

Hlapljivi spojevi aromatiziranih sireva

Vukičević, Mira

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:167:205657>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

HLAPLJIVI SPOJEVI AROMATIZIRANIH SIREVA

DIPLOMSKI RAD

MIRA VUKIČEVIĆ

Matični broj: 192

Split, srpanj 2024.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

HLAPLJIVI SPOJEVI AROMATIZIRANIH SIREVA

DIPLOMSKI RAD

MIRA VUKIČEVIĆ

Matični broj: 192

Split, srpanj 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS OF FLAVOURED CHEESES

DIPLOMA THESIS

MIRA VUKIČEVIĆ

Parent number: 192

Split, July 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij kemije, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: prof. dr. sc. Ani Radonić

HLAPLJIVI SPOJEVI AROMATIZIRANIH SIREVA

Mira Vukičević, 192

Sažetak:

U ovom diplomskom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva punomasnog tvrdog sira od kravljeg mlijeka i istih sireva kojima su dodani ekstrakti aromatičnog bilja (lavanda, smilje i vrisak) te aromatično bilje u suhoj tvari (lavanda). Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem vlakna sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) pri temperaturi od 60 °C. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj koloni, a dobiveni rezultati su raspravljani i uspoređeni. U većini uzoraka najzastupljenije su karboksilne kiseline, posebno masne kiseline heksanska, butanska, oktanska te octena kiselina. Izuzetak je sir bez dodataka gdje je najzastupljeniji spoj metilketon nonan-2-on. U ispitanim sirevima s dodatkom ekstrakta aromatičnog bilja te suhog biljnog materijala (lavanda) identificirani su i terpeni, dok u siru bez dodataka nije identificiran ni jedan terpen. Za sireve s dodatkom ekstrakta vrijedi: što je udio pojedinog ekstrakta aromatičnog bilja u siru veći, veći je i udio terpena.

Ključne riječi: sir, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 48 stranica, 16 slika, 12 tablica, 19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	predsjednik
2. doc. dr. sc. Marina Zekić	član
3. prof. dr. sc. Ani Radonić	mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate Study of Chemistry, orientation Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: Ani Radonić, PhD, Full Prof.

VOLATILE COMPOUNDS OF FLAVOURED CHEESES

Mira Vukičević, 192

Abstract:

In this diploma thesis, the composition and content of volatile compounds in full-fat hard cheese made from cow's milk were analysed, including those cheeses to which extracts of aromatic herbs (lavender, immortelle and savory) and aromatic herbs in dry matter (lavender) were added. Isolation of volatile compounds was performed by headspace solid phase microextraction using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber at a temperature of 60 °C. All samples were analysed using a gas chromatography-mass spectrometry system with a non-polar column, and the obtained results were discussed and compared. In almost all samples, carboxylic acids were the most prevalent, particularly hexanoic, butanoic, octanoic and acetic acid. The exception was cheese without additives, where the most abundant compound was the methyl ketone 2-nonanone. In the tested cheeses with the addition of aromatic herb extracts and dry plant material (lavender), terpenes were also identified, while no terpenes were identified in the cheese without additives. For cheeses with added extracts, the trend was observed: the higher the proportion of a particular aromatic herb extract in the cheese, the higher the proportion of terpenes.

Keywords: cheese, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 48 pages, 16 figures, 12 tables, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof | chair person |
| 2. Marina Zekić, PhD, Asst. Prof | member |
| 3. Ani Radonić, PhD, Full Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in 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.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvo prof. dr. sc. Ani Radonić u razdoblju od veljače do srpnja 2024. godine.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog rada je izolirati, analizirati i usporediti hlapljive spojeve sira s dodatkom aromatičnog bilja koristeći metodu izolacije - mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) na DVB/CAR/PDMS vlaknu (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan, „sivo“ vlakno) pri temperaturi od 60 °C te metodu analize plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MC).

Metoda HS-SPME odabrana je zbog svoje efikasnosti i preciznosti u izolaciji hlapljivih spojeva iz kompleksnih matrica poput sira. Ova tehnika omogućava izolaciju hlapljivih komponenti bez potrebe za opsežnom pripremom uzorka, čime se minimiziraju mogućnosti kontaminacije i gubitka analita.

Analiza plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS) omogućava identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih spojeva, pružajući sveobuhvatan uvid u kemijski sastav ispitivanih uzoraka. Kombinacijom ovih tehnika (HS-SPME/GC-MS) istražiti će se utjecaj različitih vrsta aromatičnog bilja na profil hlapljivih spojeva sira.

Očekuje se da rezultati ovog istraživanja pruže dublje razumijevanje interakcija između sira i dodataka aromatičnog bilja, što može imati značajne implikacije za prehrambenu industriju, posebice u segmentu proizvodnje sireva s dodanom aromom.

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva punomasnog tvrdog sira od kravljeg mlijeka i istih sireva kojima su dodani ekstrakti aromatičnog bilja (lavanda, smilje i vrisak) te aromatično bilje u suhoj tvari (lavanda). Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi korištenjem vlakna sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) pri temperaturi od 60 °C. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj koloni, a dobiveni rezultati su raspravljani i uspoređeni. U većini uzoraka najzastupljenije su karboksilne kiseline, posebno masne kiseline heksanska, butanska, oktanska te octena kiselina. Izuzetak je sir bez dodataka gdje je najzastupljeniji spoj metilketon nonan-2-on. U ispitanim sirevima s dodatkom ekstrakta aromatičnog bilja te suhog biljnog materijala (lavanda) identificirani su i terpeni, dok u siru bez dodataka nije identificiran ni jedan terpen. Za sireve s dodatkom ekstrakta vrijedi: što je udio pojedinog ekstrakta aromatičnog bilja u siru veći, veći je i udio terpena.

Ključne riječi: sir, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

ABSTRACT

In this diploma thesis, the composition and content of volatile compounds in full-fat hard cheese made from cow's milk were analysed, including those cheeses to which extracts of aromatic herbs (lavender, immortelle and savory) and aromatic herbs in dry matter (lavender) were added. Isolation of volatile compounds was performed by headspace solid phase microextraction using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber at a temperature of 60 °C. All samples were analysed using a gas chromatography-mass spectrometry system with a non-polar column, and the obtained results were discussed and compared. In almost all samples, carboxylic acids were the most prevalent, particularly hexanoic, butanoic, octanoic and acetic acid. The exception was cheese without additives, where the most abundant compound was the methyl ketone 2-nonanone. In the tested cheeses with the addition of aromatic herb extracts and dry plant material (lavender), terpenes were also identified, while no terpenes were identified in the cheese without additives. For cheeses with added extracts, the trend was observed: the higher the proportion of a particular aromatic herb extract in the cheese, the higher the proportion of terpenes.

Keywords: cheese, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Sir – definicija i osnovna podjela	3
1.2. Aroma i komponente arome sira.....	4
1.2.1. Kiseline	6
1.2.2. Ketoni.....	6
1.2.3. Alkoholi	7
1.2.4. Aldehidi	7
1.2.5. Esteri	8
1.2.6. Laktoni	8
1.2.7. Sumporni spojevi	8
1.2.8. Amini	9
1.2.9. Terpeni	9
1.3. Biokemija arome sira	10
1.3.1. Metabolizam rezidualne laktoze, laktata i citrata	10
1.3.2. Lipoliza i katabolizam slobodnih masnih kiselina.....	12
1.3.3. Proteoliza i katabolizam aminokiselina	13
1.4. Izolacija i analiza hlapljivih spojeva sira.....	15
1.5. Profil hlapljivih spojeva odabranih vrsta sireva	18
1.5.1. Kars Gruyere.....	18
1.5.2. Šarski sir (Sharri).....	19
1.5.3. Minas sir	20
1.5.4. Edam, emmental i gouda	20
1.5.5. Surk sir.....	21
1.5.6. Sir iz špilje Divle	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. Materijal – sir s dodatkom različitog aromatičnog bilja	23
2.2. Korištena aparatura	23
2.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	24
2.2.2. Vezani sustav GC-MS	25

3.	REZULTATI I RASPRAVA.....	28
3.1.	Hlapljivi spojevi sira.....	29
3.2.	Hlapljivi spojevi sira s dodatkom lavande.....	32
3.3.	Hlapljivi spojevi sira s dodatkom ekstrakta smilja.....	40
3.4.	Hlapljivi spojevi sira s dodatkom ekstrakta vriska.....	42
4.	ZAKLJUČAK.....	45
5.	LITERATURA.....	47

UVOD

Sir je svakodnevna namirnica s bogatom poviješću prepunom mitova, legendi i povijesnih dokaza. Kroz stoljeća, ratovi i susreti civilizacija doprinijeli su razvoju različitih metoda proizvodnje sira. Danas je poznato preko 2000 vrsta sira, iako je moguće klasificirati samo 18 osnovnih vrsta iz kojih proizlaze brojne varijacije. U današnje vrijeme sir je više od prehrambene namirnice - on je kulturni, tehnološki i zdravstveni fenomen. Mliječni proizvodi, uključujući sir, ključni su za pravilnu prehranu zbog toga što sadrže visokovrijedne proteine, vitamine i minerale. Sir je također važan za zdravlje zubi jer kalcij i fosfor iz sira pomažu u očuvanju zubne cakline.

Što se tiče njegovog tehnološkog značaja, proces proizvodnje sira smatrao se majstorstvom. U početku ljudi nisu razumjeli promjene koje se događaju tijekom izrade sira, ali su posjedovali iskustvena znanja koja su prenosili generacijama. Razumijevanje procesa proizvodnje sira započelo je u 19. stoljeću s razvojem kemije, biokemije i mikrobiologije. Danas je poznato da različiti enzimi, bakterije i plijesni sudjeluju u proizvodnji sira. Ova znanja koriste moderne biotehnologije, čineći sir jednim od začetnika ove znanstvene discipline.

Osim toga, važna je njegova kulturna i vjerska podloga. Sir je često spominjan u povijesnim tekstovima, uključujući Homerovu Odiseju i Bibliju. Bio je cijenjen od strane mnogih civilizacija i religija. Drevni Grci smatrali su sir hranom bogova, a u Rimskom Carstvu sir je bio važan dio vojne prehrane. U Starom zavjetu, sir se spominje kao vrijedna hrana i poklon.

Također, važno je spomenuti njegovu ulogu za ekonomiju jer sir je omogućio konzerviranje mlijeka i akumulaciju financijske vrijednosti. U prošlosti je služio kao sredstvo plaćanja, a njegova potražnja bila je velika, posebno u Rimu gdje je car Dioklecijan regulirao njegovu cijenu. Bio je ključan za trgovinu, a Švicarci su ga koristili za trgovinu s Rimljanima, mijenjajući ga za meso, vino i ulje. Sir je, dakle, više od obične namirnice - on je proizvod s bogatom poviješću, značajan u kulturnom, tehnološkom i ekonomskom kontekstu.¹

Aroma sira ključna je za njegovu kvalitetu i prepoznatljivost među potrošačima. U prehrambenoj industriji dodatak aromatičnog bilja u sir često se koristi za poboljšanje organoleptičkih svojstava proizvoda. Specifična aroma sira rezultat je kombinacije okusa i mirisa, pri čemu miris potječe isključivo od hlapljivih spojeva. Međutim, ne utječu svi hlapljivi spojevi jednako na intenzitet arome sira. Aroma zrelog sira nastaje kroz niz biokemijskih interakcija koje uključuju bakterije starter kulture, enzime iz mlijeka, enzime za koagulaciju mlijeka i pripadajuće lipaze, kao i sekundarnu mikrofloru mlijeka. Uz najčešće spominjane spojeve poput diacetila i acetaldehida, ukupnu aromu zrelog sira čine i ketoni, alkoholi, kiseline, fenoli, sulfhidrili i drugi spojevi sa sumporom, terpeni, esteri, amini, amidi te ostali dušikovi spojevi.²

Cilj ovog rada je izolirati, analizirati i usporediti hlapljive spojeve sira s dodatkom aromatičnog bilja koristeći metodu izolacije - mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) te metodu analize vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MC). Metoda HS-SPME omogućava efikasnu i preciznu izolaciju hlapljivih spojeva bez opsežne pripreme uzorka, dok GC-MS pruža detaljnu identifikaciju i kvantifikaciju tih spojeva. Očekuje se da će rezultati istraživanja pružiti uvid u utjecaj različitih vrsta aromatičnog bilja na profil hlapljivih spojeva sira, što će biti korisno za optimizaciju okusa i kvalitete proizvoda u prehrambenoj industriji.

