĄCYCH GEN TAUMATYNY II

Streszczenie

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) jest nowoczesną techniką izolacji związków lotnych i może stanowić alternatywę dla metod tradycyjnych. Była ona z powodzeniem stosowana w analizie różnych surowców roślinnych i produktów spożywczych. Przedmiotem zainteresowania autorów był aromat transgenicznego ogórka modyfikowanego genem taumatyny II. Do tej pory nie publikowano wyników badań oceniających wpływ tego typu modyfikacji genetycznej na profil zapachowy surowca. Celem pracy był dobór parametrów techniki SPME do oceny aromatu ogórka. Optymalizacja parametrów techniki SPME obejmowała wybór: rodzaju włókna, temperatury, czasu ekstrakcji i wysalania próby. Zastosowanie SPME pozwoliło na identyfikację związków lotnych odpowiedzialnych za aromat ogórka. Ponadto zaobserwowano zróżnicowanie ilościowe zawartości związków lotnych pomiędzy liniami transgenicznymi a niemodyfikowaną linią kontrolną.

Słowa kluczowe: ogórek transgeniczny, gen taumatyny II, aromat, mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

Wprowadzenie

Ogórek (*Cucumis sativus* L.) jest jednym z popularniejszych warzyw uprawianych i spożywanych w Polsce. Ceniony jest on m.in. ze względu na swoje walory smakowo-zapachowe. Za kształtowanie aromatu ogórka odpowiedzialne są związki lotne powstające na drodze biosyntezy z kwasów tłuszczowych - linolowego i linolenowego [14]. Najważniejszymi z nich są (E,Z)-2,6-nonadienal i (E)-2-nonenal [11]. Zawartość tych związków uzależniona jest od wielu czynników, na przykład: odmiany, warunków uprawy czy terminu zbioru.

Mgr inż. M. Gośliński, dr hab. R. Zawirska-Wojtasiak, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 30, 60-624 Poznań, dr hab. J. Gajc-Wolska, Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Współczesna inżynieria genetyczna przyczynia się do postępu w wielu dziedzinach nauki, m.in. w uprawie roślin. Transgeniczne odmiany charakteryzują się na ogół lepszymi właściwościami użytkowymi, takimi jak: plenność, odporność na choroby, herbicydy czy szkodniki. Badania prowadzone są również w nowych kierunkach, np. poprawy cech sensorycznych warzyw i owoców. Tego typu modyfikacje dotyczą najczęściej zmiany odczucia smaku słodkiego poprzez wprowadzenie genu słodkiego białka np. taumatyny. Ekspresję genu taumatyny uzyskano m.in. w pomidorze [1], ziemniaku [15] i truskawce [10].

Przedmiotem zainteresowania autorów niniejszej pracy był jednak zapach ogórka modyfikowanego genem taumatyny II. Do tej pory nie publikowano wyników badań oceniających wpływ modyfikacji genetycznych na profil zapachowy transgenicznego surowca.

Pomiaru aromatu dokonuje się przy użyciu technik chromatograficznych. Powszechnie stosowana w izolacji związków lotnych mikrodestylacja–ekstrakcja w aparacie Likensa–Nickersona jest efektywna, jednak bardzo czasochłonna. Poszukuje się zatem nowych metod i rozwiązań, które mogłyby stanowić alternatywę dla metod tradycyjnych. Dane literaturowe wskazują, że technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) była z powodzeniem stosowana do izolacji związków lotnych z różnych surowców roślinnych i produktów spożywczych, takich jak: kawa [9], chmiel [7], piwo [4], jabłka [12], koper [17] czy oleje roślinne [3].

