

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA SIRA S DODATKOM AROMATIČNOG BILJA

Krmek, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:967532>

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](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA SIRA S DODATKOM
AROMATIČNOG BILJA

DIPLOMSKI RAD

MIHAELA KRMEK

Matični broj: 166

Split, listopad 2023.

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

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA SIRA S DODATKOM
AROMATIČNOG BILJA

DIPLOMSKI RAD

MIHAELA KRMEK

Matični broj: 166

Split, listopad 2023.

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

**PROFILE OF VOLATILE COMPOUNDS OF CHEESE WITH THE
ADDITION OF AROMATIC HERBS**

DIPLOMA THESIS

MIHAELA KRMEK

Parental number: 166

Split, October 2023.

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

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA SIRA S DODATKOM AROMATIČNOG BILJA
Mihaela Krmek, 166

Sažetak:

U ovom diplomskom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva punomasnog tvrdog sira (od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka) i istih sireva kojimu je dodano aromatično bilje (lavanda, kadulja i bosiljak) u različitim udjelima. 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 uspoređeni. U svim uzorcima najzastupljenije su karboksilne kiseline, posebno masne kiseline butanska, heksanska i oktanska kiselina te octena i propanska kiselina. U svim ispitanim sirevima identificirani su i terpeni. U aromatiziranim sirevima identificiran je veći broj terpena nego u siru bez dodatka. Za sve aromatizirane sireve vrijedi isto: što je udio pojedine aromatične biljke u siru veći, veći je i broj i udio terpena, a ističu se terpeni specifični za pojedinu biljku.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 10 slika, 9 tablica, 15 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: 26. listopada 2023.

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.

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.

**PROFILE OF VOLATILE COMPOUNDS OF CHEESE WITH THE ADDITION OF AROMATIC
HERBS**

Mihaela Krmek, 166

Abstract:

In this thesis, the composition and content of volatile compounds of full-fat hard cheese (from mixed cow's and sheep's milk) and the same cheese to which aromatic herbs (lavender, sage, basil) were added in different proportions were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (DVB/CAR/PDMS) at a temperature of 60 °C. All samples were analyzed by chromatography-mass spectrometry using nonpolar column, and the results were compared. In all samples, the most abundant compounds are carboxylic acids, especially the fatty acids butanoic, hexanoic and octanoic acid as well as propanoic and acetic acid. Terpenes were also identified in all the cheeses studied. A higher number of terpenes was identified in the flavored cheeses than in the cheese without additives. For all flavored cheeses: the higher the proportion of a particular aromatic plant in the cheese, the higher the number and proportion of terpenes, with the terpenes specific to a particular plant standing out.

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

Thesis contains: 42 pages, 10 figures, 9 tables, 15 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: October 26, 2023.

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 svibnja do listopada 2023. godine.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je odrediti profil, odnosno kemijski sastav i udio, hlapljivih (aromatičnih) spojeva nositelja aroma sira bez dodataka kao i sira s dodacima aromatičnog bilja lavande, kadulje te bosiljka. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je metoda mikroekstrakcije 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. Na taj način dobiveni su uzorci koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS).

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva punomasnog tvrdog sira (od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka) i istih sireva kojimu je dodano aromatično bilje (lavanda, kadulja i bosiljak) u različitim udjelima. 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 uspoređeni. U svim uzorcima najzastupljenije su karboksilne kiseline, posebno masne kiseline butanska, heksanska i oktanska kiselina te octena i propanska kiselina. U svim ispitanim sirevima identificirani su i terpeni. U aromatiziranim sirevima identificiran je veći broj terpena nego u siru bez dodatka. Za sve aromatizirane sireve vrijedi isto: što je udio pojedine aromatične biljke u siru veći, veći je i broj i udio terpena, a ističu se terpeni specifični za pojedinu biljku.

