

# Hlapljivi spojevi kozjeg sira iz mišine

---

Jurlina, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:893358>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**HLAPLJIVI SPOJEVI KOZJEG SIRA IZ MIŠINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**KRISTINA JURLINA**

**Matični broj: 518**

**Split, rujan 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**KEMIJA**

**HLAPLJIVI SPOJEVI KOZJEG SIRA IZ MIŠINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**KRISTINA JURLINA**

**Matični broj: 518**

**Split, rujan 2023.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY**  
**CHEMISTRY**

**VOLATILE COMPOUNDS OF GOAT CHEESE IN A SACK**

**BACHELOR THESIS**

**KRISTINA JURLINA**

**Parent number: 518**

**Split, September 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Mentor:** doc.dr.sc. Marina Zekić

**Komentor:** /

### HLAPLJIVI SPOJEVI KOZJEG SIRA IZ MIŠINE Kristina Jurlina, 518

**Sažetak:**

U ovom završnom radu izvršena je analiza sastava i sadržaja hlapljivih spojeva kozjeg sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem dva vlakna različitog sastava (svjetlo-plavo i sivo) pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Dobiveno je ukupno šest uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. U svim uzorcima, bez obzira na vrstu vlakna, pronađene su sljedeće klase spojeva: karboksilne kiseline, esteri, ketoni i alkoholi, s tim da su karboksilne kiseline bile najzastupljenije u svim uzorcima. Različite temperature ekstrakcije nisu značajnije utjecale na kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva.

**Ključne riječi:** kozji sir iz mišine, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 38 stranica, 15 slika, 6 tablica, 22 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof. dr. sc. Vesna Sokol (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Josip Radić (član)
3. doc.dr.sc. Marina Zekić (mentor)

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study of Chemistry

**Scientific area:** natural sciences

**Scientific field:** chemistry

**Supervisor:** Marina Zekić, PhD, assistant profesor

**Co-supervisor:** /

### VOLATILE COMPOUNDS OF GOAT CHEESE IN A SACK

Kristina Jurlina, 518

**Abstract:**

In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the goat cheese in a sack were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using two fibers of different composition (light blue and gray) at three different temperatures (40, 50 and 60°C). A total of six samples were obtained and analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. In all samples, regardless of the type of fiber, the following classes of compounds were found carboxylic acids, esters, ketones and alcohols, with carboxylic acids being the most abundant in all samples. Different extraction temperatures did not significantly affect the chemical composition and content of volatile compounds.

**Keywords:** goat cheese in a sack, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 38 pages, 15 figures, 6 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Vesna Sokol, PhD, assistant prof. chair person
2. Josip Radić, PhD, associate prof. member
3. Marina Zekić, PhD, assistant prof.

**Defence date:**

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju , Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc.dr.sc. Marina Zekić, tijekom mjeseca ožujka 2022. godine.*

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Marini Zekić na ukazanom povjerenju, nesebično prenesenom znanju te korisnim savjetima i sugestijama tijekom izrade ovog završnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, ljubavi i strpljenju koju su mi pružali tijekom ovih godina studiranja – bez vas ništa od ovoga ne bi bilo ostvarivo. Posebice mojim roditeljima koji su moja inspiracija za sve što radim u životu te primjer kako ništa nije nemoguće niti nedohvatljivo.*

*Mojem V., hvala ti za bezuvjetnu podršku i strpljenje koje si imao za mene u posljednjem periodu, bez tvoje vjere u mene, razumijevanja i ljubavi ovo sve bi puno teže proteklo.*



## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine pripravljenog od kozjeg mlijeka. Hlapljivi spojevi sira izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog i svijetlo-plavog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Na taj način dobiveno je ukupno šest uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

## SAŽETAK

U ovom završnom radu izvršena je analiza sastava i sadržaja hlapljivih spojeva kozjeg sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem dva vlakna različitog sastava (svjetlo-plavo i sivo) pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Dobiveno je ukupno šest uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. U svim uzorcima, bez obzira na vrstu vlakna, pronađene su sljedeće klase spojeva: karboksilne kiseline, esteri, ketoni i alkoholi, s tim da su karboksilne kiseline bile najzastupljenije u svim uzorcima. Različite temperature ekstrakcije nisu značajnije utjecale na kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva.

**Ključne riječi:** kozji sir iz mišine, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

## **SUMMARY**

In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the goat cheese in a sack were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using two fibers of different composition (light blue and gray) at three different temperatures (40, 50 and 60°C). A total of six samples were obtained and analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. In all samples, regardless of the type of fiber, the following classes of compounds were found carboxylic acids, esters, ketones and alcohols, with carboxylic acids being the most abundant in all samples. Different extraction temperatures did not significantly affect the chemical composition and content of volatile compounds.

**Keywords:** volatile compounds, GC-MS, cheese in a sack

# SADRŽAJ

## UVOD

<b>1.OPĆI DIO</b> .....	2
1.1 SIR .....	2
1.2 SIR IZ MIŠINE.....	2
1.2.1 MLIJEKO KAO SIROVINSKA BAZA .....	3
1.3 TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SIRA IZ MIŠINE .....	4
1.4 BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA IZ MIŠINE .....	5
1.5 PRIMARNI BIOKEMIJSKI PROCESI .....	6
1.5.1 GLIKOLIZA .....	6
1.5.2 LIPOLIZA.....	6
1.5.3 PROTEOLIZA .....	8
1.6 SPOJEVI AROME SIRA IZ MIŠINE.....	9
1.6.1 UTJECAJ PEPTIDA .....	10
1.6.2 UTJECAJ AMINOKISELINA .....	11
1.7 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	12
1.7.1 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	12
1.8 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	13
1.8.1 VEZANI SUSTAV GC-MS.....	13
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
2.1 SIR IZ MIŠINE.....	14
2.2 APARATURA .....	14
2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	15
2.3.1 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	15
2.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	16
<b>3. REZULTATI</b> .....	18
<b>4. RASPRAVA</b> .....	31
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	34
<b>6.POPIS KRATICA I SIMBOLA</b> .....	35
<b>7. LITERATURA</b> .....	36

## UVOD

Sir (*grč.* formos, *lat.* caseus), svakodnevna hrana općeprihvaćena u raznim društvima i kulturama, ima svoju dugu tradiciju i bogatu povijest. Predstavlja nasljeđe brojnih civilizacija i kultura te se ne može reći da je proizvod samo jedne civilizacije i kulture. Tehnologija proizvodnje sira usavršavala se stoljećima a vještina proizvodnje sira tradicionalno se prenosila sa generacije na generaciju te bi svaka generacija dodala nešto svoje i na taj način unaprijedila proizvodnju.

Proizvodnja sira koji sazrijeva u životinjskoj koži dio je tradicije koja je i danas ostala sačuvana u nekoliko zemalja svijeta kao što su Hrvatska (planinsko područje Dinare), Turska (istočna i središnja Anatolija), Bosna i Hercegovina (nekoliko planinskih područja), Libanon, Alžir te Crna Gora. Pretpostavlja se da je sir nastao slučajno kada su nomadski uzgajivači ovaca, uslijed nedostatka odgovarajućeg skladišta te opreme za transport, počeli koristiti janječju kožu za transport mlijeka sa planina u nizinske krajeve.

Posebnost ovih sireva jest da se njihovo zrenje odvija u jarećoj ili janjećoj koži pri anaerobnim uvjetima. Životinjska koža koja se koristi kao medij za zrenje sastoji se od vlaknastih proteina poput kolagena, elastina, retikulina i keratina. Ova vrsta porozne strukture omogućava određenu propusnost zraka i vodene pare, što utječe na kemijska i biokemijska svojstva te spojeve arome koji nastaju tijekom zrenja. Aroma koja nastaje rezultat je kombiniranog djelovanja bakterija mliječne kiseline, bakterija nestartarske mikroflore te drugih bakterija, kvasaca i plijesni koje dolaze iz sirovog mlijeka, ali i iz okoliša tijekom zrenja sira.

Sirevi čije se zrenje odvija u životinjskoj koži izraženog su mirisa i okusa, odlikuju se pikantnošću i specifičnom teksturom. Karakteristična aroma ovih sireva rezultat je intenzivnih biokemijskih procesa (proteolize, lipolize i glikolize) koji se odvijaju tijekom zrenja u specifičnim uvjetima. Za aromu nekog sira nije odgovoran samo jedan spoj već se općenito smatra da karakteristična aroma većine sireva proizlazi iz suptilne kombinacije velikog broj hlapljivih spojeva prisutnih u ispravnim omjerima koncentracije.<sup>1,2</sup>

# 1.OPĆI DIO

## 1.1 SIR

Malo koja prehrambena namirnica može se pohvaliti tako dugom i raznolikom poviješću kao sir. Najraniji arheološki dokazi o proizvodnji sira, pronađeni u grobnici na području Egipta, datiraju prije više od 4000 godina. Postoji legenda koja kaže da su za nastanak sira zaslužni arapski nomadi koji su na jedno od svojih dugih putovanja pustinjom ponijeli mlijeko u mišini životinjskog mjehurca. Prisutnost enzima renina u životinjskoj mješini prouzročila je koagulaciju mlijeka, a trenje uzrokovano jahanjem i toplina od sunca su još dodatno pospješile nastajanje sira.

Zbog vruće klime Egipćani su bili prisiljeni raditi kisele i slane sireve kako bi izbjegli njihovo kvarenje. Europski sirevi nisu morali biti toliko soljeni pa je to omogućilo nastanak zrelih sireva robusnih aroma, često s plemenitom plijesni.

Iako je proizvodnja sira u zapadnoj i središnjoj Europi započela davno prije Rimskoga Carstva ipak je ono najviše pridonijelo njenom razvoju. Svakako, ne smije se zanemariti niti jak utjecaj Katoličke Crkve na razvoj i proizvodnju sireva. Samostani su bili najvažniji proizvođači sira pri čemu su većinom koristili mlijeko s vlastitog imanja te ljubomorno čuvali postupak proizvodnje. Naime, pojedini dio proizvodnog postupka znao je samo jedan redovnik koji bi ga doveo do savršenstva. Jedino je predstojnik samostana znao čitav postupak, a znanje je prenosio isključivo na svoga nasljednika. Samostani, kao i veća feudalna imanja, najčešće su funkcionirali kao jedinstvene, zatvorene proizvodne cjeline koje su razvijale vlastitu proizvodnju što je vjerojatno jedan od najbitnijih razloga za nastanak velikog broja različitih vrsta i varijanti sireva.<sup>3,4</sup>

## 1.2 SIR IZ MIŠINE

Sir iz mišine (slika 1) rezultat je dugogodišnje tradicije koja se održala do današnjeg dana na područjima Velebita, Dalmatinske zagore i dijela Like. Povijest ovog sira

vezuje se za stare Ilire i Tračane koji su svoja stada ovaca čuvali na pašnjacima planine Dinare. Tradicionalna receptura se prenosila usmeno s generacije na generaciju a sama tehnologija proizvodnje se nije puno mijenjala od prvih zabilježenih izvora.