SPME (solid phase microextraction) jest jedną z najnowszych technik izolacji związków lotnych. Do jej zalet zaliczyć można: krótki czas ekstrakcji, brak konieczności stosowania rozpuszczalników, niski koszt oraz prostotę analizy [5]. SPME polega na zaadsorbowaniu związków na fazie stacjonarnej (sorbencie), którą jest cienkie, kwarcowe włókno pokryte specjalnym polimerem. W zależności od charakteru chemicznego izolowanych związków stosuje się włókna o zróżnicowanych właściwościach sorpcyjnych. Rodzaj fazy stacjonarnej jaką pokryte jest włókno SPME determinuje czułość i selektywność metody. Wybór odpowiedniego włókna zależy w dużej mierze od właściwości chemicznych analitu. Ekstrakcja powinna być przeprowadzona na zasadzie „podobne-podobnym”, np. związki o charakterze polarnym dobrze ekstrahowane są na włóknach o polarnym charakterze grup funkcyjnych jego fazy stacjonarnej [5, 8]. Wpływ rodzaju włókna na wydajność procesu ekstrakcji badano również w innych pracach wykorzystujących technikę SPME [2, 6]. Desorpcja związków zaadsorbowanych na włóknie SPME ma miejsce w komorze nastrzykowej chromatografu gazowego pod wpływem wysokiej temperatury [5, 8].

Temperatura jest istotnym parametrem wpływającym na efektywność ekstrakcji związków lotnych. Na ogół podwyższenie temperatury sprzyja przechodzeniu analitu z próby do fazy nadpowierzchniowej i jego adsorpcji na włóknie. Z drugiej strony wyższa temperatura fazy nadpowierzchniowej powoduje desorpcję analitu z włókna

i obniżenie czułości analizy [5, 8]. Zależność wydajności ekstrakcji od temperatury określano np. w pracach badawczych dotyczących izolacji związków lotnych z płatków owsianych [6].

Następnym ważnym parametrem techniki SPME jest wybór odpowiedniego czasu ekstrakcji. Czas ekspozycji włókna znacząco wpływa na wydajność procesu ekstrakcji, objawiającą się przyrostem powierzchni pików izolowanych związków lotnych [5, 8].

Dodatek do próby wodnego roztworu soli zwiększa stałą podziału włókno/matryca, a tym samym może przyczyniać się do poprawy efektywności ekstrakcji związków lotnych aromatu ogórka [5, 8].

Celem pracy była optymalizacja parametrów techniki SPME do oceny aromatu owoców linii transgenicznych ogórka ekspresujących gen taumatyny II.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły 4 linie ogórków transgenicznych, o zróżnicowanym poziomie ekspresji genu taumatyny II, uprawiane doświadczalnie w warunkach polowych w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Rośliny transgeniczne zostały uzyskane po transformacji wektorowej [LBA4409/pRUR528] mikroskrawków liściowych linii B [13], która została wyprowadzona ze starej polowej odmiany ogórka (*Cucumis sativus* L.) Borszczagowski.

Ogórki myto i krojono w drobną kostkę, a następnie miksowano na jednolitą masę. W szklanych naczynkach o pojemności 15 ml umieszczano 10 g tak przygotowanej próby ogórków. Naczynka zamykano kapslem z membraną silikon/teflon. Każdą próbę ogórka przygotowano w 5 powtórzeniach. Po przebiciu igłą strzykawki SPME membrany naczynka i wysunięciu włókna, następowała adsorpcja związków lotnych.

Optymalizacja parametrów techniki SPME obejmowała dobór takich elementów, jak: rodzaj włókna, temperaturę i czas ekstrakcji oraz dodatek do próby roztworu soli.

W pracy porównano 3 włókna SPME firmy Supelco o różnej fazie stacjonarnej: 100 μm polidimetylosiloksan (PDMS), 75 μm carboxen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS) i 50 μm divinylbenzen/carboxen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS). Stosowano temperaturę ekstrakcji: 20, 30, 40, 50 i 60°C oraz czas ekstrakcji: 10, 20, 30 i 40 min. Do 10 g badanych prób ogórka dodawano po 5 ml wodnego roztworu chlorku sodu o zróżnicowanym stężeniu: 2, 5 i 10% NaCl. Efekt ww. parametrów mierzono powierzchnią pików izolowanych związków aromatu ogórka.

