

## Cheese & Science June 11th 2024

# Validierte Methode zur Bestimmung von freien flüchtigen Carbonsäuren in Käse und Bakterienkulturen mittels GC-FID

René Badertscher, Carola Blaser , Priska Noth

Grégory Pimentel

Agroscope - Methodenentwicklung und Analytik Gruppe  
Inhaltsstoffe

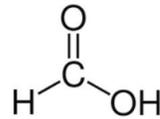


© Agroscope, Carole Parodi

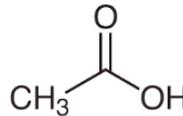
# Freie flüchtige Carbonsäuren (FFCS)

- Bildet sich während der Käsureifung.
- Komponenten des erwünschten und unerwünschten Geschmacks und Aromas.
- Erlauben eine Bewertung der Herstellungsfehler von Käse und ihrer Ursachen.
- Kann zur Charakterisierung und Unterscheidung von Käsesorten verwendet werden.

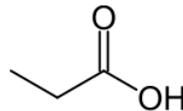
C1 : Ameisensäure



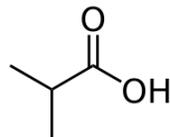
C2 : Essigsäure



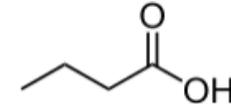
C3 : Propionsäure



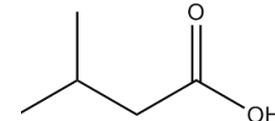
i-C4 : Iso-Buttersäure



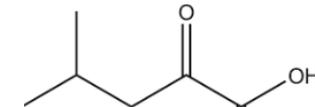
C4 : Buttersäure



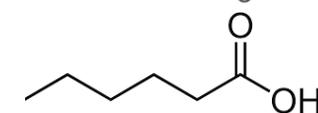
i-C5 : Iso-Valeriansäure



i-C6 : Iso-Carbonsäure



C6 : Capronsäure





# Stoffwechselprodukte von käseschädigenden Keimen

Mikroorganismen	Produkte
Obligat heterofermentative Laktobazillen	Acetat
Fakultativ heterofermentative Laktobazillen	Formiat, Acetat
Propionsäurebakterien	Propionat , Acetat
Coliforme Bakterien	Formiat, Acetat
<i>Clostridium butyricum</i>	Acetat , Butyrat
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Acetat , Butyrat
<i>Clostridium sporogenes</i>	Acetat , Propionat , Butyrat , Iso-Valerat, Iso-Butyrat , Iso-Caproat
<i>Clostridium spp.</i>	Acetat , Butyrat
Hefen	Acetat

## Unerwünschte Einflüsse auf die Käsequalität

- Gasbildung
- Vorzeitige/späte Blähung
- Fehl-Geschmack
- Unerwünschte Perforation / Lochbildung
- Braune Flecken
- Putrifikus (Weißfäule)
- Atypische Buttersäuregärung (wenig Gas und Buttersäure)

# Bedarf an einer neuen hausinternen Methode

Verschiedene bestehende Ansätze zur Quantifizierung von FFCS:

- Extraktion: mit polaren oder apolaren Lösungsmitteln, Dampf, dynamischer Headspace, Festphasen(mikro)extraktion
- Schritte: Vorreinigung mit verschiedenen Adsorptionsmitteln, Umwandlung in Natriumsalze, Trocknung, Veresterung
- Analyse: GCFID, Wärmeleitfähigkeits- oder MS-Detektoren.

Notwendigkeit einer hausinternen Methode:

- Einfacher, schneller
- Simultan
- Quantitativ
- GC-FID



Food Chemistry  
Volume 398, 1 January 2023, 133932



Validated method for the determination of free volatile carboxylic acids in cheese and bacterial cultures by GC-FID after esterification in aqueous extract and headspace injection

[René Badertscher](#)   [Carola Blaser](#), [Priska Noth](#)

# Headspace / GC-FID-Verfahren

Methode:

- Schwach basische wässrige Extraktion
- Veresterung mit Ethanol direkt aus der wässrigen Phase in einem Headspace-Fläschchen.
- Die gebildeten Ethylester werden mittels GC-FID analysiert.

