

# Hlapljivi spojevi sira iz mišine

---

**Martinović, Filipa**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:167:857287>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**FILIPA MARTINOVIĆ**

**Matični broj: 388**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**FILIPA MARTINOVIĆ**

**Matični broj: 388**

**Split, rujan 2021.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS OF CHEESE IN A SACK**

**BACHELOR THESIS**

**FILIPA MARTINOVIĆ**

**Parent number: 388**

**Split, September 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA LISTA

## ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Preddiplomski studije kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. elektroničkoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Marina Zekić

### HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE

Filipa Martinović, 388

#### Sažetak:

Sir iz mišine je tradicionalni hrvatski sir koji zrije u životinjskoj (jarećoj ili janjećoj) koži-mješini. U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni, a dobiveni rezultati su uspoređeni. U sva tri uzorka najzastupljeniji spoj je alkohol etanol, a od ostalih spojeva u uzorcima prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri.

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

**Rad sadrži:** 30 stranica, 13 slika, 3 tablice, 22 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

- |                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| 1. Izv.prof.dr.sc. Ani Radonić     | predsjednik |
| 2. Doc.dr.sc. Zvonimir Marijanović | član        |
| 3. Doc.dr.sc. Marina Zekić         | član-mentor |

**Datum obrane:** 23. rujna 2021.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

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

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Chemistry and Technology Split,  
electronical session no. 6

**Mentor:** Marina Zekić, PhD, assistant professor

### VOLATILE COMPOUNDS OF CHEESE IN A SACK

Filipa Martinović, 388

#### **Abstract:**

Cheese in a sack is a traditional Croatian cheese that ripens in animal (goat or lamb) skin. In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the cheese in a sack were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using gray fiber at three different temperatures (40, 50 and 60 °C). All samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column, and the results were compared. In all three samples, the most common compound is alcohol ethanol, and of the other compounds in the samples, carboxylic acids and their esters predominate.

**Key words:** cheese in a sack, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 30 pages, 13 figures, 3 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Associate prof. Ani Radonić, PhD          | chair person |
| 2. Assistant prof. Zvonimir Marijanović, PhD | member       |
| 3. Assistant prof. Marina Zekić, PhD         | supervisor   |

**Defence date:** September 23 , 2021.

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





*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju , Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Zekić, u razdoblju od srpnja do rujna 2021. godine.*

*Na početku svega želim zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Marini Zekić na pomoći prilikom izrade ovog završnog rada, te na svim pruženim savjetima i strpljenju. Također se zahvaljujem laborantici Editi Jelinčić na pomoći oko eksperimentalnog dijela rada. Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su bili ogromna podrška tijekom mog školovanja.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine pripremljenog od kravljeg mlijeka. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je metoda mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi na sivom vlaknu pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Na taj način su dobivena tri uzorka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

## SAŽETAK

Sir iz mišine je tradicionalni hrvatski sir koji zrije u životinjskoj (jarećoj ili janjećoj) koži-mješini. U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni, a dobiveni rezultati su uspoređeni. U sva tri uzorka najzastupljeniji spoj je alkohol etanol, a od ostalih spojeva u uzorcima prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri.

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

## **SUMMARY**

Cheese in a sack is a traditional Croatian cheese that ripens in animal (goat or lamb) skin. In this bachelor thesis, the composition and content of volatile compounds from the cheese in a sack were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using gray fiber at three different temperatures (40, 50 and 60 °C). All samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column, and the results were compared. In all three samples, the most common compound is alcohol ethanol, and of the other compounds in the samples, carboxylic acids and their esters predominate.

**Key words:** cheese in a sack, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

## Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Sir kroz povijest .....	2
1.1.1.  Sirarstvo starog vijeka.....	3
1.1.2.  Sirarstvo srednjeg vijeka.....	4
1.1.3.  Sirarstvo u razdoblju renesanse i industrijske revolucije.....	4
1.1.4.  Suvremeno (moderno) doba sirarstva .....	5
1.2. Civilizacijski značaj sira .....	6
1.2.1.  Sir kao prehrambeni i znanstveni fenomen.....	6
1.2.2.  Sir kao tehnološki fenomen .....	6
1.2.3.  Sir kao kulturni i vjerski fenomen .....	6
1.2.4.  Sir kao ekonomski fenomen.....	7
1.3. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži.....	7
1.4. Sir iz mišine .....	8
1.5. Proizvodnja sira iz mišine.....	9
1.6. Aroma sira.....	10
1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	12
1.7.1.  Destilacija .....	12
1.7.2.  Ekstrakcija.....	13
1.7.3.  Sorpcijske tehnike .....	13
1.8. Identifikacija izoliranih hlapljivih spojeva .....	14
1.8.1.  Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa .....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
2.1. Sir iz mišine .....	16
2.2. Kemikalije i aparatura.....	16
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva .....	17

2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.....	17
2.3.2. GC-MS analiza hlapljivih spojeva .....	18
3. REZULTATI.....	20
4. RASPRAVA .....	25
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. LITERATURA .....	29

## UVOD

Sir iz mišine je tradicionalni hrvatski sir koji se proizvodi na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima na području Dalmacije, i Like (Velebita). Točan podatak o nastanku ovog sira nije poznat, ali se pretpostavlja da je nastao još za vrijeme Ilira i Tračana.

Proizvodnja sira iz mišine je počela slučajno, spontanom fermentacijom mlijeka u mješini koja je inače služila za spremanje i transport sira. U prošlosti se proizvodio samo od punomasnog ovčjeg mlijeka, a danas se proizvodi od obranog ili punomasnog ovčjeg, kravljeg, kozjeg mlijeka i njihovih mješavina. S obzirom na tehnologiju proizvodnje spada u skupinu polutvrđih sireva, ali s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira pripada skupini tvrdih sireva.<sup>1,2</sup>

Aroma sira jedan je od ključnih parametara kvalitete i raspoznavanja pojedine vrste sira. Tijekom zrenja, u siru se odvijaju biokemijske i mikrobiološke promjene koje imaju značajan utjecaj na formiranje organoleptičkih karakteristika gotovog proizvoda. Biokemijske promjene tijekom zrenja dijele se u dvije skupine: primarne (odgovorne za promjene teksture) te sekundarne (formiraju konačni miris i okus sira).<sup>3</sup>

Cilj ovog rada bio je analizirati hlapljive spojeve sira iz mišine koji su zaslužni za njegov okus i aromu. Izolacija je provedena pomoću mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME). Kemijski sastav prikupljenih vršnih para određen je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS).



# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Sir kroz povijest

Sir je hrana koju promatramo kao nešto uobičajeno u svakodnevnom životu, često ne razmišljajući o tome da je većina sireva koje danas konzumiramo i proizvodimo nastala u starom ili srednjem vijeku te ima bogatu povijest. Vještina proizvodnje sira razvijala se stoljećima unazad u cilju što kvalitetnije prehrane ljudi, ali i konzerviranja i čuvanja mlijeka kroz što duže razdoblje. Proizvodnja sira se tradicionalno prenosila kroz generacije, a mnogi ratovi, osvajanja i susreti civilizacija su doprinijeli za njeno širenje i razvoj. Sir ima dugu povijest ispunjenu svakojakim legendama, mitovima i povijesnim dokazima.

Nastanak sira povezuje se sa pripitomljavanjem životinja, a smatra se da se to odvijalo između 10000. i 8000. god. pr. Krista. Ljudi su počeli pripitomljivati životinje koje su im bile dostupne s obzirom na njihovo stanište. U početku su s čovjekom najvjerojatnije živjeli vukovi te koze i ovce, zbog čega su prvi sirevi i nastali iz kozjeg i ovčjeg mlijeka. Tek kasnije su se pojavile životinje poput krava, konja i deva. Na početku su se ove životinje koristile za dobivanje mesa i hrane, a tek se kasnije spoznalo da se može koristiti i tekućina koju ove životinje izlučuju. Ne zna se kako je točno nastao sir i tko je zaslužan za to pa se pretpostavlja da je sir nastao slučajno. U to vrijeme ljudi su živjeli nomadskim životom i mlijeko su čuvali i transportirali u životinjskim mješinama, slično kao i vodu. Visoke vanjske temperature su pomogle bržem rastu i razvoju bakterija mliječne kiseline koje kisele mlijeko i tako ga pretvaraju u gel. Gel je prilično stabilan, ali nakon što se protrese ili mehanički razbije razdvaja se u dvije faze: čvrstu fazu koja se naziva gruša, a sastoji se od masti i proteina, te tekuću fazu koja se naziva sirutka, a sastoji se od vode i u vodi topljivih sastojaka. Ljudi su otkrili da sirutku mogu konzumirati odmah kao napitak, a grušu su sušili na zraku i dodavali mu sol. Druga kategorija sireva je nastala čuvanjem mlijeka u mješinama mlađih životinja čija stijenka sadrži proteolitičke enzime (renin ili sirilo) koji zgrušavaju mlijeko i stvaraju gel koji se dalje sličnim postupkom odvaja na grušu i sirutku. Prednost ove metode je što se gruša dobivena enzimima mogao duže čuvati od onoga dobivenog djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Treća kategorija sireva je također nastala slučajno i to upotrebom topline. Ljudi su počeli upotrebljavati vatru za zagrijavanje hrane tj. mlijeka te je pri zagrijavanju dolazilo do grušanja i stvaranja čvrste i tekuće faze.<sup>4,5</sup>

### 1.1.1. Sirarstvo starog vijeka

Stari vijek značajno je razdoblje za razvoj umijeća proizvodnje i širenje sira kao hrane. Sumerani se smatraju prvom visokorazvijenom civilizacijom čije se gospodarstvo temeljilo na poljoprivredi i stočarstvu. U pronađenoj literaturi vidi se da su Sumerani upotrebljavali riječ ga-bar za sir. Poznavali su oko 20 varijeteta sira koje su s obzirom na vrstu dijelili na: bijeli, svježi i bogati sir. Nakon Sumerana pojavili su se Babilonci koji su također proizvodili sir i koristili ga u prehrani o čemu svjedoče pronađeni recepti iz toga doba.