Analiza związków lotnych ogórka obejmowała zarówno ocenę jakościową, jak i ilościową, które przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett Packard 6890 GC z detektorem FID i kolumną ZB WAX (60 m \times 0,53 mm \times 1,0 μm). Temperatura portu nastrzykowego wynosiła 230°C, a detektora 260°C. Rozdział następował w temp. programowanej: 40°C przez 1 min, a następnie przyrost temperatury 8°C/min do 230°C. Jako gazu nośnego użyto helu o przepływie 5,6 ml/min. Związki

lotne izolowano i nanoszono na kolumnę chromatografu za pomocą urządzenia SPME. Włókno SPME eksponowano w komorze nastrzykowej chromatografu gazowego przez 5 min.

Do sporządzenia krzywych wzorcowych użyto następujących standardów związków lotnych: (E,Z)-2,6-nonadienu (95%, Aldrich), (E)-2-nonenalu (97%, Aldrich), hexanal (98%, Aldrich), 2-pentylfuranu (97%, Aldrich).

Statystyczną istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji, przy $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Spośród włókien analizowanych w niniejszej pracy najwłaściwsze do izolacji związków lotnych ogórka okazało się włókno o fazie stacjonarnej carboxen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS). Zdecydowała o tym przede wszystkim ilość związków wyekstrahowanych z prób ogórka. Ponadto kryterium brany pod uwagę była powierzchnia piku (E,Z)-2,6-nonadienu, czyli najważniejszego związku lotnego aromatu ogórka. Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1. i na rys. 1.

Tabela 1

Efektywność ekstrakcji różnych rodzajów włókien SPME.
The efficiency of extraction of different SPME fibres.

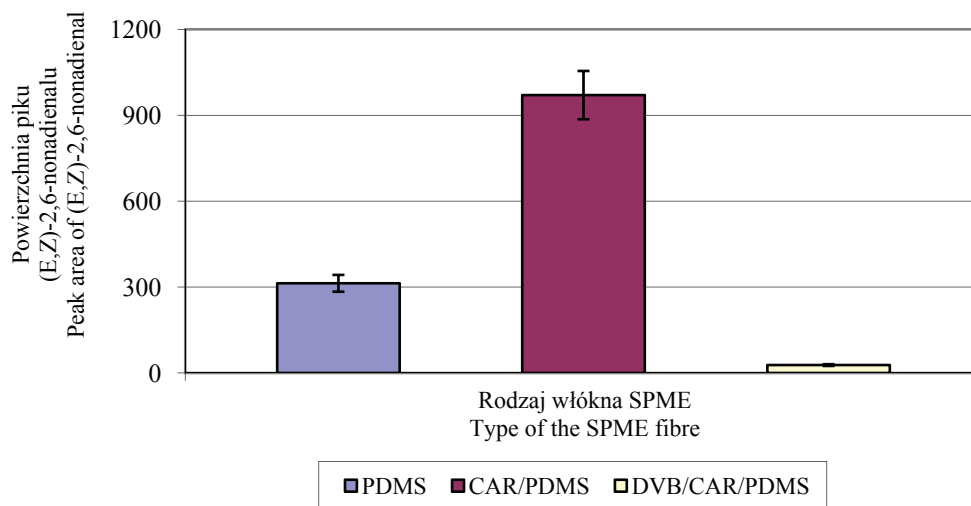
Wyszczególnienie Specification	Rodzaj włókna SPME Type of the SPME fibre		
	PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
Liczba zintegrowanych pików Number of integrated peaks	14	29	6
Łączna powierzchnia wszystkich pików Total area of integrated peaks	3035,2	10493,9	982,7

PDMS – polidimetylosiloksan

CAR/PDMS – carboxen/polidimetylosiloksan

DVB/CAR/PDMS – divinylbenzen/carboxen/polidimetylosiloksan

Doboru odpowiedniej temperatury analizy dokonywano w zakresie 20–60°C na podstawie pomiaru przyrostu powierzchni pików izolowanych związków lotnych aromatu ogórka. Zależność odnoszącą się do (E,Z)-2,6-nonadienu i (E)-2-nonenalu przedstawiono na rys. 2. Na podstawie otrzymanych wyników wybrano temperaturę 50°C, gdyż po jej przekroczeniu nie następował już wyraźny przyrost powierzchni pików analizowanych związków.