1. OPĆI DIO

1.1. Sir – definicija i osnovna podjela

Sir je svježi proizvod ili proizvod različita stupnja zrelosti koji se proizvodi odvajanjem sirutke nakon zgrušavanja mlijeka bilo kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg ili njihovih mješavina.¹

U svijetu postoji mnogo vrsta sireva te se mogu razvrstati na razne načine, ali osnovna podjela je prema vrsti mlijeka, načinu koagulacije, konzistenciji, količini masti u suhoj tvari sira te prema zrenju.

Mlijeko može biti kravlje, ovčje, kozje i bivolje ili njihova mješavina.

Prema načinu koagulacije tj. grušanja mlijeka razlikuju se kiseli sirevi koji su proizvedeni fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline ili dodatkom kiseline u mlijeko, zatim slatki sirevi proizvedeni dodatkom sirila te mješoviti kod kojih se kombiniraju navedeni načini sirenja.

Nadalje, prema konzistenciji sirevi se dijele na jako tvrde, tvrde, polutvrde, polumeke te meke odnosno svježije sireve. Konzistencija u podjeli vrsta sireva znači udio vode odnosno suhe tvari u masi sira bez masti, pa prema tome jako tvrdi sirevi imaju manje od 50 % vode, tvrdi sirevi imaju između 49 % i 56 % vode, polutvrđi između 54 % i 63 % vode, a polumekima je udio vode između 61 % i 69 %. Meki, odnosno svježiji sirevi imaju više od 67 % vode u svojoj masi.

Količina masti u suhoj tvari sira dijeli sireve na vrlo masne (>60 %), punomasne (45-60 %), polumasne (25-45 %), malomasne (10-25 %) te posne sireve (<10 %).

Posljednje, sirevi se dijele prema zrenju. Razlikuju se sirevi bez zrenja, oni koji zriju uz pomoć bakterija te sirevi koji zriju uz pomoć plijesni. Ukoliko sirevi zriju uz pomoć bakterijskih kultura, iste mogu biti aktivne pretežno u unutrašnjosti sira ili na njegovoj površini. Kod sireva koji zriju uz pomoć plemenite plijesni, ta se plijesan može nalaziti na površini sira i pritom se za zrenje koriste bijele plijesni, u njegovoj unutrašnjosti gdje se

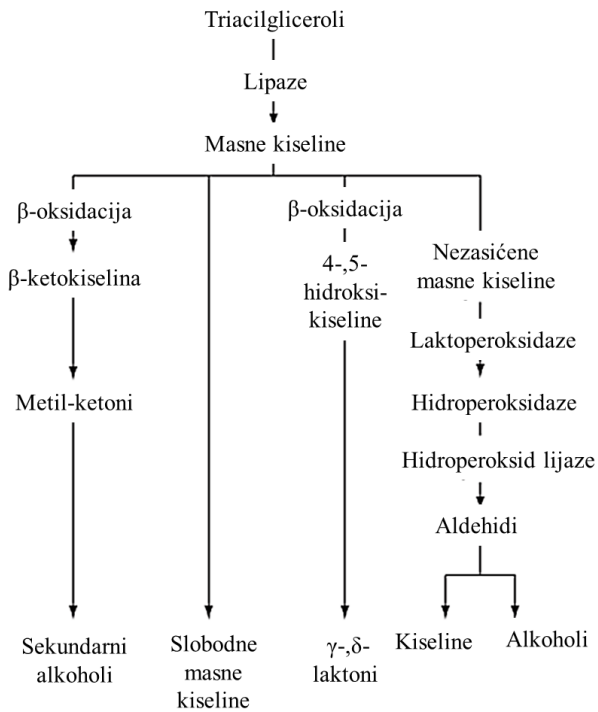
koriste plave ili zelene plijesni, a ponekad se istovremeno kombiniraju obje vrste plemenite plijesni.¹

1.2. Aroma i komponente arome sira

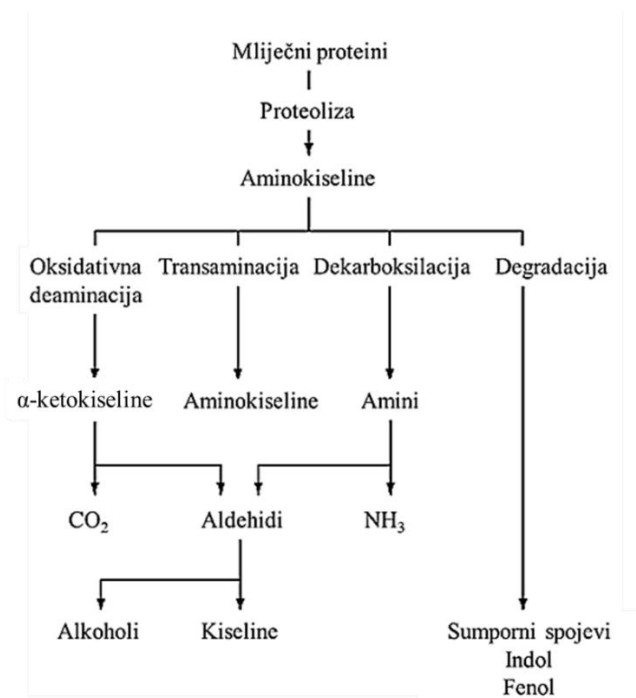
Prihvaćena definicija arome od strane British Standard Institute-a glasi da je aroma sinergija osjetila okusa i mirisa na čiji ukupan doživljaj utječu osjećaj boli, topline, hladnoće i dodira.³

Aromu hrane čine hlapljive komponente koje se detektiraju u nosu u olfaktornom epitelu bilo ortonazalnim ili retronazalnim putem te nehlapljive komponente koje se detektiraju jezikom te se one najčešće vezuju za okus hrane. Ortonazalni put predstavlja percepciju arome udisajem kroz nos dok retronazalni predstavlja percepciju arome tijekom izdisaja kada hlapljive komponente otpuštene tijekom žvakanja hrane kroz ždrijelo dolaze do olfaktornog epitela nosa.⁴

Aroma sira sadrži mnoštvo hlapljivih spojeva među kojima su najbrojnije masne kiseline, ketoni, aldehidi, laktoni, esteri, alkoholi, spojevi sumpora, amini te pirazini. Navedene komponente arome pretežno nastaju iz tri metabolička puta koja se odvijaju za vrijeme zrenja sira, a to su metabolizam lipida i katabolizam aminokiselina (slika 1), metabolizam laktoze, laktata i citrata te metabolizam proteina i katabolizam aminokiselina.³ (slika 2)



Slika 1. Metabolizam lipida i katabolizam slobodnih masnih kiselina³



Slika 2. Metabolizam proteina i katabolizam slobodnih aminokiselina³

Odsutnost ili prisutnost navedenih hlapljivih spojeva, njihova koncentracija te omjer najčešći su pokazatelji razlike u vrstama sireva.⁴

1.2.1. Kiseline

Masne su kiseline važan dio arome sira jer ne samo da imaju aromatična svojstva već su i prekursori ostalih aromatičnih spojeva kao što su metilketoni, alkoholi, laktoni i esteri (slika 1). Većina masnih kiselina u siru, s 4 do 20 ugljikovih atoma, nastaje lipolizom triglicerida. Masne kiseline kraćeg lanca (s manje od 6 ugljikovih atoma) podložne su oksidaciji pri čemu nastaju ketoni, esteri te aldehidi.

Octena kiselina glavna je organska kiselina u sirevima poput Cheddar-a, Gruyere-a, Rancala te Emmentala. Karakterizira ju oštra, kisela aroma.

Maslačnu kiselinu (butanska kiselina) karakterizira miris „pokvarenog“, međutim važna je za aromu mnogih sireva primjerice Pecorina te Ragusana.

Oktanska i nonanska kiselina zaslužne su za aromu „kozjeg“ te snažno doprinose okusu i mirisu tvrdog kozjeg sira.

Tvrđim sirevima, tj. njihovoj aromi pridružuju se i dekanska, dodekanska te heksanska kiselina.^{2,3}

1.2.2. Ketoni

Ketoni se formiraju u aromi sira uglavnom putem razgradnje triglicerida te oksidacije pritom oslobođenih zasićenih masnih kiselina. Metilketoni zaslužni su za prepoznatljivu aromu tradicionalnih sireva s plemenitom plijesni, a stvaraju ih plijesni *Penicillium roqueforti* i *Penicillium camemberti* iz masnih kiselina.

Homologni niz ketona (alkan-2-ona) neparnog broja C-atoma (C3 – C15) glasi za jedne od najvažnijih spojeva arome sireva koji zriju uz pomoć plijesni na njihovoj površini. Među njima najčešće se nalaze nonan-2-on te heptan-2-on.

Osim njih, važni su i nezasićeni ketoni poput non-3-en-2-ona i undec-10-en-2-ona. Koncentracija navedenih spojeva u aromi povećava se kako zrenje sira napreduje.²

1.2.3. Alkoholi

Alkoholi u aromi sira nastaju raznim metaboličkim putevima, primjerice iz masnih kiselina katabolizmom lipida te iz aminokiselina katabolizmom proteina. Primarni i sekundarni alkoholi su najvažnije komponente arome mekih sireva te onih koji zriju uz pomoć plemenite plijesni.

Od primarnih alkohola, 3-metilbutan-1-ol prisutan je u relativno visokim koncentracijama u siru, a od sekundarnih treba spomenuti heptan-2-ol te nonan-2-ol.⁵

1.2.4. Aldehidi

Ravnolančani aldehidi uglavnom nastaju katabolizmom masnih kiselina dok drugi aldehidi, uglavnom razgranati, potječu iz aminokiselina iz kojih nastaju reakcijom transaminacije.

Najvažniji aldehidi koji se pojavljuju u aromi sira su heksanal, heptanal, oktanal, nonanal, dekanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal te benzaldehid.

Heksanal nosi aromatičnu zelenu notu, tj. notu nezrelog voća dok oktanal, nonanal, dekanal te dodekanal podsjećaju na aromu naranče. Benzaldehid posjeduje aromu gorkih badema.⁵

1.2.5. Esteri

Esteri koji se nalaze u siru najčešće nastaju u jednom koraku, esterifikacijom etanola s parcijalnim gliceridima.

Pojavljaju se tijekom rane faze zrenja, a nastaju najčešće zrenjem uz pomoć kvasaca. Većina estera u siru imaju aromatične note voća, osim onih koji imaju fenilnu skupinu kao supstituent, kao što su 2-feniletil-acetat te 2-feniletil-butirat koji imaju cvjetne aromatične note.²

1.2.6. Laktoni

Prekursori laktona u siru su hidroksilirane slobodne masne kiseline koje su dio triglicerida mliječne masti i koje se otpuštaju enzimskom razgradnjom, lipolizom, ili zagrijavanjem.

Laktoni imaju važan utjecaj na okus sira, a njihove aromatične note su karakterizirane uglavnom kao voćne, dok su note nekih vrsta laktona opisane kao maslačne.

U siru su najčešće prisutni γ -dekalakton, δ -dekalakton, γ -dodekalakton te δ -dodekalakton.²

1.2.7. Sumporni spojevi

Sumporni spojevi u siru potječu iz degradacije aminokiseline metionina gdje se veza sumpor-ugljik kida pomoću enzima metionin-demetilaze.

Spojevi sumpora prisutni su u sirevima koji zriju uz pomoć plemenitih plijesni na površini te su važne komponente sveukupne arome sira. Neki od najvažnijih su dimetildisulfid, dimetiltrisulfid koji doprinose aromi sira uz karakteristične note češnjaka i gorčine, dok

primjerice metional ima snažan miris koji podsjeća na kuhane krumpire, a važan je za aromu sireva kao što se Cheddar, Emmental, kozjeg sira, Pecorino...⁵

1.2.8. Amini

Hlapljivi amini identificirani u siru su metilamin, etilamin, *N*-propilamin, izopropilamin, *N*-butilamin, *N*-amilamin, etanolamin, dibutilamin...

Njihova je aroma opisana kao voćna uz alkoholne note te note laka.

Nastaju dekarboksilacijom aminokiselina što za produkt osim slobodnih amina daje i ugljikov dioksid (CO₂).^{2,5}

1.2.9. Terpeni

Terpeni su velika te raznolika grupa organskih spojeva koji se nalaze u raznim vrstama biljaka. Osnovni strukturni element je izoprenska jedinica (C₅H₈), a ovisno o njihovom broju mogu se klasificirati u monoterpene (C₁₀), seskviterpene (C₁₅), diterpene (C₂₀), triterpene (C₃₀). Od navedenih, monoterpeni i seskviterpeni su hlapljivi spojevi te su osnovni sastojci eteričnih ulja.

