

Analiza hlapljivih spojeva iz trajne kobasice kulenova seka

Žanko, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:737033>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ TRAJNE KOBASICE
KULENOVA SEKA

ZAVRŠNI RAD

TEA ŽANKO

Matični broj:1441

Split, ožujak 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STRUČNI STUDIJ KEMIJSKA TEHNOLOGIJA
SMJER PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ TRAJNE KOBASICE
KULENOVA SEKA

ZAVRŠNI RAD

TEA ŽANKO

Matični broj:1441

Split, ožujak 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
PROFESSIONAL STUDY CHEMICAL TECHNOLOGY
FOOD TECHNOLOGY DIRECTION

**STUDY OF VOLATILE COMPOUNDS FROM DRY FERMENTED
SAUSAGE *KULENOVA SEKA***

BACHELOR THESIS

TEA ŽANKO

Parent number:1441

Split, March 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Stručni studij Kemijske tehnologije
Smjer Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

Pomoć pri izradi: Marina Kranjac, doktorandica

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ TRAJNE KOBASICE *KULENOVA SEKA*

Tea Žanko, 1441

Sažetak:

Kulenova seka je tradicionalni mesni proizvod s područja istočne Hrvatske (Slavonije i Baranje) koja se ubraja u fermentirane trajne kobasice. Tijekom procesiranja fermentiranih proizvoda odvijaju se brojne enzimatske i neenzimatske reakcije koje dovode do povećanja koncentracije hlapljivih komponenata aroma. Te komponente su odgovorne za specifične okusne i mirisne osobine ovog proizvoda. Za ekstrakciju tih spojeva iz uzoraka korištena je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva su analizirani plinskom kromatografijom spektrometrijom masa (GC-MS). Ukupno je identificirano 20 spojeva. Identificirani spojevi su pripadali sljedećim kemijskim grupama: aldehidi, ketoni, alkoholi, aromatski ugljikovodici i organosumporni spojevi.

Ključne riječi: *kulenova seka*, HS-SPME, GC-MS, hlapljivi spojevi, arome

Rad sadrži: 30 stranica, 13 slika, 3 tablice, 21 literatura referena

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član - mentor

Datum obrane: 28. ožujak 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Professional study of Chemical Technology
Food Technology direction

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology,
session no. 3th

Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

Technical assistance: Marina Kranjac, PhD

STUDY OF VOLATILE COMPOUNDS FROM DRY FERMENTED SAUSAGE *KULENOVA SEKA*

Tea Žanko, 1441

Abstract:

Kulenova seka is a traditional meat product from eastern Croatia (Slavonija and Baranja) 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. For extraction of such compounds from the samples, a headspace solid-phase microextraction was used (HS-SPME). All the extracts were analysed by gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS). Total identified 20 volatile compounds. They belonged to the following chemical groups: aldehydes, ketones, alcohols, aromatic hydrocarbons and organosulfur compounds.

Keywords: *kulenova seka*, HS-SPME, GC-MS, volatile compounds, aroma

Thesis contains: 30 pages, 13 figures, 3 tables, 21 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Ani Radonić - PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Danijela Skroza – PhD, assistant prof. | member |
| 3. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date: March 28th, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom Doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od lipnja do rujna 2017 godine.

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći koju mi je pružio tijekom izrade i pisanja ovog završnog rada.

Također se zahvaljujem dr. sc. Marini Kranjac, na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i razumijevanju koju mi je pružala cijelo moje studiranje.

ZADATAK

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz tri uzorka trajne kobasice *kulenova seka*.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).
- Dobivene uzorke hlapljivih spojeva analizirati spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).
- Obradom dobivenih podataka utvrditi sličnosti i razlike dobivenih rezultata s objavljenom znanstveno-stručnom literaturom o hlapljivim spojevima *kulenove seke*.

SAŽETAK

Kulenova seka je tradicionalni mesni proizvod s područja istočne Hrvatske (Slavonije i Baranje) koja se ubraja u fermentirane trajne kobasice. Tijekom procesiranja fermentiranih proizvoda odvijaju se brojne enzimatske i neenzimatske reakcije koje dovode do povećanja koncentracije hlapljivih komponenata aroma. Te komponente su odgovorne za specifične okusne i mirisne osobine ovog proizvoda. Za ekstrakciju tih spojeva iz uzoraka korištena je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva su analizirani plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS). Ukupno je identificirano 20 spojeva. Identificirani spojevi su pripadali sljedećim kemijskim grupama: aldehidi, ketoni, alkoholi, aromatski ugljikovodici i organosumporni spojevi.

Ključne riječi: *kulenova seka*, GC-MS, HS-SPME, hlapljivi spojevi, arome

SUMMARY

Kulenova seka is a traditional meat product from eastern Croatia (Slavonija and Baranja) 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. For extraction of such compounds from the samples, a headspace solid-phase microextraction was used (HS-SPME). All the extracts were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Total identified 20 volatile compounds. They belonged to the following chemical groups: aldehydes, ketones, alcohols, aromatic hydrocarbons and organosulfur compounds.

Keywords: *kulenova seka*, GC-MS, HS-SPME, volatile compounds, aroma

SADRŽAJ

Uvod	1
1. Opći dio	2
1.1. Specifičnosti tehnologije proizvodnje trajnih kobasica	3
1.2. Dimljenje	4
1.3. Miris sušenog mesa	4
1.4. Analiza hlapljivih spojeva	7
1.4.1. Plinska kromatografija	7
1.4.2. Spektrometija masa	8
1.4.3. Spregnuta tehnika plinska kromatografija – spektrometija masa	10
2. Eksperimentalni dio	11
2.1. <i>Kulenova seka</i> (kulenica)	12
2.2. Aparatura	13
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva	13
2.4. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom (GC-MS)	15
3. Rezultati	17
3.1. Rezultati određivanja hlapljivih spojeva	18
4. Rasprava	23
5. Zaključak	26
6. Literatura	28

Uvod

Kobasice su proizvodi dobiveni nadijevanjem prirodnih ili umjetnih ovitaka smjesom različitih vrsta i količina usitnjena mesa, masnih tkiva, kožica, iznutrica, ostataka vezivnog tkiva i dodatnih sastojaka.