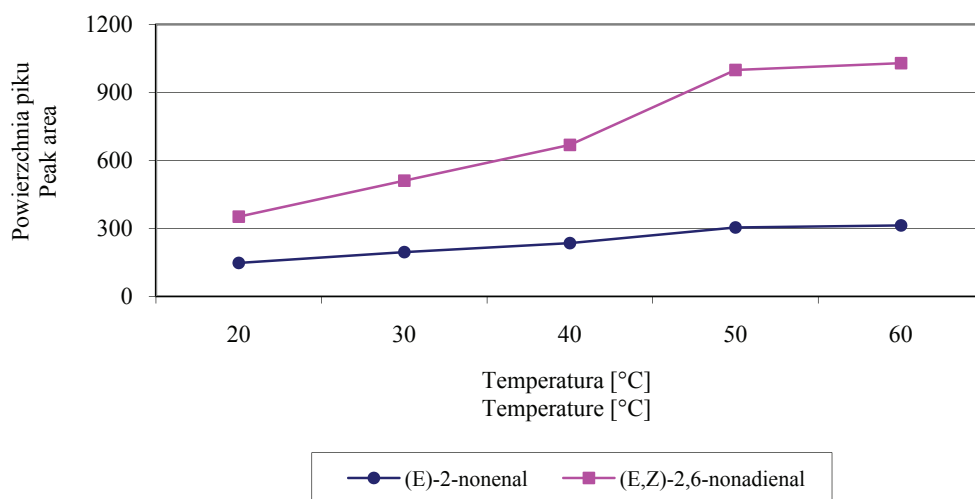
PDMS – polidimetylosiloksan

CAR/PDMS – carboxen/polidimetylosiloksan

DVB/CAR/PDMS – divinylbenzen/carboxen/polidimetylosiloksan

Rys. 1. Powierzchnia pików (E,Z)-2,6-nonadienu w zależności od rodzaju włókna SPME.

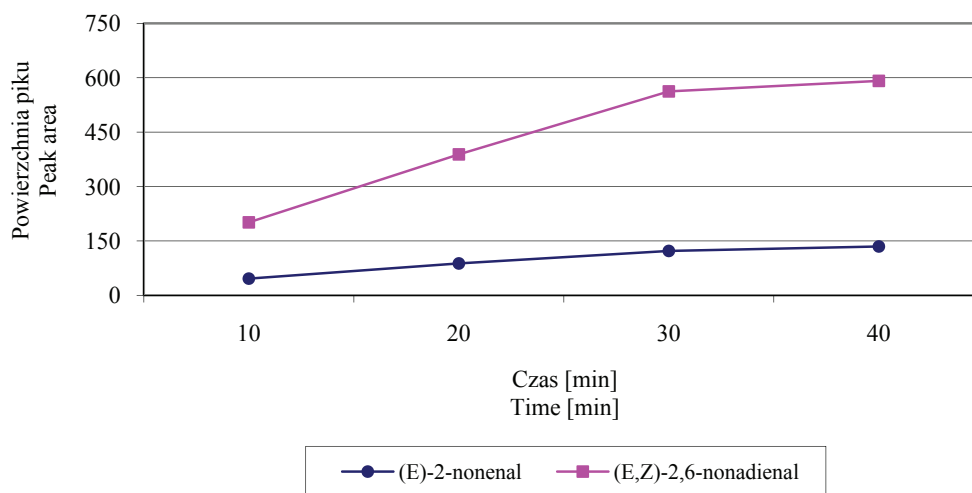
Fig. 1. Area of the peak of (E,Z)-2,6-nonadienal depending on the various types of SPME fibre.



Rys. 2. Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji, włókno CAR/PDMS.