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

ABSTRACT

In this thesis, the composition and content of volatile compounds of full-fat hard cheese (from mixed cow's and sheep's milk) and the same cheese to which aromatic herbs (lavender, sage, basil) were added in different proportions were analyzed. Isolation of volatile compounds was performed by solid phase microextraction (HS-SPME) using divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (DVB/CAR/PDMS) at a temperature of 60 °C. All samples were analyzed by chromatography-mass spectrometry using nonpolar column, and the results were compared. In all samples, the most abundant compounds are carboxylic acids, especially the fatty acids butanoic, hexanoic and octanoic acid as well as propanoic and acetic acid. Terpenes were also identified in all the cheeses studied. A higher number of terpenes was identified in the flavored cheeses than in the cheese without additives. For all flavored cheeses: the higher the proportion of a particular aromatic plant in the cheese, the higher the number and proportion of terpenes, with the terpenes specific to a particular plant standing out.

Key words: cheese, flavored cheeses, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1 Sir – definicije i podjele.....	2
1.2. Suvremeno (moderno) doba sirarstva.....	2
1.3. Civilizacijski značaj sira.....	3
1.3.1. Sir kao prehrambeni i zdravstveni fenomen	3
1.3.2. Sir kao tehnološki fenomen	4
1.3.3. Sir kao kulturni i vjerski fenomen	4
1.3.4. Sir kao ekonomski fenomen.....	4
1.4. Aroma sira.....	5
1.5. Ljekovito i aromatično bilje	6
1.5.1. Lavanda.....	6
1.5.2. Kadulja.....	7
1.5.3. Bosiljak	8
1.6. Metode izolacije hlapljivih spojeva	9
1.6.1. Destilacija	9
1.6.2. Ekstrakcija.....	10
1.6.3. Sorpcijske tehnike	10
1.7. Analiza hlapljivih spojeva	12
1.7.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO	15
2.1. Materijal.....	15
2.2. Kemikalije i aparatura	16
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva.....	16
2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	16
2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva.....	18
3. REZULTATI	20
4. RASPRAVA.....	35
4.1. Hlapljivi spojevi sira.....	35
4.2. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom lavande.....	36
4.3. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom bosiljka	37
4.4. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom kadulje	38

5. ZAKLJUČAK	40
6. LITERATURA	41

UVOD

Sir je rasprostranjena i vrijedna namirnica koja se koristi u svakodnevnici. Sir od mješavine kravljeg i ovčjeg sira tradicionalno se proizvodi na gospodarstvima i u siranama diljem Hrvatske. S obzirom na tehnologiju proizvodnje spada u skupinu tvrdih sireva.

Aroma sira je glavni parametar kvalitete pojedine vrste sira. Procesom zrenja, u siru se odvijaju biokemijske i mikrobiološke promjene koje izravno utječu na organoleptička svojstva namirnice. Primarne biokemijske promjene odgovorne su za promjenu teksture dok su sekundarne odgovorne za formiranje konačnog mirisa i okusa sira. U posljednje vrijeme, aromatizirani sirevi su sve popularniji u industriji sireva. Aromatiziranjem se poboljšava okus i senzorne osobine ali i čuvanje namirnice, te zadovoljstvo gurmana. Sirevi se aromatiziraju različitim biljnim materijalom kao što su lavanda, kadulja, bosiljak, ružmarin i mnogi drugi. Osim hranjivih svojstava dodaci su korisni i zbog antimikrobne vrijednosti.