Ovici za kobasice štite nadjev od vanjskih utjecaja, a moraju omogućavati isparavanje vode iz nadjeva kao i prodiranje dima u nadjev. Osnovna namjena ovitka je da održava proizvod u obliku i veličini svojstvenima za pojedinačne vrste kobasica. Ovici mogu biti prirodni i umjetni.

Kobasice su najbrojnija skupina mesnih prerađevina i broje nekoliko stotina vrsta. S obzirom na sastav, trajnost i metode konzerviranja i povećanja trajnosti, u našoj zemlji se dijele na: trajne, polutrajne, obarene kobasice, kuhane kobasice i kobasice od iznutrica.



Slika 1. Trajne kobasice ¹

Trajne kobasice (slika 1), po sirovinskom sastavu i prehrambenoj vrijednosti, su najvrijedniji i najkvalitetniji kobasičarski proizvodi. Proizvode se od najkvalitetnijeg mesa i tehnološki se podvrgavaju dugotrajnom skupom procesu zrenja-fermentaciji. Na presjeku imaju izgled mozaika sastavljen od ujednačenog komadića čvrstog bijelog masnog tkiva bez šupljina i pukotina. Komadići čvrstog bijelog masnog tkiva ravnomjerno su raspoređeni, a prilikom narezivanja se ne smiju razmazivati ni ispadati iz nareska. Ovitak dobro prijanja uz nadjev i lako se narezuje na tanke nareske.²

1. Opći dio

1.1. Specifičnosti tehnologije proizvodnje trajnih kobasica

Suhomesnati proizvodi su uglavnom vrlo skupi specijaliteti koji se proizvode soljenjem ili salamurenjem i sušenjem ili termičkom obradom, uz dimljenje ili bez dimljenja.

Tehnološki proces proizvodnje *kulenove seke* (kulenice):³

1. **Izvor sirovina:** svinjsko meso I. i II. kategorije (30-70%) i slanina do maksimalno 30%.
2. **Primarna obrada:** obuhvaća klanje i obradu trupa, hlađenje svinjskih polovica, rasijecanje, iskoštavanje i odstranjivanje suvišnih masnoća i vezivnog tkiva, priprema mesa i priprema slanine, cijedenje i hlađenje mesa i slanine, usitnjavanje (promjer perforacije 6-8 mm) i miješanje zamrznutog mesa i slanine.
3. **Dodavanje soli i začina:** kuhinjska sol (1,8-2%), slatka paprika (0,6%), ljuta paprika (0,4%) i češnjak (0,25%).
4. **Miješanje nadjeva:** smjesa usitnjenog mesa i slanine, kuhinjske soli i začina.
5. **Nadijevanje kulara ili zadnjeg svinjskog crijeva:** najučinkovitije ukoliko se koristi vakuum punilica, jer sprječava stvaranja „zračnih džepova“.
6. **Vješanje sirovih kulenica:** na „pritka kolica“ u prostoriji za zrenje ili pušnice,
7. **Izjednačavanje temperature nadjeva, fermentacija:** provodi se u komorama za zrenje i optimalno traje 2 dana, uz osigurane optimalne uvjete za proces fermentacije (pri cca 20 °C).
8. **Hladno dimljenje, fermentacija, sušenje i zrenje:** hladno dimljenje ovisi o temperaturi i vlažnosti zraka. Tijekom dimljenja vrši se i sušenje proizvoda na zraku. Dim se obično dobiva sagorijevanjem jasena, graba ili bukve. Samo dimljenje traje dva tjedna, i to 3-4 sata svako drugi dan.
9. **Zrenje:** najznačajnija faza tehnološkog procesa proizvodnje *kulenove seke*. Tijekom zrenja koje traje 2,5-3 mjeseca, proizvod poprima specifična organoleptička svojstva te osobito svojstveni pikantan okus i miris po zrelom mesu i dimu, koji blago nadopunjava češnjak.

1.2. Dimljenje

Sušenje dimom, jedna je od najstarijih tehnika konzerviranja hrane. Konzervirajuće djelovanje dimljenjem zasniva se na:

- a) antioksidacijskom djelovanju dima koje je posljedica aktivnosti fenola te manjim dijelom kiselina i
- b) baktericidnom djelovanju dima, za što su odgovorni sljedeći spojevi u sastavu dima: formaldehidi, smole, masne kiseline, ugljikovodici, amonijak, octena i mravlja kiselina, alkoholi itd.

Važnija je uloga dimljenja dobivanje specifičnog, ugodnog mirisa i okusa mesa po dimu te zlatnožuta boja mesnih proizvoda.⁴ Pirolizom lignina nastaju derivati fenolnih spojeva. Metoksifenoli su jedni od značajnih spojeva za miris dima. 2-metoksifenol čini 20-30%, a 2,6-dimetoksifenol 70-80% od ukupnih metoksifenola.⁵ Koncentracija fenola kao i metilfenola, dimetilfenola i etilfenola u dimu je veoma mala. Jedna od grupa spojeva dima koji su štetni za ljudsko zdravlje su policiklički aromatski ugljikovodici.⁶ Oni nastaju tijekom termičke razgradnje drva uz ograničen dotok kisika. Komponente dima nalaze se u plinovitoj fazi ili su kondenzirane na česticama dima, a mogu biti u obje faze istovremeno.