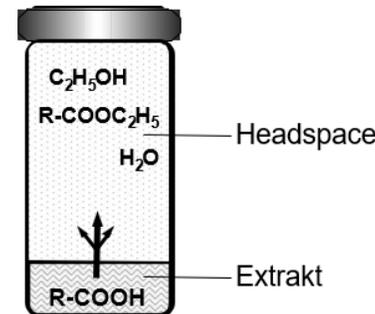


Food Chemistry  
Volume 398, 1 January 2023, 133932



Validated method for the determination of free volatile carboxylic acids in cheese and bacterial cultures by GC-FID after esterification in aqueous extract and headspace injection

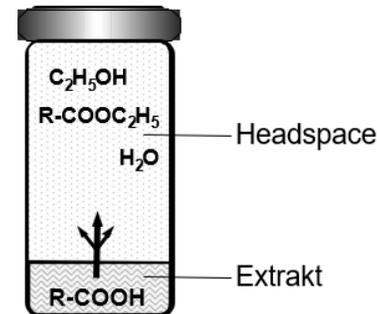
René Badertscher   Carola Blaser, Priska Noth



Agroscope's experimental cheese factory (A), Agilent 8890 gas chromatograph coupled with a flame ionization detector and a PAL3 autosampler in headspace mode (B).

# Vorbereitung der Probe

- Vorbereitung der Probe:
  - 4,0 g geriebener Käse + 20 ml entionisiertes Wasser / 2,0 g Kultur + 22 ml entionisiertes Wasser
  - 1,0 ml interne Standardlösung (2,2-Dimethylpropansäure / 3,3-Dimethylbutansäure) hinzufügen
  - Homogenisieren (Polytron PT1300 D Dispergiergerät)
  - 1 ml Zinksulfatlösung hinzufügen
  - Filtrierung und Klärung der Suspension durch einen Whatman-Filter
- Probenextraktion im Headspace-Fläschchen:
  - 1 ml Filtrat + 200  $\mu$ l HCl 10 % + 200  $\mu$ l Ethanol.
  - Fläschchen 3 Stunden lang bei 95 °C bebrüte



Agroscope's experimental cheese factory (A), Agilent 8890 gas chromatograph coupled with a flame ionization detector and a PAL3 autosampler in headspace mode (B).

# Getestete Proben

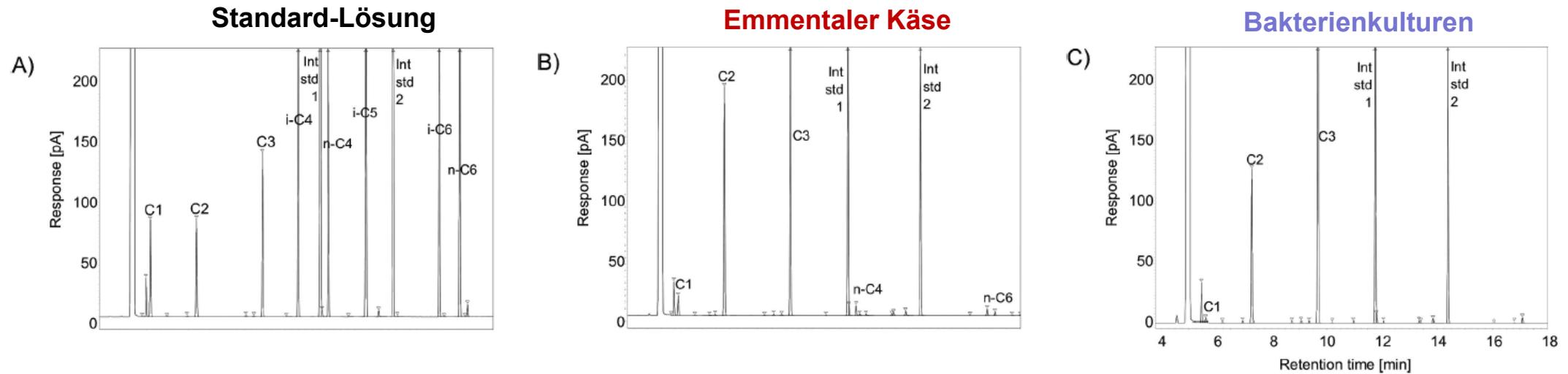
- Schweizer Hart- und Halbhartkäseproben aus der Versuchskäserei von Agroscope oder aus dem lokalen Lebensmittelhandel:
  - Appenzeller (n = 3)
  - Emmentaler (n = 38)
  - Gruyère (n = 19)
  - Sbrinz (n = 4)
  - Raclette (n = 8)
  - Alpkäse (n = 9)
- 41 Propionsäurekulturen
- Aufgestockte / nicht aufgestockte und Kontrolllösungen (10 µg/ml und 40 µg/ml jeder Carbonsäure)