Terpeni se u siru najčešće nalaze ukoliko je siru dodano aromatično bilje ili se putem biljaka koje čine pašnu smjesu prenesu u mlijeko pašnih životinja (krave, ovce, koze) i na kraju u sir.³

1.3. Biokemija arome sira

Zrenje sira je dinamičan proces koji uključuje razgradnju složenih molekula poput proteina, lipida i ugljikohidrata u one jednostavnije koje su odgovorne za njegovu aromu i teksturu. Osnovni agensi zrenja su mliječni enzimi primjerice plazmin te lipoprotein lipaza, mliječni koagulanti kao što je kimozin, starter mliječne kulture bakterija, sekundarne kulture te aditivi za dozrijevanje. Sam je proces veoma kompleksan te uključuje određene mikrobiološke i biokemijske promjene. Mikrobiološke promjene uključuju smrt i lizu bakterijskih starter stanica, nestarter bakterija mliječne kiseline (engl. *Nonstarter lactic acid bacteria*, NSLAB) te sekundarne mikroflora.⁶

Biokemijske promjene uključuju kompleksne reakcije u kojima se razgrađuju složene organske molekule na jednostavnije putem primarnog i sekundarnog metabolizma. Primarno se odvijaju glikoliza, lipoliza, proteoliza te metabolizam rezidualne laktoze, laktata i citrata koji utječu na osnovnu (engl. *Base*) aromu sira, konkretnije na sam okus sira.

S druge strane, sekundarni metabolizam odgovoran je za nastanak specifičnih komponenti aroma određenih vrsta sireva te nastanak hlapljivih spojeva putem niza reakcija kao što su dekarboksilacija, transaminacija, deaminacija i desulfurizacija aminokiselina te β -oksidacija i esterifikacija masnih kiselina.²

U narednim su poglavljima prethodno spomenute biokemijske reakcije primarnog i sekundarnog metabolizma detaljnije obrađene i opisane.

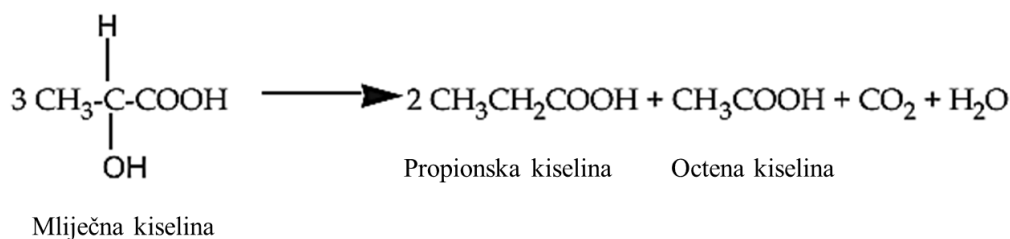
1.3.1. Metabolizam rezidualne laktoze, laktata i citrata

Primarna glikolitička reakcija, konverzija laktoze u laktat (anion mliječne kiseline) odvija se uz pomoć starter kultura pri početku proizvodnje sira ili u ranim fazama njegova zrenja. U slučajevima kada je glikoliza nepotpuna uz starter bakterijske kulture, potpunosti reakcije doprinose nestarter bakterije mliječne kiseline.⁶

Veliki se udio laktoze (96 %) izgubi u sirutci^a pri početku proizvodnje sira bilo u obliku laktoze ili laktata. Preostala količina laktoze koja zaostaje, tzv. rezidualna laktoza, značajno doprinosi kvaliteti sira. U ranim fazama zrenja, zaostala laktoza se prvenstveno metabolizira u L-laktat. Reakcija ovisi o temperaturi, omjeru soli i vlage u skuti^b te količini nestarter bakterija mliječne kiseline. Pri niskom omjeru soli naspram vlage i niskoj količini nestarter bakterija, rezidualna se laktoza uglavnom metabolizira u L-laktat, dok se pri višim koncentracijama nestarter kultura stvara D-laktat.⁷ D-laktat može nastati racemizacijom L-laktata pomoću spomenutih nestarter bakterija ili direktno fermentacijom rezidualne laktoze. Racemizacija laktata uključuje oksidaciju L-laktata u piruvat uz enzim L-laktat dehidrogenazu te redukciju piruvata u D-laktat pomoću D-laktat dehidrogenaze.⁶

Laktat se može i oksidirati do acetata koji značajno doprinosi okusu sira, međutim njegove su visoke koncentracije nepoželjne jer uzrokuju neugodnu aromu.⁷

U nekim švicarskim sirevima, *Propionibacterium spp.* metaboliziraju mliječnu kiselinu, tj. laktat, tijekom zrenja sira dajući propionat (propionsku kiselinu), acetat (octenu kiselinu), CO₂ i H₂O (slika 3).⁷



Slika 3. Reakcija metaboliziranja mliječne kiseline

Nastali CO₂ je odgovoran za stvaranje rupica u siru koje su karakteristika određenih švicarskih sireva.⁷

Kao što je već spomenuto mliječna kiselina nastaje iz laktoze pomoću starter bakterija, a njezina je važnost u procesu proizvodnje sira što stimulira aktivnost koagulanata, pomaže u

^a Sirutka (engl. *whey*) - tekućina koja preostaje nakon grušanja mlijeka pri proizvodnji sira. Sadrži ~6 % suhe tvari koju pretežito čini mliječni šećer laktoza (~70 %), a ostatak su bjelančevine bogate esencijalnim aminokiselinama, mineralne tvari, vitamini i mast.

^b Skuta je albuminski sir u našem narodu poznat još pod imenom urda, furda, hurda, bjelava, cvarog, provara. Ovaj zadnji naziv najbolje bi odgovarao jer se kod pravljenja skute sirutka zaostala poslije pravljenja sira zakuha ili provari.

izbacivanju sirutke iz mase sira smanjujući pritom njegovu vlažnost te prevenira rast nepoželjnih bakterija u siru.²

Citrat se u mlijeku primarno nalazi u obliku ioniziranih soli pri koncentracijama manjim ili jednakima 1,8 g/L, od kojeg se većina izgubi u sirutci pri proizvodnji sira.²

Većina starter kultura bakterija ne metabolizira citrat, ali specifični mezofilni laktobacili u nestarter mikroflori ga metaboliziraju pri čemu nastaju acetat, diacetil, acetoin te butandiol koji doprinose aromi sira.⁶

1.3.2. Lipoliza i katabolizam slobodnih masnih kiselina

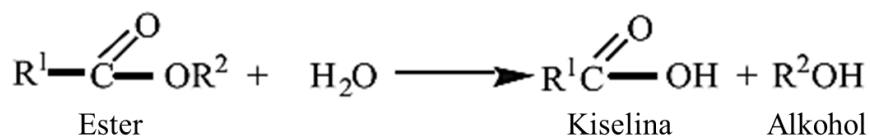
Lipidi imaju veliki značaj za aromu sira samim time što su izvor masnih kiselina, naročito masnih kiselina kratkog lanca koje pridonose snažnom i karakterističnom mirisu sira. Osim toga, masne su kiseline produkt razgradnje lipida, a njihovim katabolizmom nastaju i drugi spojevi arome kao što su metilketoni i laktoni. Nadalje, polinezasićene masne kiseline podložne su oksidaciji pri kojoj nastaju razni nezasićeni aldehidi snažnog neugodnog mirisa koji su pokazatelji oksidativne ranjetljivosti sira.⁷

Jedna od najvažnijih reakcija pri zrenju sira je lipoliza kojom se oslobađaju masne kiseline čijom daljnjom modifikacijom nastaju hlapljivi spojevi arome sira.

Lipoliza se odvija uz enzime lipaze, a njihov su izvor mlijeko, sirilo^c, starter bakterijske kulture, nestarter kulture te ekstracelularni enzimi. Lipaze kataliziraju razgradnju triglicerida oslobađajući pritom masne kiseline dugog i srednjeg lanca, parcijalne gliceride te glicerol.²

Općenito, lipaze hidroliziraju estere karboksilnih kiselina reakcijom (slika 4):⁷

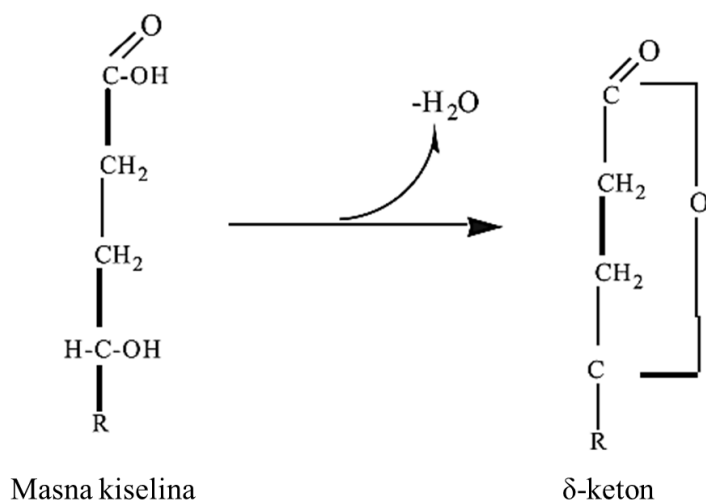
^c Sirilo – vrsta enzima koji uzrokuju grušanje kazeina u svježem mlijeku. Izlučuje ga želučana sluznica mladunčadi sisavaca.



Slika 4. Hidroliza estera

Iz lipolizom oslobođenih masnih kiselina nastaju razni hlapljivi spojevi arome sira pa tako njihovom β -oksidacijom nastaju metilketoni, spojevi dominantni u aromi sireva s plemenitom plijesni.⁶

Osim spomenutih, intramolekulskom esterifikacijom oksigeniranih masnih kiselina (hidroksikiselina) uz gubitak vode nastaju ciklički esteri – laktoni (slika 5).⁷



Slika 5. Intramolekulska esterifikacija hidroksikiselina uz nastanak laktona⁷

Konačno, sudbina oslobođenih masnih kiselina može biti i reakcija sa sulfhidrilnim skupinama tvoreći pritom tioestere koji siru doprinose aromatičnim notama češnjaka te jaja.²

1.3.3. Proteoliza i katabolizam aminokiselina

Među dosad spomenutim biokemijskim putevima koji se odvijaju za vrijeme zrenja sira, proteoliza je najkompleksnija i najvažnija. Osnovna uloga proteolize je razvoj teksture

i specifične arome sira. Osim poželjnog okusa i arome, proteoliza može biti uzrok nepoželjnog i gorkog okusa sira zbog formiranja kratkolančanih peptida i aminokiselina.⁷

Proteinaze su enzimi odgovorni za proteolizu, tj. degradaciju proteina čime nastaju peptidi i slobodne aminokiseline, a njihovi su izvori koagulanti (sirilo), mlijeko, starter mliječne bakterijske kulture, nestarter kulture, sekundarna mikroflora i dr.⁶ Uloga je proteinaza u sirarstvu specifična hidroliza κ -kazeina čime se ruši koloidna stabilnost njegovih micela pri čemu se odvija koagulacija. Od spomenutih enzima, kazein je najvažnija proteinaza tradicionalnih sirila koje se upotrebljavaju u proizvodnji sira, a potječe iz želuca mladunčadi sisavaca.⁷

Za vrijeme zrenja sira proteolizom nastaju peptidi i slobodne aminokiseline, što je i glavna uloga ove biokemijske reakcije, koji služe kao prekursori za kataboličke reakcije u kojima se stvaraju hlapljivi spojevi arome sira.²

