

II. ARAŞTIRMALAR

PEYNİRLERDE OLGUNLAŞMA SONUNDA ORTAYA ÇIKAN KISA KARBON ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN TAYİN METODLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Doç. Dr. Nurhan AKYÜZ/1

ÖZET

Bu çalışmada örneklerdeki uçucu yağ asitlerini miktar bakımından asgari kayıplarla elde edebilmek için, analiz maddeleri farklı miktarlarda alınmış ve değişik yöntemler uygulanmıştır. Sonuç olarak 1 gr. peynir, asitlendirildikten sonra dolgu maddesi Silicic asit olan kolonda bütanolün kloroform içindeki % 1'lik eriğiyle ile yıkanarak yağ asitleri peynirden ayırılmıştır. Elde edilen asitler dekanolla esterleştirilip, ince tabaka kromatografisi ile asit esterleri saf halde ayrılmıştır. Plâkalardan kazınan madde içindeki asitesterleri % 100 ether eriyiği ile yıkanarak, 5 ml. lik cambalon içinde toplanmıştır. Buradan alınan 3 mikrolitre gazkromatografisine enjekte edilmiş, örnekteki miktarları geri alma oranları Asetik asit esteri için % 87, Propionik asit esteri için % 92, Tereyağ asiti esteri için % 87 Valerik asit esteri için de % 85 olarak saptanmıştır.

I - GİRİŞ

Peynir olgunlaşması, belli bir zaman içerisinde mikroorganizmalar ve enzimlerin birlikte çalışmaları ile sağlanır. Olgunlaşma zamanı boyunca süt bileşenleri bunlar tarafından çeşitli ürünlere parçalanır. Peynir kalitesi ve aroması olgunlaşma sonunda ortaya çıkan bu maddeler tarafından tayin edilmektedir. Organoleptik kriterleri etkileyen bu maddelerin istihsal edilmesinde yağ önemli bir kaynaktır. Lipolitik organizmalar tarafından yağın hidrolize edilmesi ile bileşiminde bulunan yağ asitleri serbest hale ge-

çer. Bunlar içerisinde, uçucu olmaları ve suda kolay erimeleri gibi özelliklerden ötürü duyu organımızla kolay hissedilen kısa karbonlu yağ asitleri, peynir aromasına tesir eden bileşenlerin başında gelmektedir. Olgunlaşma sonunda ortaya çıkan bu yağ asitlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri konusunda, çeşitli yöntemlerle çok sayıda araştırmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır. Ele aldığımız konuda da kısa karbonlu yağ asitlerinin tayin metodu üzerinde durulmaktadır.

1/ Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt ve Gıda Teknolojisi Öğretim Üyesi

II - Materyal ve Metod

A- Araştırmada kullanılan çeşitli maddeler:

1- Kaşar peyniri

2- H_2SO_4 (% 50)

3- Silisik Asit

4- Alfamin Red indikatörü: 50 mgr. alfamin red indikatörü 25 ml. saf su içinde eritilir.

5- 1 N - NH_4OH

6- Saf Su

7- Butanol-kloroformeriği (% 1): Ayırıcı huni yardımı ile kloroform içerisinde bulunan alkol, kloroformun yarısı kadar saf su ile üç defa yıkanarak alınır. Ayırıcı huni içinde yıkanmış bir litre kloroforma 10 ml. n-butanol ilave edilir, kuvvetlice çalkalanır ve 25 ml. saf su ilave edilerek tekrar çalkalanır. İlave edilen suyun üstte toplanması için bir müddet bekledikten sonra, musluk açılarak eriyik alınır. Sulu kısım atılır. Eriyik içinde kalan suyu yok etmek için, içerisine granule Na_2SO_4 atılır.

8- Butanol-kloroform eriği (%10): 900 ml. önceden yıkanmamış kloroform ayırıcı huni içinde 100 ml. n-butanol ilave edilir, karıştırılır, 25 ml. saf su ilave edilir, tekrar karıştırılır. Kloroform eriği sudan ayrılınca musluk açılarak alınır, eriyik içinde kalan su-

yu yok etmek için granule Na_2SO_4 ilave edilir.