Egipat je bio poljoprivredna zemlja pa se većina Egipćana bavila ratarstvom i stočarstvom. U grobnicama vladara pronađene su slike na zidovima koje prikazuju proizvodnju sira. Također, pronađene su keramičke posude za koje je utvrđeno da su služile za čuvanje sira.

Postojanje i proizvodnja sira utvrđeno je i na području Europe oko 6000. god. pr. Kr. o čemu svjedoči pronalazak specifičnih keramičkih posuda na području Sjeverne Europe koje su vjerovatno služile za odvajanje sirutke od gruš.

Vrlo malo se zna o proizvodnji sira na Bliskom istoku u doba starog vijeka zbog siromašne literature, ali se pretpostavlja da je to dio svijeta u kojem je sir prvi nastao (slika 1).



Slika 1. Sušenje sira na krovu šatora beduina, Arabija početkom 20. st.<sup>6</sup>

Grčka civilizacija je imala dobro razvijenu poljoprivredu i stočarstvo, ali zbog nepovoljnih klimatskih uvjeta i specifičnosti terena Grci su uzgajali samo ovce i koze. Iskapanjem na grčkom otoku Therasia, nastradalom u erupciji vulkana (oko 1627. god. pr. Kr.) pronađeni su

zagoreni ostaci. Arhelozzi koji su provodili iskapanja u 19. st. smatrali su da se radilo o siru. Svoja opažanja o siru zabilježio je i Aristotel (400. god. pr. Kr.). Iz njegovog pisanja može se pretpostaviti da je *trophalides* mali svježi sir koji je tipičan za njegovo doba i da se prodaje za jedan srebrni novčić.

Civilizacija koja je najviše pridonijela širenju i razvoju sirarstva je Rim. Sir je bio jako važan u prehrani Rimljana što saznajemo po mnoštvu sačuvanih recepata. Kolumela, rimski pisac koji je najpoznatiji po opisivanju agrikulturne, ostavio je detaljan opis proizvodnje sira. Po njemu se sir treba raditi od što svježijeg punomasnog mlijeka jer ako je mlijeko ustajalo ili pomiješano s vodom brzo poprimi kiseli okus. Zgrušava se pomoću sirila od teleta ili jareta. Lonac ne smije biti u kontaktu s vatrom nego treba stajati pored vatre. Kada se tekućina krene gruštati, potrebno ju je prebaciti u pletena cjedila ili kalup. Nakon što se sir ocijedi potrebno ga je ostaviti na hladno i mračno mjesto da se spriječi kvarenje, zatim se sir posoli da bi se izdvojila sirutka. Ovaj postupak se ponavlja devet dana, sir se ispiru svježom vodom i slaže u redove tako da se međusobno ne dodiruju, dok se do kraja ne osuše.<sup>5</sup>

### *1.1.2. Sirarstvo srednjeg vijeka*

Srednji vijek je razdoblje koje traje od 476. godine do 1492. godine. Karakterizira ga nastanak novih država pa samim time dolazi do promjene gospodarske, političke i društvene slike Europe. Proizvodnja sira se nastavila razvijati i upravo u srednjem vijeku je nastala većina sireva koje danas poznajemo. Sir se većinom pravio od kozjeg i ovčjeg mlijeka i bio je nalik današnjem Feta siru. U ovom razdoblju značajnu ulogu ima Katolička crkva koja osniva samostalne zajednice, samostane, koji postaju novi kulturni i gospodarski centri. U samostanima se proizvodio i sir, ali postupak proizvodnje bio je tajna. Svaki redovnik sirar je znao samo svoj opis posla dok je samo vođa samostana znao cijeli postupak. Samostani i pojedinačna feudalna imanja sir su proizvodili isključivo za svoju upotrebu, ljubomorno čuvajući recepturu. To je vjerovatno jedan od glavnih razloga za nastanak velikog broja vrsta i varijeteta sireva tog doba.<sup>5</sup>

### *1.1.3. Sirarstvo u razdoblju renesanse i industrijske revolucije*

U razdoblju renesanse nije došlo do neke značajne promjene u proizvodnji sira, postupak je ostao isti kao u srednjem vijeku. Opada i konzumiranje sira jer ga plemstvo smatra nezdravim te sir postaje hrana nižih slojeva. Otkrićem Amerike sir se pojavljuje i na tom kontinentu. U drugoj polovici 19. stoljeća, nakon prve industrijske revolucije dolazi do industrijskog razvoja sira. Prva sirana otvorena je u New Yorku, a nedugo nakon toga u Londonu.<sup>5</sup>

#### 1.1.4. Suvremeno (moderno) doba sirarstva

Suvremeno doba sirarstva počinje završetkom prve industrijske revolucije. Kao vodeći svjetski proizvođači spominju se Amerika, Australija i Oceanija. Postupak proizvodnje sira uglavnom je sličan onome iz starog i srednjeg vijeka. Napredak znanosti donosi nova saznanja o kemijskim, biokemijskim i mikrobiološkim procesima koji se odvijaju tijekom proizvodnje sira. Tehničke inovacije ubrzavaju rad i omogućuju masovnu proizvodnju sira. Sve više se radi i na kontroli kvalitete mlijeka i sira. Tako su krajem 19.stoljeća razvijene metode za određivanje masti i proteina u hrani koje se koriste i danas. Louis Pasteur značajno je pridonio razvoju sirarstva otkrićem bakterija mliječne kiseline koje su važne za nastanak sira i otkrićem bakterija maslačne fermentacije koje su zaslužne za kvarenje sira. Razvio je postupak u kojem se mlijeko zagrijava kako bi se uništila većina prisutnih bakterija i taj proces je nazvan pasterizacija. Pasterizacija je postala standardnim postupkom obrade mlijeka u proizvodnji sira (slika 2).<sup>5</sup>



Slika 2. Pločasti paster<sup>7</sup>

Masovna proizvodnja sira uzrokovala je nestašicu telećih želudaca što je dovelo do razvoja alternativnih zamjena životinjskog sirila mikrobnim sirilima i enzimom pepsinom. Danas se na tržištu može pronaći sirilo od telećeg želuca, ali većinom se koriste pripravci mikrobnog i

rekombinantnog enzima kimozina. Značajno je spomenuti i Gustafa de Lavalu koji je izumio separator za vrhnje što je omogućilo standardizaciju masti u mlijeku i siru. Današnje sirarstvo primjenjuje mehanizaciju i automatizaciju s ciljem prerade što većih količina mlijeka i dobivanja sira ujednačene kvalitete. Također su uvedeni sustavi upravljanja kvalitetom poput HACCP-i ISO-a, koji greške svode na minimum i povećavaju učinkovitost i ujednačenost proizvodnje te financijsku dobit sirarima. Unaprijeđeni su i načini pakiranja sira što omogućava njegovo čuvanje na duži period. Osim proizvodnje u velikim siranama prisutna je i proizvodnja sira na obiteljskim gospodarstvima koja suvremeno znanje kombiniraju s tradicijskim nasljeđem.<sup>5</sup>

## 1.2. Civilizacijski značaj sira

### *1.2.1. Sir kao prehrambeni i znanstveni fenomen*

Sir kao namirnica ima veliku ulogu u svakodnevnoj prehrani. Osim dobrog okusa sir je bogat izvor hranjivih tvari. Izrazito je bogat proteinima, a uz proteine sir je dobar izvor vitamina, ali i mineralnih tvari poput kalcija, fosfora i magnezija. Poznato je da je za zdrav razvoj zubi potreban kalcij i fosfor kojima sir obiluje tako da sir pomaže u očuvanju zubne cakline. Također, sir sprječava nastanak zubnog karijesa neutralizacijom kiselina koje nastaju razgradnjom ugljikohidrata u ustima. Značaj sira kao namirnice je dugo poznat, o čemu svjedoče i zapisi o njegovoj zastupljenosti u svakodnevnoj prehrani starih Rimljana kojima je sir bio važan dio obroka kojeg su vojnici nosili za vrijeme ratovanja. Osim sira otkrivena je i vrijednost sirutke koja nastaje kao sporedni proizvod, a kroz 18. stoljeće je doživjela svoj vrhunac upotrebe u terapijskom liječenju.<sup>5</sup>