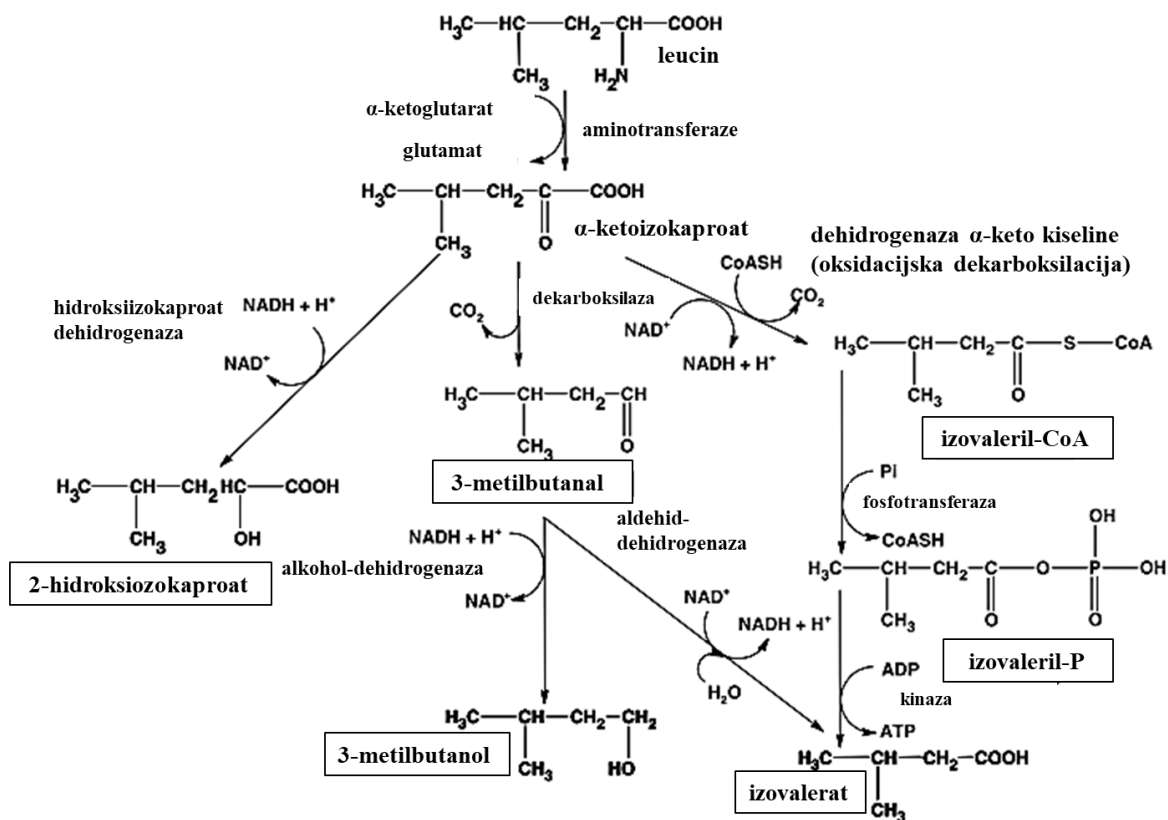
Kataboličke reakcije oslobođenih aminokiselina (slika 6) uključuju dekarboksilaciju, deaminaciju, transaminaciju, desulfurizaciju te hidrolizu bočnih lanaca aminokiselina koje vode k nastanku širokog niza spojeva poput karboksilnih kiselina, amina, amonijaka (NH_3), ugljikovog (IV) oksida (CO_2), aldehida, alkohola, tiola i drugih sumpornih spojeva, fenola te ugljikovodika.⁷

Većina aminokiselina prvo podliježe djelovanju aminotransferaza, enzima koji transferiraju amino-skupine na akceptorsku molekulu, što je u siru α -ketoglutarat. Time nastaju odgovarajuće α -ketokiseline koje su nestabilne te koje su izvor ostalih hlapljivih spojeva arome poput hidroksikiselina te aldehida.⁶

Dekarboksilacija aminokiselina s druge strane daje za produkt odgovarajući amin uz gubitak CO_2 . Glavni amin koji nastaje u siru je tiramin.⁷

Deaminacija aminokiselina rezultira stvaranjem amonijaka (NH_3) koji je važan spoj mnogih sireva, primjerice Camemberta, Gruyerea te Comtea, a transaminacijom nastaju druge aminokiseline pomoću enzima transaminaza.⁷

Hlapljivi sumporni spojevi uključujući H_2S , dimetil sulfid [$(\text{CH}_3)_2\text{S}$], dimetil disulfid ($\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$) te metantiole (CH_3SH) nastaju uglavnom iz metionina djelovanjem niza enzima kao što su cistationin- γ -liaze, cistationin- β -liaze te metionin- γ -liaze.⁶



Slika 6. Katabolizam aminokiseline leucina⁸

1.4. Izolacija i analiza hlapljivih spojeva sira

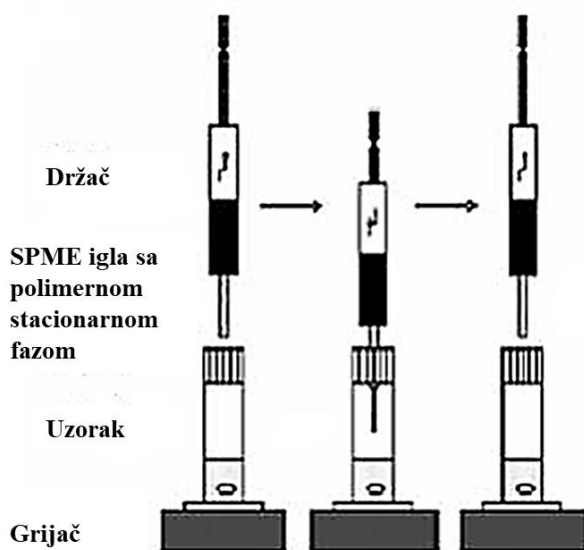
Za izolaciju hlapljivih spojeva najčešće se primjenjuju destilacijske i ekstrakcijske metode.

Destilacija je proces u kojem se određena tekućina zagrijava do točke isparavanja, a zatim se ispareni plin kondenzira u hladilu i prikuplja u posebnu posudu kao tekućina. Ova metoda se koristi za pročišćavanje tekućina, isparavanje organskih otapala, razdvajanje tekućih smjesa na temelju različitih vrelišta te za identifikaciju tekućina određivanjem njihovih vrelišta.

Ekstrakcija je metoda izolacije i pročišćavanja tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese koristeći drugo otapalo koje se ne miješa s početnim otapalom. Otapalo korišteno za ekstrakciju mora biti kemijski inertno prema tvarima u smjesi, ne smije imati previsoko

vrelište kako bi se lakše uklonilo nakon ekstrakcije, mora biti ekonomično, što manje zapaljivo i otrovno te mora imati visoku topljivost za ekstrahiranu tvar. Također, otapalo i otopina iz koje se ekstrahira moraju imati značajnu razliku u gustoći.⁹

Za izolaciju hlapljivih spojeva sira najčešće korištena tehnika je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME). Ova tehnika omogućava uzorkovanje, ekstrakciju i koncentraciju hlapljivih spojeva u jednom koraku, bez korištenja otapala. Tehnika koristi silikonsko vlakno (duljine 1-2 cm) obloženo polimernim filmom za ekstrakciju hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno je dio igle koja je smještena na SPME držaču. Vrsta vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije; nepolarna vlakna se koriste za ekstrakciju nepolarnih spojeva, a polarna vlakna za ekstrakciju polarnih spojeva.¹⁰ Slika 7 prikazuje uređaj za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME.



Slika 7. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi¹¹

Uzorak se stavlja u SPME vijalicu, hermetički zatvara septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja, hlapljivi spojevi se sakupljaju u prostoru iznad uzorka, tzv. headspace prostoru.

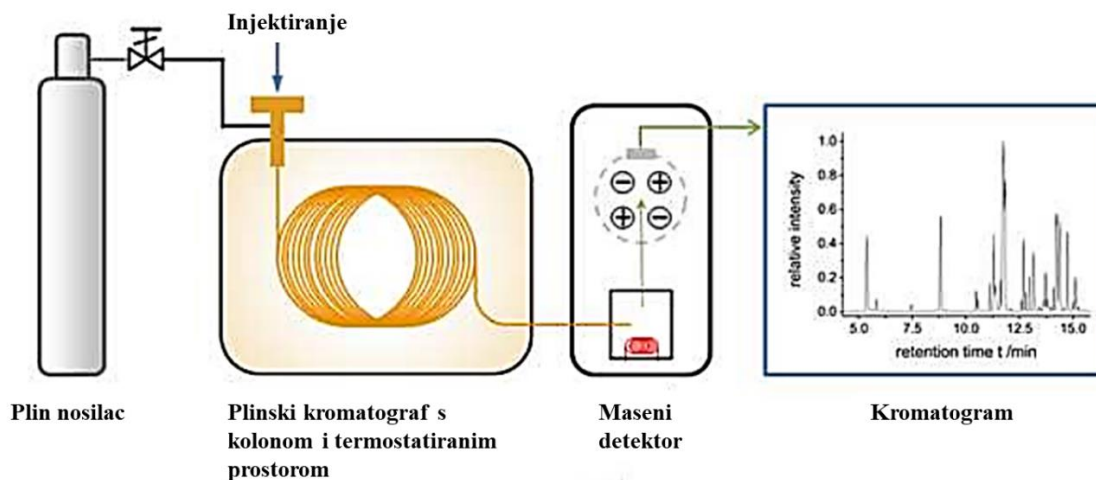
Nakon toga, vlakno se uvodi u prostor iznad uzorka (*headspace*) gdje se hlapljivi spojevi adsorbiraju na vlakno. Vlakno se zatim uvlači i hlapljivi spojevi se desorbiraju izravnim umetanjem vlakna u injektor uređaja za identifikaciju hlapljivih spojeva, najčešće plinskog kromatografa.

Prednosti ove metode su što ne koristi otapalo, jednostavna je i brza te pogodna za identifikaciju nepoželjnih mirisa kao i za brzu usporedbu uzoraka. Nedostaci uključuju ovisnost aromatičnog profila sakupljenih spojeva o debljini, vrsti i duljini vlakna te o temperaturi i vremenu uzorkovanja. Također, neka vlakna mogu diskriminirati polarne spojeve.¹⁰

Nadalje, za analizu smjesa hlapljivih spojeva najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa koji omogućava razdvajanje spojeva i njihovu identifikaciju. Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je visoko učinkovita instrumentalna tehnika koja se najčešće koristi za analizu smjesa hlapljivih spojeva. Ova tehnika omogućava razdvajanje spojeva i njihovu strukturnu analizu uz minimalnu količinu uzorka. Plinska kromatografija se koristi za odvajanje i kvantifikaciju sastojaka smjese, ali nije pouzdana za kvalitativno određivanje, stoga je spektrometrija masa koristi za nadopunu. Povezivanjem ovih dviju tehnika, njihova specifičnost i osjetljivost se značajno povećavaju, omogućujući preciznu kvantitativnu i kvalitativnu analizu.¹¹

Osnovne komponente uređaja za GC-MS su (slika 8):

1. Boca s plinom nositeljem
2. Injektor
3. Peć s kromatografskom kolonom
4. Maseni detektor
5. Računalo.



Slika 8. Vezani sustav plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS)¹¹

1.5. Profil hlapljivih spojeva odabranih vrsta sireva

Već spomenuti kriterij odsutnosti ili prisutnosti hlapljivih spojeva, njihove koncentracije te omjera najčešći je pokazatelj razlike u vrstama sireva. Hlapljivi spojevi sira obično se izoliraju tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) budući je brza i jednostavna za upotrebu te ne zahtijeva upotrebu otapala. Analiza izoliranih hlapljivih spojeva vrši se vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) gdje je plinska kromatografija korisna za kvantitativnu, a spektrometrija masa za kvalitativnu analizu.¹²

1.5.1. Kars Gruyere

Gruyere je tvrdi sir koji se proizvodi u Francuskoj, Austriji, Finskoj te Švicarskoj. Osim u spomenutim zemljama, Gruyere se često proizvodi i u provinciji Kars u Turskoj, u regiji Istočne Anatolije zbog čega je i dobio naziv Kars Gruyere. Proizvodi se od čistog kravljeg mlijeka uz dodatak sirila i termofilne starter kulture (bakterija propanske kiseline).

Okusom podsjeća na Emmental, a teksturom na švicarske sireve. Aromu ovog sira čini 40 identificiranih hlapljivih spojeva među kojima su aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline, esteri, terpeni, aromatski ugljikovodici, dušikovi i sumporovi spojevi te furani. Najvažniji spojevi koji ujedno i direktno utječu na konačnu aromu Kars Gruyerea su acetaldehid, nonanal, pentan-2-on, etanol, octena kiselina, propionska kiselina (propanska kiselina), maslačna kiselina (butanska kiselina), etil-propionat, etil-butirat, butil-acetat, toluen te 6-metiltio-(1)-benzotiazol.¹³

1.5.2. Šarski sir (Sharri)

Sharri, odnosno šarski sir autentični je proizvod tvrde konzistencije i izuzetno slanog okusa, a potječe s teritorija Šar-planine, tj. područja Makedonije. Izrađuje se ručno od sirovog ovčjeg ili kravljeg mlijeka ili njihove mješavine bez dodatka starter bakterijske kulture. Izolacijom i analizom spojeva arome šarskog sira zaključeno je da hlapljivi profil odgovara onom tipičnom za sireve u salamuri. Sveukupno su identificirana 82 hlapljiva spoja uključujući estere (20), kiseline (16), alkohole (15), terpene (7), aldehide (7) i ketone (5). Od 20 određenih estera, etilni i metilni esteri su najzastupljeniji, konkretno metil-butirat te metil-heksanoat. Među 16 identificiranih karboksilnih kiselina, octena, maslačna, heksanska te heptanska su najzastupljenije. Masne kiseline diktiraju okus sira, naročito one kratkog lanca koje su odgovorne za pikantan okus, a to su maslačna te heksanska (kapronska) kiselina. Od alkohola treba spomenuti 3-metilbutan-1-ol, a glavni aldehidi identificirani u šarskom siru su 3-metilbutanal, 2-metilbutanal i 2-metilpropanal. 3-Metilbutanal povezan je s neugodnom aromom ukoliko se nalazi u suvišku. Terpeni prisutni na početku zrenja ovog sira su β -mircen i limonen čija se koncentracija znatno smanjuje tijekom zrenja.