Hrvatski sir iz mješine izvorno je izrađivan od sirovog ovčjeg mlijeka, bez dodavanja starter kultura. Kako se u proizvodnji sira koristilo prirodno sirilo, njegova pravilna priprema bila je bitan faktor u proizvodnji. Priprema i izrada mješine predstavlja vjerojatno najvažniju fazu u proizvodnji ovog sira jer samo odgovarajuće pripremljena mješina daje specifična organoleptička svojstva sira. Danas se hrvatski sir iz mješine proizvodi od ovčjeg, kravljeg i kozjeg mlijeka ili iz njihovih smjesa. Kvaliteta sira unaprijeđena je prelaskom na korištenje industrijskih, umjesto prirodnih, sirila što je pak dovelo do unaprijeđenja na kvaliteti sira jer je omogućena jednolikost i ujednačenost proizvoda. Iako se proizvodna tehnologija od samih početaka proizvodnje u određenoj mjeri promijenila, osnovni proizvodni parametri i karakteristike sira ostali su jedinstveni i prepoznatljivi.<sup>5,6</sup>



*Slika 1. Sir iz mišine<sup>7</sup>*

## **1.2.1 MLIJEKO KAO SIROVINSKA BAZA**

### **KOZJE MLIJEKO**

U kozjem mlijeku su sadržani svi sastojci potrebni za rast i razvoj organizma što ga čini odličnom hranjivom namirnicom. U posljednjem desetljeću je zabilježen značajan

porast proizvodnje kozjeg mlijeka naspram proizvodnje kravljeg i ovčjeg mlijeka. Najzastupljenije pasmine u Republici Hrvatskoj su: francuska alpina, domaća koza, sanska koza, njemačka plemenita koza te križanci. Kemijski sastav mlijeka unutar svake pojedine pasmine varira iz dana u dan, a ovisi o brojnim čimbenicima. Gledano po kemijskom sastavu te promjena masti i bjelančevina tijekom laktacije, kozje mlijeko je najsličnije kravljem mlijeku. Najvarijabilniji sastojak kozjeg mlijeka je mliječna mast koja varira od 2 do 8%. Ustanovljeno je da je najniža vrijednost sadržaja masti u kozjem mlijeku upravo u ljetnim mjesecima prvenstveno radi načina prehrane te stadija laktacije koza. Mast kozjeg mlijeka sačinjena je od triglicerida, a sastav masti karakteriziran je visokim udjelom nižih masnih kiselina u odnosu na kravlje mlijeko. Od nižih masnih kiselina najzastupljenije su kapronska, kaprilna i kaprinska, koje su zaslužne za karakterističan „kozji miris“ kozjeg mlijeka.<sup>8</sup>

### **1.3 TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SIRA IZ MIŠINE**

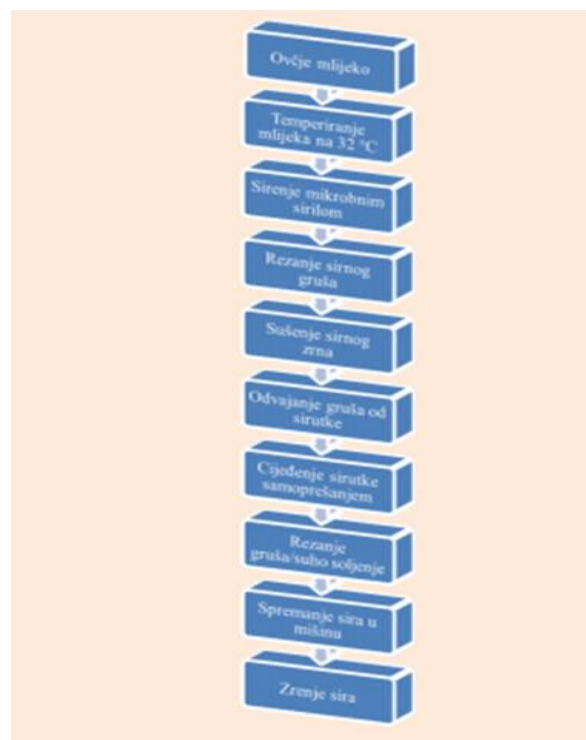
Tehnološki procesi proizvodnje sira iz mišine razlikuju se s obzirom na državu u kojoj se sir proizvodi. Proizvodnja sira (slika 2) u Hrvatskoj može se podijeliti na sljedeće faze: priprema mišine, mužnja i priprema mlijeka, priprema sirila, sirenje i spremanje u mišine te zrenje i čuvanje sira. Treba napomenuti da tehnologija proizvodnje nije standardizirana pa postoje određene razlike u pojedinim fazama proizvodnje između obiteljskih gospodarstava na kojima se sir danas proizvodi.<sup>5</sup> Sir iz mišine proizvodi se iz pasteriziranog ili nepasteriziranog mlijeka koje se doprema s farne neposredno nakon mužnje. Mlijeko se najprije filtrira kroz gazu radi otklanjanja eventualno prisutnih mehaničkih nečistoća te se temperira na temperaturu od 32 do 37°C uz dodatak sirila, prirodnog ili komercijalnog. Slijedi proces sirenja mlijeka koji traje između 30 i 60 minuta, a najviše ovisi o temperaturi i jačini sirila. Sirenje je gotovo kada se formira gruš koji se potom reže nožem na zrna veličine 4x4 cm. Sirno zrno se suši pola sata uz miješanje i zagrijavanje do temperature 34-40°C. Njegova veličina nakon sušenja odgovara veličini lješnjaka ili oraha. Sirni gruš se zatim cijedi u platnenim maramama bez upotrebe pritiska, a nakon cijedenja, reže se na komade veličine 10x10x5 cm, soli se krupnom morskom soli te stavlja u posebno pripremljenu mješinu. Komadi sira se slažu tako da se što više ispuni unutarnji prostor mišine te se



sve dobro sabije da se istisne sav zrak (anaerobno zrenje). Slijedi period zrenja sira koji traje 60-90 dana pri temperaturi 16-20°C te relativnoj vlažnosti zraka u zionici od 60% do 85%. Na početku procesa zrenja, potrebno je svakodnevno okretanje sira, dok se stariji sirevi okreću svaka 2-3 dana, a zreli sirevi svakih 5 dana.<sup>5,9</sup>

Sir Tulum, koji se tradicionalno proizvodi u Turskoj, zrije u mišini od kozje kože 3-6 mjeseci na temperaturi od 6° do 10°C i relativnoj vlažnosti 65-85%.<sup>10</sup>

U Bosni i Hercegovini, sir se nakon cijedenja i soljenja sprema u kacu sve dok se ne skupi količina dovoljna da se napuni prethodno alkoholom dezinficiran mijeh, unutar kojeg se događa aerobna konverzija laktoze u mliječnu kiselinu. Takav sir zrije pri temperaturi od 12° do 15°C.<sup>11</sup>



*Slika 2.* Dijagram toka proizvodnje sira iz mišine<sup>12</sup>

## 1.4 BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA IZ MIŠINE

Tijekom procesa sazrijevanja sira iz mišine dolazi do kompleksnih mikrobioloških i biokemijskih promjena koje značajno utječu na formiranje organoleptičkih svojstava

gotovog sira. U mikrobiološke promjene spadaju odumiranje bakterija startera (bakterija mliječne kiseline dodane u formi kulture), rast nestarterskih bakterija (*eng.* Non-Starter Lactic Acid Bacteria ili NSLAB) te rast sekundarne mikroflore specifične za određenu vrstu sira. Nadalje, govoreći o biokemijskim promjenama tokom zrenja sira, one se mogu podijeliti u dvije skupine, primarne i sekundarne. Primarni procesi tijekom sazrijevanja sira su proteoliza, glikoliza i lipoliza dok su sekundarni procesi metabolizam amino i masnih kiselina. Primarne biokemijske promjene odgovorne su za osnovne promjene teksture sira, dok sekundarne formiraju konačni miris i okus sira.<sup>13</sup>

## **1.5 PRIMARNI BIOKEMIJSKI PROCESI**

### **1.5.1 GLIKOLIZA**

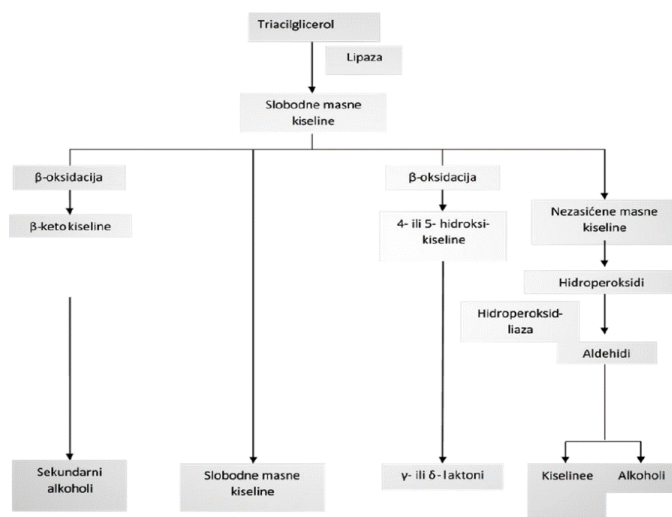
Osnovni primarni biokemijski proces u proizvodnji sira iz mišine je fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu. Laktoza je disaharid sastavljen od monosaharidnih jedinica glukoze i galaktoze, a prirodno je prisutan u mlijeku sisavaca. U probavnom traktu razgrađuje se pomoću enzima laktaze, a potom ulazi u proces glikolize. Razgradnju laktoze glikolitičkim (fosfoketolaznim) putem vrše bakterije mliječne kiseline. Konačan produkt glikolitičkog puta razgradnje laktoze je mliječna kiselina, dok su produkti fosfoketolaznog puta razgradnje laktoze laktat, acetat, etanol i ugljikov monoksid (CO). U proizvodnji sira iz mišine gotovo sva laktoza iz mlijeka, 98% , prelazi u sirutku, dok se u svježoj sirnoj masi zadrži 1-2 % laktoze. Ovisno o razini soli u grušu i temperaturi, zaostala laktoza na početku zrenja metabolizira u L(+) laktat. Niski pH i brzi prodor soli u grušu usporavaju glikolizu dok previsoke koncentracije soli dovode do inhibicije bakterija mliječne kiseline. U kom smjeru će se glikoliza odviti i koji će spojevi nastati ovisit će o vrsti sira.<sup>14</sup>

### **1.5.2 LIPOLIZA**

Lipoliza je biokemijski proces u kojem dolazi do razgradnje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol, a odvija se pod utjecajem enzima lipaza. Ti su enzimi

prirodno prisutni u mlijeku u obliku lipoproteina dok ostale lipaze koje se pronalaze u siru, potječu iz sirila, mljekarske kulture, nestarterske mikroflore i sekundarne mikroflore. Mliječna mast je spoj različitih lipidnih tvari među kojima su najviše zastupljeni trigliceridi (98%) dok su u manjoj mjeri prisutni i monoacilgliceroli, diacilgliceroli, fosfolipidi, kolesterol, slobodne masne kiseline, cerebrozidi, mineralne tvari, kao i vitamini A, D, E i K. Mliječna mast je podložna promjenama – lipolitičkim i oksidacijskim.