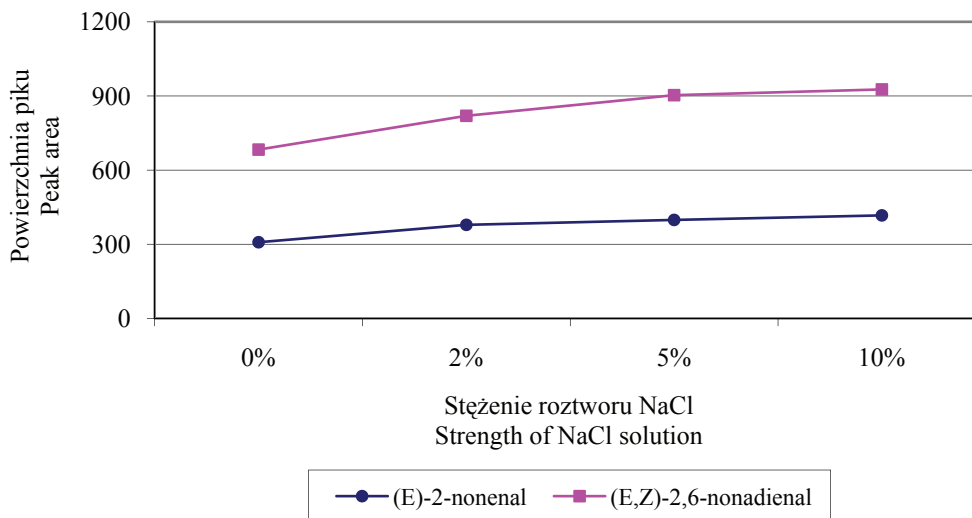
Fig. 2. Effect of the temperature on the extraction efficiency, CAR/PDMS fibre.

Następnym analizowanym parametrem techniki SPME był wybór odpowiedniego czasu ekstrakcji. Otrzymane wyniki przedstawiono graficznie na rys. 3. Ostatecznie do dalszych analiz aromatu ogórka transgenicznego wybrano wariant 30-minutowy.



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

Fig. 3. Effect of the exposure time on the extraction efficiency, CAR/PDMS fibre.



Rys. 4. Wpływ stężenia roztworu NaCl na wydajność ekstrakcji, włókno CAR/PDMS.

Fig. 4. Effect of the strength of NaCl solution on the extraction efficiency, CAR/PDMS fibre.

Zależność powierzchni pików (E)-2-nonenalu i (E,Z)-2,6-nonadienu od ilości dodanej soli przedstawiono na rys. 4. Spośród analizowanych wariantów jako optymalny wybrano dodatek 5 ml 10% roztworu NaCl.

Kolejnym etapem badań było praktyczne wykorzystanie ustalonych parametrów techniki SPME do oceny aromatu owoców linii transgenicznych ogórka ekspresujących gen taumatyny II. Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 2. We wszystkich próbach w największych ilościach występowały (E,Z)-2,6-nonadien i (E)-2-nonenal, które są najważniejszymi komponentami zapachowymi ogórka [11, 14].

Tabela 2

Zawartość związków lotnych w badanych próbach ogórka transgenicznego.
Content of volatile compounds in the transgenic cucumber samples studied.

Związek lotny Volatile compound	Seria 1 / Series 1			
	B	210	212	224
	Zawartość związku lotnego [$\mu\text{g}/100\text{g}$] * Content of the volatile compound [$\mu\text{g}/100\text{g}$] *			
Hexanal	20,0	22,1	20,7	24,4
2-pentylfuran	43,5	43,3	43,4	43,4
(E)-2-nonenal	109,1	101,9	119,0	107,6
(E,Z)-2,6-nonadien	249,3	111,2	256,0	166,9

Związek lotny Volatile compound	Seria 2 / Series 2			
	B	210	212	224
	Zawartość związku lotnego [$\mu\text{g}/100\text{g}$] * Content of the volatile compound [$\mu\text{g}/100\text{g}$] *			
Hexanal	19,8	20,4	19,4	19,8
2-pentylfuran	43,8	43,5	43,8	43,7
(E)-2-nonenal	105,7	105,5	106,5	105,0
(E,Z)-2,6-nonadien	205,5	196,1	247,4	208,4

Objaśnienia: / Explanatory notes:

* wartości średnie z 4 powtórzeń / mean values from 4 repetitions;

współczynniki zmienności 2,5-5% / relative standard deviation 2.5-5%;