Prema navedenom u radu, ovakav profil hlapljivih spojeva sira rezultat je salamurenja, tj. dodatka velike količine soli koja usporava biokemijske reakcije i formiranje hlapljivih spojeva.¹⁴

1.5.3. Minas sir

Minas je ručno proizvedeni sir (engl. *Artisanal Minas cheese*, AMC) iz sirovog mlijeka od velike kulturne ekonomske i povijesne važnosti. Povezan je sa stogodišnjom tradicijom proizvodnje koja se prenosila generacijama, a koja je zaslužna za opstanak i preživljavanje ljudi nekoliko gradova regije Minas Gerais u Brazilu. Minas se proizvodi u 10 regija, a budući je produkt ručnog rada, svaki sir se međusobno razlikuje ovisno o tome gdje je proizveden, kakav je sastav mikrobioma mlijeka, vlažnost te koji je tip hrane za ispašu korišten za stado. Ono što je slično svim Minas sirevima jest hlapljivi profil arome koji uključuje aldehide (20), ketone (17), karboksilne kiseline (20), terpene (6), estere (57), ugljikovodike (15) i alkohole (31), a njihova koncentracija i omjer razlikuju se ovisno o području proizvodnje sira. Zanimljiva je razlika u sastavu terpena gdje su kamfen, kariofilen-oksidi i α -pinen identificirani isključivo u siru proizvedenom u Canastra i Serro regiji, a α -ksilen samo u Serro regiji. Kako terpeni u siru potječu od pašne hrane jer su produkti metabolizma biljaka, isti se koriste kao biljni markeri (engl. *plant markers*) za praćenje porijekla proizvoda sa zaštićenom oznakom izvornosti (engl. *protected designation of origin*, PDO). Ovo je važno jer se upravo vrsta hrane koju životinje konzumiraju i probavljaju može identificirati putem prisutnih terpena u proizvodima životinjskom podrijetla.¹⁵

1.5.4. Edam, emmental i gouda

Edam, emmental i gouda marke Milbona podvrgnuti su izolaciji i analizi sastava hlapljivih spojeva nakon zagrijavanja uzoraka. Ukupno je identificirano 50 hlapljivih spojeva među kojima su metilketoni, masne kiseline, aminokiseline, aromatski spojevi, dušikovi spojevi, pirol i terpeni. U sve tri vrste sira najzastupljenije su masne kiseline i njihovi derivati (metilketoni), a glavni identificirani spojevi su nonan-2-on, undekan-2-on te heptan-2-on. Od kiselina to su dekanska te heksanska kiselina. Druga najzastupljenija skupina spojeva u ovim sirevima su dušikovi spojevi, konkretno alkilpirazini. Glavni identificirani su trimetil-izopentilpirazin, 2-izopentil-3,5-dimetilpirazin i tetrametilpirazin koji nastaju kao produkti

toplinske razgradnje i nisu dio hlapljivih spojeva arome negrijanoga sira. Ono što je zanimljivo jest da je N-nitrozopiperidin identificiran u grijanom emmentalu, a nije pronađen u ostalim sirevima. Nitrozamini inače nastaju reakcijom nitrita s primarnim, sekundarnim ili tercijarnim aminima. Dekarboksilacijom aminokiseline lizina dolazi do stvaranja kadaverina, amina koji podliježe oksidativnoj deaminaciji uz ciklizaciju do piperidina i konačno termičkom obradom sira dolazi do nastanka N-nitrozopiperidina. N-nitrozopiperidin je otrovan i kancerogen kontaminant hrane te se zahtijeva njegovo praćenje u hrani, pa tako i u grijanom emmentalu, radi sigurnosti potrošača.¹⁶

1.5.5. Surk sir

U Turskoj, kiseli tip sira uglavnom se proizvodi zagrijavanjem zakiseljenog mlijeka ili razrijeđenog jogurta. Surk sir tradicionalno se radi vrenjem razrijeđenog jogurta (ajrana) u trajanju od 30 minuta kako bi mliječni proteini koagulirali. Zatim se dodaju začini i aromatično bilje (metvica, timijan, kumin, crni papar, cimet, đumbir). Surk se konzumira svjež bez prethodnog zrenja, nakon što se suši na zraku u tamnom prostoru u trajanju 3-4 dana. Začini i aromatično bilje koji se koriste za proizvodnju ovog sira imaju važnu ulogu za ljudsko zdravlje budući imaju antikancerogena, antioksidativna i protuupalna svojstva. Uzevši u obzir način izrade Surka, njegov aromatični profil rezultira u obilju kiselina i hlapljivih spojeva čija koncentracija i vrsta varira od sira do sira ovisno o vrsti bilja i začina korištenih za proizvodnju. Od organskih kiselina najzastupljenije su oksalna, orotska, limunska, mliječna, propionska i octena kiselina. Dvojaka je uloga organskih kiselina u siru, prvenstveno sprječavaju kvarenje i razvoj patogenih mikroorganizama te, osim toga, poboljšavaju njegove osjetilne karakteristike. Najbrojnija skupina hlapljivih spojeva u Surku su terpeni od kojih su najzastupljeniji karvakol, γ -terpinen i *p*-cimen. Terpene po zastupljenosti slijede slobodne masne kiseline od kojih je najviše butanske, pentanske, heksanske, oktanske i dekanske. Od estera, najbrojniji su etil-heksanoat, metil-oktanoat, etil-oktanoat, metil-dekanoat, etil-dekanoat i metil-benzoat. Važnu ulogu za karakterističan okus ovog sira imaju 3 identificirana alkohola, a to su 2-etilheksan-1-ol, 2-feniletanol i *p*-cimen-7-ol. 2-Feniletanol doprinosi cvjetnoj aromi, posebno aromatičnim notama ruže.¹⁷

1.5.6. Sir iz špilje Divle

Sir iz špilje Divle polutvrđi je sir koji se izrađuje od sirovog poluobranog ovčjeg mlijeka. Proizvodnja ovog sira odvija se u Karamanu, ruralnom području središnje Turske, a zrenje se odvija u Divle špilji na jugu te regije u trajanju od 4 mjeseca u vrećama od kozje kože. Sir je mrvičaste teksture i pikantnog okusa. Izolacijom i analizom hlapljivih spojeva identificirano je 110 spojeva arome među kojima su kiseline, alkoholi, ketoni, esteri, terpeni, aldehidi, ugljikovodici i drugi. Kiseline su najbrojnija skupina hlapljivih spojeva te znatno doprinose aromi ovog sira. Ukupno ih je identificirano 13, a one koje značajno doprinose aromi su heksanska, oktanska te dekanska kiselina. 3-Metilbutanska kiselina (izovalerijanska kiselina) je najzastupljenija kiselina razgranatog lanca u siru iz špilje Divle, a aromi doprinosi raketljivim, sirastim mirisom. Od alkohola, u najvišoj koncentraciji identificirani su sekundarni alkoholi i to butan-2-ol, heptan-2-ol, oktan-2-ol te pentan-2-ol. Među 12 identificiranih ketona, metilketoni su najbrojniji i to metil-etilketon (butan-2-on), metil-propilketon (pentan-2-on) i metil-butilketon (heksa-2-on) koji su karakteristični za ovčje sireve. Etilni esteri su najbrojniji od svih estera u ovom siru, a najvažniji su etil-butanoat i etil-heksanoat te butil-acetat. Od hlapljivih terpena, najvažniji identificirani u ovom siru su α -pinen, *p*-cimen, β -pinen i α -kopaen. Među svim navedenim spojevima, butanska, octena i valerijanska kiselina, butan-2-ol, spomenuti metilketoni, etil-butanoat, α -pinen i toluen najzastupljenije su komponente u hlapljivom profilu sira iz špilje Divle te doprinose konačnoj karakterističnoj aromi tog tradicionalnog sira.¹⁸

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal – sir s dodatkom različitog aromatičnog bilja

U ovom diplomskom radu korišten je punomasni tvrdi kravlji sir - *Dalmatinski sir* (sirana Puđa d.o.o., Trilj) te isti sir kao baza u koju je dodano različito aromatično bilje bilo kao suhi biljni materijal ili kao ekstrakt dobiven ekstrakcijom superkritičnim CO₂ (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE). Sirevi su proizvedeni u rujnu i listopadu 2023., a dodane biljke su lavanda (*Lavandula officinalis L.*), suhi biljni materijal i CO₂ ekstrakt te smilje (*Helichrysum italicum*), CO₂ ekstrakt, i vrisak (*Satureja montana L.*), CO₂ ekstrakt. Uzorci sira su sljedeći:

1. *Dalmatinski sir* bez dodataka – kontrola
2. *Dalmatinski sir* s dodatkom suhog biljnog materijala lavande (6 g suhog materijala na 100 L mlijeka) – napravljen 13. 9. 2023.
3. *Dalmatinski sir* s dodatkom ekstrakta lavande (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka) – napravljen 10. 10. 2023.
4. *Dalmatinski sir* s dodatkom ekstrakta lavande (0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka) – napravljen 17. 10. 2023.
5. *Dalmatinski sir* s dodatkom ekstrakta smilja (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka) – napravljen 10. 10. 2023.
6. *Dalmatinski sir* s dodatkom ekstrakta vrisaka (0,1 g ekstrakta na 100 L mlijeka) – napravljen 17. 10. 2023.

2.2. Korištena aparatura

Za eksperimentalni dio ovog diplomskog rada korištene su sljedeće aparature:

1. Tehnička vaga ADAM, model PGW 1502i, ADAM[®], Velika Britanija
2. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME) s vlaknom koji ima polimerni sloj sastava

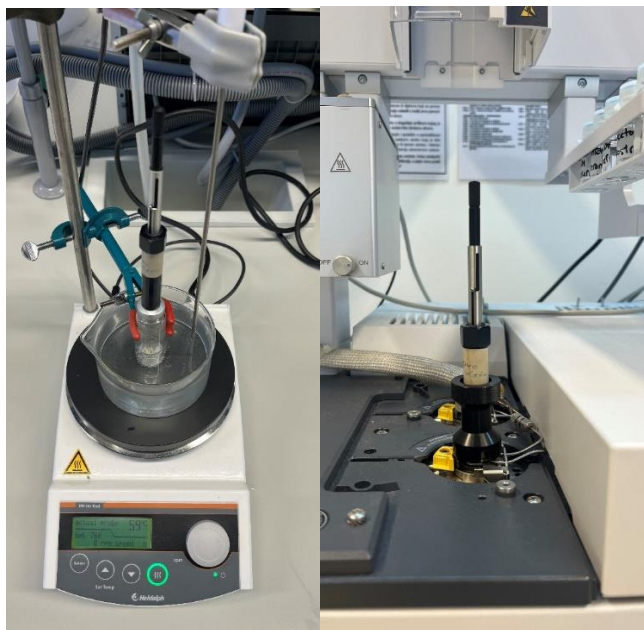
divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS, tzv. sivo vlakno), Supelco, SAD

3. Magnetska miješalica Heidolph model MR Hei-End s temperaturnim senzorom Pt 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG., Njemačka
4. Aparatura za vezani sustav plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS): plinski kromatograf model 7890A i spektrometar masa model 5975C, Agilent Technologies, SAD

Kako bi analizirali hlapljive spojeve sira, prethodno treba izvršiti njihovu izolaciju. U ovom radu izolacija je provedena tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna, dok je analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

2.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Hlapljivi spojevi sira izolirani su primjenom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi pri temperaturi od 60 °C (slika 8). Za tu svrhu korišteno je sivo vlakno, prethodno kondicionirano prema preporukama proizvođača. Kondicioniranje uključuje postavljanje SPME igle u injektor plinskog kromatografa pri temperaturi od 270 °C tijekom 60 minuta. Svi su uzorci pripremljeni na identičan način. U staklenu bočicu je dodano 2 grama sira te je zatvorena septom i smještena u vodenu kupelj zagrijanu na 60 °C. Magnetska miješalica je korištena kako bi se održala stabilna temperatura vodene kupelji. Tijekom 15 minuta termostiranja, hlapljivi spojevi (vršne pare) iz uzorka su isparili u prazni prostor iznad uzorka. Nakon toga, SPME držač s iglom sa sivim vlaknom je postavljen u prazni prostor iznad uzorka radi adsorpcije vršnih para, što je trajalo 40 minuta. Nakon adsorpcije, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvađeno iz staklene bočice i odmah umetnuto u injektor GC-MS uređaja. Toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva u GC kolonu trajala je 10 minuta.