Lipolitičke promjene podrazumijevaju reakcije cijepanja esterskih veza triacilglicerola prilikom kojih dolazi do stvaranja alkohola glicerola i slobodnih masnih kiselina koje su onda podložne reakcijama oksidacije. Slobodne masne kiseline mogu reagirati s alkoholnom i slobodnim sulfhidrilnim skupinama prilikom čega će nastati tioesteri i esteri koji daju jaku aromu siru, međutim, ako su te koncentracije niske i pravilno izbalansirane s ostalim produktima reakcija tijekom zrenja, one imaju poželjan doprinos stvaranju arome sira. Isto tako slobodne masne kiseline mogu biti i prekursori za nastajanje drugih spojeva arome pa su tako produkti katabolizma slobodnih masnih kiselina (slika 3) upravo sekundarni alkoholi, kiseline i laktoni. No ipak, mliječna je mast podložnija lipolitičkim negoli oksidacijskim promjenama upravo zbog niskog oksidacijsko-redukcijskog potencijala u siru. Upravo su lipolitičke promjene te koje su izraženije kod sireva proizvedenih od sirovog mlijeka, baš kao što je sir iz mišine. Ta se lipolitička aktivnost može objasniti upravo zbog prisutnosti lipoproteinskih lipaza i primarne mikroflore mlijeka te korištenjem sirila koje sadrži predželučanu esterazu, a daje na pikantnom okusu siru iz mišine. Intenzivna lipoliza zapravo je nepoželjna kod većine polutvrdih i tvrdih sireva (s unutarnjim zrenjem). Visok udio slobodnih masnih kiselina uzrokuje užegao okus sira, posebice kratkolančane masne kiseline kao što je maslačna kiselina.<sup>14,15</sup>

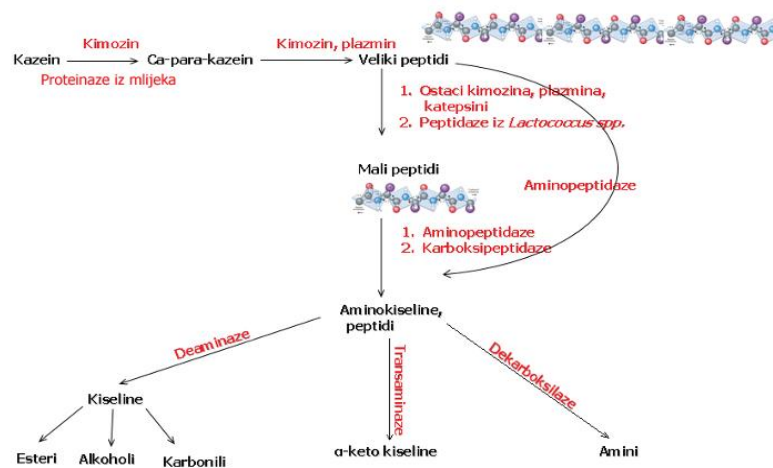


*Slika 3.* Katabolizam slobodnih masnih kiselina<sup>14</sup>

### 1.5.3 PROTEOLIZA

Najvažniji i najsloženiji biokemijski proces koji se događa prilikom sazrijevanja sireva koji zriju u životinjskoj koži je upravo proteoliza. To je proces u kojem dolazi do razgradnje kazeina (slika 4) na peptide i aminokiseline pod utjecajem proteolitičkih enzima – proteaza. Kao rezultat proteolize dolazi do promjene u strukturi sira prilikom čega ona postaje mekša, dok se sadržaj vode u siru smanjuje, a pH-vrijednost povećava. Proteoliza izravno utječe na okus i miris sira nastajanjem kratkih peptida i aminokiselina, oslobađa aromatske spojeve iz unutrašnjosti sira te slobodne aminokiseline koje su supstrati za sekundarne kataboličke promjene odgovorne za nastajanje spojeva koji daju aromu siru.

Proces proteolize se dijeli na primarnu i sekundarnu proteolizu. Primarna proteoliza se odvija pod djelovanjem plazmina i kimozina, gdje kazein hidrolizira do određenih razgradnih produkata ovisno o aktivnosti i količini rezidualnog sirila, te o aktivnosti plazmina. Sekundarna proteoliza dovodi do razgradnje proteina i proteoza na peptide i aminokiseline, a sve se događa pod utjecajem enzima nestarterske mikroflora i bakterija mliječne kiseline. Nastali produkti sekundarne proteolize dalje se u procesima dekarboksilacije, transaminacije, deaminacije i desumporizacije prevode u spojeve arome.<sup>14</sup>



Slika 4. Enzimski razgradnja kazeina<sup>13</sup>

## 1.6 SPOJEVI AROME SIRA IZ MIŠINE

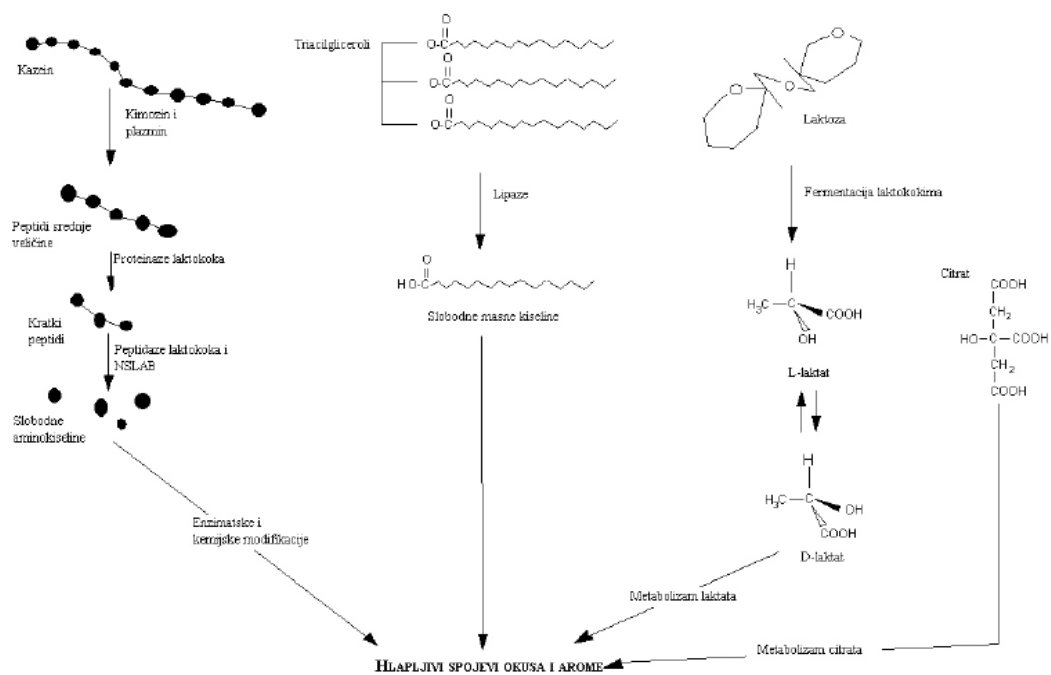
Aroma neke tvari je suma karakteristika osjećaja koje ta tvar izaziva u ustima, a najviše je percipiramo osjetilima mirisa i okusa. Spojevi koji su odgovorni za okus uglavnom su nehlapljivi pri sobnoj temperaturi za razliku od spojeva odgovornih za miris koji su hlapljivi. Aroma je jedna od glavnih senzorskih svojstva koja je primarna za odabir, prihvatljivost i probavu hrane.<sup>16</sup>

Istraživanje arome sira započelo je početkom 20. stoljeća, a značajniji iskorak dostignut je razvojem plinske kromatografije i masene spektrometrije. Izolirano je više stotina različitih spojeva okusa i mirisa sira. Okus sira koncentriran je u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline, amini), dok je miris sira koncentriran u hlapljivoj frakciji (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri). Potvrđeno je da aromu sira sačinjava kombinacija raznih spojeva koji su nastali tijekom sazrijevanja sira. Većina sireva sadrži iste ili slične spojeve, ali u različitim koncentracijama, što pak daje na specifičnosti arome svake pojedine vrste sira.

Sir iz mišine, kao i svaki drugi sir koji sazrijeva u životinjskoj koži, odlikuje se izraženim okusom i pikantnom aromom. Te su karakteristike posljedica složenih biokemijskih procesa (slika 5) koji prate zrenje sira u specifičnom mediju – životinjskoj koži, a prilikom kojih nastaju hlapljivi aromatski spojevi. Na okus i miris sireva koji sazrijevaju u koži, utjecaj mogu imati i postotak vode u siru, vrijednosti pH, vrsta

mlijeka, udio soli i metoda soljenja, temperatura zrenja te aktivnost primarne i sekundarne mikroflora sira.

Najzastupljenije isparljive komponente koje daju aromu ovim vrstama sireva jesu esteri, alkoholi, kiseline, aldehidi, terpeni i ketoni. Aldehidi su prisutni u manjem broju budući da većinom prelaze u odgovarajuće alkohole ili kiseline te na taj način utječu na formiranje konačne arome sira. Nasuprot tomu, zabilježen je veći sadržaj estera i terpena, posebice limonena koji daje citrusnu aromu siru. Od alkohola je najviše zastupljen etanol koji ima ograničenu ulogu u stvaranju arome sira, ali sudjeluje u sintezi etilnih estera. Uz njega se u siru iz mišine često pojavljuje i 3-metilbutanol.<sup>14</sup>



Slika 5. Biokemijski procesi koji imaju utjecaj na konačnu formaciju arome sira iz mišine<sup>17</sup>

### 1.6.1 UTJECAJ PEPTIDA

Enzimaska hidroliza proteina dovodi do formiranja peptida manjih molekulskih masa, među kojima, većinom hidrofobni, daju **gorak okus** siru. U slučaju nepotpune hidrolize peptida dolazi do njihovog nakupljanja i sir dobiva gorak okus. U stvaranju

gorkih peptida važnu ulogu imaju bakterije NSLAB, enzimi sirila i startera. Kod zrelih sireva, određena količina gorkih peptida može biti poželjna, međutim, povećanjem koncentracije gorkih peptida iznad granice koja je dozvoljena, sir postaje gorak. Gorak okus može se pripisati i pogreškama koje se događaju prilikom tehnoloških procesa proizvodnje. Dokazano je da se pogreška u okusu i mirisu sira može spriječiti dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus* koja onda potiče stvaranje veće količine slobodnih masnih kiselina.

