

شناسایی ترکیبات فرار پنیر سفید آب نمکی - ایرانی به روش گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی (GC - MS)

مریم هاشمی*، مهین آذر** و کوروش تبار حیدر***

خلاصه

با توجه به ارزش تغذیه ای و اقتصادی پنیر و اهمیت روزافزون ارتقاء ویژگیهای حسی این فرآورده مهم لبنی، بررسی ترکیبات مولد عطر و طعم و عوامل مؤثر در تشکیل آنها کاملاً ضروری می نماید. لذا به عنوان بخشی از مطالعه تغییرات بیوشیمیایی پنیر سفید آب نمکی - ایرانی طی فرآیند رسیدن، از روش گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی (GC - MS) جهت شناسایی ترکیبات مولد عطر و طعم استفاده گردید. مواد فرار پنیر سفید آب نمکی چهل و پنج روزه به روش (SDE) Likens-Nickerson استخراج گردید. عصاره های استخراجی با تزریق یک میکرولیتر از کنسانتره آماده شده به دستگاه گاز کروماتوگرافی GC - ۸۰۶۰ متصل شده به طیف سنج Trio - ۱۰۰۰ تجزیه گردیدند. شناسایی ترکیبات فرار نیز بر اساس مقایسه طیف ها با کتابخانه NIST صورت گرفت. تعیین مقدار کمی ترکیبات فرار با برقراری تناسب بین شدت هر پیک و شدت پیک استاندارد داخلی محاسبه و برحسب نانوگرم به ازاء هر گرم پنیر ارائه شده است. آنالیز و شناسایی ترکیبات جداسازی شده نشان داد که عمده مواد فرار پنیر مورد آزمون از انواع کتونها، اسیدها، لاکتونها، آلدئیدها، دی متیل دی سولفید و تری متیل دی سولفید تشکیل شده است.

واژه های کلیدی: پنیر آب نمکی ایرانی، ترکیبات فرار، طیف سنجی جرمی

مقدمه

دکربوکسیلاسیون و دسولفوریزاسیون اسیدهای آمینه، بتااکسیداسیون اسیدهای چرب و حتی برخی واکنشهای سنتزی مانند استریفیکاسیون می باشند (۳).
شناسایی و اندازه گیری ترکیبات مولد عطر و طعم گام مهمی در جهت درک بهتر ویژگیهای حسی خاص هر نوع پنیر به حساب می آید همچنین کمک موثری در توسعه طعم و عطر مطلوب و ایجاد تنوع در پنیتهای تولیدی فراهم می کند. هدف از این مطالعه شناسایی و اندازه گیری انواع ترکیبات فرار در پنیر سفید آب نمکی ایرانی به روش آنالیز گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی

تسریع و تنوع در توسعه طعم پنیر یکی از اهداف عمده اقتصادی می باشد زیرا طعم نهایی محصول تعیین کننده بخشی از انتخاب مصرف کننده است. طعم که در طول رسیدن پنیر ایجاد می گردد، فرآیند پیچیده ای شامل سه مسیر متابولیکی عمده یعنی گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز می باشد. تغییرات بیوشیمیایی اولیه به واسطه واکنشهای مذکور ایجاد می گردند اما طعم نهایی پنیتر در نتیجه تغییرات کاتابولیکی ثانویه بسیار زیادی حاصل می شود که بر روی ترکیبات شیمیایی ناشی از واکنشهای اولیه صورت می گیرد این تغییرات شامل دامیناسیون،

*دانش آموخته دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه علوم و صنایع غذایی

*** مرکز تحقیقات شیمی و مهندسی شیمی ایران

پس از آن تا پایان دوره رسیدن به سردخانه ۶-۴ درجه سانتیگراد منتقل گردید. به منظور تعیین ترکیبات فرار در روز چهارم و پنجم از پنیرهای تولیدی در سه تکرار نمونه برداری و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲) جداسازی ترکیبات فرار