Slika 9. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi. Na slici lijevo je prikazana adsorpcija hlapljivih spojeva na sivo vlakno, dok je na slici desno prikazan SPME držač s iglom umetnutom u injektor GC-MS-a.

2.2.2. Vezani sustav GC-MS

Izolirani spojevi su analizirani korištenjem spregnutog sustava plinska kromatografija i spektrometrija masa, GC-MS (slika 9). Analize uzoraka su provedene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), koja se sastoji od 5 % difenila i 95 % dimetilpolisiloksana, s dimenzijama 30 m x 0,25 mm unutarnjeg promjera i debljinom sloja stacionarne faze od 0,2 μm . Helij je korišten kao plin nositelj protoka 1 mL/min, temperatura injektora je bila 250 °C, omjer cijepanja je bio 1:5, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV. Temperaturni program za odvajanje spojeva vršnih para na HP-5MS koloni plinske kromatografije bio je sljedeći: 2 minute pri 70 °C, nakon čega je temperatura postupno povećavana do 200 °C brzinom od 3 °C/min te zadržana na toj temperaturi još 2 minute.



Slika 10. GC-MS uređaj

Za svaki analizirani uzorak pomoću GC-MS sustava dobivene su sljedeće informacije: kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC), vrijeme zadržavanja (t_R) svake pojedinačne komponente, relativni udio svake komponente izražen u postocima te naziv spoja čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente. Identifikacija pojedinačnih komponenti provedena je putem usporedbe masenih spektara s masenim spektrima dostupnima u dvije komercijalne baze podataka: Wiley 9 i NIST 17 kao i usporedbom njihovih vremena zadržavanja s onima u literaturi. S obzirom da se vremena zadržavanja komponenti mijenjaju s temperaturom, odnosno temperaturnim programom pri kojem se provodi analiza i protokom plina nositelja, za identifikaciju pojedinačnih komponenti prikladnije je koristiti retencijske indekse. Zato su iz vremena zadržavanja svake pojedinačne komponente izračunati linearni retencijski indeksi, RI. Retencijski indeks sastojka x je logaritam njegovog vremena zadržavanja (t_R) interpoliran na homologni niz n -alkana:

$$RI_{(x)} = 100 \frac{\log t_{R(x)} - \log t_{R(N)}}{\log t_{R(N+1)} - \log t_{R(N)}} + 100 \cdot N$$

gdje x označava nepoznati sastojak, a N i (N+1) n-alkane s N odnosno (N+1) C atomom.

Prethodno je provedena GC-MS analiza otopine homolognog niza C₈–C₂₂ n-alkana radi određivanja njihovog vremena zadržavanja. Izračunati retencijski indeksi svih komponenti uspoređeni su s retencijskim indeksima iz literature.¹⁹

3. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati analiza hlapljivih spojeva arome istraživanih sireva prikazani su u tablicama 1 – 5*. Analizirano je šest (6) uzoraka sira i to: punomasni, tvrdi kravlji sir bez dodataka (*Dalmatinski sir* proizvođača Puđa d.o.o.), sirevi u koje su dodani ekstrakti lavande (2 uzorka), smilja (1 uzorak) i vriska (1 uzorak) dobiveni ekstrakcijom superkritičnim CO₂ te sir u koji je dodan suhi biljni materijal lavande (1 uzorak). Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME. Analiza izoliranih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. HS-SPME/GC-MS analize svih uzoraka ponovljene su tri puta. U tablicama 1 – 5 je dan kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u pojedinim uzorcima testnih sireva. U tablicama označenim zvjezdicom prikazana je, za svaki uzorak sira, srednja vrijednost udjela identificiranih spojeva i standardna devijacija (tablice 1* - 5*). Udjeli identificiranih spojeva su relativni, odnosno to su udjeli površine pika identificiranog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Spojevi su poredani prema redosljedu eluiranja s nepolarne kromatografske kolone (HP-5MS).

Značenje simbola u tablicama je:

RI – retencijski indeks

SD – standardna devijacija

/ – standardnu devijaciju nije moguće izračunati

- – spoj nije identificiran u uzorku

^a – identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST17 biblioteka masenih spektara

tr – spoj se pojavljuje u tragovima.

3.1. Hlapljivi spojevi sira

Kemijski sastav i sadržaj, odnosno udio hlapljivih spojeva izoliranih HS-SPME metodom iz punomasnog tvrdog sira od kravljeg mlijeka prikazan je u tablicama 1 i 1*.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama punomasnog, tvrdog kravljeg sira bez dodataka (kontrola)

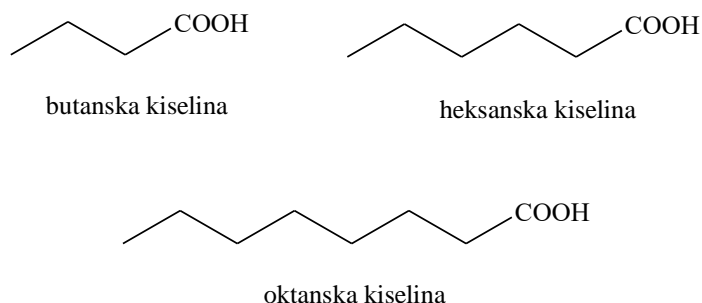
Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	7,75	11,97	10,51
2.	pentan-2-on	<800	1,44	3,81	2,20
3.	acetoin	<800	2,57	3,50	2,87
4.	butanska kiselina	<800	8,42	10,27	9,52
5.	okt-1-en ^a	<800	-	2,24	0,88
6.	heptan-2-on	892	9,05	13,94	10,67
7.	heksanska kiselina	995	17,78	11,50	16,93
8.	2,2,4,6,6-pentametilheptan ^a	997	2,87	3,33	2,91
9.	non-8-en-2-on ^a	1085	3,00	2,84	2,74
10.	nonan-2-on	1093	32,70	29,32	28,64
11.	nonan-2-ol	1101	tr	tr	0,69
12.	nonanal	1106	-	0,75	
13.	oktanska kiselina	1177	3,34	1,35	2,29
14.	undekan-2-on	1295	6,31	2,50	4,59
15.	dekanska kiselina	1371	tr	-	-

Tablica 1.* Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama punomasnog, tvrdog kravljeg sira bez dodataka (kontrola)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) \pm SD
1.	octena kiselina	<800	10,08 \pm 2,143113
2.	pentan-2-on	<800	2,48 \pm 1,210137
3.	acetoin	<800	2,98 \pm 0,474657
4.	butanska kiselina	<800	9,40 \pm 0,930501
5.	okt-1-en ^a	<800	1,56 \pm 0,961665
6.	heptan-2-on	892	11,22 \pm 2,490963
7.	heksanska kiselina	995	15,40 \pm 3,406998
8.	2,2,4,6,6-pentametilheptan ^a	997	3,04 \pm 0,254820
9.	non-8-en-2-on ^a	1085	2,86 \pm 0,131149
10.	nonan-2-on	1093	30,22 \pm 2,174488
11.	nonan-2-ol	1101	0,23 \pm 0,325269
12.	nonanal	1106	0,75 /
13.	oktanska kiselina	1177	2,33 \pm 0,812828
14.	undekan-2-on	1295	4,47 \pm 1,557869
15.	dekanska kiselina	1371	-

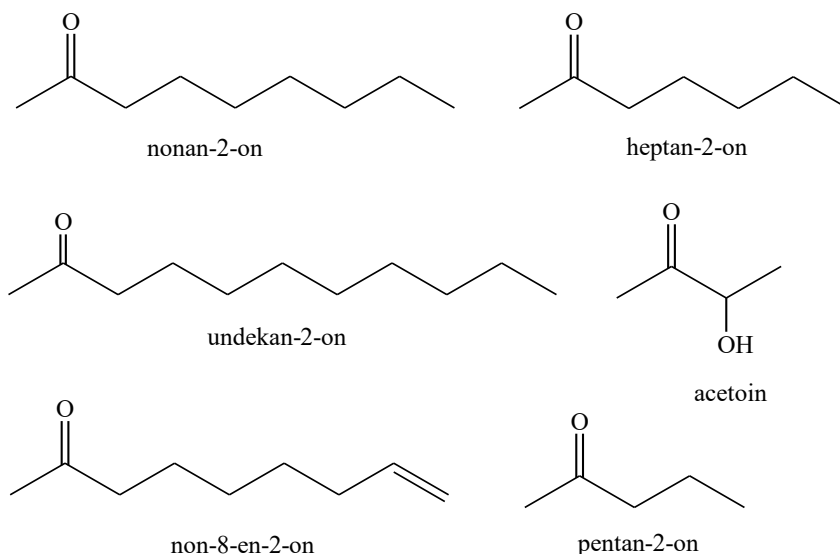
U vršnim parama punomasnog, tvrdog kravljeg sira bez dodataka identificirano je petnaest (15) spojeva. Glavni spoj vršnih para ovog sira je metilketon nonan-2-on (30,22%), a slijede karboksilne kiseline od kojih su najzastupljenije heksanska (15,40%), octena (10,08%), butanska (9,40%) i oktanska kiselina (2,33%). Butanska, heksanska i oktanska kiselina

spadaju u skupinu zasićenih masnih kiselina kratkog ugljikovodičnog lanca (C4 – C8). Ove kiseline se češće nazivaju trivijalnim imenima. Tako je trivijalno ime butanske kiseline maslačna kiselina, heksanska je kapronska kiselina, a oktanska kaprilna kiselina (slika 11).



Slika 11. Masne kiseline – hlapljivi spojevi arome sira

Osim navedenih masnih kiselina identificirana je i zasićena masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca (C10), dekanska ili kaprinska kiselina, međutim samo u tragovima. Navedena masna kiselina uobičajena je, važna, a često i dominantna u aromi mnogih sireva. Većina masnih kiselina nastaje lipolizom mliječne masti ili procesom fermentacije laktoze ili mliječne kiseline. Octena kiselina ne spada u skupinu masnih kiselina, ali je također uobičajeni hlapljivi spoj nositelj arome sireva. Slobodne masne kiseline kratkog i srednje dugog ugljikovodičnog lanca (C4 – C12) direktno pridonose aromi sireva, ali su i prekusori drugih hlapljivih spojeva arome kao što su alkoholi, karbonilni spojevi (metilketoni i aldehidi), laktoni i esteri. U ovom uzorku sira identificirano je šest (6) metilketona (slika 12): pentan-2-on, acetoin (3-hidroksibutan-2-on), heptan-2-on, non-8-en-2-on, nonan-2-on i undekan-2-on. Metilketon nonan-2-on ujedno je i glavni hlapljivi spoj arome istraživanog sira. Ostali kvantitativno važni spojevi u ovom uzorku su također spojevi iz skupine metilketona heptan-2-on (11,22%), undekan-2-on (4,47%), acetoin (2,98%), non-8-en-2-on (2,86%) te pentan-2-on (2,48%).



Slika 12. Metilketoni – hlapljivi spojevi arome sira

Među hlapljivim spojevima tvrdog punomasnog kravljeg sira bez dodatka aromatičnog bilja nije identificiran ni jedan terpen.

3.2. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom lavande

U tablicama 2A – 2B* dan je profil hlapljivih spojeva punomasnog sira od kravljeg mlijeka kojemu su dodani ekstrakti lavande dobiveni ekstrakcijom superkričnim CO₂, dok je u tablicama 3 i 3* dan profil hlapljivih spojeva punomasnog sira od kravljeg mlijeka kojemu je dodan suhi biljni materijal lavande.