Cilj ovog rada bio je analizirati hlapljive spojeve, nosioce arome ovoga sira. Izolacija se izvršila mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj 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 – definicije i podjele

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009.), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon zgrušavanja mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sireva dopuštena je uporaba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih enzima zgrušavanja i/ili dopuštenih kiselina za zgrušavanje. Sir se definira i kao fermentirani ili nefermentirani proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka, obranog mlijeka ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina te otjecanjem sirutke (uz dodatak sirila ili nekog drugog zamjenskog enzima zgrušavanja).¹

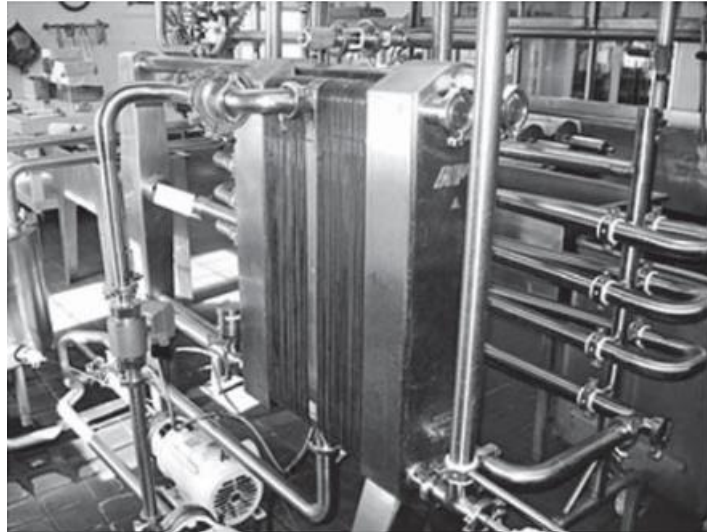
Prema sadržaju vode u bezmasnoj suhoj tvari sirevi su podijeljeni na ekstra-tvrde, tvrde, polutvrde, meke i svježe. Sljedeća podjela sireva je prema sadržaju masti u suhoj tvari na ekstramasne, punomasne, masne, polumasne i posne. Sirevi se mogu podijeliti i prema načinu zrenja na sireve koji ne zriju, sireve koji zriju pretežno s bakterijama u unutrašnjosti, sireve koji zriju pretežno s bakterijama na površini i sireve koji zriju sa plijesnima pretežno u unutrašnjosti i s plijesnima pretežno na površini.¹

U tehnologiji proizvodnje sira potrebno je zadovoljiti dva cilja: proizvesti sir željenih senzorskih osobina (vanjski izgled, boja, presjek, konzistencija, miris i okus) te postaviti tehnološki lako ponovljiv protokol koji će uvijek iznova rezultirati sirom istih karakteristika.¹

1.2. Suvremeno (moderno) doba sirarstva

Početak suvremenog sirarstva definiran je krajem prve industrijske revolucije. Potrošačko društvo modernog doba zahtijevalo je masovnu proizvodnju sira, no postupak moderne proizvodnje nije se mnogo razlikovao od proizvodnje starog i srednjeg vijeka. Razvojem znanosti otkriveni su brojni kemijski, biokemijski i mikrobiološki procesi koji se odvijaju tijekom procesa sirenja i zrenja sira. Važno je spomenuti i tehničke inovacije i razvoj kemijskih metoda za kontrolu kvalitete koje su dovele do lakog vođenja i praćenja procesa proizvodnje. Rezultat svega je olakšana i ubrzana proizvodnja te veća količina proizvoda. Novi smjer razvoja proizvodnje sira svakako je definiran istraživanjima Louisa Pasteura, koji je otkrio da su uzročnici fermentacije maslačne kiseline upravo bakterije koje kvare sir te da su bakterije

mliječne kiseline neophodne za proces sirenja i zrenja sira. Istraživanja su vodila razvoju postupka pasterizacije (slika 1), toplinske obrade kako bi se uništile prisutne patogene bakterije. Danas je pasterizacija standard u postupcima obrade mlijeka u proizvodnji.