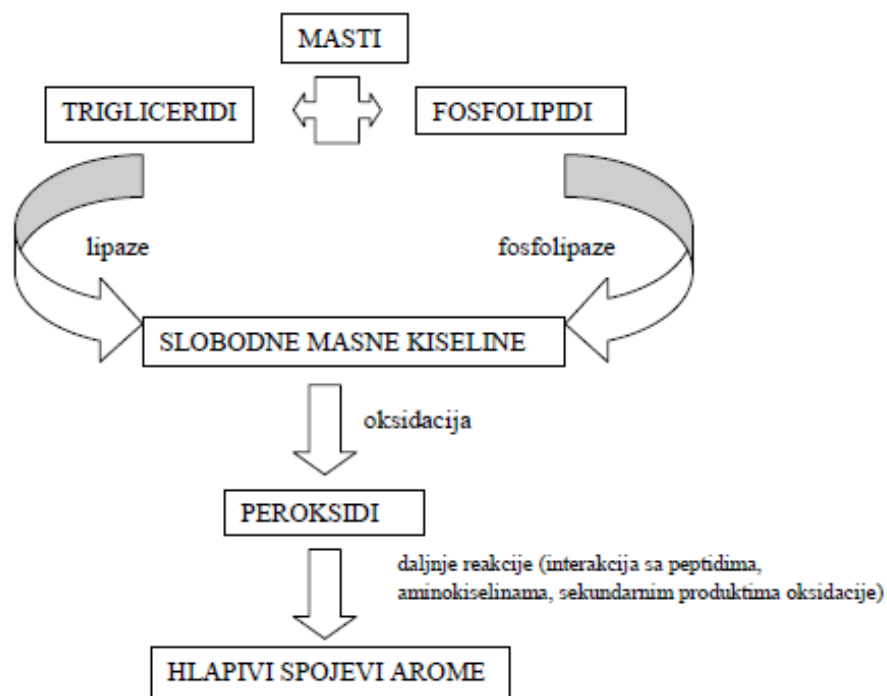
Mnogi tipovi dimljene i sušene hrane tradicionalni su proizvodi gdje su se ovi tipovi procesa koristili da bi se produžio period skladištenja, zadržala kvaliteta i poboljšao okus i konzistentnost prehrambenog proizvoda.⁷

1.3. Miris sušenog mesa

Miris je važan senzorski aspekt za potpunu prihvatljivost mesnih proizvoda. Za stvaranje tipičnih aroma i okusa trajnih kobasica zaslužne su reakcije slobodnih aminokiselina i slobodnih masnih kiselina s drugim spojevima te oksidacija slobodnih masnih kiselina, iako neke od njih u osnovi nisu poželjne.⁸

Aroma je definirana kao impresija o proizvodu koja nastaje u ustima kroz kemijska osjetila. Ona uključuje aromatične (olfaktorne percepcije), okusne (percepcija okusa) i kemijske osjetilne faktore. Aroma je ustvari kombinirani doživljaj okusa koji se zapaža okusnim pupoljcima na jeziku i mirisa koji se zapaža olfaktornim epitelom u nosu.⁹

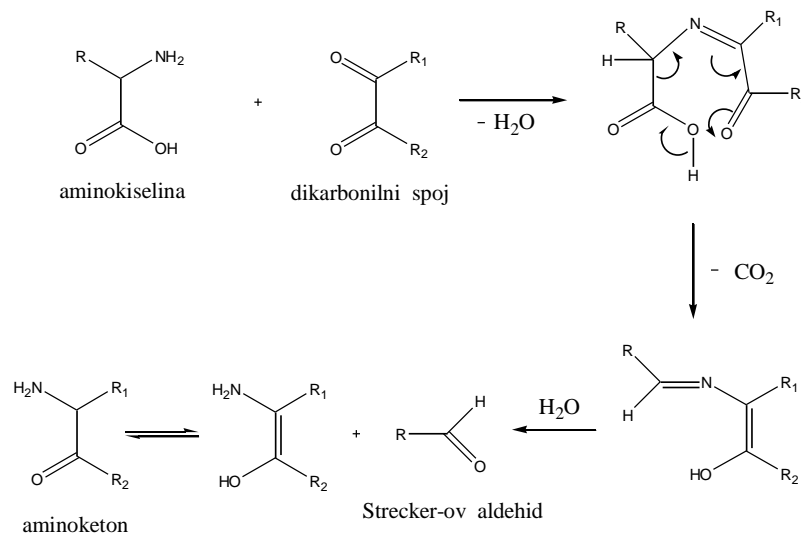
Tijekom faze zrenja trajnih kobasica dolazi do niza biokemijskih reakcija koje su ključne pri formiranju arome. Kao najvažnije mogu se izdvojiti reakcije proteolize i lipolize (slika 2). To su dva ključna procesa kojima nastaju hlapljivi spojevi arome.⁹



Slika 2. Lipoliza⁸

Različiti hlapljivi spojevi su pronađeni u sušenom mesu: ugljikovodici, aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline kratkog lanca, sumporovi spojevi i dušikovi spojevi...Važne grupe mirisnih spojeva suhomesnatih proizvoda su:¹⁰

• **Aldehidi**- ovi spojevi imaju važnu ulogu u aromi sušenog mesa, zato što imaju nizak prag „mirisne detekcije“. Linearni aldehidi, kao što su heksanal, heptanal, oktanal i nonanal stvaraju se uglavnom oksidativnom razgradnjom nezasićenih masnih kiselina.¹¹ Heksanal je aldehyd koji nastaje oksidacijom linolne kiseline, a može davati miris na svježe meso, travu ili ranketljivost.¹² S druge strane, glavni put formiranja razgranatih aldehida je oksidativna deaminacija-dekarboksilacija i to najvjerojatnije preko Strecker-ove degradacije reakcije aminokiselina koja je prikazana na (slici 3).¹¹



Slika 3. Opća shema Strecker-ovih degradacija aminokiselina¹³

• **Alkoholi** - porijeklo ovih spojeva može biti kemijska degradacija aminokiselina, a djelomičnu ulogu u njihovom stvaranju ima mikrobiološka aktivnost.¹¹

• **Ketoni** – kod suhomesnatih proizvoda su manje zastupljeni, a najvjerojatnije su derivati Maillard-ovih reakcija složenih ugljikohidrata (celuloze) nastale pirolizom tijekom dimljenja.¹⁴

• **Esteri** - su također jako važni spojevi kod stvaranja arome. To su derivati nastali u interakciji slobodnih masnih kiselina i različitih alkohola stvorenih intermuskularnom lipidnom oksidacijom.¹¹