9- Na_2CO_4 eriği (% 1)

10- 0.1 NaOH

11- Decanol

12- Al_2O_3

13- % 55 ether (hexan içinde).

14- Silica gel

15- 2,4 dichlorofloure scein

16- % 100 ether

B- Araştırmada kullanılan Malzemeler ve Aletler:

1- Kurutma fırını

2- Havan

3- Ayırıcı huni

4- Cam yünü

5- Basınç kaynağı (azot gazı)

6- Bağlayıcı cam malzeme ve seh-palar.

7- Santrifuj şişesi (250 ml.)

8- Santrifuj (1500-1600 devir/dak.)

9- Şırınga (100 ml.).

10- Kapaklı cam tüp (5 ml).

11- Isıtıcı

12- Kolon kromatografisi

13- İnce tabaka kromatografisi (komple)

14- Gas kromatografisi.

III- ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA:

A- Sonuçların elde edilmesi:

Kolon materyali; 10 gr. silisik asit (72 saat $175^\circ C$ de tutulmuş) 2 ml. Alphamine Red indikatör ve

ve 1 N NH_4OH eriğinden 3 damla ile porselen havan içinde ezilerek hazırlanmıştır. Daha sonra silisik asitin butanol-kloroform eriği içinde

yapışıcı katı madde halinde toplanmasını önlemek için yeterli miktarda su (2 ml kadar) ilave edilmiş ve homojen bir eriyik elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Homojen eriyik, cam pamuğu ile dar kısmı kapatılmış olan kromatografi tüpüne dökülmüş, tüp içinde hava kabarcıklarının oluşumuna mani olmak için tüp dökme esnasında hafif eğik tutulmuştur. Tüp kolon materyali ile dondurulduktan sonra, dikey olarak bir sehpaye raptedilmiştir. Cam tüpü basınç kaynağına bağlamak için, üst kısmına içinden ince cam boru geçen lastik tıpa yerleştirilmiş, 5-10 lb/İnc² basınçla kolon materyali tüp içine yerleştirilmiştir.

Kolon hazır hale gelince, sıvı kısmın seviyesi, katı materyal seviyesine gelinceye kadar basınç tatbik edilmiştir. Burada dikkat edilecek nokta, sıvı kısmın düzeyinin katı materyal düzeyinin altına düşmemesidir. Aksi halde kolonu yeniden hazırlamak gerekir.

Metodun etkinliğini saptamak için, araştırılan kısa karbonlu yağ asitlerinin esterleri hazırlanmış, bunlardan belli mektarlarda gas kromatografisine enjekte edilmiştir. Ayrıca, asetik, propionic, butyric ve valerik asitlerin her birinden 25 mikrogram alınarak karıştırılmış, örneğe tatbik edilen metod aynıyle bu karışıma tatbik edilmiştir. Standart eriyiklerden ve hazırlanan karışım esterlerinden gas kromatografisine enjekte edilen örneklerden elde edilen pik sahalarının mukayesesi ile recovery rasyon (tekrar geri elde etme oranı) tayin edilmiştir.

Peynir örneği de şu şekilde hazırlanmıştır:

Bir gram peynir, % 50 lik sülfirik asitle pH = 1.8-2.0'ye dönü-

şünceye kadar asitlendirilmiştir. 175°C de 72 saat kurutulan silisik asitten 5 gr. alınarak peynir örneği ile karıştırılmış ve bir havanda iyice ezilmiştir. Elde edilen örnek hazırlanan kolonun üst kısmına dikkatlice alınmıştır.

Yağ asitleri karışımından elde edilen örnekle, hazırlanan peynir örneği ayrı ayrı kolonlara alınmıştır. Kolonların altına 250 cm³. lük birer santrifüj tüpü konmuş ve kolonlar % 1 lik butanol-kloroform eriyiği ile doldurulmuştur.