Agroscope's experimental cheese factory (A), Agilent 8890 gas chromatograph coupled with a flame ionization detector and a PAL3 autosampler in headspace mode (B).



# Wiederfindungsrate



**Table 1**  
Recovery rate of free volatile carboxylic acids in different types of cheese.

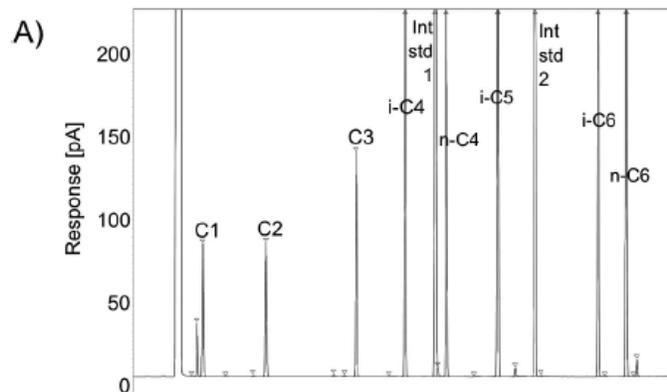
Cheese	Added level (mmol kg <sup>-1</sup> )	Sbrinz (n = 10)		Appenzeller (n = 10)		Gruyère (n = 10)		Mean (n = 3) Recovery ± SD (%) <sup>a)</sup>
		Sample (mmol kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Sample (mmol kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Sample (mmol kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	
C1	13.29	0.70	109	1.91	106	1.82	110	108 ± 2
C2	8.44	9.90	96	9.39	83	16.35	92	90 ± 7
C3	7.12	0.70	109	0.80	107	0.45	110	109 ± 2
i-C4	5.23	0.00	108	0.86	105	0.16	110	108 ± 3
n-C4	5.45	1.05	108	0.19	106	1.57	108	107 ± 1
i-C5	4.53	<0.01	107	2.04	104	0.18	108	106 ± 2
i-C6	3.79	0.00	103	0.00	100	0.00	99	101 ± 2
n-C6	4.00	0.26	105	0.00	95	0.05	98	99 ± 5

Mean and standard deviation of 3 types of cheese.