### *1.2.2. Sir kao tehnološki fenomen*

U prošlosti ljudi nisu razumjeli promjene koje se događaju tijekom proizvodnje sira, ali su na osnovu znanja koje se prenosilo s generacije na generaciju vješto upravljali tim procesima. Znanja koja su ljudi stoljećima koristili u proizvodnji sira danas su objedinjena u biotehnologiji, spoju prirodnih i tehničkih znanosti. Stoga se proizvodnja sira može smatrati začetkom moderne biotehnologije.<sup>5</sup>

### *1.2.3. Sir kao kulturni i vjerski fenomen*

O siru je pisano u grčkoj, rimskoj i modernoj književnosti, a najraniji i najznačajniji zapis o siru je u "Odiseji" koju je napisao Homer oko 700. god. pr. Krista. Sir kao hrana bio je cijenjen i kod Židova tako da se zapisi o siru mogu pronaći i u Starom zavjetu.<sup>5</sup>

#### *1.2.4. Sir kao ekonomski fenomen*

U prošlosti sir se koristio kao sredstvo plaćanja i mijenjali su ga za meso, vino i ulje. U Rimu je bila tolika potražnja za sirom da je car Dioklecijan morao izdati dekret kojim je poticao proizvodnju sira i regulirao njegovu cijenu.<sup>5</sup>

#### **1.3. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži**

Postoji nekoliko vrsta sireva koji zriju u životinjskoj koži i proizvode se u određenim dijelovima svijeta. S ponekim razlikama u tehnološkoj proizvodnji i vrsti mlijeka, sirevi koji zriju u životinjskoj koži proizvode se u: Hrvatskoj (planinsko područje Dinare), Turskoj (planinske regije istočne i središnje Anadolije) te planinskim područjima Bosne i Hercegovine i Crne Gore. Glavna specifičnost ovih sireva je njihovo zrenje u životinjskoj koži, janjećoj ili kozjoj, koja ima različite nazive: mišina ili mješina (Hrvatska), mijeh (Bosna i Hercegovina), tulum (Turska). Ovaj sir se proizvodi od ovčjeg, kravljeg, kozjeg mlijeka ili njihovih mješavina. Upravo zrenje sira u mješini pri anaerobnim uvjetima od nekoliko mjeseci daje siru specifičan okus, teksturu, miris i aromu.<sup>2</sup>

Proizvodnja sira iz mišine dijeli se na više faza: priprema mješine; mužnja i priprema mlijeka; priprema sirila; sirenje i spremanje u mješine te zrenje i čuvanje sira. Kod proizvodnje sira iz mišine ključnu ulogu ima pravilna priprema janjeće kože jer samo odgovarajuća mješina osigurava pravilno zrenje sira tijekom kojeg se formiraju i njegova specifična svojstva (slika 3). Janje čija će se koža koristiti za izradu mješine mora biti staro najmanje 6 mjeseci. Za izradu mješine može se koristiti i vanjski dio kože na kojem se nalazila vuna i unutarnji dio kože koji se nalazio uz meso. Nakon što je koža skinuta s trupa potrebno ju je oprati u hladnoj vodi i zatvoriti sve otvore na mješini sa špagom. Samo oko zadnjeg otvora se naprave rupice razmaknute oko 2 cm u koje se uvuče drveni štapić promjera 0,5 cm i duljine 20 cm, koji sprječava klizanje špage prilikom puhanja mješine. Mišina se puše dok ne poprimi oblik pogodan za brijanje, a puhanje se vrši kroz šuplje bazgino drvo promjera 1 cm koje se uvuče u stražnju nogu. Prije sušenja mišina se soli te stavlja na sušenje koje traje 15 do 30 dana. Nakon sušenja potrebno je otvoriti otvor na mišini da bi se provjetrila i oprati je u vodi ili sirutki. Također, mišina se ispire u alkoholu, najčešće rakiji, u svrhu preveniranja kvarenja sira i dezinfekcije.<sup>8</sup>



Slika 3. Pripremljene mješine za sir <sup>9</sup>

#### 1.4. Sir iz mišine

Sir iz mišine je specifični hrvatski autohtoni sir koji ima dugu tradiciju proizvodnje koja se prenosi s koljena na koljeno. Područje proizvodnje vezano je za područje Dalmacije, točnije nalazi se unutar tri županije: Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske i Zadarske. Na tim područjima najbrojnija pasmina ovaca je dalmatinska pramenka i njeni križanci, a upravo se mlijeko te pasmine koristi u proizvodnji sira iz mišine jer je bogatog kemijskog sastava i odlično za proizvodnju sira iz mišine. Knjiga “Sirarstvo u Dalmaciji“, autora Ljudevita Tejkala iz 1913. godine predstavlja prvi pisani dokument o tradicionalnim tehnološkim procesima proizvodnje sira iz mišine na području Dinare i Velebita. Poznato je da su još Iliri i Tračani uzgajali ovce na pašnjacima Dinare, a mišinu su koristili za spremanje i transport sira s planine u dolinu. Mišina ima oblik vreće koja je napravljena od kože čitavog janjeta. Sir iz mišine se prije pravio samo od punomasnog ovčjeg mlijeka, a danas se proizvodi od punomasnog ili obranog, ovčjeg, kozjeg, kravljeg mlijeka i njihovih kombinacija. Proizvodi se većinom na malim obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima koja imaju vlastiti uzgoj životinja za proizvodnju mlijeka za sirenje. Sir iz mišine se također može proizvesti i u industrijskim uvjetima iz pasteriziranog mlijeka. S obzirom na tehnologiju proizvodnje sir iz mišine pripada skupini polutvrđih sireva, ali ako se u obzir uzme prosječni udio vode u bezmasnoj tvari sira (53,34 %) onda pripada skupini tvrdih sireva. Sastav mlijeka korištenog za proizvodnju sira iz mišine ima veliki udio suhe tvari i masti, pa sir iz mišine pripada skupini masnih sireva s prosječnim udjelom masti u suhoj tvari sira 55,52 % na kraju zrenja. Sir je na kraju procesa

zrenja čvrstog oblika, bijele ili žućkaste boje koja ovisi o vrsti mlijeka i dužini zrenja u mišini (slika 4).<sup>10</sup>



Slika 4. Sir iz mišine<sup>11</sup>

### 1.5. Proizvodnja sira iz mišine

Tradicionalna priprema sira iz mišine zadržala se do danas na obiteljskim gospodarstvima u Dalmaciji. Tehnologija proizvodnje sira iz mišine nije još standardizirana pa se mogu pronaći razlike u proizvodnji na različitim gospodarstvima. Sir se može praviti iz pasteriziranog ili nepasteriziranog mlijeka. Za proizvodnju jednog kilograma sira potrebno je 7-8 litara pasteriziranog mlijeka ili 7-9 litara nepasteriziranog mlijeka. Pasterizacija se provodi u sirarskoj kadi pri 63-65 °C u trajanju od 30 minuta nakon čega je mlijeko potrebno ohladiti. Ako se sirenje vrši iz nepasteriziranog mlijeka ono treba biti izvrsne mikrobiološke kvalitete. Mlijeko je potrebno filtrirati prije sirenja da bi se otklonile nečistoće ako ih ima, iako je filtracijom moguće ukloniti samo vidljive nečistoće. Za koagulaciju mlijeka koriste se razni enzimi koji kazein pretvaraju u netopljivi kalcijev para-kapa-kazeinat i peptide. Najpoznatiji enzim koji se koristi je kimozin, a naziva se sirilo. Danas se sirilo dobiva na industrijski način. Telad od koje se dobiva sirilo mora biti hranjena samo mlijekom. Iz očišćenih i osušenih želudaca se dobiva sirilo u praškastom obliku. U novije vrijeme, koriste se i proteolitički enzimi izolirani iz mikroorganizama i oni spadaju u grupu mikrobnih sirila. Prije sirenja mlijeka potrebno je dodati tehnološki korisne mikroorganizme, tzv. mikrobne kulture ili inokulum. Ovisno o načinu proizvodnje i vrsti sira dodaje se određena količina i vrsta mikrobne kulture. Ako se mikrobna kultura dodaje sirovom mlijeku, ona mora prerasti prirodnu mikrofloru mlijeka i usmjeriti fermentaciju na pravilan način. Dodatak mikrobne kulture u pasterizirano mlijeko je obavezno budući da dodani mikroorganizmi moraju zamijeniti mikroorganizme