## 1.6.2 UTJECAJ AMINOKISELINA

Aminokiseline imaju važnu ulogu kod formiranja arome sira budući da služe kao prekursori u formaciji drugih spojeva koji sudjeluju u konačnoj formaciji okusa i mirisa sira iz mišine. Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju sljedeći spojevi: alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi, koji formiraju specifične arome. U proces razgradnje uključeni su enzimi koji potječu iz mlijeka, sirila i bakterija mliječne kiseline. Razlikujemo dva glavna puta razgradnje aminokiselina, pomoću aminotransferaza i liaza, te rjeđe deaminaza ili dekarboksilaza.

U formiranju arome sira važne su razgranate aminokiseline kao što su valin (Val), izoleucin (Ile), leucin (Leu), potom aromatske aminokiseline triptofan (Trp), tirozin (Tyr) i fenilalanin (Phe) te aminokiselina sa sumporovim atomom, cistin (Cys) i metionin (Met).

Razgradnjom valina, izoleucina i leucina, nastaju izovalerijanska i izomaslačna kiselina (slatkog, gorkog, kiselog, trulog ili maslačnog okusa i mirisa), 2-metilbutan, 3-metilbutan te 2-etilpropan s karakterističnom **voćnom ili alkoholnom aromom**.

Iz aromatskih aminokiselina nastaju feniloctena kiselina, fenilacetaldehid, benzaldehid, krezol, fenol i indol, koji daju **cvjetni miris ili fenolni miris** i važne su komponente mirisa u polutvrdih i tvrdih sireva.

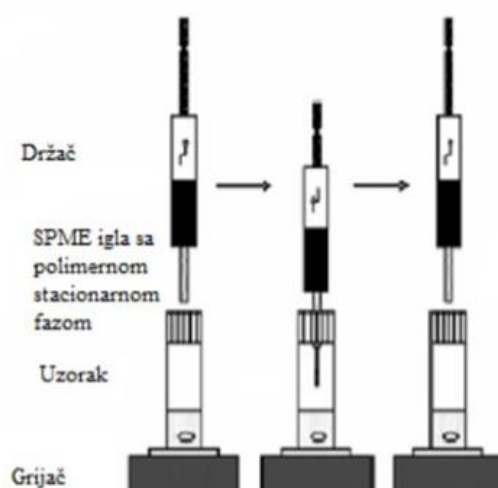
Razgradnjom aminokiselina koje sadrže sumpor (metionin i cistin) nastaju sumporni spojevi koji su zaslužni za stvaranje **okusa i mirisa sira po kelju, jajima, bijelom luku i krumpiru**. Osjete se pri vrlo niskim koncentracijama pa su izrazito bitni u formaciji arome sira.<sup>13,17</sup>

## 1.7 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi jedna je od najčešće korištenih metoda za izolaciju hlapljivih spojeva arome sira.

### 1.7.1 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (*engl.* headspace solid phase microextraction, HS-SPME) je sorpcijska tehnika koja omogućuje uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje hlapljivih spojeva u jednom koraku i bez upotrebe otapala. Ova tehnika zahtijeva korištenje silikonskog vlakna (dugog 1 ili 2 cm) prekrivenog filmom od polimera na kojem se tijekom ekstrakcije adsorbiraju hlapljivi spojeva iz uzoraka. U sastavu igle nalazi se vlakno koje je postavljeno na SPME držaču. Vlakna mogu biti različitog sastava i polarnosti pa tip vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije. Napolarna vlakna koriste se za ekstrakciju napolarnih spojeva, a polarna za ekstrakciju polarnih spojeva.



*Slika 6.* Uređaj za HS-SPME<sup>18</sup>



Postupak rada je jednostavan (slika 6). Uzorak se stavlja u staklenu vijalicu, hermetički zatvori pomoću septe te zagrijava pri čemu se prostor iznad uzorka ispuni vršnim parama. Nakon tog se vlakno uvodi (izvlači iz igle) u vršne pare iznad uzorka pri čemu dolazi do adsorpcije hlapljivih spojeva na vlakno. Nakon adsorpcije vlakno se uvlači u iglu i desorbira direktnim umetanjem u injektor plinskog kromatografa.

Metoda ima svojih prednosti, ali i nedostataka. Prednosti metode su što se radi o brznoj i jednostavnoj metodi koja ne koristi otapalo, a pokazala se uspješnom kod brze usporedbe uzoraka ili identifikacije neželjenih mirisa. Nedostatci metode su ovisnost aromatičnog profila skupljenih isparljivih spojeva o vrsti, debljini te dužini korištenog vlakna kao i o temperaturi i vremenu uzorkovanja te činjenica da su neka vlakna ipak diskriminirajuća za polarne spojeve.<sup>16,18</sup>

## **1.8 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Analiza hlapljivih spojeva obuhvaća njihovu izolaciju iz uzorka, odjeljivanje iz smjese i identifikaciju. Najčešće korišten sustav za odjeljivanje i identifikaciju hlapljivih spojeva je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

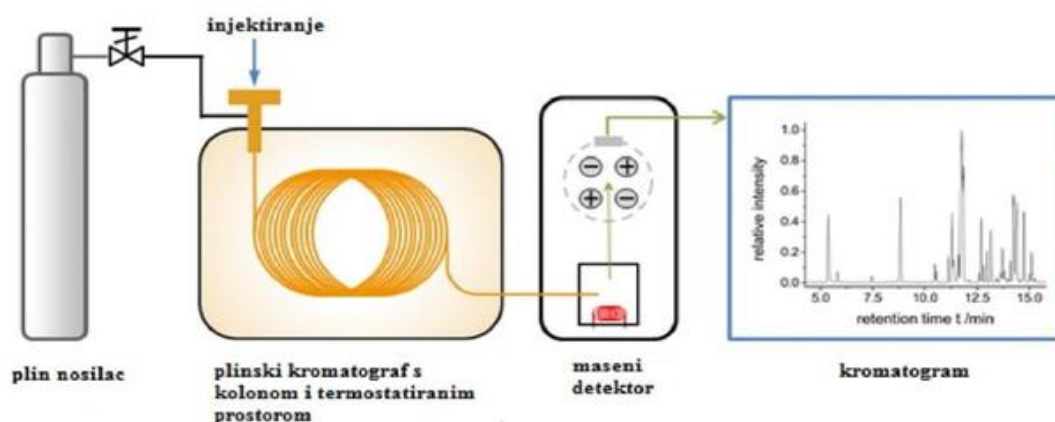
### **1.8.1 VEZANI SUSTAV GC-MS**

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (*engl.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GS-MS) je instrumentalna metoda koja se koristi za analizu smjese isparljivih spojeva, uz primjenu minimalne količine uzorka. Ove dvije metode uspješno se nadopunjuju budući da plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese a spektrometrija masa za kvalitativnu analizu.

Osnovne komponente GC-MS uređaja (slika 7):

- boca s plinom nosiocem,
- injektor,
- peć s kromatografskom kolonom,

- maseni detektor,
- računalo.



*Slika 7.* Shema vezanog sustava GC-MS<sup>18</sup>

Pojednostavljeni princip rada:

Uzorak se injektira u injektor plinskog kromatografa gdje se prevodi u plinovito stanje. Plin nosioc potom nosi uzorak u kromatografsku kolonu gdje dolazi do odjeljivanja sastojaka smjese hlapljivih spojeva. Odijeljeni sastojci odvođe se u spektrometar masa gdje se identifikacija nepoznatog spoja provodi usporedbom njegovog masenog spektra sa masenim spektrima spojeva iz komercijalno dostupnih biblioteka.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 SIR IZ MIŠINE

U svrhu izrade ovog završnog rada korišteni su uzorci sira iz mišine pripravljenog od kozjeg sira proizvedenog u sirani I-Pak u Pakovom selu 2021. godine.

### 2.2 APARATURA

U svrhu izrade ovog završnog rada upotrebljena je sljedeća aparatura:

- Tehnička vaga Kern, model 572 (Njemačka)
- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi sa SPME vlaknima: sivo vlakno sa ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetil-siloksan, proizvođača Supelco Co. (SAD) te svijetlo-plavo vlakno sa ovojnicom karboksen/polidimetil-siloksan, proizvođača Agilent (SAD)
- Magnetska miješalica, model MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001 (Heidolph, Njemačka)
- Vezani sustav plinska kromatografija–spektrometrija masa, Agilent Technologies (SAD): plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.

## **2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

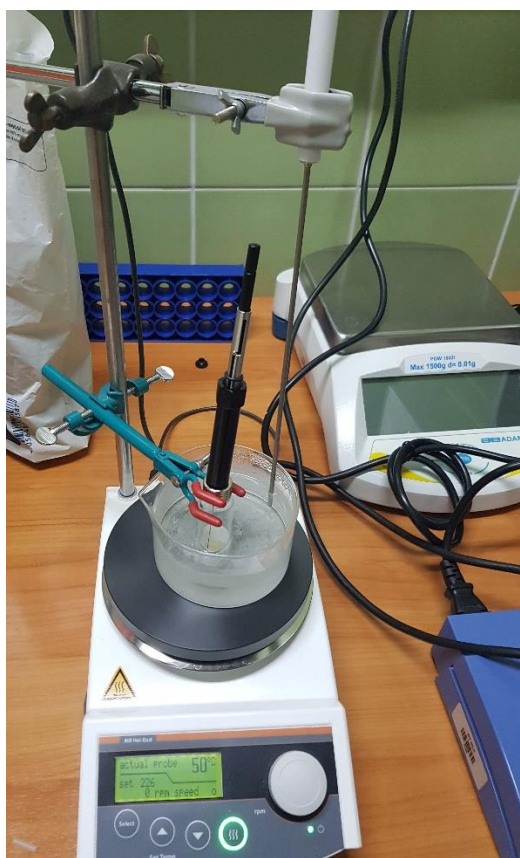
Hlapljivi spojevi sira iz mišine izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem dvaju različitih vlakana, sivog i svijetlo-plavog, pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Na taj je način dobiveno ukupno 6 uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

### **2.3.1 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI**

Hlapljivi spojevi sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem dvaju različitih vlakana, sivog i svijetlo-plavog, pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Prije samog početka rada, vlakna su kondicionirana u skladu sa uputama proizvođača i to, sivo vlakno na temperaturi od 270°C 30 minuta te svijetlo-plavo vlakno na temperaturi od 300°C sat vremena. Po završetku kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Svih šest uzoraka pripravljeno je na isti način, jedino se mijenjala temperatura pri kojoj je rađena mikroekstrakcija (slika 8). U staklene bočice (vialice) stavljeno je po 1g

kozjeg sira iz mišine te je vialica dobro zatvorena sa septom i postavljena u vodenu kupelj na određenu temperaturu – 40, 50 ili 60°C. U vodenoj kupelji korištena je magnetska miješalica s termostatom za održavanje konstantne temperature. U prostoru iznad uzoraka skupljaju se hlapljivi spojevi (vršne pare), a nakon njihovog oslobađanja, uvodi se SPME igla sa sivim ili svijetlo-plavim vlaknom u vialicu, prilikom čega se izvlači vlakno i provodi ekstrakcija hlapljivih spojeva oko 40 minuta. Po završetku uzorkovanja, vlakno se uvlači u iglu i odmah postavlja u GC-MS injektor. U injektoru se vlakno izvlači iz igle i vrši toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva pri 250°C izravno u GC kolonu u trajanju od 7 minuta.