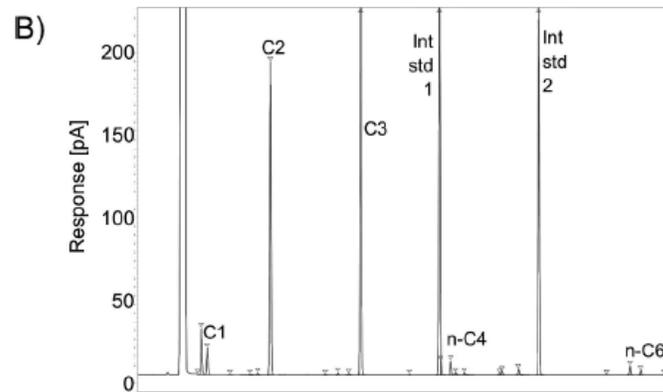


# Präzision

## Standard-Lösung



## Emmentaler Käse



## Bakterienkulturen

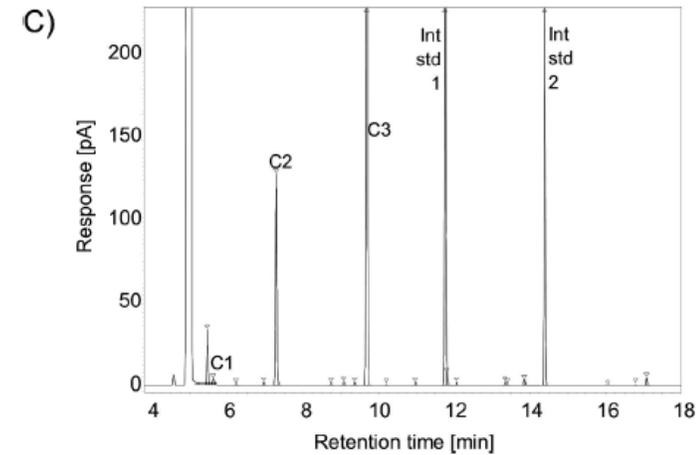


Table 3

Precision data of the FVCAs at different levels in cheese and bacterial cultures.

Cheese	max. Level (mmol kg <sup>-1</sup> )	<i>n</i> Samples	RSD <sub>r</sub> (%)	Repeatability <i>r</i> (mmol kg <sup>-1</sup> )	HORRAT <sub>r</sub>	Bacterial cultures	max. Level (mmol kg <sup>-1</sup> )	<i>n</i> Samples	RSD <sub>r</sub> (%)	Repeatability <i>r</i> (mmol kg <sup>-1</sup> )	HORRAT <sub>r</sub>
C1	9	78	1.5	0.4	0.35	C1	4	41	3.7	0.4	0.77
C2	68	78	1.4	2.7	0.48	C2	83	41	1.1	2.6	0.37
C3	100	78	0.9	2.5	0.31	C3	164	41	0.7	3.4	0.28
i-C4	1	74	0.3	0.01	0.05	i-C4	0.1	41	3.7	0.01	0.48
n-C4	10	78	0.4	0.1	0.11	n-C4	0.17	41	3.1	0.01	0.44
i-C5	1	78	0.9	0.02	0.16	i-C5	0.07	41	4.2	0.01	0.52
i-C6	0.4	42	0.8	0.01	0.14	i-C6	0	0			
n-C6	1	78	1.0	0.02	0.19	n-C6	0	0			



# Nachweisgrenze / Quantifizierung

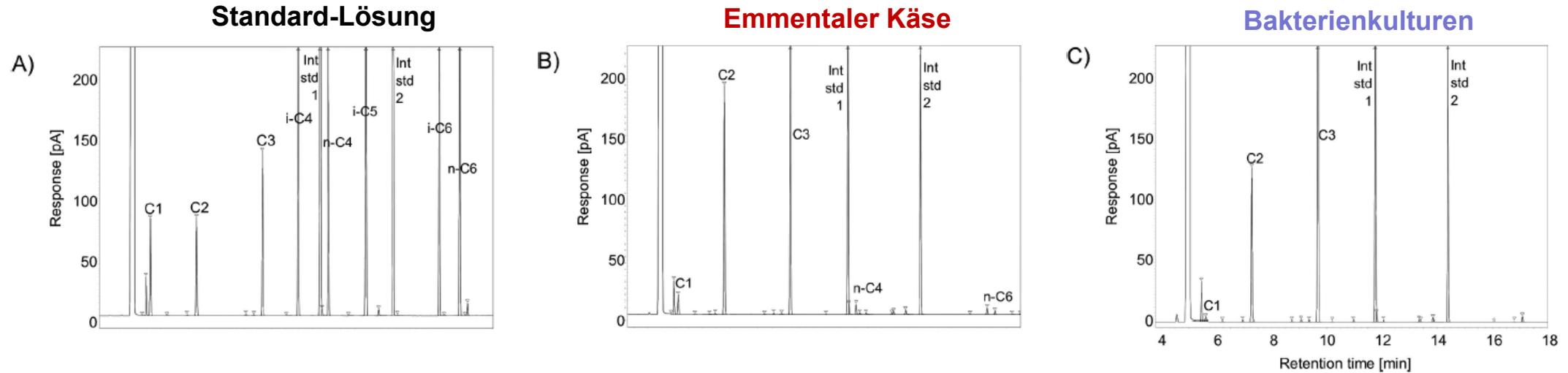


Table 4

LOD and LOQ of the FVCAs at different levels in cheese and bacterial cultures.