prirodne mikroflore mlijeka. Nakon odabira mlijeka podešava se temperatura sirenja koja se najčešće kreće u rasponu 28–35 °C. Zatim se mlijeku doda inokulum mikroorganizama, ako je potrebno kalcijev klorid i na kraju sirilo. Količina sirila ovisi o jakosti sirila, vrsti sira kojeg želimo dobiti i temperaturi sirenja. Mlijeko koagulira u roku od 30 do 40 minuta. Nakon otprilike pola sata provjeri se je li gruš postigao dovoljnu čvrstoću. Sirna lopatica uroni se u gruš i podigne prema gore. Ako je grušanje gotovo, gruš će puknuti oštro, a izdvojena sirutka imat će prozirno-zelenkastu boju. Ako dođe do neravnomjernog pucanja gruša i pojave bjelkaste sirutke potrebno je pričekati još 5-10 minuta do završetka grušanja. Zatim se gruš reže na veće ili manje komade, za tvrde sireve sirna zrna su sitnija, za meke sireve su veća. Opet slijedi zagrijavanje izrezanih komada da bi se u potpunosti izdvojila sirutka na temperaturi od 34 do 40 °C. Dovoljno osušeno sirno zrno odvaja se od sirutke i stavlja se u kalupe različitih oblika i veličina koje odgovaraju vrsti sira. Zamatanjem sira u maramu podvrgava se prešanju kako bi se uklonili eventualni ostatci sirutke. Nakon prešanja slijedi soljenje sira koje se provodi iz više razloga: radi boljeg okusa, lakšeg i bržeg bubrenja proteina, poprimanja konačnog oblika kore, smanjenja vlage i produljenja trajnosti. Nakon soljenja sir se konačno prenosi u mišinu na način da ostane što manje međuprostora među grumenjima. Sir je potrebno dobro nabiti u mišinu i istisnuti sav zrak iz nje kako bi se spriječilo kvarenje sira. Zrenje sira odvija se pri temperaturi od 16 do 18 °C, dok je relativna vlažnost zraka 65-80 % . Mišinu je potrebno njegovati i brisati vlažnom krpom svaki dan radi skidanja plijesni. Također je potrebno mišinu okretati prvih par dana nakon punjenja, a kasnije svaki drugi dan.<sup>10,5</sup>

## 1.6. Aroma sira

Aroma se definira kao kombinacija okusa i mirisa koje percipiraju naša usta i nos. Aroma sira jedan je od važnijih pokazatelja kvalitete i raspoznavanja pojedine vrste sira. Sirevi od kozjeg i ovčjeg mlijeka obično imaju izraženiji okus, miris i jaču aromu od sireva napravljenih od kravljeg mlijeka. Aroma i okus sira ovise o udjelu vode i pH sirutke, te kasnije udjelu soli, metodi soljenja, temperaturi zrenja, aktivnosti mikroflore, vrsti mlijeka. Jedinostveni okus sira rezultat je kombinacije hlapljivih i nehlapljivih kemijskih spojeva nastalih od mliječne masti, bjelančevina i ugljikohidrata oslobođenih tijekom zrenja sira. Okus sira potječe od frakcije topljive u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline i amini), dok je za aromu odgovorna hlapljiva frakcija (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri, ketoni, alkoholi). Svaki sir ima drugačiji sastav hlapljive frakcije, ovisan o načinu proizvodnje sira i uvjetima pri kojima se događa zrenje sira. Aromatski profil sireva koji zriju u životinjskoj koži slabo je istražen, a

najviše istraživanja provedeno je na Tulum siru i ponešto na libanonskom Darfiyeh siru, dok za ostale vrste sireva, koji zriju u životinjskoj koži nema nikakvih podataka.

Biokemijske promjene tijekom zrenja sira dijele se u dvije skupine: primarne (proteoliza, lipoliza i metabolizam rezidualne laktoze) i sekundarne (metabolizam masnih kiselina i aminokiselina). Primarne biokemijske promjene su odgovorne za osnovne promjene teksture, dok sekundarne formiraju konačni miris i okus sira. Najvažniji proces za stvaranje okusa i arome je lipoliza, biokemijski proces razgradnje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol. Hidrolizom masti nastaju slobodne masne kiseline koje služe kao prekursori za formiranje ketona, primarnih i sekundarnih alkohola, laktona, aldehida i estera. Proteolitički procesi dovode do promjene strukture sira, a proteoliza direktno utječe i na okus kroz proizvodnju kratkih peptida i aminokiselina, olakšava oslobađanje aromatskih spojeva iz unutrašnjosti sira te osigurava slobodne aminokiseline koje su supstrati za sekundarne kataboličke promjene odgovorne za stvaranje spojeva arome.<sup>10</sup>

Karboksilne kiseline osim što daju aromu siru služe i kao prekursori za nastajanje novih spojeva (ketona, aldehida, alkohola, estera). Tijekom zrenja sira, karboksilne kiseline mogu nastati lipolizom, proteolizom i metabolizmom rezidualne laktoze. Octena kiselina je nositelj oštrog kiselkastog mirisa, kapronska kiselina je odgovorna za vruću bockavu aromu, butanska kiselina daje užegao, a kaprilna kiselina voštani, sapunast, užegao i voćni okus.

Alkoholi u siru mogu nastati iz aldehida, metabolizmom laktoze ili katabolizmom aminokiselina. Alkoholi su općenito najprisutniji hlapljivi spojevi u siru, a osobito etanol. Smatra se da je količina alkohola u siru najprisutnija prvih mjesec dana te s vremenom opada jer procesom esterifikacije nastaju esteri. Alkoholi mogu biti nositelji slatkog, voćnog okusa, ali također mogu pružiti okus alkohola npr. vina.

Aldehidi se ne zadržavaju dugo u siru zato što prelaze u alkohole i kiseline. Koncentracija aldehida u siru ovisi o zrenju sira, vrsti mlijeka, korištenju ili ne korištenju starter kultura. Najčešći aldehidi identificirani u sirevima su: heksanal, heptanal i nonanal.

Esteri su najzastupljeniji hlapljivi spojevi u siru, a nastaju kroz dvije enzimske reakcije, esterifikaciju i alkoholizu. Nositelji su voćnog okusa sira, tako npr. etil-butanoat, etil-acetat i ostali spojevi daju siru slatkasti okus ananasa, banane, marelice.

Sumporni spojevi u siru nastaju većinom razgradnjom aminokiselina cisteina i metionina. Doprinosu stvaranju okusa i mirisa sira po kelju, jajima, bijelom luku i krumpiru.

Terpeni u siru su povezani s pašnjacima na kojima životinje obitavaju i hrane se jer se zadržavaju u mlijeku životinja i tako ostaju prisutni u siru. Zaslužni su za citrusnu aromu sira.

Osim gore navedenih spojeva u siru se mogu pronaći i aromatski ugljikovodici kao što su toulen i stiren. Toulen može nastati kao produkt razgradnje karotena iz mlijeka ili može potjecati od otapala korištenog za analizu. Stiren, koji miriše na plastiku, je uobičajeni spoj u sirevima koji sazrijevaju u životinjskoj koži. Vjerovatno potječe od polistirena iz plastičnih vrećica koje se koriste za čuvanje uzoraka prije izvođenja analize. Ovi spojevi mogu potjecati i iz okoliša ili nastati kontaminacijom tijekom skladištenja sira ili tijekom same analize.<sup>3,12</sup>

## 1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva

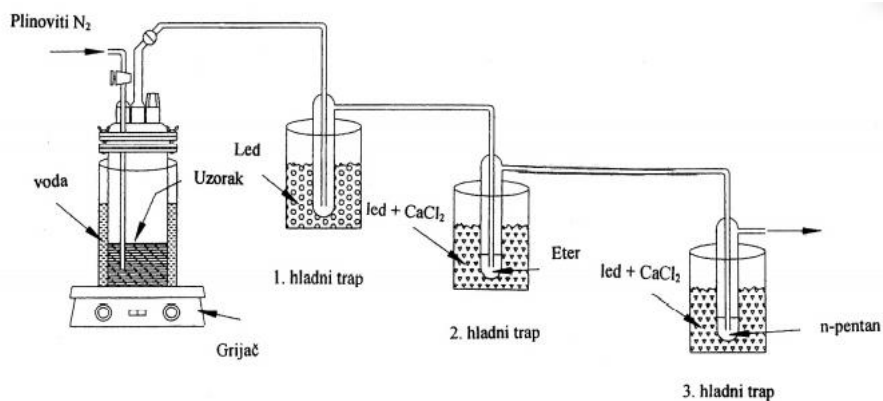
Najčešće korištene metode za izolaciju hlapljivih spojeva su općenito razne destilacijske i ekstrakcijske metode. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira od destilacijskih metoda pogodna je destilacija s dušikom i trapovima, a od ekstrakcijskih mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.