بدین منظور یک نمونه ۵۰ گرمی از پنیر خرد و یکنواخت شده با ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به بالن ته گرد یک لیتری منتقل شد سپس بالن مذکور به دستگاه استخراج **Likens - Nikerson** وصل گردید (شکل ۱). به یک بالن ته گرد یکصد میلی لیتری نیز ۵۰ میلی لیتر دی کلرومتان و ۷۰ میکروگرم دئودکان در دی کلرومتان به عنوان استاندارد داخلی اضافه شد. ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان هم به حلقه برگردان حلال دستگاه استخراجی **Likens-Nikerson** اضافه شد. بالن نمونه و حلال را تا دمای جوش حرارت داده و با تداوم حرارت عمل رفلکس به مدت چهار ساعت ادامه یافت. سپس حرارت قطع و بالنها تا رسیدن به شکل ۱- دستگاه استخراج **Likens-Nikerson** دمای اتاق خنک شدند به دنبال آن دی کلرومتان بالن حلال و حلقه برگردان جمع آوری شد. دی کلرومتان جمع آوری شده ابتدا در حضور سولفات سدیم، خشک شده سپس با استفاده از گاز ازت تا حجم ۰/۵ میلی لیتر تغلیظ گردید.

۳) گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی

GC - MS

عصاره های استخراجی **Likens-Nikerson** با تزریق یک میکرو لیتر از کنسانتره آرومایی آماده شده به دستگاه گاز کروماتوگرافی GC-۸۰۶۰ متصل شده به طیف سنج ۱۰۰۰ - **Italy Trio** - **Fisons** تجزیه گردیدند. سیستم گاز کروماتوگرافی مجهز به ستون **CP 5CB ۳۰m × ۰/۲۵ mm** و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر بود. از هلیوم به

جرمی (GC - MS) عصاره حاصل از **Simultaneous am distillation- extraction (SDE, Likens-Nickerson)** می باشد. ترکیبات فرار

چندین نوع پنیر توسط محققین مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است و در این رابطه مقالات مروری متعددی ارائه شده است (۱، ۲). وان دوايگ و رینسون در سال ۱۹۹۰ اثر تکنیکهای مختلف جداسازی شامل تقطیر، دیالیز و استخراج با حلال را بر ترکیبات فرار پنیر چدار مقایسه کردند (۵). ویژگیهای طعمی شش نوع پنیر اسپانیایی نیز در سال ۱۹۹۱ توسط فروتوس و همکارانش به روش (GC - MS) عصاره **SDE** توصیف گردید (۴). در سال ۱۹۹۹، دیرینک و واین پروفیل ترکیبات فرار چندین نوع پنیر گودا و امتال را نیز به همان روش مورد ارزیابی قرار دادند. مطالعات متعددی نشان داده است که طعم پنیر به واسطه تعداد معدودی از ترکیبات فرار ایجاد نمی گردد بلکه نتیجه تعادل مخلوط پیچیده ای از ترکیبات مختلف می باشد (۲). بنابراین از جمله روشهای کارا در توصیف دستگاهی عطر و طعم پنیر ترکیبی از یک روش جداسازی مناسب مواد فرار، پروفیل **GC** یا **GC - MS** و فرآوری داده های حاصله به روش آماری مناسب مانند **Principal Component Analysis** می باشد.

مواد و روش کار

۱) پنیر

فرآیند رسیدن برای اغلب پنیرهای تولیدی کشور تعریف نشده است. مدت زمان رسیدن نیز به میزان عرضه و تقاضا بستگی دارد لذا به منظور حصول اطمینان از طی کردن مرحله رسیدن پنیر سفید آب نمکی به روش یکی از کارخانجات بزرگ کشور در مقیاس پایلوت در بخش تحقیق و توسعه مجتمع کارخانجات پگاه تهران وابسته به شرکت سهامی صنایع شیر ایران در دو نوبت به فاصله یک هفته تولید و پانزده روز در دمای ۱۲-۱۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲- بوتانون (استوئین) می‌باشد که احتمالاً به متابولیسم کربوهیدرات مربوط می‌شود و در اثر کندانه شدن آنزیمی دو مولکول استائید یا بر اثر احیاء دی استیل تشکیل می‌شود. دی استیل یا بوی شدید کره‌ای به علت نزدیکی وزن مولکولی با حلال قابل اندازه گیری نبوده است (۲). شدت تولید متیل کتونها با غلظت اسیدهای چرب آزاد به عنوان پیش ساز ارتباط مستقیم ندارد به طوریکه اسیدهای چرب آزاد با غلظت بالا ممکن است نقش مهار کننده داشته باشند (۳).

اسیدهای چرب آزاد دسته دیگری از ترکیبات فرار شناسایی شده در پنیر سفید آب نمکی بوده که حاصل فعالیت لیپولیتیکی می‌باشند. مقدار زیادی اسیدهای چرب زنجیر متوسط (C₆ تا C₁₀) با تعداد کربن زوج و همچنین اسیدهای چرب زنجیر متوسط با تعداد کربن فرد با غلظت کمتر در نمونه های مورد آزمایش وجود داشته اند.