Eriyik düzeyleri kolon materyalleri düzeylerine ulaşınca kadar, basınçla eriyik kolonlardan geçirilerek kolonlar altındaki santrifüj tüplerine alınmış, bu işleme santrifüj tüplerindeki eriyik miktarları 250 cm³'ü buluncaya kadar devam edilmiştir. Bu suretle asetik asit hariç diğer serbest yağ asitleri santrifüj tüplerinde toplanmıştır. Asetik asiti de kolonlardan tüpe almak için, kolonlar % 10'luk butanol-kloroform eriyiği ile yıkanmıştır.

Yağ asitlerini içeren 250 cm³'lük tüpler, 1 cm³ % 1 Na₂ CO₃ ilave edildikten sonra, iyice karıştırılarak santrifüje yerleştirilmiş ve 5 dakika 1600 devir/dakika'da döndürülmüştür. Santrifüj tüplerinde, üst düzeyde toplanan yağ asitlerinin altındaki butanol-kloroform eriyiği, bir şırınga yardımı ile alınarak atılmıştır. Geriye kalan kısımlar, 5 cm³ lük ağız kapalı tüplere, birinci tüpler çok az su ile çalkalanmak sureti ile alınmış 1 mikrolitre 0.1 N NaOH ilave edilerek, sıcak yüzey üzerinde kurutulmuşlardır. Kurutma esnasında, oksitlenme ile kayıpları önlemek için, tüpler

içerisine azot gazı verilmiş ve tüpler su dolu beher içerisine daldırılmıştır. Yağ asitlerinden başka maddelerin uçurulmasından sonra asitlerin esterleştirilmesi için tüplere 0.1 cm³ dekonol ilave edilmiş, örmeklerin tam kurumalarını sağlamak için 35 mikrolitre sülfirik asit (reagent) konmuş, 600 devir/dakikada 5 dakika döndürülmüşlerdir. Daha sonra tüplerin ağzı kapatılarak 55°C de 2-3 saat ısıtılmıştır.

Isıtma işleminin tamamlanmasından sonra, örnekler hexan'la sulandırılmış ve tamamen 0.75 mm. lik silika gel G ile kaplanmış ince tabaka plakaları üzerine yayılmışlardır. Daha sonra, plakalar cam küvet içinde, % 10 dietilether (hexan içinde) eriyiğine daldırılarak geliştirilmiş, küvetten çıka-

rılan plakalar bir kaç dakika kurutulduktan sonra, 2, 4 dichloroflour-escein püskürtülerek yağ asit esterleri bantları, florasans ışığı altında saptanmıştır. Yağ asit ester bantları plakalar üzerinden kazanarak kolonlara alınmış, % 100 dietiletherle 6 defa her seferinde 5 ml. kullanarak yıkanmış, silica gel G'den ayılmışlardır. Ether, nitrojen gazı ile uçurulmuş, yağ asit esterleri 5 ml. hexanla yeniden sulandırılmış bunlardan alınan 3 mikrolitre'ler Gaz kromatografisine enjekte edilmiştir. Gas kromatografisinde S. E. 30 kolon kullanılmıştır. Kolon 160°C de 4 dakika tutulmuş, daha sonra 8 dakika içinde kolon ısı 250°C ye çıkartılmış, yağ asit ester pikleri elde edilinceye kadar bu sıcaklıkta tutulmuştur.

B- SONUÇLAR ve TARTIŞMA:

Kısa karbonlu asitlerin standart olarak hazırlanan dekanol esterlerinden elde edilen piklerle; aynı asitlerin modu uygulanarak elde edilen

piklerin mukayesinde, her asit esterleri için tekrar geri elde etme oranları Tablo (1) de gösterilmiştir.