### 1.7.1. Destilacija

Destilacija je metoda u kojoj se tekućina zagrijava i prelazi u paru, koja se dalje odvodi i u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u drugoj posudi. Svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, odjeljivanje smjese s obzirom na razliku temperatura vrenja njenih komponenti, identifikacija tekućih tvari te otparavanje organskih otapala.<sup>13</sup>

#### 1.7.1.1. Destilacija s dušikom i trapovima

Aparatura za destilaciju s dušikom i trapovima (engl. *nitrogen purge and steam distillation*, NPSD) sastoji se od posude s uzorkom na koju su spojene dvije staklene cijevi, na jednu ulazi čisti dušik, a na drugu izlazi dušik obogaćen hlapljivim spojevima uzorka (slika 5.). Uzorak se nalazi na konstantnoj temperaturi (ovisno o vrsti uzorka) što se osigurava korištenjem uljne kupelji. Strujanjem dušika kroz uzorak izdvajaju se najhlapljivije komponente koje se zajedno s vodenom parom kondenziraju u seriji hladnih trapova. Tri trapa se nalaze u ledenoj kupelji, prvi trap je prazan, u drugom trapu se nalazi dietil-eter, a u trećem trapu pentan. Za ovu destilaciju potrebno je nekoliko sati. Na kraju eksperimenta, uzorak iz prvog trapa potrebno je i ekstrahirati eterom, dok je uzorke iz drugog i trećeg trapa potrebno samo osušiti.<sup>14</sup>



Slika 5. Aparatura za destilaciju s dušikom i trapovima<sup>14</sup>

### 1.7.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese uz pomoć otapala. Otapalo koje se koristi kod ekstrakcije mora zadovoljavati nekoliko uvjeta: mora biti kemijski inertno, mora imati visoku moć otapanja tvari koju je potrebno izolirati, gustoća matične otopine i korištenog otapala se moraju razlikovati, ne smije imati previsoko vrelište te mora biti lako dostupno i jeftino. Dvije su osnovne vrste ekstrakcije, a to su ekstrakcija iz tekuće faze (tekuće-tekuće) i ekstrakcija iz čvrste faze (čvrsto-tekuće).<sup>13</sup>

### 1.7.3. Sorpcijske tehnike

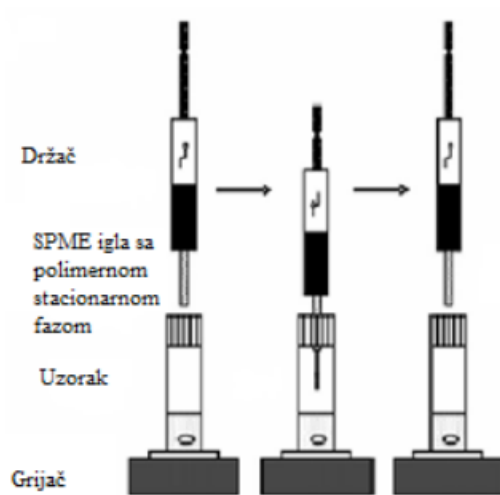
Sorpcijske tehnike temelje se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Omogućuju brzu ekstrakciju bez otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Najčešće sorpcijske tehnike su mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.<sup>14</sup>

#### 1.7.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je tehnika koja se često upotrebljava za izolaciju aromatičnih tvari. Ova tehnika koristi silikonsko vlakno koje je dugo 1 ili 2 cm i prekriveno polimernim filmom za skupljanje isparljivih spojeva iz uzoraka. Igla je postavljena na SPME držač za uzorkovanje, a vlakno se nalazi u sustavu igle. Postoji više vrsta vlakana i upravo vrsta vlakna je važna za selektivnost ekstrakcije. Nepolarna vlakna se koriste za izolaciju nepolarnih spojeva, a polarna za izolaciju polarnih spojeva. U SPME posudu se postavi uzorak i zatvori septom. Vlakno se pomoću igle uvodi u vršne pare iznad uzorka, ili se uroni u tekućinu. Nakon što su se hlapljivi spojevi

adsorbirali na vlakno, vlakno su uvlači i hlapljivi spojevi se desorbiraju direktnim umetanjem u injektor plinskog kromatograma (slika 6.).

Prednosti tehnike su što nije potrebno otapalo, tehnika je brza i jednostavna za rad te je pogodna za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju neželjenih mirisa. Nedostaci su što je aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan o vrsti, debljini i dužini vlakna te temperaturi i vremenu, a osim toga neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve. Kod usporedbe uzoraka najbolji rezultati dobiju se korištenjem istog vlakna na svim uzorcima.<sup>14</sup>



Slika 6. Aparatura za HS-SPME<sup>15</sup>

### 1.8. Identifikacija izoliranih hlapljivih spojeva

Za odjeljivanje hlapljivih spojeva najčešće se koristi plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC). Plinski kromatograf sastoji se od: plina nositelja, injektora uzoraka, grijanog dijela za injektor, kromatografske kolone, kolonske peći, detektora i izlaza za plin. Mobilna faza je inertni plin (He, H<sub>2</sub>, Ar), dok je stacionarna faza krutina ili, danas isključivo, tekućina nanosena na kolonu. Uzorak mora biti hlapljiv i stabilan na temperaturi kromatografske kolone. Odjeljivanje se temelji na raspodjeli komponenti između mobilne i stacionarne faze. Nakon odjeljivanja komponente uzorka u različitim vremenima dolaze na detektor.

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda kojom se analiziraju i identificiraju molekule na temelju njihovog omjera mase i naboja. Molekule se prvo ioniziraju i zatim se ioni razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Ovo je metoda strukturne analize, tj.

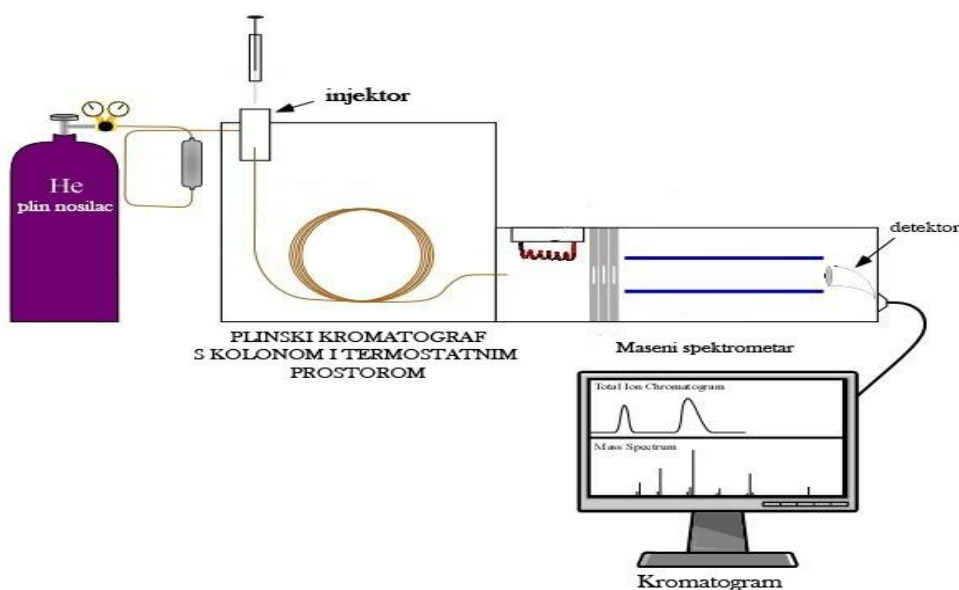
metoda identifikacije ispitivane tvari zato jer je spektar masa karakterističan za svaku tvar. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se uspoređivanjem masenog spektra ispitivanog spoja sa masenim spektrom iz datoteke spektara poznatih tvari.<sup>16</sup>

### 1.8.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je jedna od najučinkovitijih instrumentalnih metoda. Koristi se za analizu smjese hlapljivih spojeva, tj. njihovo razdvajanje i strukturnu analizu uz minimalnu količinu uzorka. Povezivanje ovih dviju tehnika međusobno povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost što omogućuje analizu pikogramskih i femtogramskih količina uzorka, čime se omogućuje kvantitativna i kvalitativna analiza. Plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese, ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa učinkovita za kvalitativnu analizu čime se ove dvije metode odlično nadopunjuju.<sup>17</sup>

Osnovne komponente uređaja za GC-MS su (slika 7.):

- Boca s plinom nositeljem
- Injektor
- Peć s kromatogramskom kolonom
- Maseni detektor
- Računalo



Slika 7. GC-MS uređaj<sup>18</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Sir iz mišine

Za izradu ovog završnog rada korišten je kravlji sir iz mišine (slika 8.) proizveden na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu u Drnišu 2021. godine.



Slika 8. Sir iz mišine

### 2.2. Kemikalije i aparatura

Za izradu ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka,
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom: sivo vlakno sa ovojnicom divinilbenzen/karboksen/poli(dimetilsiloksan) (DVB/CAR/PDMS), Supelco Co., 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 čvrstoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci vršnih para koji se dalje analiziraju GC-MS metodom.