شش نوع لاکتون از نوع دلنا و گاما در این مطالعه شناسایی گردید. لاکتونها استرهای حلقوی هستند که از استریفیکاسیون درون مولکولی هیدروکسی اسیدها با از دست دادن یک مولکول آب و تشکیل ساختار حلقوی ایجاد می‌شوند. لاکتونها ممکن است از طریق احیاء کتواسیدهای تولید شده در نتیجه لیپولیز نیز تشکیل شوند(۳).

دلنالاکتونها آستانه طعم بسیار پائینی دارند و به نظر می‌رسد که غلظت آنها با شدت طعم مرتبط باشد (۳). نقش لاکتونها در ایجاد طعم کره ای پنیر نیز کاملاً شناخته شده است (۲).

نوعی آلکن به نام فیتین نیز در نمونه های مورد بررسی شناسایی گردیده است. احتمالاً حضور آلکنها مربوط به خوراک دام است و نه فرآیند رسیدن (۲). ترکیبات گوگردی دی متیل دی سولفید و دی متیل تری سولفید نیز در نمونه های مورد بررسی شناسایی شده‌اند. ترکیبات مذکور بسیار فرار بوده و از اکسیداسیون متیونال و متان دی آل تشکیل می‌شوند این

عنوان گاز حامل با شدت جریان ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. برنامه حرارتی ستون ابتدا روی C ۳۵۰ به مدت ۵ دقیقه و سپس به منظور رسیدن به دمای C ۲۵۰ با شدت ۴/۵ درجه سانتیگراد به ازاء هر دقیقه تنظیم گردید. ستون به مدت ۴۵ دقیقه در این دما باقیمانده سپس با سرعت C ۳۰۰ به ازاء هر دقیقه تا دمای C ۳۵۰ سرد شد. از تزریق نسبت تقسیم (Split) با نسبت ۱:۲۰ استفاده شد. دمای محل تزریق (Injector) و خطوط اتصال (Transfer lines) C ۲۵۰ بود.

طیفهای جرمی توسط دستگاه GC - MS باسیستم یونیزاسیون برخورد الکترونی (Electron Impact.EI) تحت انرژی ۷۰ الکترون ولت گرفته شدند. کروماتوگرامها با ردیابی (TIC) Total Ion Current در محدوده جرمی ۲۰ - ۴۵۰ ثبت گردیدند. شناسایی ترکیبات فرار نیز بر اساس مقایسه طیف ها با کتابخانه NIST صورت گرفت. تعیین مقدار کمی ترکیبات فرار با برقراری تناسب بین شدت هر پیک و شدت پیک استاندارد داخلی محاسبه و برحسب نانوگرم به ازاء هر گرم پنیر ارائه شده است. اندازه گیری نیز در سه تکرار انجام و میانگین مربوطه به عنوان مقادیر کمی گزارش گردیده است.

نتایج و بحث

شکل ۲ پروفیل GC-MS پنیر سفید آب نمکی چهل و پنج روزه را نشان می‌دهد. ترکیبات شناسایی شده توسط MS نیز بر اساس طبقه بندی شیمیایی در جدول ۱ فهرست شده اند که عبارتند از: کتونها، اسیدها، لاکتونها، الدیها و ترکیبات سولفیدی. ۲- متیل کتونها (C ۵ تا C ۱۵) با تعداد کربن فرد از جمله ترکیبات عمده شناسایی شده می‌باشند. این ترکیبات از تجزیه چربیها حاصل شده و از طریق بتا اکسیداسیون و دکربوکسیلاسیون اسیدهای چرب تشکیل می‌شوند. از جمله کتونهای موجود ۳- هیدروکسی -

نیز گزارش شده است. لازم به ذکر است که تفاوت مذکور نقش اساسی در ویژگیهای حسی فرآورده نهائی و تنوع طعم دارد. به طوری که این امرعامل توسعه انواع پنیرهای تولیدی علی رغم یکسان بودن شیر مصرفی به عنوان ماده اولیه می باشد.