Cheese (n = 10) <sup>a</sup>	LOD		Lower LOQ		Upper LOQ	
	( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	( $\text{mmol kg}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )
C1	0.29	13.5	0.98	45.0	136	6270
C2	0.19	11.4	0.63	37.8	86	5160
C3	0.10	7.6	0.34	25.2	73	5370
i-C4	0.04	3.4	0.13	11.3	54	4730
n-C4	0.05	4.3	0.16	14.3	55	4890
i-C5	0.03	3.0	0.10	10.1	46	4710
i-C6	0.03	3.2	0.09	10.8	39	4510
n-C6	0.03	3.4	0.10	11.4	41	4770

<sup>a</sup> The limits for bacterial cultures must be extended by a factor of 2.

Nachweisgrenzen (LOD)

Bestimmungsgrenzen (LOQ)

# Schlussfolgerungen

- Gute Wiederfindungsraten: 90 bis 108 %  
gegenüber 96,51 bis 108,83 %<sup>1</sup> oder 96,51 bis 108,83 %<sup>2</sup> in der Literatur
- Hohe Präzision: RSD < 1,5 %  
gegenüber < 10 %<sup>2</sup> oder < 5 %<sup>3</sup> in der Literatur
- Hohe Empfindlichkeit: LOD: 3 bis 13 µg/kg ; LOQ: 10 µg/kg bis 6300 mg/kg  
vs LOD 7 bis 43 µg/kg und LOQ 18 bis 109 µg/kg<sup>4</sup> oder LOQ von 5,71 bis 11,20 µg/ml <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Innocente, Moret, Corradini, & Conte, 2000. Einfache Extraktion der FVCAs mit Wasser + GC-FID.

<sup>2</sup> Kim, Kwon, Choi, & Ahn, 2019. Extraktion mit Ethylether-Hexan gefolgt von Aminopropyl-Festphasenextraktion (SPE) + GC-FID.

<sup>3</sup> Berard, Bianchi, Careri, Chatel, Mangia, & Musci, 2007. Dynamische Headspace-Extraktionstechnik in Verbindung mit GC-MS.

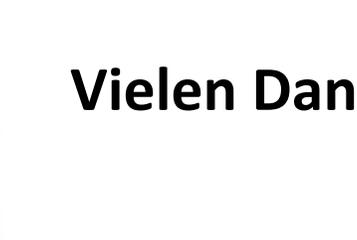
<sup>4</sup> Rincon, Pino, Ayala, & Afonso, 2014. Multiple headspace solid-phase microextraction (MHS-SPME) + GC-FID.

# Schlussfolgerungen

- Gleichzeitige quantitative Bestimmung von (FFCA).
- In Käse und Bakterien-Kulturen.
- Einfach in der Anwendung und sehr robust.
- Optimiert und validiert für acht Zielanalyten.



- <sup>1</sup> Innocente, Moret, Corradini, & Conte, 2000. Einfache Extraktion der FVCAs mit Wasser + GC-FID.
- <sup>2</sup> Kim, Kwon, Choi, & Ahn, 2019. Extraktion mit Ethylether-Hexan gefolgt von Aminopropyl-Festphasenextraktion (SPE) + GC-FID.
- <sup>3</sup> Berard, Bianchi, Careri, Chatel, Mangia, & Musci, 2007. Dynamische Headspace-Extraktionstechnik in Verbindung mit GC-MS.
- <sup>4</sup> Rincon, Pino, Ayala, & Afonso, 2014. Multiple headspace solid-phase microextraction (MHS-SPME) + GC-FID.



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit**

**Grégory Pimentel**

[gregory.pimentel@agroscope.admin.ch](mailto:gregory.pimentel@agroscope.admin.ch)

**Agroscope** gute Lebensmittel, gesunde Umwelt

[www.agroscope.admin.ch](http://www.agroscope.admin.ch)