#### *2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi*

Hlapljivi spojevi sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi korišteno je sivo vlakno koje je prije početka rada kondicionirano u skladu s uputama proizvođača. Kondicioniranje je izvršeno postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa pri 270 °C na 60 minuta. Sva tri uzorka pripremljena su na isti način, jedino što se mijenjalo je temperatura pri kojoj je vršena mikroekstrakcija. U staklenu bočicu tzv. vialicu stavljen je 1 gram kravljeg sira iz mišine. Vialica s uzorkom je zatvorena teflonskom silikon septom i postavljena u vodenu kupelj odgovarajuće temperature (40, 50 ili 60 °C) i ostavljena na konstantnoj temperaturi 15 minuta. Za održavanje konstantne temperature vodene kupelji korištena je magnetska miješalica s termostatom. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare. Nakon oslobađanja vršnih para uvedena je SPME igla sivog vlakna u vialicu, vlakno je izvučeno i provedena ekstrakcija hlapljivih spojeva u vremenu od 40 minuta (slika 9.). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vialice i odmah postavljeno u GC-MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.





Slika 9. Uređaj za HS-SPME<sup>19</sup>

### 2.3.2. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Korišten je plinski kromatograf proizvođača Agilent Technologies, model 7820A, povezan sa spektrometrom masa proizvođača Agilent Technologies, model 5977E, koji je spojen na računalo na kojem se prikazuju rezultati (slika 10.). Analize uzoraka napravljene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies kemijskog sastava 5 % difenil – 95 % dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij protoka od 1 mL/min, temperatura injektora je bila 250 °C, a omjer cijepanja 1:50, temperatura detektora je bila 280 °C, energija ionizacije 70 eV, a temperatura izvora ionizacije 230 °C. Temperatura peći određena je programom: 2 min izotermno na 70 °C, slijedi porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom od 3 °C min<sup>-1</sup>, te zadržavanje 2 min pri 200 °C. Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiven je: kromatogram ukupne ionske struje (TIC), vrijeme zadržavanja svake komponente, relativni udio svake komponente izražen u postocima te naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente. Pojedinačne komponente su identificirane usporedbom njihovih masenih spektara s već poznatim masenim

spektrima iz baze podataka Wiley9 (Wiley MS libraries) i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD).



Slika 10. Prikaz GC-MS<sup>19</sup>

### 3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Postupak pripreme uzoraka opisan je u prethodnim poglavljima. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani tablično (tablice 1-3), a identificirani spojevi poredani su u tablicama prema redosljedju eluiranja s kolone HP-5MS. Kako HP-5MS nije kiralna kolona, nije bilo moguće odrediti točan izomer za kiralne spojeve. U radu su prikazani kromatogrami (slike 10-12) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio spojeva u uzorcima izražen je u postotcima i predstavlja udio površine pika određenog spoja u ukupnoj površini (površina svih pikova na kromatogramu). Spojevi su identificirani usporedbom njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley<sup>9</sup> i NIST<sup>17</sup>.

Značenje simbola u tablicama je:

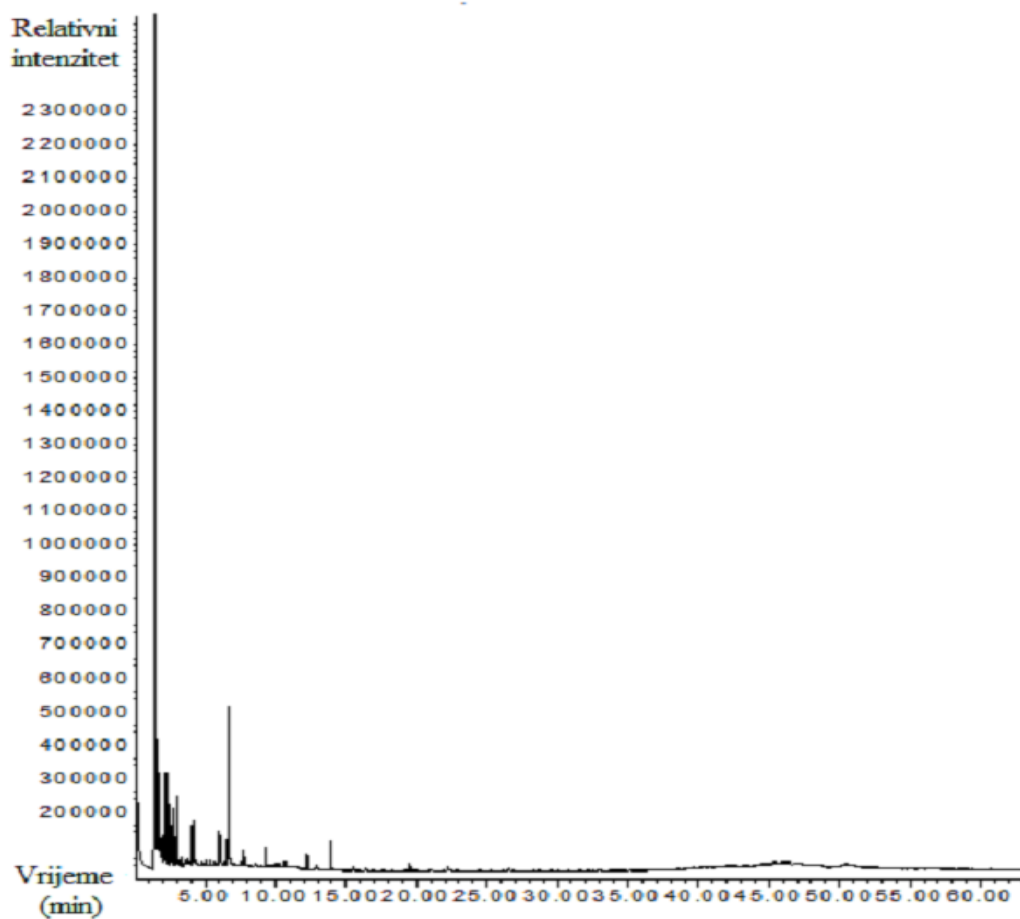
$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

- spoj nije identificiran u uzorku.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 40 °C.

Redni broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) 40 °C
1.	etanol	1,41	47,46
2.	octena kiselina	1,55	8,26
3.	etil-acetat	1,71	6,28
4.	acetoin	2,10	2,12
5.	3-metilbutanol	2,23	3,62
6.	butanska kiselina	2,45	3,44
7.	butan-2,3-diol	2,66	1,80
8.	etil-butanoat	2,73	2,58
9.	heksanska kiselina	6,16	2,56

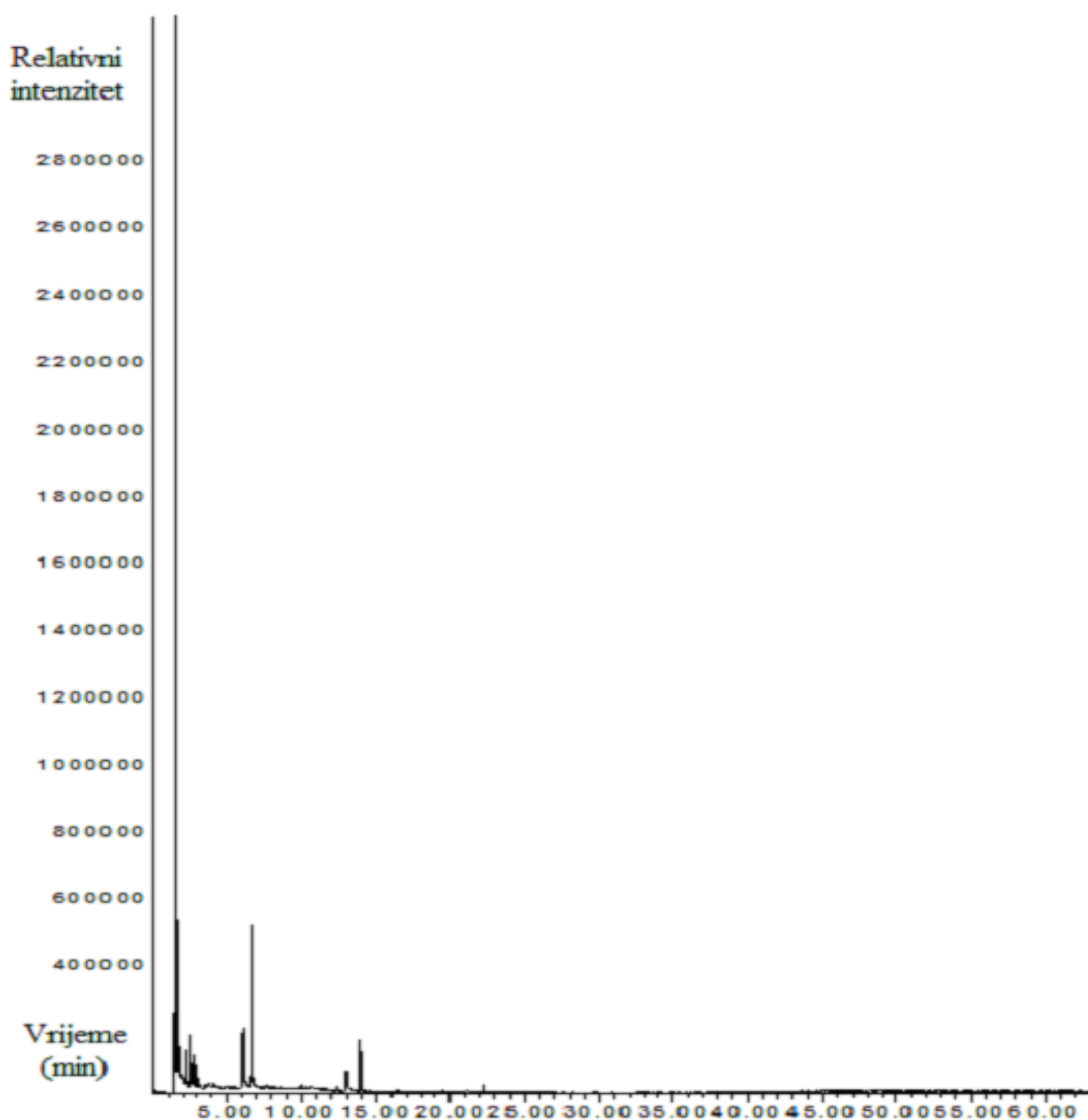
10.	etil-heksanoat	6,65	9,69
11.	etil-oktanoat	13,94	2,15
<b>Ukupno</b>			<b>89,86</b>
<b>identificirano (%)</b>			



Slika 11. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 40 °C

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 50 °C.