- **Spojevi sumpora** - stvaraju se degradacijom sumpornih aminokiselina i imaju jak miris. Ovi spojevi mogu potjecati od češnjaka, a najzastupljeniji je alicin.^{9,11}

- **Terpeni** - prisustvo terpena je moguće jer su ovi spojevi uobičajeni konstituenti neosapunivih frakcija biljnih masti. Prema tome, oni dolaze hranom i akumuliraju se u tijelu životinje. Također se mogu naći u suhomesnatim proizvodima preko dodanih začina.¹¹

- **Spojevi dušika** - visoka temperatura potiče reakciju između diketo spojeva i amino spojeva stvarajući pirazinske spojeve.¹¹

1.4. Analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva se provodi spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

1.4.1. Plinska kromatografija

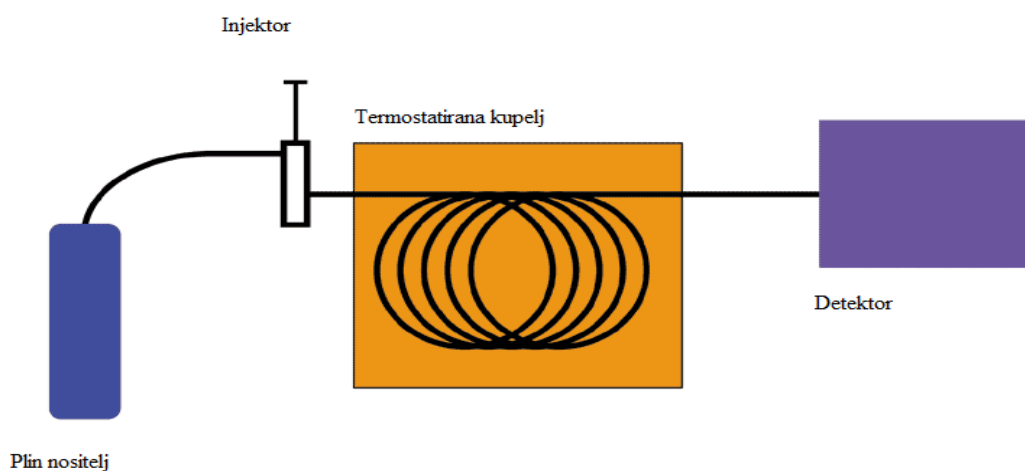
Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja se nalazi u termostatiranom prostoru, detektora i računala (slika 4). Uzorak u injektoru brzo i potpuno ispari, a inertni plin prenese pare uzorka od injekcijskog bloka preko kolone, na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese, do detektora.

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin (He, Ar, N₂), koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Stacionarna faza je najčešće tekućina nanosena na neki kruti adsorbens (punjene kolone) ili vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone).

Sastojci smjese, koji su odijeljeni na kromatografskoj koloni i izneseni plinom nositeljem, moraju se na neki način registrirati odnosno detektirati. Neki od najvažnijih vrsta GC detektora su:

- plamenoionizacijski detektor (engl. „Flame Ionization Detector“, FID) – jedan od najčešće korištenih GC-detektora čiji je najveći nedostatak činjenica da razara uzorak
- detektor toplinske vodljivosti (engl. „Thermal Conductivity Detector“, TCD)
- plamenofotometrijski detektor (engl. „Flame Photometric Detector“, FPD)
- fotoionizacijski detektor (engl. „Photo-ionization Detector“, PID)
- detektor apsorpcije elektrona (engl. „Electron Capture Detector“, ECD).

Pravilan izbor detektora od posebne je važnosti i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Najveći broj podataka potrebnih za identifikaciju i određivanje strukture složenih organskih molekula pruža spektrometrija masa.¹⁵



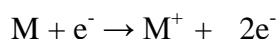
Slika 4. Plinski kromatograf¹⁶

1.4.2. Spektrometrija masa

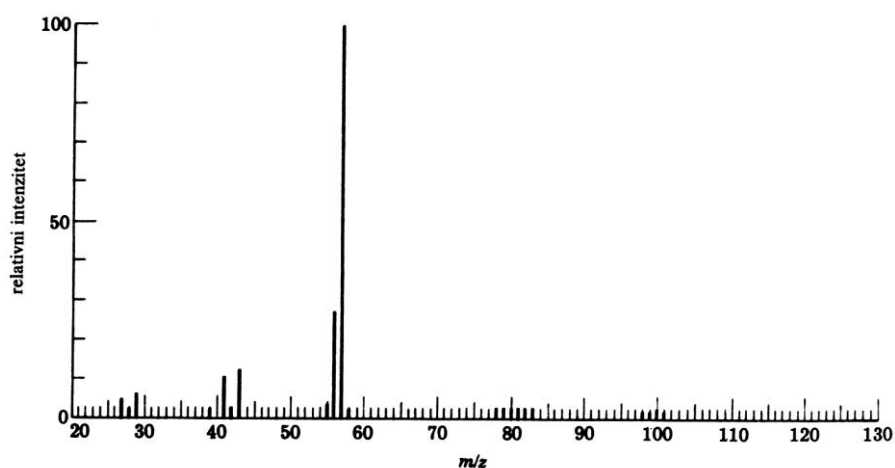
Spektrometrija masa je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Postupak se primjenjuje za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njihovih molekulskih formula. Spektrometrija masa

uključuje dva važna postupka, prvi je ionizacija uzorka, a zatim slijedi razdvajanje i određivanje iona.

Spektrometar masa se sastoji od komore za bombardiranje, u koju se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju. Unutrašnjost spektrometra je pod vakuumom, što omogućava ionima prelazak puta od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama. Kod elektronske ionizacije (EI) uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivni ion M^+ koji se fragmentira:



Tako nastaju različiti fragmenti, a analizom se može zaključiti kakva je struktura dotičnog spoja i kolika mu je molekulska masa. Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru prema intenzitetu i veličini m/z . Ioni se na osjetljivom dijelu analizatora registriraju kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala i tako se dobiva spektar masa koji se obično prikazuje kao linijski dijagram s odnosom relativnog intenziteta i omjera mase i naboja fragmenata, (m/z) (slika 5).