Tablica 2A. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	7,55	8,21	8,46
2.	pentan-2-on	<800	0,98	0,76	1,14

3.	acetoin	<800	-	-	1,12
4.	butanska kiselina	<800	17,61	19,13	21,00
5.	heptan-2-on	892	3,38	1,48	3,59
6.	heksanska kiselina	995	36,11	37,62	36,45
7.	limonen	1033	0,70	0,47	tr
8.	1,8-cineol	1037	1,46	1,77	1,19
9.	<i>cis</i> - β -ocimen	1041	0,71	0,88	0,41
10.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,53	-	0,46
11.	nonan-2-on	1093	3,87	1,15	2,50
12.	linalol	1101	10,26	11,94	7,08
13.	kamfor	1149	0,47	0,57	0,44
14.	borneol	1170	1,48	1,92	1,58
15.	oktanska kiselina	1177	9,66	7,90	8,22
16.	terpinen-4-ol	1180	2,18	2,08	1,64
17.	linalil-acetat	1260	0,75	0,86	0,48
18.	dekanska kiselina	1371	1,08	0,40	0,66

Tablica 2A*. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) \pm SD
1.	octena kiselina	<800	8,07 \pm 0,470142
2.	pentan-2-on	<800	0,96 \pm 0,190788
3.	acetoin	<800	1,12 /
4.	butanska kiselina	<800	19,25 \pm 1,698009
5.	heptan-2-on	892	2,82 \pm 1,162340
6.	heksanska kiselina	995	36,73 \pm 0,792107

7.	limonen	1033	0,39 ± 0,291318
8.	1,8-cineol	1037	1,47 ± 0,290230
9.	<i>cis</i> -β-ocimen	1041	0,67 ± 0,237978
10.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,50 ± 0,049497
11.	nonan-2-on	1093	2,51 ± 1,360012
12.	linalol	1101	9,76 ± 2,468279
13.	kamfor	1149	0,49 ± 0,068069
14.	borneol	1170	1,66 ± 0,230651
15.	oktanska kiselina	1177	8,59 ± 0,937514
16.	terpinen-4-ol	1180	1,97 ± 0,287286
17.	linalil-acetat	1260	0,70 ± 0,195533
18.	dekanska kiselina	1371	0,71 ± 0,343123

Tablica 2B. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande (0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	5,48	8,21	10,86
2.	pentan-2-on	<800	0,96	1,48	1,80
3.	acetoin	<800	-	-	0,68
4.	butanska kiselina	<800	10,92	10,49	14,18
5.	etil-butanoat	<800	-	0,99	0,83
6.	heptan-2-on	892	5,21	4,47	3,56
7.	heksanska kiselina	995	20,60	21,74	21,81
8.	etil-heksanoat	1000	-	0,67	0,53
9.	limonen	1033	1,24	0,65	0,62
10.	1,8-cineol	1037	3,08	2,72	2,65

11.	<i>cis</i> -β-ocimen	1041	1,60	1,69	1,54
12.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,79	tr	tr
13.	nonan-2-on	1093	4,01	3,26	1,35
14.	linalol	1101	22,44	25,08	21,59
15.	nonanal	1106	1,76	-	tr
16.	kamfor	11149	0,91	0,96	0,86
17.	borneol	1170	3,32	3,79	3,31
18.	oktanska kiselina	1177	3,81	4,17	4,51
19.	terpinen-4-ol	1180	3,27	3,37	3,28
20.	dekanal	1205	0,87	-	-
21.	linalil-acetat	1260	1,48	2,03	1,78
22.	dekanska kiselina	1371	-	1,08	0,88

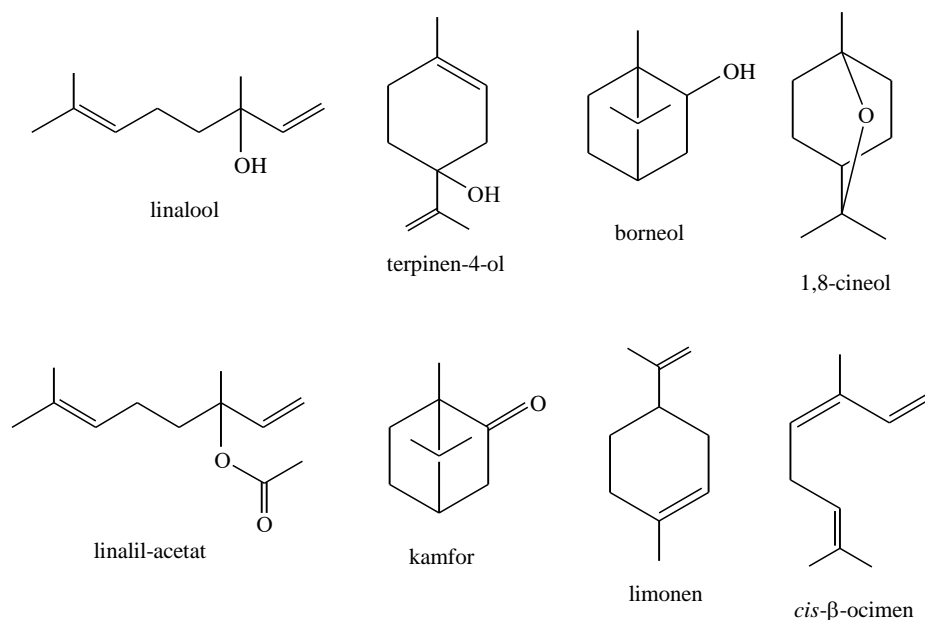
Tablica 2B*. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande (0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) ± SD
1.	octena kiselina	<800	8,18 ± 2,690099
2.	pentan-2-on	<800	1,41 ± 0,423950
3.	acetoin	<800	0,68 /
4.	butanska kiselina	<800	11,86 ± 2,017779
5.	etil-butanoat	<800	0,91 ± 0,113137
6.	heptan-2-on	892	4,41 ± 0,826458
7.	heksanska kiselina	995	21,38 ± 0,679289
8.	etil-heksanoat	1000	0,60 ± 0,098995
9.	limonen	1033	0,84 ± 0,349619
10.	1,8-cineol	1037	2,82 ± 0,230723

11.	<i>cis</i> - β -ocimen	1041	1,61 \pm 0,075498
12.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,26 \pm 0,372409
13.	nonan-2-on	1093	2,87 \pm 1,371508
14.	linalol	1101	23,04 \pm 1,819899
15.	nonanal	1106	0,88 \pm 0,88
16.	kamfor	11149	0,91 \pm 0,05
17.	borneol	1170	3,47 \pm 0,274287
18.	oktanska kiselina	1177	4,16 \pm 0,350048
19.	terpinen-4-ol	1180	3,31 \pm 0,055076
20.	dekanal	1205	0,87 /
21.	linalil-acetat	1260	1,76 \pm 0,275379
22.	dekanska kiselina	1371	0,98 \pm 0,141421

Što je masa dodanog ekstrakta lavande u siru veća, veći je i broj identificiranih hlapljivih spojeva (tablice 2A* i 2B*). Tako je u vršnim parama sira s ekstraktom lavande pripremljenog dodatkom 25 g ekstrakta na 100 L mlijeka (tablice 2A i 2A*) identificirano osamnaest (18) spojeva, a u siru s ekstraktom lavande pripremljenog dodatkom 0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka (tablice 2B i 2B*) dvadeset dva (22) spoja. U vršnim parama sira s dodatkom suhog biljnog materijala lavande identificirano je osamnaest (18) spojeva (tablice 3 i 3*).

Glavni spojevi u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande (pripremljenog dodatkom 0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka) su masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca heksanska (36,73%), butanska (19,25%), octena (8,07%) te oktanska (8,59%). Identificirana je i masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, dekanska kiselina s udjelom 0,71%. Od ostalih kvantitativno važnih spojeva identificirani su metilketoni nonan-2-on (2,51%) te heptan-2-on (2,82%). Što se tiče terpenskih spojeva, identificirano je 8 monoterpena (slika 13), a najzastupljeniji je alkohol linalol s udjelom 9,76%, slijede alkoholi terpinen-4-ol (1,97%) i borneol (1,66%), ciklički eter 1,8-cineol (1,47%), ester linalil-acetat (0,70%), ugljikovodici *cis*- β -ocimen (0,67%) i limonen (0,39%) te keton kamfor (0,49%).



Slika 13. Monoterpeni u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta lavande

S druge strane, u vršnim parama sira s dodatkom veće mase ekstrakta lavande (sir pripremljen dodatkom 0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka) identificirane su iste masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca, ali s manjim udjelima. To su redom heksanska (21,38%), butanska (11,86%), octena (8,18%) te oktanska kiselina (4,16%). Masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, koja je identificirana u ovom uzorku sira, je dekanska kiselina (0,98%). U ovom su siru identificirani i esteri masnih kiselina etil-butanoat (0,91%) te etil-heksanoat (0,60%) koji nisu identificirani u siru u koji je dodana manja količina ekstrakta lavande. Što se tiče terpena, u ovom siru identificirano je također osam (8) monoterpena (slika 14). Prisutni terpeni su linalol (23,04%), borneol (3,47%), terpinen-4-ol (3,31%), 1,8-cineol (2,82%), linalil-acetat (1,76%), *cis*-β-ocimen (1,61%), kamfor (0,91%) te limonen (0,84%). Svi terpeni pojavljuju se u većim udjelima, a glavni terpenski spoj, linalol u znatno većem udjelu što je i očekivano s obzirom da je dodana i veća količina ekstrakta lavande.

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom suhog biljnog materijala lavande (6 g suhog materijala na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	4,90	5,59	6,26
2.	pentan-2-on	<800	1,05	1,06	1,10
3.	acetoin	<800	0,57	0,64	0,62
4.	butanska kiselina	<800	17,97	18,73	17,28
5.	etil-butanoat	<800	0,55	0,52	0,45
6.	heptan-2-on	892	1,17	1,03	0,86
7.	heksanska kiselina	995	31,46	33,69	32,63
8.	1,8-cineol	1037	1,43	1,44	1,32
9.	<i>cis</i> - β -ocimen	1041	0,78	0,69	0,71
10.	nonan-2-on	1093	0,58	0,48	0,44
11.	linalol	1101	17,03	15,58	16,08
12.	kamfor	1149	0,60	0,60	0,62
13.	borneol	1170	2,50	2,45	2,33
14.	oktanska kiselina	1177	11,81	10,57	11,46
15.	terpinen-4-ol	1180	3,45	3,09	3,35
16.	etil-oktanoat	1199	0,52	0,52	0,58
17.	linalil-acetat	1260	1,66	1,40	1,52
18.	dekanska kiselina	1371	1,65	1,06	0,95

Tablica 3.* Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom suhog biljnog materijala lavande (6 g suhog materijala na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) \pm SD
1.	octena kiselina	<800	5,58 \pm 0,680025
2.	pentan-2-on	<800	1,07 \pm 0,026458
3.	acetoin	<800	0,61 \pm 0,036056
4.	butanska kiselina	<800	17,99 \pm 0,725282
5.	etil-butanoat	<800	0,51 \pm 0,051316
6.	heptan-2-on	892	1,02 \pm 0,155242
7.	heksanska kiselina	995	32,59 \pm 1,115452
8.	1,8-cineol	1037	1,40 \pm 0,066583
9.	<i>cis</i> - β -ocimen	1041	0,73 \pm 0,047258
10.	nonan-2-on	1093	0,50 \pm 0,072111
11.	linalol	1101	16,23 \pm 0,736546
12.	kamfor	1149	0,61 \pm 0,011547
13.	borneol	1170	2,43 \pm 0,087369
14.	oktanska kiselina	1177	11,28 \pm 0,639296
15.	terpinen-4-ol	1180	3,30 \pm 0,185831
16.	etil-oktanoat	1199	0,54 \pm 0,034641
17.	linalil-acetat	1260	1,53 \pm 0,130128
18.	dekanska kiselina	1371	1,22 \pm 0,376431

Glavni spojevi vršnih para tvrdog punomasnog kravljeg sira s dodatkom suhog biljnog materijala lavande (6 g suhog materijala na 100 L mlijeka) su masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca, a to su heksanska (36,73%), butanska (19,25%), octena (8,07%) te oktanska kiselina (8,59%). Identificirana je i masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, dekanska kiselina s udjelom 0,71%. Za razliku od sireva s dodatkom ekstrakta lavande,

u siru s dodatkom suhog biljnog materijala identificirano je sedam (7) terpenskih spojeva. Linalol je, kao i kod ostalih sireva, najzastupljeniji s udjelom 16,23% te slijede terpinen-4-ol (3,30%), borneol (2,43%), linalil-acetat (1,53%), 1,8-cineol (1,40%), *cis*- β -ocimen (0,73%) te kamfor (0,61%).

3.3. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom ekstrakta smilja

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih iz sira s dodatkom ekstrakta smilja (0,25 g na 100 L mlijeka) prikazan je u tablicama 4 i 4*.