Tablo -1- Kısa Karbonlu Yağ Asitleri Esterleri Tekrar Geri Elde Etme Oranları

Esterin adı	N	
	Geri elde etme oranı	
Dekanol Asetat	87	
Dekanol Propionat	92	
Dekanol butyrat	87	
Dekanol valerat	85	

Tablonun incelenmesinden anlaşılacağı gibi, kısa karbonlu yağ asitlerinin dekanolla yaptığı esterlerin açıklanan metotla tekrar geri elde etme oranları, araştırmacıyı tatmin edici düzeydedir.

Kayıplar oldukça azdır ve % 8-15 arasında değişmektedir. Esterleşme işleminde dekanol yerine metanol kullanıldığında bu kadar yüksek oranlar elde etmek zordur. Çünkü metil es-

terler çevre şartlarından daha çabuk etkilenir ve dekanol esterlerden daha uçucudurlar. Bundan dolayı metil esterlerin kayıp oranları daha yüksek olur. Metil esterlerin dekanol esterlere göre mahzurlu bir yönü de, elde edilmelerinden hemen sonra analiz edilme zorluğudur. Atmosfer nitrojeni içinde 2°C de 24 saatten fazla muhafazası, kayıp oranını artırmaktadır. Dekanol esterlerin ise aynı şartlarda bir kaç gün muhafazası mümkündür

(Sampling and oils Ce-Z-66, Sayfa 2).

Açıklanan metodla, kaşar peyniri örneğinin içerdiği kısa karbonlu yağ asitlerinin tayini üzerinde yapılan çalışmalar sonunda, peynirden bir gram alındığı ve daha önce açıklanan şekilde hazırlanarak kolona ilave edildiği taktirde, gas kromatografisinde 8 attenuation değerinde, 125°C de kısa karbonlu yağ asitlerin ölçülebilen piklerini elde etmek mümkün olduğu tesbit edilmiştir.

IV- A STUDY ON THE DETERMINATION METHODS OF THE SHORT CHAIN FATTY ACIDS IN RIPENING CHEESES:

In this research determination of the short chain fatty acids of ripening cheeses by means of gas chromatography was evaluated.

First, Short chain fatty acids are isolated by use of column and thin layer chromatography. The column preparation and separation of fatty acids are examined in official methods of Analysis of The Association of official Analytical chemists page 313-315. Second, eluted compounds of the fatty

acids are separated on thin layer plates. Then, the short chain fatty acids are scraped off from the plates and washed by using % 100 the ethylether. The ether solution is evaporated down to 5 ml. volum. After that, 3 ml of the short chain fatty acids esters are injected in to gas chromatography. The recovery ratios for decanol acetate, decanol propionate, decanol butyrate and decanol valerate are 87 %, % 92, % 87, % 85 respectively.

V- LİTERATÜR LİSTESİ

Barnett, A.J. ve G.A. Tawab., 1956. The Estimation of the Total Volatile Fatty Acids in Cheese. J. Dairy Research, 23: 277

Berridge, N.J., E.R. Hiscox ve M. Zielinska, 1953. Some Flavor Constituents of English Cheese. Proc. 13 th. Intern. Dairy Congr., 2: 587. 1953.

Bills, D.D., LL. Khatri ve E.A. Day., 1963. Method for the Determination

of the Free Fatty Acids of Milk Fat. J. Dairy Sci. 46: 1342.

Harper, W.J. 1953. Direct Chromatographic Determination of Acetic, Propionic and Butyric Acids in Cheese. J. Dairy Sci., 36: 808.

Herb, S.F., P. Magidman., F.E. Luddy ve R.W. Riemenschneider., 1962

Fatty acids of cows milk. B. Composition by Gas-Liquid Chroma-

tography Aided by Other Methods of Fractionation. J. Am. Oil Chemists Soc., 39: 142.

Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, Sayfa 313-315. 1975. Published

by the Association of Official Analytical Chemists. PO Box 540. Benjamin Franklin Station. Washington, DC 20044.

Sampling and Analysis of Commercial Fats and oils. Ce. 2-66, Sayfa. 2.