*Slika 8.* Prikaz aparature i samog proces mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi pri 50°C

## 2.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (slika 9) pri čemu je korišten plinski kromatograf

proizvođača Agilent Technologies (SAD), model 7820A, u kombinaciji s masenim detektorom istog proizvođača, model 5977E, spojenog na računalo na kojem se očitavaju rezultati.



*Slika 9.* Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa<sup>18</sup>

Analize su rađene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies (kemijskog sastava: 5% difenil-95% dimetilpolisilksan, 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ ). Plin nositelj je helij (protok: 1 mL/min), temperatura injektora iznosila je 250 °C, omjer cijepanja 50:1, temperatura detektora 280 °C, energija ionizacije 70 eV te temperatura izvora ionizacije 230°C. Programom je određena temperatura peći: zadržavanje 2 min izotermno na 70 °C, potom porast temperature od 70°C do 200°C brzinom od 3°Cmin<sup>-1</sup> te zadržavanje 2 min pri 200°C.

Za svaki analizirani uzorak dobiven je kromatogram ukupne ionske struje. Pojedinačni pikovi na kromatogramu su identificirani usporedbom retencijskih vremena ( $t_R$ ) s onima iz literature i dostupnim standardima, kao i usporedbom njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz Wiley9 i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) baza podataka.

### 3. REZULTATI

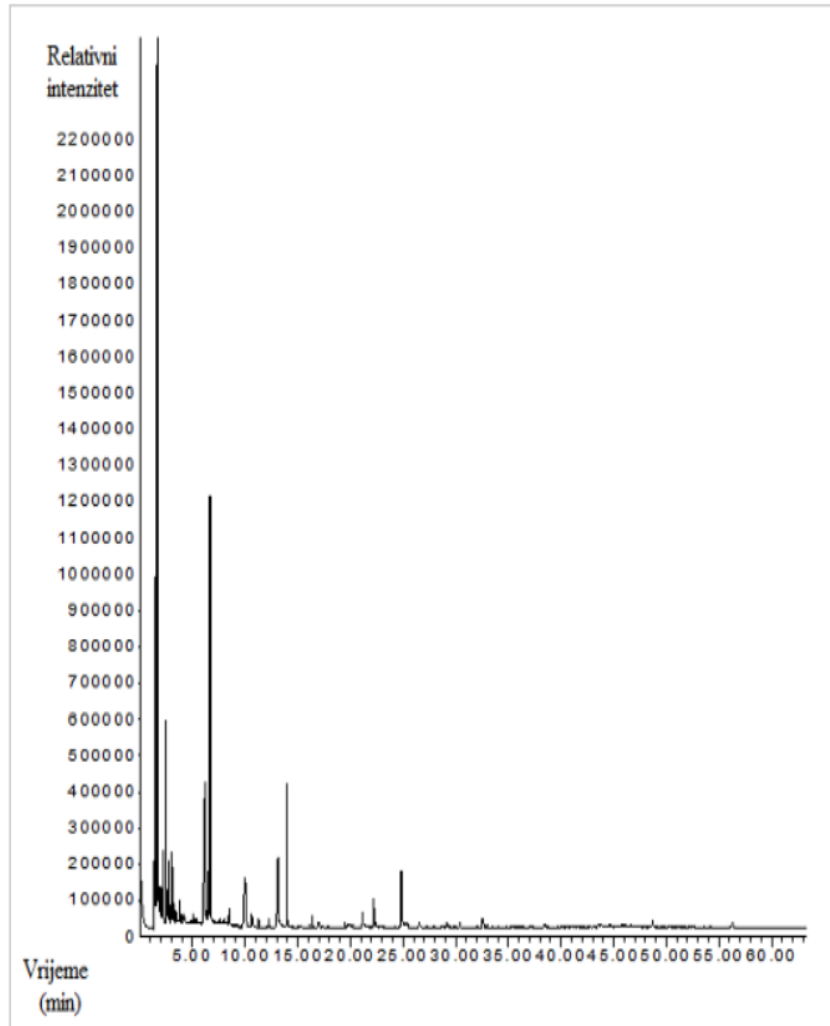
Hlapljivi spojevi sira iz mišine pripravljenog od kozjeg mlijeka izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog i svjetlo-plavog vlakna pri različitim temperaturama ekstrakcije (40, 50 i 60°C). Postupak pripreme uzoraka opisan je u prethodnim poglavljima. Za analizu hlapljivih spojeva korišten je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa sa HP-5MS kolonom. Dobiveni rezultati su prikazani tablično (Tablice 1.-6.), a identificirani spojevi poredani prema redosljedu eluiranja s kolone. Budući da HP-5MS nije kiralna kolona, nisu određeni točni izomeri kiralnih spojeva. U radu su prikazani kromatogrami ukupne ionske struje (Slike 10.-15.) za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio spojeva u uzorcima izražen je u postocima i predstavlja udio površine pika određenog spoja u ukupnoj površini (površina svih pikova na kromatogramu). Identifikacija spojeva izvršena je usporedbom njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley9 i NIST17.

Značenje simbola u tablicama:

$t_R$  - vrijeme zadržavanja izraženo u minutama

Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	8,66
2.	Octena kiselina	1,55	8,20
3.	Butan-2-on	1,61	23,16
4.	Acetoin	2,03	0,86
5.	3-Metilbutanol	2,17	2,28
6.	Butanska kiselina	2,46	6,20
7.	Etil-butanoat	2,73	1,66
8.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	1,39
9.	3-Metilbutil-acetat	3,82	0,68
10.	Heksanska kiselina	6,23	11,38
11.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	1,53
12.	Etil-heksanoat	6,67	12,24
13.	Oktanska kiselina	13,24	4,47
14.	Etil-oktanoat	13,96	4,84
15.	Etil-dekanoat	22,25	1,00
UKUPNO IDENTIFICIRANO			88,55

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (sivo vlakno, 40°C)

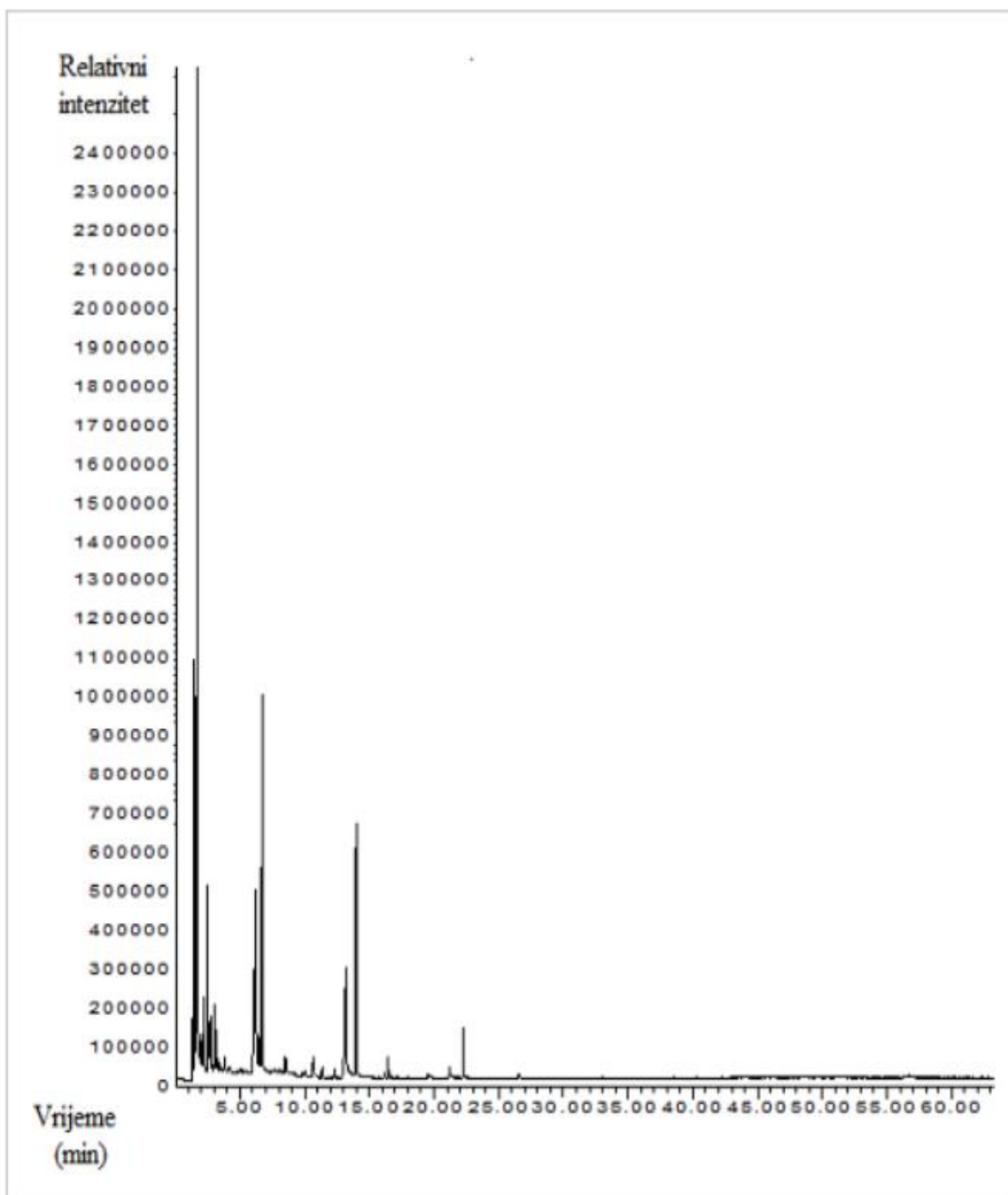


*Slika 10.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (sivo vlakno, 40 °C)



Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	9,95
2.	Octena kiselina	1,55	5,31
3.	Butan-2-on	1,61	26,78
4.	Acetoin	2,03	0,85
5.	3-Metilbutanol	2,17	2,29
6.	Butanska kiselina	2,46	6,07
7.	Etil-butanoat	2,73	1,52
8.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	0,99
9.	Heksanska kiselina	6,23	14,89
10.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	1,13
11.	Etil-heksanoat	6,67	10,74
12.	Oktanska kiselina	13,24	7,41
13.	Etil-oktanoat	13,96	7,27
14.	Etil-dekanoat	22,25	1,48
UKUPNO IDENTIFICIRANO			96,68