B – linia kontrolna ogórka / control line of the cucumber,

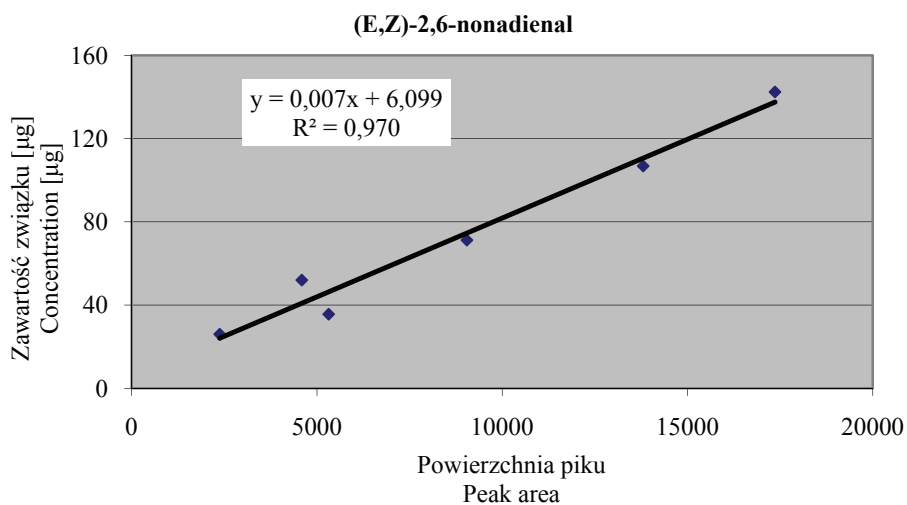
210 – linia ogórka o niskim stężeniu taumatyny / cucumber line showing a low concentration of thaumatin,

212 – linia ogórka o wysokim stężeniu taumatyny / cucumber line showing a high concentration of thaumatin,

224 – linia ogórka o wysokim stężeniu taumatyny / cucumber line showing a high concentration of thaumatin.

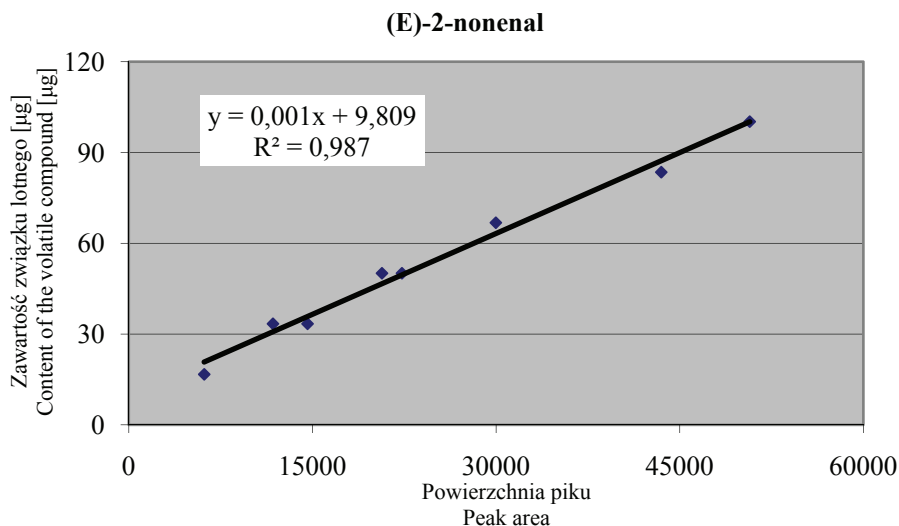
Obliczenia zawartości powyższych związków lotnych ogórka dokonano z krzywych wzorcowych przedstawionych na rys. 5–8.

Zaobserwowano zróżnicowanie zawartości głównych związków lotnych pomiędzy próbkami transgenicznymi a próbą kontrolną. Linia 212 odznaczała się największą zawartością (E,Z)-2,6-nonadienu. Zróżnicowanie pomiędzy próbkami ogórków było bardzo podobne do tego, jakie obserwowano we wcześniejszych badaniach metodą mikrodestylacji-ekstrakcji w aparacie Likensa-Nickersona [16].