Slika 5. Primjer spektra masa ¹⁷

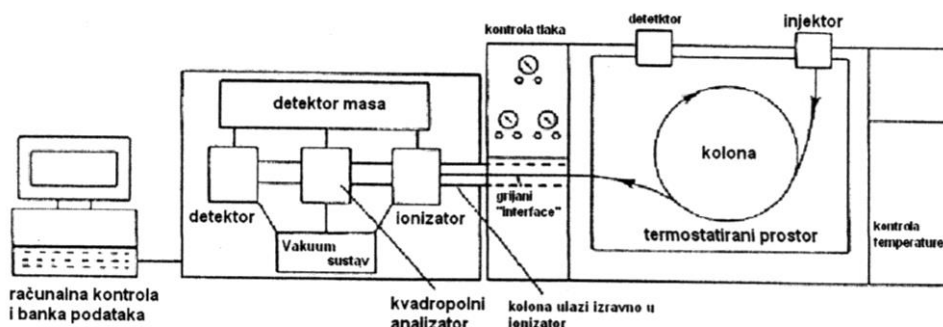
Način fragmentiranja u spektrometrima masa organskih spojeva u bliskoj je vezi s kidanjem veza u njihovim kemijskim reakcijama. Tumačenje samog fragmentiranja važno je za dokazivanje spoja.¹⁵

1.4.3. Spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa

Spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. „gas chromatography-mass spectrometry“, GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka (slika 6).

Kod ove tehnike spektrometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju i može djelovati kao opći (kada detektira sve fragmente m/z u zadanom intervalu) ili vrlo selektivni detektor (kada detektira samo određene fragmente m/z koji su karakteristični za pojedinu strukturu).

Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantizaciju, ali i nepouzdana za kvalitativno određivanje, gdje je spektrometrija masa gotovo savršena.¹⁷ Kombinacijom ovih dviju metoda se može postići visoka osjetljivost (do 10^{-15} g) te se mogu analizirati smjese s velikim brojem komponenti relativno velikom brzinom.



Slika 6. Shematski prikaz spregnute tehnike GC-MS¹⁵

Komponente smjese se odjeljuju u termostatisiranoj koloni plinskog kromatografa, a zatim odijeljene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa).

Dobiveni spektar masa se uspoređuje s računalnom bazom spektara masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj. Još jedan važan podatak za identifikaciju spoja je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni. Dakle, za svaki odjeljeni spoj spregnuta tehnika GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja: vrijeme zadržavanja spoja na koloni i spektar masa.

2. Eksperimentalni dio

2.1. *Kulenova seka* (kulenica)

Kulenova seka (kulenica) je autohtoni trajni fermentirani proizvod s područja Slavonije (slika 7). U proizvodnji autohtone *kulenove seke* meso se rasijeca ručno, puni se u suvremenim punilicama i potom se dimi u pušnicama. Nakon dimljenja provodi se fermentacija *kulenove seke* u klimatiziranim prostorima ili prostorima uz prirodnu ventilaciju.

Proizvod je izdužena oblika slijedi strukturu zadnjeg svinjskog crijeva te je nepravilna oblika. Polučvrste je konzistencije, pod pritiskom se djelomično savija, izvana poprima tamnosmeđu do crvenkastu boju.

Presjek je svijetlo do tamnocrvene boje, izgledom poput mozaika zbog komadića mišićnog tkiva crvenkaste boje i masnog tkiva bijele boje. Glatke i sjajne površine bez šupljina i pukotina.³

U ovom radu su istražene tri *kulenove seke* s područja Slavonije pripremljene u skladu s tradicionalnom procedurom koja je opisana u poglavlju 1.2., za vlastitu uporabu.



Slika 7. Kulenova seka

2.2. Aparatura

- aparatura za mikroekstrakciju na krutoj fazi (SPME):
 - nosač za vlakno
 - sivo vlakno: DVB/Carboxen/PDMS (Supelco)
- magnetska miješalica: Heidolph EKT 3001
- spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS):
 - GC 7820A Agilent Technologies
 - MSD 5977E Agilent Technologies
 - kolona HP-5MS J&W

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je da je najpogodnije vlakno (s obzirom na ukupan broj identificiranih hlapljivih spojeva) za apsorpciju vršnih para *kulenove seke* sivo vlakno (s filmom divinilbenzen/carboksen/polidimetilksiloksan (DVB/CAR/PDMS)) proizvođača Supelco Co. (Bellefonte; PA, USA).



Slika 8. Vlakna s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno)¹³

1 gram uzorka se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C), s termostatom (Heidolph EKT 3001, Njemačka). Na slici 9 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).¹¹

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min pri 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka.¹³



Slika 9. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno sakuplja vršne pare u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.

2.4. Analiza hlapljivih spojeva vezanim sustavom(GC-MS)

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je i spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo (slika 10). Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD).



Slika 10. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:¹³

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C min⁻¹,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin⁻¹.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- ime spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Pojedinačni pikovi identificirani su usporedbom njihovih retencijskih indeksa (u odnosu na C₈-C₃₀ *n*-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature, kao i uspoređivanje njihovih spektara masa s Wiley 09 MS library i NIST14 (National Institute of Standards and Technology) bazom podataka. Postotci identificiranih komponenti iz uzoraka *kulenove seke* su izračunati iz površine pikova.

3. Rezultati

3.1. Rezultati analize hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi *kulenove seke* analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa i to na koloni HP-5MS. Rezultati ispitivanja su prikazani tablično te u obliku kromatograma.

Tablica 1. Kemijski sastav hlapljivih spojeva *kulenove seke* za uzorak 1.