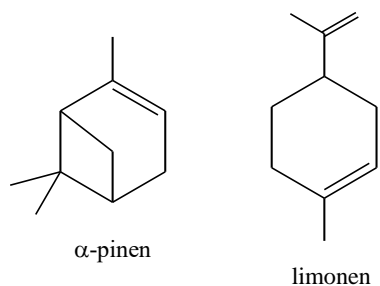
Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta smilja (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	12,29	13,55	12,41
2.	pentan-2-on	<800	1,91	2,21	2,53
3.	acetoin	<800	0,67	1,96	1,00
4.	butanska kiselina	<800	22,13	22,17	21,70
5.	etil-butanoat	<800	0,70	0,75	1,01
6.	heptan-2-on	892	3,46	2,25	3,21
7.	α -pinen	939	0,51	0,32	0,44
8.	heksanska kiselina	995	37,48	38,79	41,10
9.	etil-heksanoat	1000	0,66	0,52	0,70
10.	limonen	1033	0,33	-	-
11.	nonan-2-on	1093	0,46	0,45	0,56
12.	oktanska kiselina	1177	10,60	10,21	10,44
13.	nonanska kiselina ^a	1273	0,35	0,29	tr
14.	dekanska kiselina	1371	0,88	0,64	0,81

Tablica 4.* Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta smilja (0,25 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) \pm SD
1.	octena kiselina	<800	12,75 \pm 0,695414
2.	pentan-2-on	<800	2,22 \pm 0,310054
3.	acetoin	<800	1,21 \pm 0,670149
4.	butanska kiselina	<800	22,00 \pm 0,260576
5.	etil-butanoat	<800	0,82 \pm 0,166433
6.	heptan-2-on	892	2,97 \pm 0,638775
7.	α -pinen	939	0,42 \pm 0,096090
8.	heksanska kiselina	995	39,12 \pm 1,832876
9.	etil-heksanoat	1000	0,63 \pm 0,094516
10.	limonen	1033	0,33 /
11.	nonan-2-on	1093	0,49 \pm 0,060828
12.	oktanska kiselina	1177	10,42 \pm 0,196044
13.	nonanska kiselina ^a	1273	0,21 \pm 0,152825
14.	dekanska kiselina	1371	0,78 \pm 0,123423

U vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta smilja identificirano je ukupno četrnaest (14) spojeva, među kojima su najzastupljenije masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca, a to su heksanska (39,12%), butanska (22,0%), octena (12,75%) te oktanska kiselina (10,42%). Osim navedenih masnih kiselina identificirana je i zasićena masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, dekanska s udjelom 0,78%. Od ostalih spojeva, identificirana su četiri (4) metilketona, a to su heptan-2-on (2,97%), pentan-2-on (2,22%), acetoin (1,21%) te nonan-2-on (0,49%) te dva (2) estera masnih kiselina, a to su etil-butanoat (0,82%) i etil-heksanoat (0,63%). Što se tiče terpenskih spojeva, identificirana su samo dva (2) spoja i to monoterpenki ugljikovodici α -pinen (0,42%; slika 14) te limonen (0,33%).



Slika 14. Monoterpenški ugljikovodici u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta smilja

3.4. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom ekstrakta vriska

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih iz sira s dodatkom ekstrakta vriska (0,1 g na 100 L mlijeka) prikazan je u tablicama 5 i 5*.

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta vriska (0,1 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%)		
			1.	2.	3.
1.	octena kiselina	<800	7,85	4,93	5,53
2.	3-metilbutanal	<800	0,76	-	0,23
3.	pentan-2-on	<800	6,82	2,60	6,97
4.	acetoin	<800	1,35	0,38	1,38
5.	butanska kiselina	<800	17,59	16,45	19,09
6.	etil-butanoat	<800	2,90	3,10	3,46
7.	heptan-2-on	892	10,38	7,87	11,39
8.	benzaldehyd	967	0,67	0,41	0,75
9.	heksanska kiselina	995	26,67	30,44	27,55
10.	etil-heksanoat	1000	2,42	2,14	2,54
11.	<i>p</i> -cimen	1030	0,33	0,17	0,35

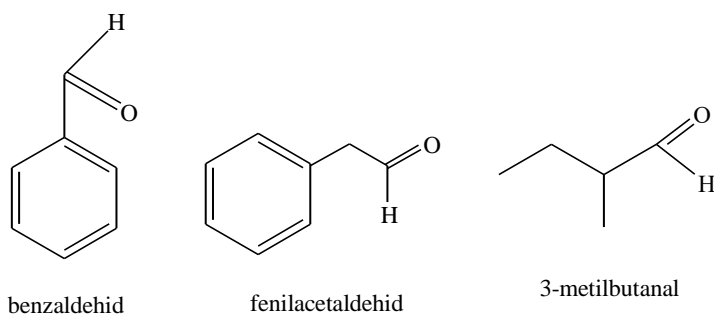
12.	fenilacetaldehid	1049	0,56	0,51	0,71
13.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,58	0,82	0,73
14.	nonan-2-on	1093	3,45	8,67	4,52
15.	oktanska kiselina	1177	6,24	10,96	6,67
16.	etil-oktanoat	1199	1,12	2,01	1,07
17.	dekanska kiselina	1371	0,44	0,77	0,52
18.	etil-dekanoat	1398	0,44	1,66	0,55

Tablica 5.* Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta vriska (0,1 g ekstrakta na 100 L mlijeka)

Redni broj	Spoj	RI	Udio (%) \pm SD
1.	octena kiselina	<800	6,10 \pm 1,542120
2.	3-metilbutanal	<800	0,50 \pm 0,374767
3.	pentan-2-on	<800	5,46 \pm 2,480853
4.	acetoin	<800	1,04 \pm 0,568888
5.	butanska kiselina	<800	17,71 \pm 1,324085
6.	etil-butanoat	<800	3,15 \pm 0,283784
7.	heptan-2-on	892	9,88 \pm 1,812484
8.	benzaldehid	967	0,61 \pm 0,177764
9.	heksanska kiselina	995	28,22 \pm 1,972283
10.	etil-heksanoat	1000	2,37 \pm 0,205264
11.	<i>p</i> -cimen	1030	0,28 \pm 0,098658
12.	fenilacetaldehid	1049	0,59 \pm 0,104083
13.	non-8-en-2-on ^a	1085	0,71 \pm 0,121244
14.	nonan-2-on	1093	5,55 \pm 2,757287
15.	oktanska kiselina	1177	7,96 \pm 2,609834

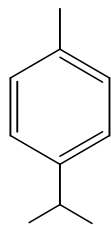
16.	etil-oktanoat	1199	$1,40 \pm 0,528867$
17.	dekanska kiselina	1371	$0,58 \pm 0,172143$
18.	etil-dekanoat	1398	$0,88 \pm 0,674858$

Glavni spojevi u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta vriska (pripravljenog dodatkom 0,1 g ekstrakta na 100 L mlijeka) su masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca heksanska (28,22%), butanska (17,71%), oktanska (7,96%) te octena kiselina (6,10%). Identificirana je i masna kiselina srednje dugog ugljikovodičnog lanca, dekanska kiselina s udjelom 0,58%. Od ostalih kvantitativno važnih spojeva identificirani su metilketoni heptan-2-on (9,88%), nonan-2-on (5,55%) te pentan-2-on (5,46%). Spojevi koji dosad nisu identificirani u ostalim sirevima su aldehidi fenilacetaldehid (0,59%) i 3-metilbutanal (0,50%) te aromatski aldehid benzaldehid (0,61%) (slika 15).



Slika 15. Aldehidi u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta vriska

Što se tiče terpenskih spojeva, identificiran je samo jedan i to monoterpenški ugljikovodik *p*-cimen s udjelom 0,28% (slika 16).



Slika 16. Monoterpenški ugljikovodik *p*-cimen u vršnim parama sira s ekstraktom vriska

4. ZAKLJUČAK

- Tehnika mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) u kombinaciji s plinskom kromatografijom i spektrometrijom masa (GC-MS) prikladna je za analizu hlapljivih spojeva. Ova metoda se koristi za određivanje kemijskog sastava i sadržaja hlapljivih tvari koje utječu na aromu sira.
- Glavni hlapljivi spojevi u gotovo svim ispitanim punomasnim sirevima od kravljeg mlijeka s dodatkom ekstrakta aromatičnog bilja su zasićene masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca (C4 – C8) heksanska, butanska i oktanska kiselina te octena kiselina. Navedene masne kiseline uobičajeni su, važni, a često i dominantni, sastojci spojeva arome mnogih sireva.
- Glavni hlapljivi spoj punomasnog kravljeg sira bez dodataka je metilketon nonan-2-on.
- Osim masnih kiselina, kvantitativno važni sastojci svih ispitanih sireva su metilketoni heptan-2-on, nonan-2-on te pentan-2-on.
- Očekivano, u sirevima s dodatkom aromatičnih biljaka identificirani su i spojevi iz skupine terpena. U tvrdom punomasnom kravljem siru bez dodataka nije identificiran ni jedan terpen.
- Najveći broj terpena identificiran je u vršnim parama sireva s dodatkom ekstrakta i suhog biljnog materijala lavande. Monoterpenski alkohol linalol je čak glavni hlapljivi spoj sira s dodatkom ekstrakta lavande (0,38 g ekstrakta na 100 L mlijeka).
- Što se tiče terpena, za sireve s dodatkom ekstrakta lavande vrijedi: što je udio ekstrakta lavande u siru veći, veći je i udio hlapljivih spojeva iz skupine terpena.
- U vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta smilja identificirana su dva terpena, monoterpenski ugljikovodici α -pinen i limonen, dok je u vršnim parama sira s dodatkom ekstrakta vriska identificiran samo jedan terpen, monoterpenski ugljikovodik *p*-cimen. Udjeli navedenih spojeva bili su <1,0%.

POPIS KRATICA

HS-SPME – mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *Headspace Solid-Phase Microextraction*)

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

PDO – porijeklo proizvoda sa zaštićenom oznakom izvornosti (engl. *protected designation of origin*)

SFE – ekstrakcija superkričnim CO₂ (engl. *Supercritical Fluid Extraction*)

TIC – kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Chromatogram*)

NIST – National Institute of Standards and Technology

RI – retencijski indeks

SD – standardna devijacija

5. 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. E. Guichard, C. Salles, M. Morzel, A. M. Le Bon, *Flavour: From Food to Perception.*, Wiley, Chichester, UK, 2016. , doi:10.1002/9781118929384
3. E. Senel, , A. Gürsoy, *Microbiology of processed liquid milk.*, Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments 95–112, 2014., doi:10.1201/b17297-8.
4. L. M. Bandić, F. Oštarić, M. Vinceković, & N. Mikulec., *Biochemistry of aroma compounds in cheese.* *Mljekarstvo* vol. 73 211–224, 2023., <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2023.0401>
5. F. A. M. Hassan, M. A. M. Abd El-Gawad, A. K. Enab, *Flavour compounds in cheese (review).* *Int J Acad Res* 4, 169–181, 2012., doi: 10.7813/2075-4124.2012/4-5/A.20
6. M. Pagthinathan, M.S.M. Nafees, *Biochemistry of cheese ripening*, *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, 10(0),16-26, 2015., <https://doi.org/10.4038/agriest.v10i0.25>.
7. P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. H. McSweeney, *Biochemistry of Cheese Ripening*, *Fundamentals of Cheese Science* 391–442, Springer US, 2017. doi:10.1007/978-1-4899-7681-9_12.
8. L. Marilley, M. G. Casey, *Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*, *International Journal of Food Microbiology* 90 139–159, 2004., [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0)
9. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2009.
10. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
11. M. Zenčić, *Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja*, Diplomski rad, Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
12. A. S. Bertuzzi, P. L. H. McSweeney, M. C. Rea & K. N. Kilcawley, *Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese*, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17, 371–390, 2018.
13. A. Çetinkaya & G. A. Kaban, *View on Volatile Compounds of Kars Gruyere Cheese, a Traditional Cheese in Turkey*, *American Journal of Food Science and Technology* 5, 6–10, 2017, doi:10.12691/ajfst-5-1-2

14. *E. Sulejmani*, Changes in volatile compounds, microstructure and texture of sharri cheese during maturation, *Journal of Nutrition, Food Research and Technology* 1, 6–12, 2018, doi: 10.30881/jnfrt.00003
15. *A. F. Dárgere, S. M. Pinto, D. S. Batista, L. F. Correia, J. O. Marçal, L. M. Z. Lima & P. B. Faria*, Characterization of the volatile compound profile of artisanal Minas cheese from different regions. *Food Science and Technology* 43, 2023. <https://doi.org/10.5327/fst.124222>
16. *S. El-Shamy, M. A. Farag*, Volatiles profiling in heated cheese as analyzed using headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography coupled to mass spectrometry., *eFood* 3, 2022., doi: 10.1002/efd2.2
17. *Z. Güler*, Profiles of organic acid and volatile compounds in acid-type cheeses containing herbs and spices (Surk cheese). *Int J Food Prop* 17, 1379–1392, 2014. doi: 10.1080/10942912.2012.697957
18. *S. Ozturkoglu-Budak, A. Gursoy, D. P. Aykas, C. Koçak, S. Dönmez, R. P. de Vries, P. A. Bron*, Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening, *J Dairy Sci* 99, 5120–5131, 2016., <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10828>
19. *V. I. Babushok, P. J. Linstrom, I. G. Zenkevich*, Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **40** (2011) 043101, <https://doi.org/10.1063/1.3653552>.