ترکیبات خود از تجزیه اسید آمینه میتونین حاصل می گردند. اسید ایزو والریک نیز از تجزیه لوسین ناشی می شود. حضور آلدئیدها هم با متابولیسم اسیدهای آمینه مرتبط می باشد (۳، ۶).
عمده ترکیبات شناسائی شده در این تحقیق در دیگر انواع پنیر با مقادیر کمی و نسبتهای متفاوت

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار* ترکیبات فرار جدا شده از پنیر سفید آب نمکی

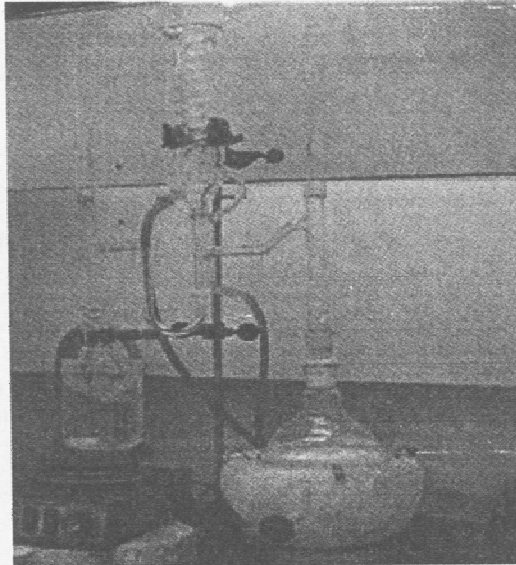
میانگین و انحراف معیار	نوع ترکیب فرار	میانگین و انحراف معیار	نوع ترکیب فرار
	لاکتونها:		کتونها:
۲۷۰±۴۶	δ - دکالاکتون	۱۶۰ ± ۵۷	ایزوپروپیل متیل کتون
۸۹۳±۱۱۶	δ - دودکالاکتون	۱۲۹ ± ۸۲	۲- بوتان - ۳- هیدورکسی
۶۲۰±۱۸	δ - تترادکالاکتون	۲۸۳ ± ۱۷۷	۴- متیل - ۲- هیدورکسی - پنتانول
۱۲۹±۵	δ - هگزادکالاکتون	۱۱۰ ± ۱۴	۲- پنتانول
۴۸±۱۳	γ - لاکتون غیر اشباع	۲۷۷ ± ۱۴۱	۲- هپتانول
۸۸±۲	۲ (۳H) فورانون، در هیدرو- ۵ (۲- اکتیل)	۳۱۱ ± ۵۸	۲- نونانول
	γ - دودکالاکتون	۵۶۲ ± ۲۱	۲- ان دکانون
	آلدئیدها:	۷۳۷± ۵۲	۲- تری دکانون
۳۱±۲۲	۲ - متیل والر آلدئید	۸۰۳ ± ۲۵	۲- پنتادکانون
۴۳۳±۱۶۱	هگزا دکانال		اسیدها:
	ترکیبات سولفیدی:	۳۴ ± ۳	لاکتیک اسید - ۲- متیل
۱۱±۸	دی متیل دی سولفید	۱۳ ± ۲	ایزو والریک اسید
۱۷±۱۲	دی متیل تری سولفید	۱۸۴۸ ± ۵۳۳	هگزانوئیک اسید
	سایر ترکیبات:	۸۵۴۶ ± ۳۰۶۱	اکتانوئیک اسید
۲۱±۱۴	۲ - هگزانول	± ۱۲۲۵۴ ۲۶۷۹۳	دکانوئیک اسید
۱۹۱±۶	فیتین	۳۲۰ ± ۲۸۰	ان دکانوئیک اسید
		± ۱۰۲۸۰ ۱۹۰۲۶	دودکانوئیک اسید
		۱۰۱ ± ۶۲	تری دکانوئیک اسید
		± ۸۸۷۴ ۱۳۳۱۴	تترادکانوئیک اسید
		۲۶۶ ± ۲۱۲	پنتادکانوئیک اسید
		۴۵۹۵ ± ۵۱۰	هگزادکانوئیک اسید