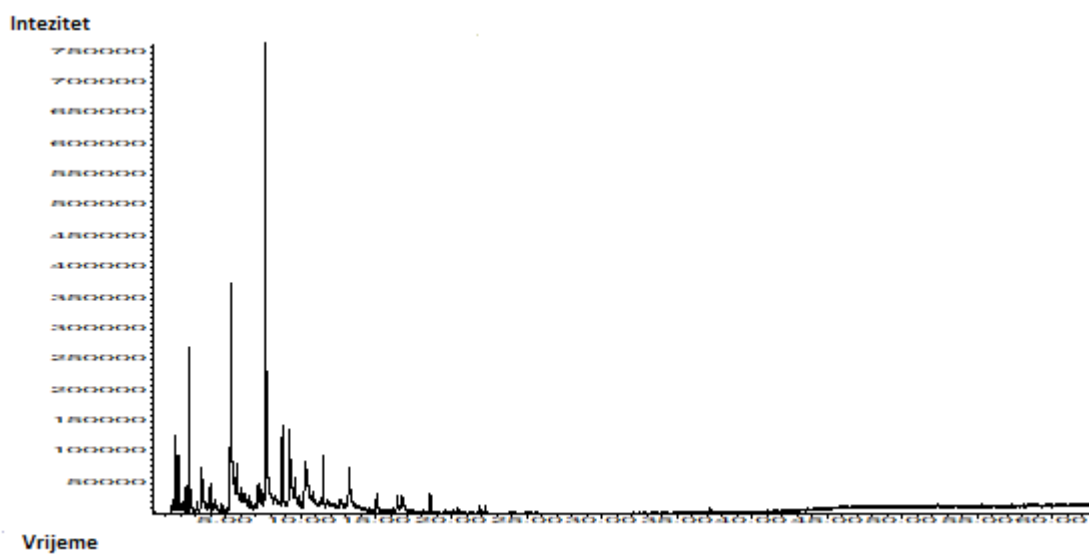
Redni broj	Spoj	Površina (%)
1.	3-metilbutanal	1,4
2.	metil-alil-disulfide	1,8
3.	heksanal	4,4
4.	benzaldehyd	17,2
5.	2-metil-2-ciklopenten-1-on	2,1
6.	limonen	0,8
7.	2-etilheksan-1-ol	2,8
8.	benzenacetaldehyd	31,7
9.	dialil-disulfid	3,8
10.	2-metoksifenol	8,8
11.	2-feniletanol	7,1
12.	1,2-dimetoksibenzen	2,1
13.	2-metoksi-4-metilfenol	4,3
14.	3,4-dimetoksitoluen	1,2
<i>ukupno identificirano</i>		<i>89,5%</i>

Tablica 2. Kemijski sastav hlapljivih spojeva *kulenove seke* za uzorak 2.

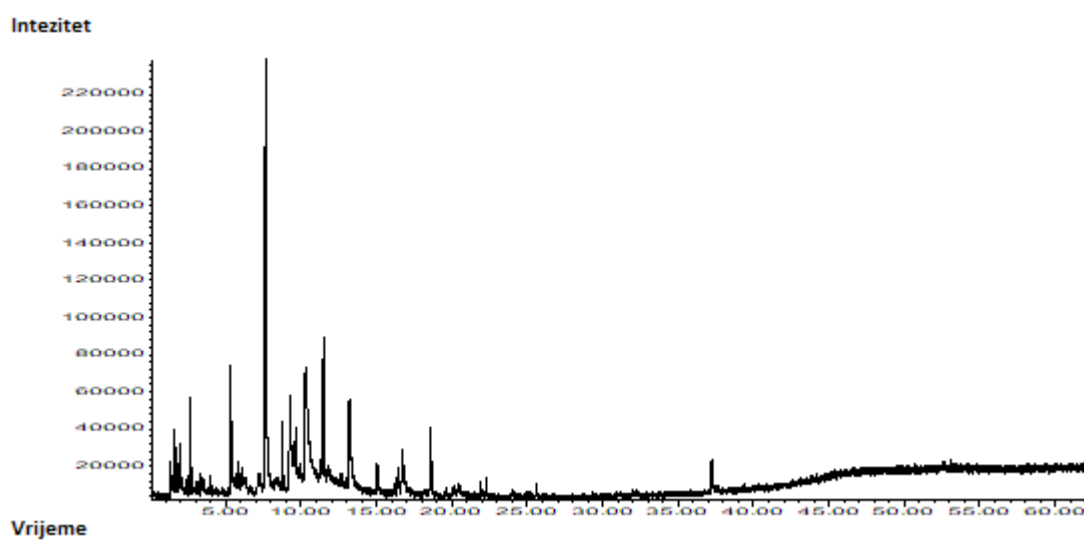
Redni broj	Spoj	Površina (%)
1.	3-metilbutanal	0,9
2.	metil-alil-disulfid	1,4
3.	heksanal	2,1
4.	benzaldehyd	5,6
5.	2-metil-2-ciklopenten-1-on	1,1
6.	limonen	0,8
7.	benzenacetaldehyd	22,3
8.	dialil-disulfid	2,7
9.	2-metoksifenol	8,4
10.	nonanal	2,6
11.	2-feniletanol	19,9
12.	1,2-dimetoksibenzen	5,2
12.	2-metoksi-4-metilfenol	8,5
14.	3,4-dimetoksitoluen	2,0
15.	2-fenil-2-butanal	2,0
16.	4-etil-2-metoksifenol	4,8
17.	(Z)-9-oktadekanal	1,9
<i>ukupno identificirano</i>		<i>91,4%</i>

Tablica 3. Kemijski sastav hlapljivih spojeva kulenove seke za uzorak 3.