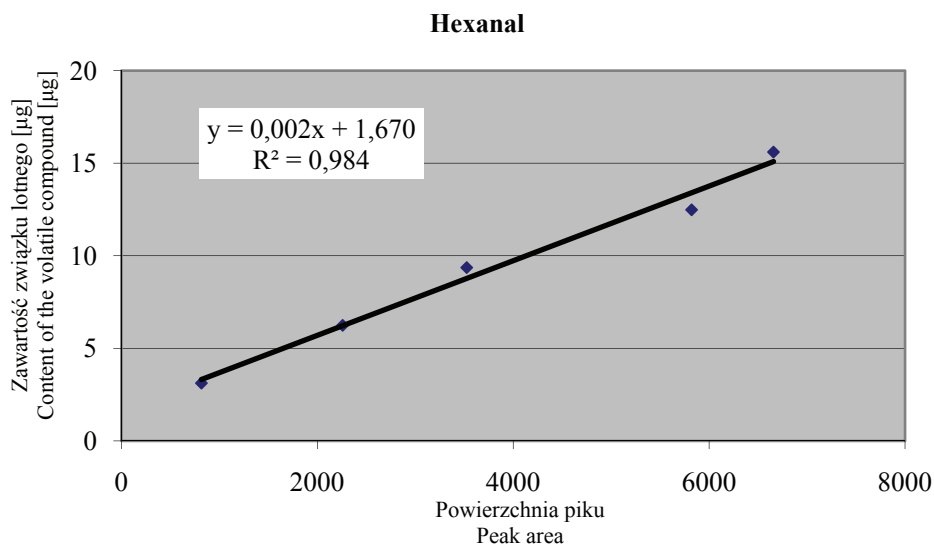
Rys. 5. Krzywa wzorcowa (E,Z)-2,6-nonadienu.

Fig. 5. Calibration curve of (E,Z)-2,6-nonadienal.



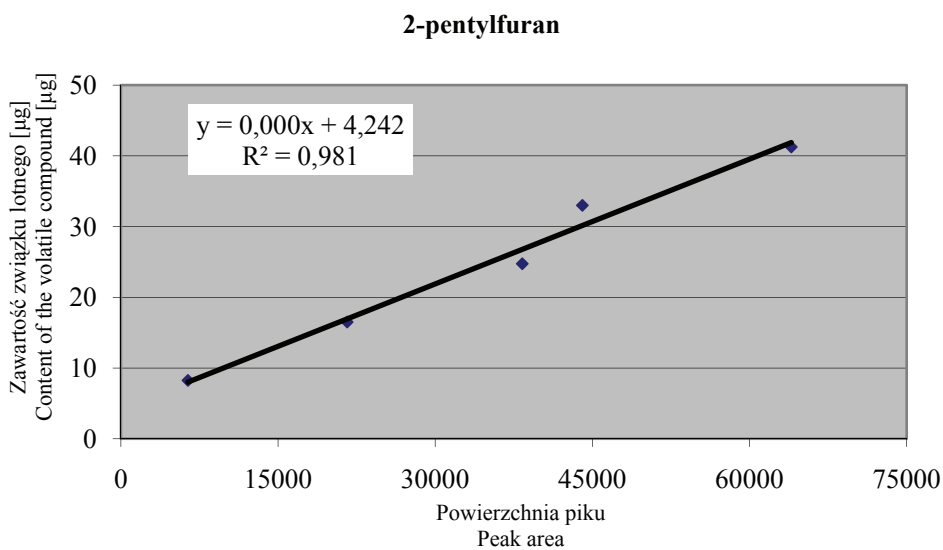
Rys. 6. Krzywa wzorcowa (E)-2-nonenalu.

Fig. 6. Calibration curve for (E)-2-nonenal.



Rys. 7. Krzywa wzorcowa hexanal.

Fig. 7. Calibration curve of hexanal.



Rys. 8. Krzywa wzorcowa 2-pentylfuranu.

Fig. 8. Calibration curve of 2-pentylfuran.