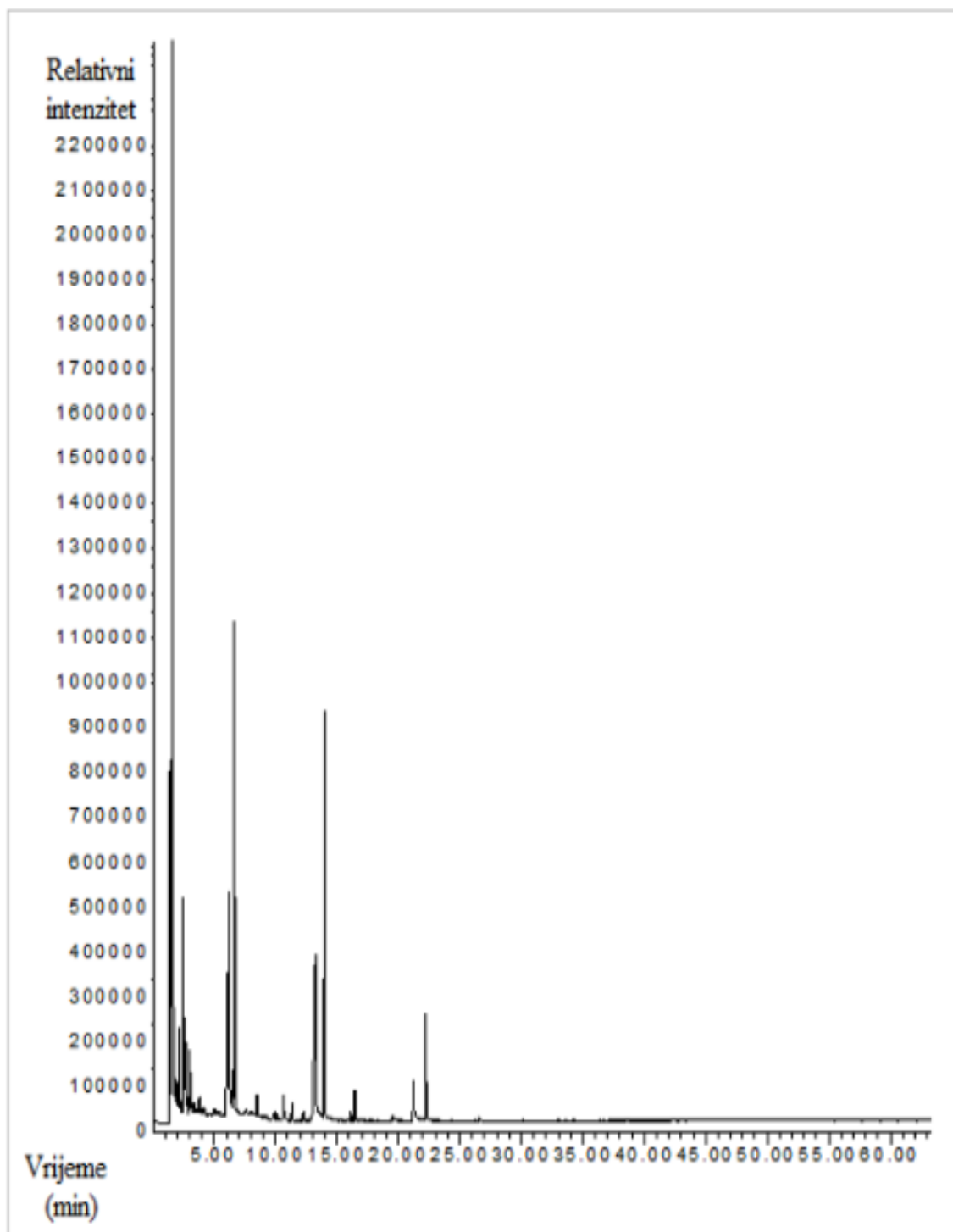
**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (sivo vlakno, 50°C)



*Slika 11.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (sivo vlakno, 50 °C)

Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	6,59
2.	Octena kiselina	1,55	5,48
3.	Butan-2-on	1,61	23,20
4.	Acetoin	2,03	0,23
5.	3-Metilbutanol	2,17	1,78
6.	Butanska kiselina	2,46	5,1
7.	Etil-butanoat	2,73	1,47
8.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	0,82
9.	Heksanska kiselina	6,23	14,12
10.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	1,13
11.	Etil-Heksanoat	6,67	11,56
12.	2-Feniletanol	10,67	0,85
13.	Oktanska kiselina	13,24	10,45
14.	Etil-oktanoat	13,96	9,26
15.	2-feniletetil-etanoat	16,44	0,81
16.	Dekanska kiselina	21,25	1,59
17.	Etil-dekanoat	22,25	2,42
UKUPNO IDENTIFICIRANO			96,86

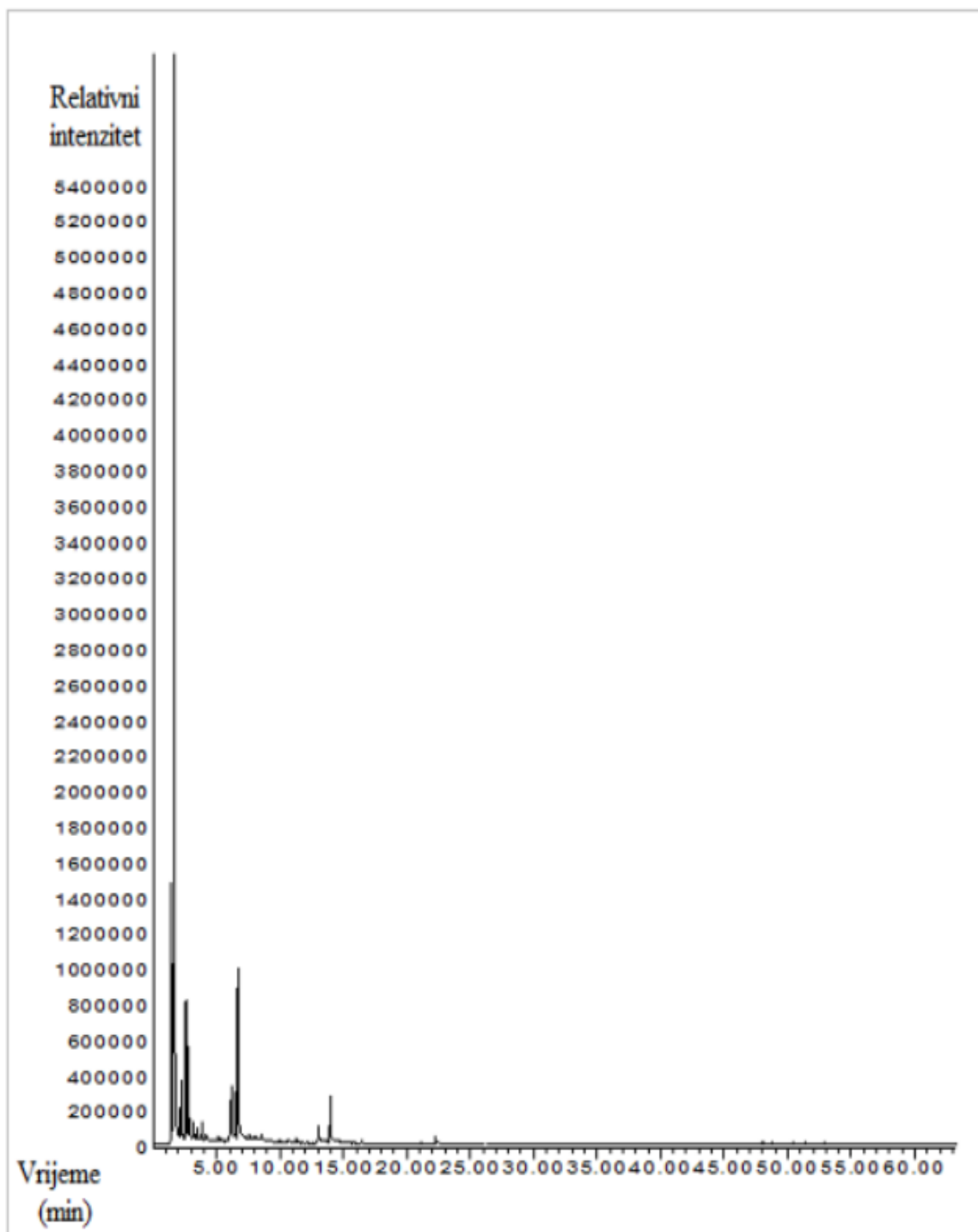
**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (sivo vlakno, 60 °C)



*Slika 12.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (sivo vlakno, 60 °C)

Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	9,15
2.	Octena kiselina	1,55	23,36
3.	Butan-2-on	1,61	29,40
4.	Acetoin	2,03	1,03
5.	3-Metilbutanol	2,17	2,18
6.	Butanska kiselina	2,46	7,80
7.	Etil-butanoat	2,73	4,14
8.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	0,52
9.	3-Metilbutil-acetat	3,82	0,75
10.	Heksanska kiselina	6,23	5,39
11.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	2,08
12.	Etil-heksanoat	6,67	9,10
13.	Oktanska kiselina	13,24	1,28
14.	Etil-oktanoat	13,96	2,63
UKUPNO IDENTIFICIRANO			98,81