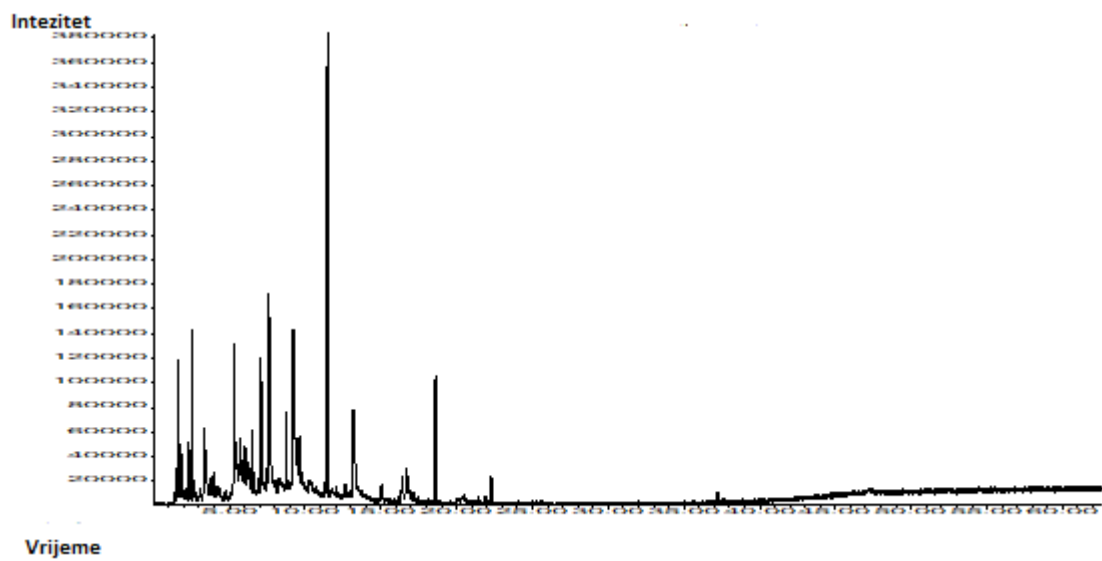
Redni broj	Spoj	Površina (%)
1.	3-metilbutanal	1,4
2.	metil-alil-disulfide	1,4
3.	etilbenzen	1,2
4.	heksanal	3,8
5.	2-furanmetanol	3,7
6.	1,3-dimetilbenzen	1,8
7.	benzaldehyd	9,9
8.	2-metil-2-ciklopenten-1-on	4,2
9.	eikosan	2,7
10.	δ -3-karen	1,6
11.	limonen	3,6
12.	benzenacetaldehyd	10,9
13.	dialil-disulfid	2,9
14.	2-metoksifenol	15,4
15.	nonanal	2,0
16.	1,2-dimetoksibenzen	14,5
17.	2-metoksi-4-metilfenol	7,2
18.	(Z)-9-oktadekanal	2,1
<i>ukupno identificirano</i>		<i>90,3%</i>



Slika 11. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *kulenove seke* izoliranih HS-SPME-om u uzorku 1.



Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *kulenove seke* izoliranih HS-SPME-om u uzorku 2.



Slika 13. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *kulenove seke* izoliranih HS-SPME-om u uzorku 3.

4. Rasprava

U ovom radu je ispitan kemijski sastav hlapljivih spojeva izoliranih iz trajnih kobasica *kulenova seka* pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Kvalitativna i kvantitativna analiza hlapljivih spojeva *kulenove seke* izvršena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) te je ukupno identificirano 20 spojeva u tri uzorka što predstavlja 89,5-91,4% površine kromatograma.

Arome u trajnim kobasicama nastaju reakcijama kemijske ili enzimске oksidacije nezasićenih masnih kiselina.¹⁸ Daljnjom interakcijom s proteinima, peptidima i slobodnim aminokiselinama čine arome suhomesnatih proizvoda. Hlapljivi spojevi također nastaju i Strecker-ovom razgradnjom slobodnih aminokiselina. Proteolitički i lipolitički enzimi igraju važnu ulogu u formiranju hlapljivih spojeva.¹⁹

Aldehidi su glavni sekundarni spojevi oksidacije lipida.¹⁹ U analiziranim uzorcima najzastupljeniji spoj je benzenacetaldehid (10,9-31,7%), a drugi najzastupljeniji aldehid je benzaldehid (5,6-17,2%). Nonanal (2,0-2,6%), koji doprinosi ukupnom osjetu arome sa slatkim i voćnom aromom¹⁹, nije pronađen u uzorku br. 1.

Ketoni su najvjerojatnije nastali Maillardovim reakcijama složenih ugljikohidrata (celuloze) nastale pirolizom tijekom dimljenja¹⁴, a također mogu potjecati od lipidne oksidacije. Najzastupljeniji keton je 2-metil-2-ciklopenten-1-on (1,1-4,2%) koji je nositelj snažnog mirisa.¹⁹

U svim analiziranim uzorcima, od identificiranih fenolnih spojeva najzastupljeniji su 2-metoksifenol (8,4-15,4%) i 2-metoksi-4-metilfenol (4,3-8,5%). 4-etil-2-metoksifenol (4,8%) pronađen je jedino u uzorku br. 2. Fenolni spojevi iz podgrupe metoksifenola su aromatski spojevi sa aromom po dimu, paljevini, zagorenome („pungent“, „cresolic“, „heavy“, „burnt“ i „smoky“) i imaju antioksidativno i antimikrobno djelovanje.²⁰ Metoksifenoli iz dima imaju strukturu koja odgovara strukturi lignina drva.¹⁴

U uzorcima br. 1. i 2. od alkohola najzastupljeniji su 2-feniletanol (7,1 % u uzorku br. 1. i 19,9% u uzorku br. 2.), dok je samo u uzorku br. 3 identificiran 2-furanmetanol (3,7%). Ovi spojevi mogu nastati lipolizom i proteolizom, ali također mogu nastati i mikrobiološkom aktivnošću.¹⁹

Spojevi koji potječu od začina dodanih *kulenovoj seki* su organosumporni spojevi. Ovi spojevi uglavnom potječu od češnjaka. U svim analiziranim uzorcima identificirani su dialil-disulfid (2,7-3,8%) i metil-alil-disulfid (1,4-1,8%). Kada se češnjak izreže ili zdrobi, enzim aliinaza 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 alicina²¹.