<b>Redni broj</b>	<b>Spoj</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Udio (%) 50 °C</b>
1.	etanol	1,41	50,95
2.	octena kiselina	1,55	9,85
3.	etil-acetat	1,71	3,43
4.	3-metilbutanol	2,23	3,43
5.	butanska kiselina	2,45	3,61
6.	butan-2,3-diol	2,66	1,89
7.	etil-butanoat	2,73	2,08
8.	heksanska kiselina	6,16	6,28
9.	etil-heksanoat	6,65	10,51
10.	oktanska kiselina	13,00	1,94
11.	etil-oktanoat	13,94	3,94
<b>Ukupno</b>			<b>96,92</b>
<b>identificirano (%)</b>			

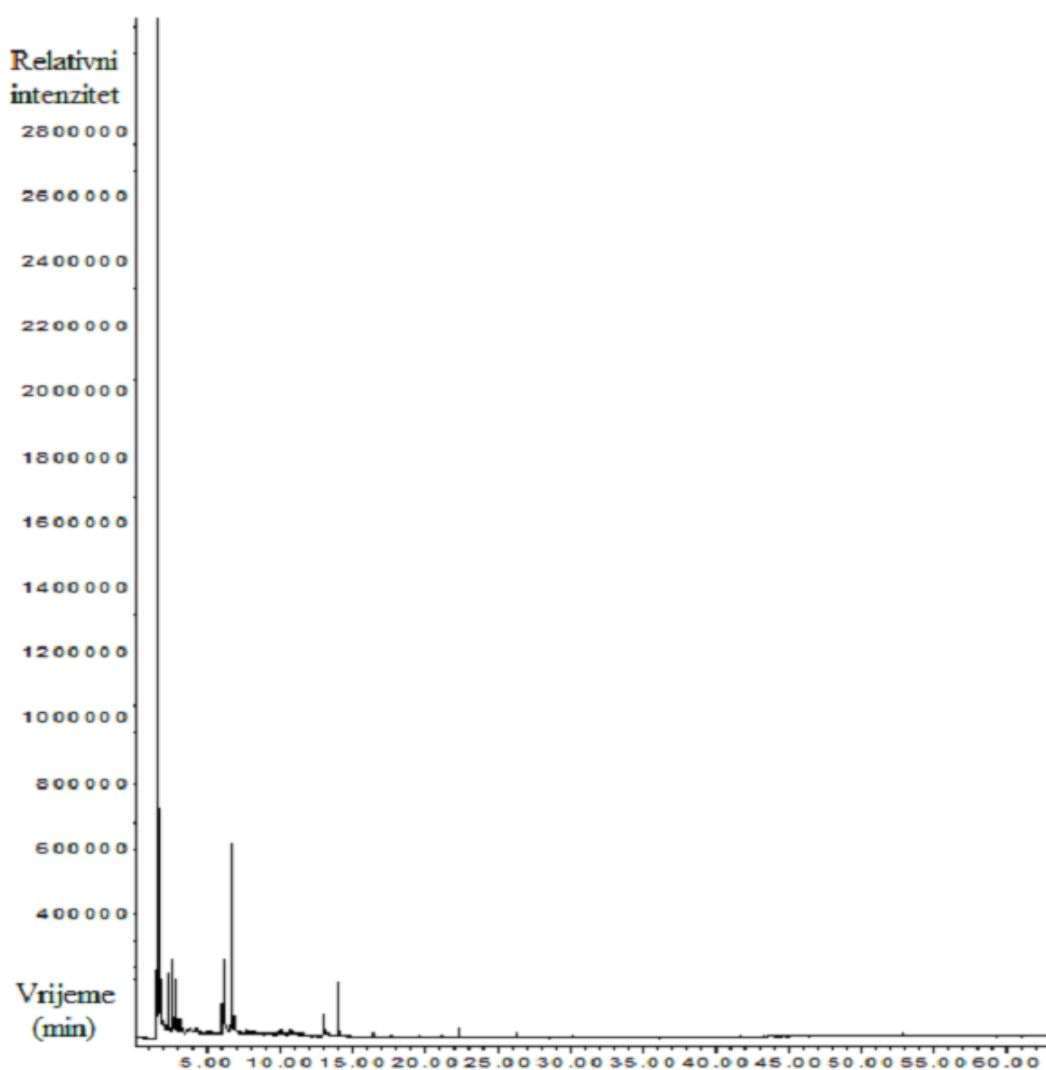


Slika 12. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 50 °C

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 60 °C

Redni broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) 60°C
1.	etanol	1,41	48,50
2.	octena kiselina	1,55	10,99
3.	etil-acetat	1,71	3,67

4.	3-metilbutanol	2,23	3,16
5.	butanska kiselina	2,45	3,87
6.	etil-butanoat	2,73	2,28
7.	heksanska kiselina	6,16	8,00
8.	etil-heksanoat	6,65	10,91
9.	oktanska kiselina	13,00	2,25
10.	etil-oktanoat	13,94	3,95
<b>Ukupno</b>			<b>97,58</b>
<b>identificirano (%)</b>			



Slika 13. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pri 60 °C

## 4. RASPRAVA

Sir iz mišine tradicionalni je hrvatski sir koji se proizvodi tradicionalnim tehnikama sirarstva na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG) Dalmatinske zagore, i dijela Like (područje Velebita). U početku se sir iz mišine proizvodio isključivo od punomasnog ovčjeg mlijeka dok se danas proizvodi sirenjem punomasnog ili obranog ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka ili njihovom mješavinom. Nema pouzdanih podataka o vremenu i načinu nastajanja ove vrste sira, ali je poznato da su još Tračani i Iliri uzgajali ovce na pašnjacima Dinare, pa najvjerojatnije od tog vremena započinje i njegova proizvodnja. Pretpostavlja se da je proizvodnja započela slučajno, spontanom fermentiranjem mlijeka u mješini koja se tada koristila za čuvanje mlijeka. Stočari su usireno mlijeko u kojem je došlo do izdvajanja sirutke i stvaranja sirne grude dalje preradili u sir te proces vremenom usavršili. Proizvodnja je vezana isključivo za područja Dalmatinske zagore i jednog dijela Like. Također je poznata i izvan Hrvatske, na području zapadne Hercegovine.<sup>1</sup>

Aroma sira jedan je od ključnih parametara kvalitete i znakova raspoznavanja pojedine vrste sira.<sup>13</sup> Tijekom zrenja sira proteolitički enzimi razgrađuju kazein do većih i manjih peptida te slobodnih aminokiselina. Količina i omjeri pojedinih aminokiselina i topljivih peptida značajno utječu na teksturu i organoleptička svojstva sira. Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi koji formiraju specifične arome raznih vrsta sireva. Okus sira je koncentriran u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline i amini), dok je aroma uglavnom koncentrirana u hlapljivoj frakciji (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri). Ono što je zanimljivo je da mnogi sirevi sadrže iste ili slične komponente, ali u različitim koncentracijama i odnosima, što daje specifičnost arome svake pojedine vrste sira.<sup>3,12</sup>

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži odlikuju se izraženim i pikantnim okusom, mirisom i aromom te imaju specifičnu granuliranu ili mazivu i glatku teksturu. Razlog takvim osobinama, koje se bitno razlikuju od osobina sireva koji zriju u prirodnoj kori, je taj da u životinjskoj koži sir zrije u anaerobnim uvjetima uz prisustvo prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline, drugih bakterija nestarterske mikroflore te kvasaca i plijesni koji zbog permeabilnosti životinjske kože čine sekundarnu mikrofloru sira. Intenzivni procesi lipolize i proteolize koji se odvijaju u siru tijekom zrenja u životinjskoj koži odgovorni su za ta karakteristična svojstva.<sup>10</sup>



Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine pripremljenog od kravljeg mlijeka. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je metoda mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi na sivom vlaknu pri tri različite temperature (40, 50 i 60 °C). Na taj način su dobivena tri uzorka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

#### VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 40 °C

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kravljeg sira iz mišine izoliranim korištenjem sivog vlakna pri 40 °C prikazan je u tablici 1. Identificirano je ukupno 11 spojeva, koji čine 89,96 % uzorka vršnih para. Najzastupljeniji spoj u uzorku je alkohol etanol (47,76 %). Ostali identificirani spojevi su: ester etil-heksanoat (9,69 %), octena kiselina (8,26 %), ester etil-acetat (6,28 %), alkohol 3-metilbutanol (3,62 %), butanska kiselina (3,44 %), ester etil-butanoat (2,58 %), heksanska kiselina (2,56 %), ester etil-oktanoat (2,15 %), acetoin (2,12 %) i alkohol butan-2,3-diol (1,80 %).

#### VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 50 °C

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kravljeg sira iz mišine izoliranim korištenjem sivog vlakna pri 50 °C prikazan je u tablici 2. Identificirano je ukupno 11 spojeva što predstavlja 96,92 % uzorka vršnih para. I u ovom uzorku najzastupljeniji spoj je alkohol etanol (50,95 %). Od ostalih spojeva prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri: etil-heksanoat (10,51 %), octena kiselina (9,85 %), heksanska kiselina (6,28 %), etil-oktanoat (3,94 %), butanska kiselina (3,61 %), etil-acetat (3,43 %), etil-butanoat (2,08 %) i oktanska kiselina (1,94 %). U uzorku su identificirani i alkoholi 3-metilbutanol (2,44 %) te butan-2,3-diol (1,89 %).

#### VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 60 °C

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama kravljeg sira iz mišine izoliranim korištenjem sivog vlakna pri 60 °C prikazan je u tablici 3. U vršnim parama ekstrahiranim na 60 °C identificirano je 10 spojeva, odnosno 97,58 % uzorka. Kao i kod uzoraka vršnih para ekstrahiranih na 40 i 50 °C i ovdje je najzastupljeniji spoj alkohol etanol (48,50 %). Sastav ovog uzorka se ne razlikuje puno od sastava prethodna dva uzorka pa i u njemu prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri: octena kiselina (10,99 %), etil-heksanoat (10,91 %), heksanska kiselina (8,0 %), etil-oktanoat (3,95 %), butanska kiselina (3,87 %), etil-acetat (3,67 %), etil-butanoat (2,28 %) i oktanska kiselina (2,25 %). Od alkohola je identificiran još 3-metilbutanol (3,16 %).

Usporedbom rezultata analiza uočljivo je da se kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva ne razlikuje bitno s obzirom na temperaturu pri kojoj je vršena ekstrakcija hlapljivih spojeva. U sva tri uzorka glavni spoj je alkohol etanol. Uzorci sadrže uglavnom iste spojeve bez značajnijih varijacija u koncentraciji. U svim uzorcima prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri a u sva tri uzorka je identificiran i alkohol 3-metilbutanol. Od alkohola je u uzorcima vršnih para izoliranim na 40 i 50 °C identificiran još i butan-2,3-diol. Jedino u uzorku vršnih para ekstrahiranim na 40 °C identificiran je acetoin, koji nije pronađen u preostala dva uzorka. Također, jedino u ovom uzorku nije identificirana oktanska kiselina koja je pronađena u ostalim uzorcima.

Dobiveni rezultati se slažu sa podacima iz literature u kojoj je dan pregled hlapljivih spojeva tradicionalnog turskog Tulum sira koji zrije u janjećoj koži. Iz literature je vidljivo da su najzastupljeniji hlapljivi spojevi koji daju aromu sirevima koji zriju u životinjskoj koži esteri, alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni i terpeni.<sup>20,21</sup>

Alkoholi se smatraju važnim hlapljivim spojevima koji sirevima daju oštru aromu. Mogu nastati izuzetno brzo iz aldehida u jakim redukcijskim uvjetima prisutnim u nekim vrstama sira, ili nekim drugim metaboličkim načinom-poput metabolizma laktoze i katabolizma aminokiselina. Mnogi autori su identificirali različite alkohole kao najprisutnije hlapljive spojeve u sirevima koji zriju u životinjskoj koži. Pa tako Hayaloglu i suradnici spominju upravo etanol kao najčešći alkohol u Tulum siru koji zrije u životinjskoj koži, a isti podatak navode i Vrdoljak i suradnici za sir iz mišine. Etanol obično nastaje kao rezultat fermentacije laktoze i katabolizma alanina te ima važnu ulogu u formiranju estera. Osim etanola, i u Tulum siru i u siru iz mišine koji su obrađivali Vrdoljak i suradnici, pronađen je 3-metilbutanol (koji je rezultat metabolizma leucina), 2-metilpropanol, 2-metilbutanol, butan-2-ol, pentan-2-ol i heksan-1-ol.<sup>12,21</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je izolirati hlapljive spojeve sira iz mišine. S obzirom na rezultate i raspravu može se zaključiti sljedeće:

- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna pri 40 °C identificirano je ukupno 11 spojeva, koji čine 89,86 % uzorka vršnih para. Pri 50 °C identificirano je ukupno 11 spojeva, koji čine 96,92 % uzorka vršnih para a pri 60 °C je identificirano 10 spojeva odnosno 97,58 % uzorka vršnih para.
- Kemijski sastav uzoraka hlapljivih spojeva ne razlikuje se bitno s obzirom na temperaturu pri kojoj je vršena ekstrakcija hlapljivih spojeva. Uzorci sadrže uglavnom iste spojeve bez značajnijih varijacija u koncentraciji. U sva tri uzorka glavni spoj je alkohol etanol (47,76-50,95 %), slijede etil-heksanoat (9,69-10,91 %) i octena kiselina (8,26-10,99 %).
- U svim uzorcima prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri, a u sva tri uzorka je identificiran i alkohol 3-metilbutanol. Od alkohola je u uzorcima vršnih para izoliranim na 40 °C i 50 °C identificiran još i butan-2,3-diol. Jedino u uzorku vršnih para ekstrahiranim na 40 °C identificiran je acetoin, koji nije pronađen u preostala dva uzorka. Također, jedino u ovom uzorku nije identificirana oktanska kiselina koja je pronađena u ostalim uzorcima.
- Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi se pokazala kao dobra metoda izolacije spojeva arome sira iz mišine budući da identificirane klase spojeva (karboksilne kiseline, njihovi esteri i alkoholi) spadaju u spojeve odgovorne za aromu sira.

## 6. LITERATURA

1. [https://www.hah.hr/arhiva/sir\\_mjesina.php](https://www.hah.hr/arhiva/sir_mjesina.php) (30.07.2021.)
2. M. Tudor Kalit, S. Kalit, J. Havranek, *Mljekarstvo* **60** (2010) 149-155.
3. N. Mikulec, I. Habuš, N. Antunac, Lj. Vitale, J. Havranek, *Mljekarstvo* **60** (2010) 219-227
4. <https://povijest.hr/drustvo/kultura/tko-je-prvi-uzivao-u-siru/> (18.08.2021.)
5. B. Matijević, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015, str. 11-29.
6. <https://www.flickr.com/photos/39411748@N06/6230792191/> (18.08.2021.)
7. <https://www.neologicengineers.com/milk-pasteurization-machine-manufacturers.php> (12.09.2021.)
8. <https://lijepanasa.com.hr/sir-iz-mjesine/> (25.08.2021.)
9. <https://cdn.agroklub.com/upload/images/image/mjesine-za-mrvljeni-ovciji-kozji-kravlji-i-mijesani-sir.jpg> (25.08.2021.)
10. T. Lojbl, *Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži*, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
11. <https://www.jabuka.tv/wp-content/uploads/2021/06/sir-iz-mijeha.jpg> (26.08.2021)
12. M. Vrdoljak, N. Mikulec, K. Markov, S. Kalit, J. Frece, *J. Cent. Eur. Agric* **19** (2018) 318-334.
13. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
14. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
15. A. M. Lovrić, *Optimizacija i validacija HS-SPME GC-MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
16. Nj. Radić, L. Kukoć Modun, F. Burčul, *Instrumentne metode analize*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.

17. M. Zenčić, *Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
18. [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-GC-MS-system\\_fig1\\_221927526](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-GC-MS-system_fig1_221927526)  
(30.08.2021.)
19. D. Sinovčić, *Kemijska analiza hlapljivih spojeva craft piva "Mrka"*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2020.
20. S. Demirici, H. I. Öztürk, D. S. Atik, C. Koçak, T. Demirci, N. Akin, *Eur. Food Res. Technol.* **247** (2021) 2097-2198.
21. A. A. Hayaloglu, S. Cakmakci, E. Y. Brechany, K. C. Deegan, P. L. H. McSweeney, *J. Dairy Sci.* **90** (2007) 1102-1121.