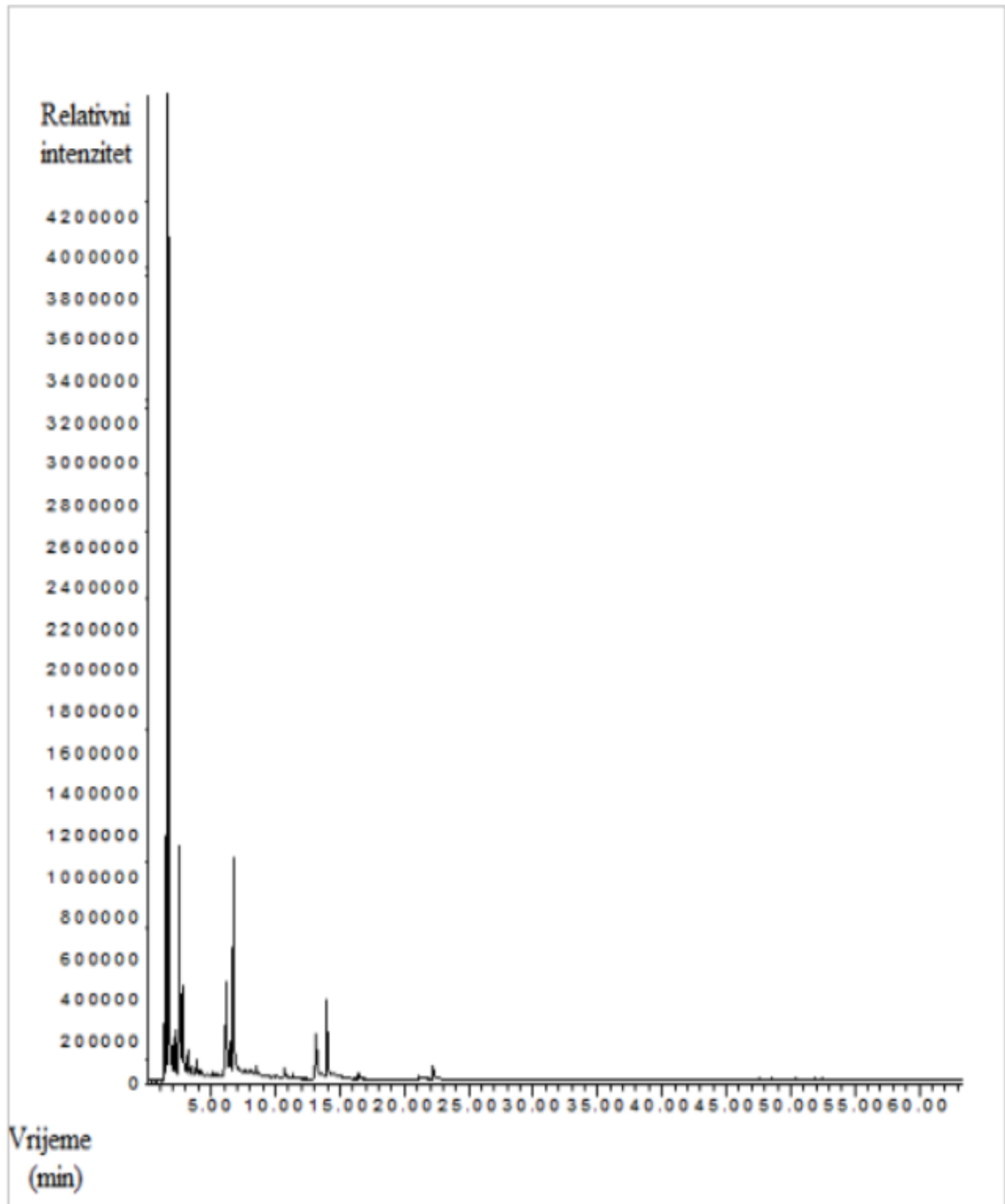
**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (svijetlo-plavo vlakno, 40 °C)



*Slika 13.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (svijetlo-plavo vlakno, 40 °C)

Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	7,07
2.	Octena kiselina	1,55	26,05
3.	Butan-2-on	1,61	19,13
4.	Acetoin	2,03	1,58
5.	3-Metilbutanol	2,17	1,73
6.	Butanska kiselina	2,46	6,68
7.	Butan-2,3-diol	2,60	2,8
8.	Etil-butanoat	2,73	2,85
9.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	0,64
10.	3-Metilbutil-acetat	3,82	0,50
11.	Heksanska kiselina	6,23	9,14
12.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	1,21
13.	Etil-heksanoat	6,67	9,41
14.	Oktanska kiselina	13,24	3,38
15.	Etil-oktanoat	13,96	3,34
16.	Etil-dekanoat	22,25	0,99
UKUPNO IDENTIFICIRANO			96,50

**Tablica 5.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (svijetlo-plavo vlakno, 50 °C)

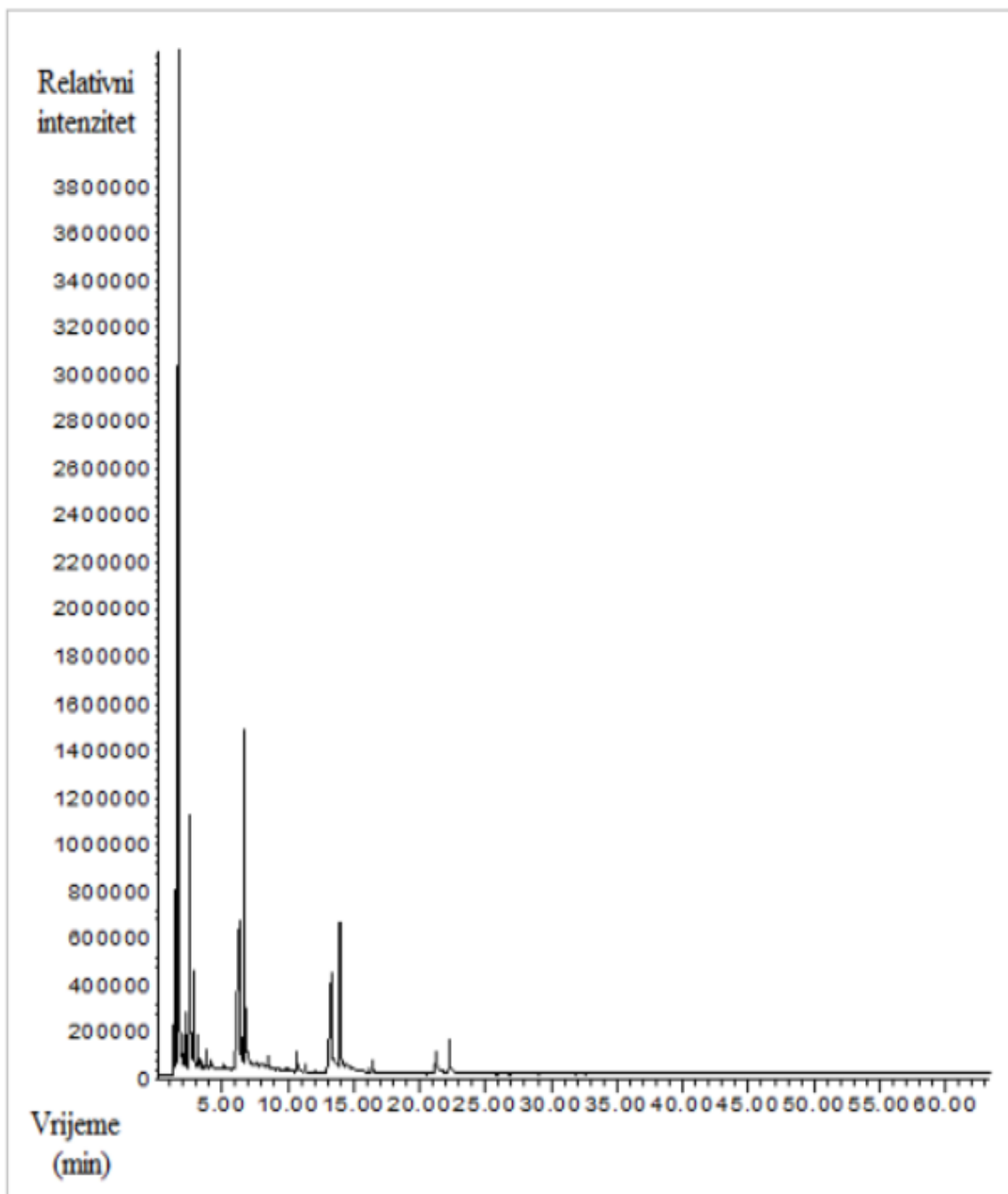


*Slika 14.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (svijetlo-plavo vlakno, 50 °C)



Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio(%)
1.	Etanol	1,41	4,68
2.	Octena kiselina	1,55	12,21
3.	Butan-2-on	1,61	23,31
4.	Acetoin	2,03	0,50
5.	3-Metilbutanol	2,17	1,24
6.	Butanska kiselina	2,46	10,43
7.	Etil-butanoat	2,73	2,64
8.	3-Metilbutanska kiselina	3,13	0,71
9.	3-Metilbutil-acetat	3,82	0,49
10.	Heksanska kiselina	6,23	14,23
11.	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	6,45	0,83
12.	Etil-heksanoat	6,67	11,05
13.	2-feniletanol	10,67	0,96
14.	Oktanska kiselina	13,24	7,69
15.	Etil-oktanoat	13,96	5,05
16.	2-Feniletetil-etanoat	16,44	0,49
17.	Dekanska kiselina	21,25	1,02
18.	Etil-dekanoat	22,25	0,99
UKUPNO IDENTIFICIRANO			98,52

**Tablica 6.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira (svijetlo-plavo vlakno, 60 °C)



*Slika 15.* Kromatogram ionske struje dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (svijetlo-plavo vlakno, 60 °C)

## 4. RASPRAVA

Sir iz mišine tradicionalni je hrvatski sir koji se proizvodi na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG), u novije vrijeme i u obrtničkim objektima, šireg područja Šibenskog zaleđa. Priprema se ponajviše od ovčjeg mlijeka, a zatim i od kozjeg te kravljeg mlijeka ili pak njihove mješavine, bez dodavanja komercijalne mljekarske kulture, uz dodatak industrijskog sirila. Specifičnost ovog sira, po kojoj je i dobio ime, je anaerobno zrenje u janjećoj koži (mišini) čime se postižu organoleptička svojstva sira kao što su okus, miris, aroma i konzistencija.<sup>2</sup>

Kod formiranja arome sira presudnu ulogu ima zrenje. Na početku zrenja sirevi se odlikuju blagim i neutralnim, najčešće sličnim, organoleptičkim svojstvima dok se karakteristični mirisi i okusi razvijaju upravo tijekom zrenja kada dolazi do složenih mikrobioloških, biokemijskih i kemijskih procesa. Biokemijske promjene koje nastaju dijele se na primarne (proteoliza, lipoliza i metabolizam rezidualne laktoze) i sekundarne promjene (metabolizam masnih kiselina i aminokiselina). Intenzivni proteolitički i lipolitički procesi tijekom zrenja zaslužni su za karakterističan miris i pikantan okus, a prirodno prisutne plijesni unutar kože pridonose u formiranju arome.<sup>2</sup> Aminokiseline su glavni prekursori za formiranje spojeva arome sira i to aminokiseline sa razgranatim lancem: valin, izoleucin i leucin, aromatske aminokiseline: triptofan, tirozin i fenilalanin te aminokiseline koje sadrže sumpor: cistin i metionin. Zbog toga je važna njihova količina i vrsta u siru te enzimi koji ih razgrađuju. Aminokiselinskom razgradnjom u siru nastaju spojevi kao što su alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi koji su pak odgovorni za formiranje specifičnih aroma u raznim sireva.<sup>13</sup>

Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine pripremljenog od kozjeg mlijeka. Hlapljivi spojevi sira izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog i svijetlo-plavog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Na taj način dobiveno je ukupno šest uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

## **VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE KORIŠTENJEM SIVOG VLAKNA**

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kozjeg sira iz mišine izoliran korištenjem sivog vlakna pri temperaturama 40, 50 i 60 °C prikazan je u tablicama 1-3. Identificirano je 17 spojeva, od čega je ukupno 6 kiselina, 6 estera, 3 alkohola, 2 ketona i 1 ugljikohidrat. Usporedbom rezultata uočljivo je da se kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva ne razlikuje bitno s obzirom na temperaturu izolacije. Uzorci sadrže uglavnom iste spojeve uz određene varijacije u koncentraciji, osim nekoliko iznimki - pa je tako dekanska kiselina (1,59%) identificirana samo pri temperaturi ekstrakcije 60 °C, esteri 3-metilbutil-acetat (0,68%) pri 40 °C, 2-fenil-etanoat (0,81%) pri 60 °C a alkohol 2-feniletanol (0,85%) samo pri 60 °C.