Slika 13. Strukturne formule dialil-disulfida i metil-alil-disulfida

Drugi važni spojevi koji potječu od začina su terpeni. U ovom radu je identificiran samo limonen i to u malim količinama osobito kod uzorka br. 1. i br. 2. (0,8%), dok je kod uzorka br. 3. sadržaj limonena bio nešto veći (3,6%). Pojavljivanje limonena u ovako malom postotku bilo je očekivano, budući da u procesu proizvodnje kobasica nisu upotrebljavani začini sa značajnijim udjelom terpena kao što su crni papar, muškadni oraščić, klinčić i dr.¹⁹

U analiziranim uzorcima *kulenove seke* nađeno je više aromatskih ugljikovodika. U većem udjelu u svim uzorcima prisutan je 1,2-dimetoksibenzen (2,1-14,5%), te 3,4-dimetoksitoluen (1,2% u uzorku br. 1. i 2,0% u uzorku br. 2.). Etilbenzen (1,2%) i 1,3-dimetilbenzen (1,8%) su identificirani jedino u uzorku br. 3.

Iako su pojedini spojevi identificirani u velikom postotku, u analiziranim uzorcima su identificirani i drugi manje zastupljeni spojevi također odgovorni za aromu kobasica.

5. Zaključak

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog završnog rada može se zaključiti sljedeće:

- Kvalitativna i kvantitativna analiza *kulenove seke* provedena GC-MS analizom ukazuje na prisustvo 20 različitih hlapljivih spojeva u analiziranim uzorcima.
- U uzorku br. 1. je identificirano 14 spojeva što predstavlja 89,5% površine kromatograma.
- U uzorku br. 2. je identificirano 17 spojeva što predstavlja 91,4% površine kromatograma.
- U uzorku br. 3. je identificirano 18 spojeva što predstavlja 90,3% površine kromatograma.
- U analiziranim uzorcima najzastupljeniji spoj je benzenacetaldehid (10,9-31,7%).
- Najzastupljeniji od fenolnih spojeva su 2-metoksifenol (8,4-15,4%) i 2-metoksi-4-metilfenol (4,3-8,5%).
- Od alkohola identificirani su 2-feniletanol (7,1 % u uzorku br. 1. i 19,9% u uzorku br. 2.) i 2-furanmetanol (3,7% pronađen samo u uzorku br.3.).
- Organosumporovi spojevi koji potječu od češnjaka su dialil-disulfid (2,7-3,8%) i metil-alil-disulfid (1,4-1,8%).
- Terpen limonen identificiran je u svim uzorcima, ali u malom postotku (0,8-3,6%) jer nisu upotrebljavani začini sa značajnijim udjelom terpena.
- U analiziranim uzorcima *kulenove seke* nađeni su i aromatski ugljikovodici. U većem udjelu u svim uzorcima prisutan je 1,2-dimetoksibenzen (2,1-14,5%), dok je 3,4-dimetoksitoluen prisutan samo u uzorku br. 1 (1,2%) i u uzorku br. 2 (2,0%). Etilbenzen (1,2%) i 1,3-dimetilbenzen (1,8%) identificirani su jedino u uzorku br. 3.
- U daljnjim istraživanjima bi bilo potrebno analizirati više uzoraka *kulenove seke* korištenjem različitih analitičkih tehnika.

6. Literatura

1. <http://www.gastrotube.net/kobasica-kroz-istoriju/>. Preuzeto: 22.09.2017.
2. Šimundić B, Jakovlić V i Tadejević V. Poznavanje robe-Živežne namirnice s osnovama tehnologije i prehrane. Rijeka, Tiskara Rijeka d.d.; 1993. p.p. 315-316.
3. Kovačević D. Tehnologija kulena i drugih fermentiranih kobasica. Osijek, Grafika d.o.o.; 2014. p.p. 221-223.
4. Kovačević D. Kemija i tehnologija mesa i ribe. Osijek, Grafika Osijek; 2001. p.p. 198.
5. Kjällstrand J, Petersson G. Phenolic antioxidants in alder smoke during industrial meat curing. Food Chem. 2001; 74:85-89.
6. Šimko P. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. Mol. Nutr. Food Res. 2005; 49:637-647.
7. https://www.vodič_o_dimljenju_mesa_-_hok.pdf, 1., Preuzeto: 25.09.2017.
8. Toldrá F. Dry-cured meat products. Chapter 3. Ames, Iowa, Wiley- Blackwell; 2002. p.p. 27-62.
9. Krišto A. Hlapljivi spojevi arome Istarskog pršuta [Diplomski rad]. Zagreb, Prehrambeno–biotehnološki fakultet u Zagrebu; 2013., 7-10.
10. Perinović S. Hlapljivi aromatični spojevi tri vrste Paškog sira i dalmatinskog pršuta [Diplomski rad]. Split, Kemijsko-tehnoški fakultet u Splitu; 2005., 16.
11. Sabio E, Vidal-Aragon MC, Bernalte MJ, Gata JL. Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. Food Chem. 1998; 61:493–503.
12. Luna G, Aparicio R, Garcia. González DL. (2006) A tentative characterization of white dry- cured hams from Teruel (Spain) by SPME. Food Chem. 2006; 97:621-630.
13. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda [Doktorski rad]. Osijek, Prehrambeno-tehnoški fakultet Osijek; 2014., 34-35, 87.

14. Jerković I, Kovačević D, Šubarić D, Marijanović Z, Mastanjević K, Suman K. Authentication study of volatile "avour compounds composition in Slavonian traditional dry fermented salami „kulen“. *Food Chem.* 2010; 119:813-822.
15. Kasum A. Profil hlapljivih spojeva monoflornog meda drače (*Paliurus spinachristi*) [Diplomski rad]. Split, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2007., 16-20.
16. <http://andrej.mernik.eu/blog/2007/12/12/kako-djeluje-plinski-kromatograf-gcms>. Preuzeto: 26.09.2017.
17. El-Sayed AM. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. 2007. <http://www.pherobase.com>.
18. Krvavica M, Babić I, Cvitković I, Đugum J, Konjačić M. Hlapljive tvari istarskog pršuta u različitim periodima zrenja. *Meso.* 2010; 12:276-282.
19. Marušić Radovčić N, Brekalo A, Janči T, Vidaček S, Kušec G, Medić H. Određivanje hlapljivih komponenata arome kulena. *Meso.* 2015; 4:338-344.
20. Guillen MD, Manzanos MJ. Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chem.* 2002; 79:283–292.
21. Kimbaris AC, Siatas NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochem.* 2006; 13:54-60.