* نانو گرم به ازاء هر گرم پنیر

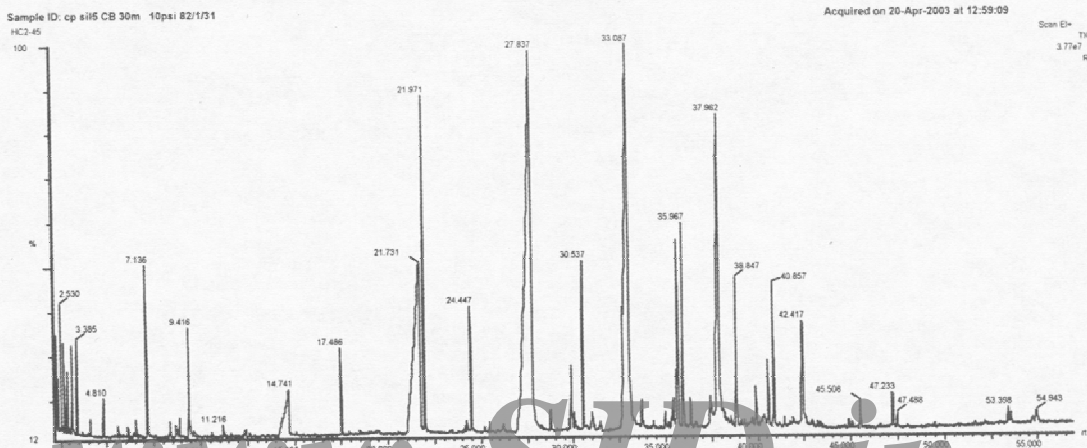
ویژگیهای حسی پنیر سفید ایرانی داشته باشند. البته با توجه به تاثیر عوامل متعدد بر ویژگیهای حسی پنی‌های تولیدی، آنالیز نمونه های بیشتری به منظور دستیابی به نتایج کلی تر از نظر نوع ترکیبات فرار و مقادیر آنها در پنیر سفید ایرانی ضرورت دارد.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آنالیز GC-MS ترکیبات فرار عصاره استخراجی Nikerson-Likens گام مناسبی جهت شناسایی دستگاهی ویژگیهای عطر و طعم پنیر سفید آب نمکی بوده و نتایج حاصله به همراه ارزیابی حسی می‌توانند نقش موثری در انتخاب روشهای مناسب جهت ارتقاء

Archive of STD



تصویر ۱: دستگاه استخراج Nikerson-Likens



تصویر ۲: نمونه ای از طیف GC-MS عصاره استخراجی پنیر سفید آب نمکی به روش Nikerson-Likens

سپاسگزاری

این مطالعه با پشتیبانی شرکت سهامی صنایع شیر ایران و مرکز تحقیق و توسعه مجتمع کارخانجات پگاه تهران انجام گردید. آزمونهای GC-MS نیز در مرکز تحقیقات شیمی و مهندسی شیمی ایران با همکاری صمیمانه خانم نخبان انجام گردید.

Identification of Volatile Components of Iranian - White Brined Cheese by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Archive of SID

Hashemi, M.* Azar, M.** and Tabar Hydar, K.***

Summary

Improvement of cheese sensory characteristics with due attention to nutritional & economical importance has been necessary. So investigation of volatile compounds and factors that affect this kind of reactions is very essential. For this reason, as a part of a study concerning the biochemical changes during ripening of Iranian-white brined cheese, gas chromatography-mass spectrometry was used for identification of aroma and flavour components. Volatile components of 45-day old white brined cheese were extracted by simultaneous steam distillation-extraction (SDE, Likens-Nickerson). Prepared extracts were analysed by injection of 1 μ l on a GC-8060 coupled to a MS Terio-1000. Identification of the volatiles was based on comparison of the spectra with those of the NIST library. Semi-quantitative determination of the volatile constituents were calculated by relating the peak intensities to the intensity of internal standard and were expressed as ng per gram of cheese. Most of the volatile fractions were composed of methylketones, fatty acids, lactones, aldehydes, dimethyl disulfide and trimethyl disulfide.

Key words: Iranian- white brined cheese, Volatile compounds, GC-MS

www.SID.ir

* Graduate from Food Science and Technology Faculty, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran
** Department of Food Science and Technology, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran
*** Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran

References

- 1- Adda, J. P.; Birch, C. G. and Lindley, M. G. (1987). Development in Flavours. Elsevier, London, p: 151.
- 2- Dirinck, P. and Winne, A. De. (1999). Flavour characterisation and classification of cheese by gas chromatographic - mass spectrometric profiling. Journal of Chromatography A, 847: 203 - 208.
- 3- Fox, P. F. (2000). Biochemistry of cheese ripening. In: Fox, P. F. (Ed). Fundamentals of Cheese Science , Aspen Publishers, Inc. pp: 236 - 278.
- 4- Frutos, M. D.; Sanz, J. and Martinez - Castro, I. (1991). Characterisation of Artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 39: 524 - 530.
- 5- Vandeweghe, P. and Reineccius, G. A. (1990). Comparison of flavour isolation techniques applied to cheddar cheese. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 38: 1549 - 1552.
- 6- Yvon, M. and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal, 11: 185 - 201.