Na svim temperaturama ekstrakcije su pronađene kiseline: heksanska (11,38-14,89%), oktanska (4,47-10,45%), octena (5,31-8,20%), butanska (5,10-6,20%) i 3-metilbutanska kiselina (0,99-1,39%); esteri: etil-heksanoat (10,74-12,24%), etil-oktanoat (4,84-9,26%), etil-dekanoat (1-2,42%) i etil-butanoat (1,47-1,66%); alkoholi: etanol (6,59-9,95%) i 3-metil-butanol (1,78-2,29%), ketoni: butan-2-on (23,16-26,78%) i acetoin (0,23-0,83%) te ugljikohidrat 2,2,4,6,6-pentametilheptan (1,13-1,53%).

## **VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE KORIŠTENJEM SVIJETLO-PLAVOG VLAKNA**

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kozjeg sira iz mišine izoliran korištenjem svijetlo-plavog vlakna pri različitim temperaturama (40, 50 i 60 °C) prikazan je u tablicama 4-6. Na ovaj način identificirano je ukupno 18 spojeva, od čega je 5 kiselina, 6 estera, 4 alkohola, 2 ketona i 1 ugljikohidrat. Kao i kod sivog, i kod korištenja svijetlo-plavog vlakna kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva se ne razlikuje bitno s obzirom na temperaturu izolacije. Iznimke su alkoholi butan-2,3-diol (2,8%) pronađen samo na temperaturi ekstrakcije 50 °C i 2-feniletanol (0,96%) pronađen na 60 °C te ester etil-dekanoat (0,99%) pronađen pri temperaturama ekstrakcije 50 i 60 °C .

Ostale spojeve, identificirane na svim temperaturama ekstrakcije, čine kiseline: octena (12,21-26,05%), heksanska (5,39-14,23%), butanska (6,68-10,43%), oktanska (1,28-7,69%), i 3-metilbutanska (0,52-0,71%); esteri: etil-heksanoat (9,10-11,05%), etil-oktanoat (2,63-5,05%), etil-butanoat (2,64-4,14%) i 3-metilbutil-acetat (0,49-0,75%); alkoholi: etanol (4,68-9,15%) i 3-metil-butanol (1,73-2,18%), ketoni: butan-2-on (19,13-29,40%) i acetoin (0,50-1,58%) te ugljikohidrat 2,2,4,6,6-pentametilheptan (0,83-2,08%).

Iz analize uzoraka vidljivo je da su u svim uzorcima, bez obzira na vrstu vlakna, prisutne slijedeće klase spojeva: kiseline, esteri, ketoni i alkoholi. Prisustvo kiselina nije neobično jer su one važni i dominantni spojevi u mnogim sirevima. Većina kiselina u sirevima nastaje kao rezultat lipolize mliječne masti ili fermentacijom laktoze i mliječne kiseline. Slobodne masne kiseline, posebice masne kiseline kratkog i srednjeg lanca, izravno pridonose okusu sira.<sup>19</sup> Nadalje, karboksilne kiseline nisu samo komponente arome kao takve, već mogu biti i prekursori novih spojeva arome, kao što su metil-ketoni, alkoholi, laktoni, aldehidi i esteri.<sup>20</sup>

Esteri su uobičajeni hlapljivi spojevi u sirevima. Smatra se da u niskim koncentracijama daju slatke, voćne (osobito etilni esteri) i cvjetne note a u visokim koncentracijama note kvasca. Zbog svoje visoke hlapljivosti na sobnoj temperaturi izravno pridonose aromi sira. Osim toga, esteri mogu doprinijeti aromi sira smanjujući gorčinu amina i oštrinu masnih kiselina. Mogu nastati kroz dvije enzimске reakcije, reakciju esterifikacije i alkoholize.

Alkoholi se smatraju važnim hlapljivim spojevima koji siru mogu dati alkoholnu, vinsku, slatku, voćnu i oštru notu.<sup>21</sup> Ketoni obično nastaju enzimskom oksidacijom masnih kiselina u  $\beta$ -keto kiseline, a zatim njihovom dekarboksilacijom u metil-ketone. Zbog svoje jedinstvene arome i niskog praga percepcije mogu značajno doprinijeti aromi sira.<sup>22</sup>

Jedan od najčešćih ugljikovodika pronađenih u sirevima koji dozrijevaju u životinjskoj koži, 2,2,4,6,6-pentametilheptan<sup>22</sup>, jedini je ugljikovodik identificiran u ovom radu. Većina ugljikovodika ne pridonosi aromi sira zbog svojih visokih vrijednosti praga percepcije.

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine pripravljenog od kozjeg mlijeka. Hlapljivi spojevi sira izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem sivog i svijetlo-plavog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Na taj način dobiveno je ukupno šest uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Usporedbom dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U svim uzorcima, bez obzira na vrstu vlakna i temperaturu ekstrakcije, su prisutne sljedeće klase spojeva: kiseline, esteri, ketoni i alkoholi, s tim da su karboksilne kiseline bile najzastupljenije u svim uzorcima.
- Rezultati su pokazali da promjena temperature ekstrakcije nije značajnije utjecala na kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva. Uzorci, osim nekoliko iznimki, sadrže uglavnom iste spojeve uz određene manje varijacije u koncentraciji.
- U uzorcima vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna su, bez obzira na temperaturu ekstrakcije, identificirane kiseline: heksanska (11,38-14,89%), oktanska (4,47-10,45%), octena (5,31-8,20%), butanska (5,10-6,20%) i 3-metilbutanska kiselina (0,99-1,39%); esteri: etil-heksanoat (10,74-12,24%), etil-oktanoat (4,84-9,26%), etil-dekanoat (1-2,42%) i etil-butanoat (1,47-1,66%); alkoholi: etanol (6,59-9,95%) i 3-metil-butanol (1,78-2,29%), ketoni: butan-2-on (23,16-26,78%) i acetoin (0,23-0,83%) te ugljikohidrat 2,2,4,6,6-pentametilheptan (1,13-1,53%).
- U uzorcima vršnih para izoliranih korištenjem svijetlo-plavog vlakna su, bez obzira na temperaturu ekstrakcije, identificirane kiseline: octena (12,21-26,05%), heksanska (5,39-14,23%), butanska (6,68-10,43%), oktanska (1,28-7,69%), i 3-metilbutanska (0,52-0,71%); esteri: etil-heksanoat (9,10-11,05%), etil-oktanoat (2,63-5,05%), etil-butanoat (2,64-4,14%) i 3-metilbutil-acetat (0,49-0,75%); alkoholi: etanol (4,68-9,15%) i 3-metil-

butanol (1,73-2,18%), ketoni: butan-2-on (19,13-29,40%) i acetoin (0,50-1,58%) te ugljikohidrat 2,2,4,6,6-pentametilheptan (0,83-2,08%).

- S obzirom da su korištenjem mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi izolirane klase spojeva koje se smatraju odgovornima za formiranje arome sira, možemo potvrditi da je korištena metoda prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva arome kozjeg sira iz mišine.

## **6.POPIS KRATICA I SIMBOLA**

NSLAB – nestarterske bakterije mliječne kulture (eng. Non-Starter Lactic Acid Bacteria)

HS-SPME – mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. headspace solid phase microextraction)

GC-MS – plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

NIST17 – Nacionalni Institut za standarde i tehnologiju (eng. National Institute of Standards and Technology)

Val – valin

Ile – izoleucin

Leu – leucin

Trp – triptofan

Tyr – tirozin

Phe – fenilalanin

Cys - cistein

Met - metionin

## 7. LITERATURA

1. *B. Matijević, I. Barukčić, R. Božanić; S. Kalit, K. Lisak Jakopović, V. Magdić, B. Perko, I. Rogelj i D. Stručić*, Sirarstvo u teoriji i praksi, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015.
2. *M. Tudor Kalit, S. Kalit i J. Havranek*, Mljekarstvo 60 (2010), 149-155
3. URL:<https://www.sirevi.hr//sve-o-siru/sir-ljubav-stara-4000-godina/>(pristupljeno 08.09.2023.)
4. URL:<https://povijest.hr/drustvo/kultura/samostani-srednjovjekovne-tvornice-sira/> (pristupljeno 08.09.2023.)
5. URL:<https://gospodarski.hr/rubrike/ostalo/sir-iz-misine-od-sirovine-do-sira/> (pristupljeno 08.09.2023.)
6. URL:<https://hrvatskakuhinja.info/sir-iz-mjesine/> (pristupljeno 08.09.2023.)
7. URL:<https://slobodnadalmacija.hr/spiza/preporuke/sir-iz-misine-kultna-je-delicija-neponovljenog-okusa-poznata-jos-od-ilirskih-vremenea-ali-gdje-ga-kupiti-doznali-smo-1264524> (pristupljeno 08.09.2023.)
8. *N. Antunac i D. Samaržija*, Mljekarstvo 50 (2000), 53-66
9. *K. Periša*, Razvijanje HACCP sustava u proizvodnji sira iz mišine, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2020.
10. *G. Yilmaz, A. Ayar i A. Akin*, J. Food Eng. 69 (2005), 269-274
11. *J. Adžić*, Tehnologija proizvodnje autohtonog sira Prlja, Enciklopedija, BiH, 2013.
12. URL:<https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr:787/preview> (pristupljeno 08.09.2023.)
13. *N. Mikulec*, Mljekarstvo 60 (2010), 219-227
14. *T. Lojbl*, Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži, Diplomski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
15. *Lj. Tratnik i R. Botanić*, Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 2012.
16. *I. Jerković*, Kemija aroma, Skripta za internu uporabu, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
17. *P. McSweeney i M. Sousa*, A review. Le Lait 80 (2000), 293-324



18. *M. Zenčić*, Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
19. *Y. Park*, *J. Dairy Sci.* 84 (2001), 84-92
20. *Y. Collins, P. McSweeney, M. Wilkinson*, *International Dairy Journal* 13 (2003), 841–866
21. *A. Hayaloglu i I. Karabulut*, *Int. J. Food Prop.* 16 (2013b). 1663-1675
22. *M. Vrdoljak, N. Mikulec, K. Markov, S. Kalit i J. Frece*, *J. Cent.Eur. Agric.* 19 (2018), 318-334