Wnioski

1. Ustalono optymalne parametry techniki SPME do oceny aromatu owoców linii transgenicznych ogórka ekspresujących gen taumatyny II. Są to: włókno CAR/PDMS, 30-minutowa ekstrakcja w temp. 50°C oraz dodatek 5 ml 10% roztworu NaCl/10 g próbki.
2. Zastosowanie SPME pozwoliło na identyfikację związków lotnych odpowiedzialnych za aromat ogórka. Potwierdzono, że we wszystkich próbach w największych ilościach występowały 2,6-nonadienal i 2-nonenal, które są najważniejszymi składnikami zapachowymi ogórka.
3. Zaobserwowano zróżnicowanie zawartości związków lotnych pomiędzy liniami transgenicznymi ogórków a niemodyfikowaną linią kontrolną. linia ogórka 212 charakteryzowała się największą zawartością (E,Z)-2,6-nonadienu.

Badania finansowane w ramach Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N312 063 32/3001. Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K.: Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, 2003, **122**, 347-351.
- [2] Bicchi C., Drigo S., Rubiolo P.: Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction – gas chromatographic analysis of aromatic medicinal plants. *J. Chrom. A*, 2000, **892**, 469-485.
- [3] Jeleń H.H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E.: Headspace solid phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2360-2367.
- [4] Jeleń H.H., Wlazły K., Wąsowicz E., Kaminski E.: Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 1469-1473.
- [5] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chrom. A*, 2000, **880**, 35-62.
- [6] Klensporf D., Jeleń H.H.: Analysis of volatile aldehydes in oat flakes by SPME-GC/MS. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14**, 389-395.
- [7] Kovacevic M., Kac M.: Solid-phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties. *J. Chrom. A*, 2001, **918**, 159-167.
- [8] Pawliszyn J.: *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York 1997, pp. 95-140.
- [9] Roberts D., Pollien P., Milo C.: Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2430-2437.
- [10] Schestibratov K.A., Dolgov S.V.: Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae*, 2005, **106**, 177-189.
- [11] Schieberle P., Ofner S., Grosch W.: Evaluation of potent odorants in cucumbers (*Cucumis sativus*) and muskmelons (*Cucumis melo*) by aroma extract dilution analysis. *J. Food Sci.*, 1999, **55**, 193-195.

- [12] Song J., Gardner B., Holland J., Beaudry R.: Rapid analysis of volatile flavour compounds in apple fruit using SPME and GC/time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1801-1807.
- [13] Szwacka M., Morawski M., Burza W.: *Agrobacterium tumefaciens* -mediated cucumber transformation with thaumatin II cDNA. *Genet. Pol.*, 1996, **37A**, 126-129.
- [14] Takeoka G.: Flavor chemistry of vegetables. Flavor Publishers, New York 1999, pp. 287-304.
- [15] Witty M.: Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum*. *Biotech. Lett.*, 1990, **12**, 131-136.
- [16] Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Szwacka M., Wąsowicz E., Malepszy S.: Gas chromatography/olfactometry evaluation of transgenic cucumber aroma. Proceedings of 8th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, Eisenach, Germany 2007, p. 54.
- [17] Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E.: Estimation of main dill seeds odorant carvone by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Nahrung/Food*, 2002, **46**, 357-359.

**PARAMETER OPTIMIZATION OF THE SPME TECHNIQUE FOR THE PURPOSE OF
EVALUATING THE AROMA OF THE FRUIT OF CUCUMBER OF TRANSGENIC LINES
WITH A GENE OF THAUMATIN II**

S u m m a r y

Solid phase microextraction (SPME) is a modern technique to isolate volatile compounds and it can be an alternative to traditional methods. It was successfully applied to analyse different plant fruit and food products. The authors of this paper focused their attention on the aroma of transgenic cucumber modified using a gene of thaumatin II. Until now, no results have been published of any studies dealing with the evaluation of the effect of this type of genetic modification on the volatile profile of raw material. The objective of this study was to select parameters of the SPME technique for evaluating the aroma of cucumber. The parameter optimization of the SPME technique comprised the selection of: type of fibre, temperature, extraction time, and salting out the sample. Owing to the application of the SPME technique, it was possible to identify volatile compounds responsible for the aroma of cucumber. Moreover, it was found that the contents of volatile compounds in the fruit of transgenic lines and in the non-modified control line differed.

Key words: transgenic cucumber, gene of thaumatin II, aroma, solid phase micro-extraction (SPME) 