Slika 1. Pločasti paster¹

Drugi vrijedni izum u proizvodnji sira bio je prvi separator za vrhnje, za čiji je razvoj zaslužan Gustaf de Laval. Njegova primjena omogućila je standardizaciju masti u mlijeku i siru te se nakon brojnih modifikacija koristi i danas. Suvremeno sirarstvo odlikuju mehanizacija i automatizacija s ciljem prerade što većih količina mlijeka te dobivanjem sira ujednačene kvalitete. Moderni sustavi upravljanja kvalitetom poput HACCP-a i ISO-a greške u proizvodnji svode na minimum, povećavaju učinkovitost i ujednačenost proizvodnje, osiguravaju dobit proizvođačima i sigurne proizvode za potrošače. Novi načini pakiranja sira doprinose njegovoj sigurnosti i čuvanju kroz duži vremenski period. Osim masovne proizvodnje, danas je sve popularnija i proizvodnja manjeg kapaciteta sa obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava koji njeguju tradicijsko nasljeđe uz suvremenu proizvodnju.¹

1.3. Civilizacijski značaj sira

1.3.1. Sir kao prehrambeni i zdravstveni fenomen

Sir je vrijedna namirnica u ljudskoj prehrani. Obiluje proteinima, mineralnim tvarima poput kalcija, fosfora i magnezija te vitaminima. S obzirom da dolazi u različitim oblicima, dajući

široku paletu okusa i mirisa prozvan je kraljevskom namirnicom. Osim što je izvor brojnih hranjivih tvari važnih za pravilnu prehranu, važan je i za očuvanje zubne cakline i zaštitu od karijesa. Za zdrave zube nužan je kalcij i fosfor. Neutralizacijom kiselina nastalih razgradnjom ugljikohidrata u ustima, poticanjem lučenja sline te remineralizacijom cakline kazeinom, kalcijem i fosforom sir sprječava razvoj zubnog karijesa. U procesu proizvodnje sira osim krajnjeg proizvoda, nastaje i sporedni proizvod - sirutka. U prošlosti se koristila za liječenje raznih tegoba zbog svojih diuretskih i okrepljujućih svojstava.¹

1.3.2. Sir kao tehnološki fenomen

Izrada kvalitetnog sira nije jednostavna. Potrebno je razumijevanje promjena tijekom izrade sira što ljudi u počecima proizvodnje nisu posjedovali. Unatoč tome, imali su iskustvena znanja koja su prenosili naraštajima koji su ih unaprjeđivali. Razvojem kemije, biokemije i mikrobiologije olakšalo se razumijevanje procesa u proizvodnji koji uključuju enzime, bakterije i plijesni. Iskustvena znanja zajedno s novim tehnologijama unaprijedili su proizvodnju. Tako se sir, uz vino, pivo i kruh smatra začetnikom moderne biotehnologije.¹

1.3.3. Sir kao kulturni i vjerski fenomen

Sir je opisan u brojnim djelima grčke, rimske i moderne književnosti. Najraniji i najznačajniji zapis o proizvodnji sira spominje se u Homerovoj Odiseji oko 700. god. pr. Kr. Osim u književnosti, sir je cijenjen kod Židova i kršćana što svjedoče zapisi u Starom zavjetu.¹

1.3.4. Sir kao ekonomski fenomen

Budući da je sirovo mlijeko lako kvarljivo, prerada u sir omogućila je njegovo konzerviranje u većim količinama. Čuvanje kroz duži vremenski period dalo mu je financijsku vrijednost pa se tako sir koristio u razmjeni dobara. S obzirom na izrazitu potražnju za sirom, car Dioklecijan morao je izdati dekret kojim je poticao proizvodnju i regulirao cijenu sira.¹

1.4. Aroma sira

Aroma je suma osjećaja koju hrana ili piće izaziva u ustima, a načelno se doživljavaju osjetima mirisa i okusa te osjetima boli, dodira i receptorima temperature u ustima. Tvari odgovorne za okus su neisparljive pri sobnoj temperaturi dok mirisne tvari moraju biti hlapljive da dođu do olfaktornog sustava. Hrana je složena smjesa bogata prekursorima arome. S obzirom na način nastajanja, aromatični spojevi hrane dijele se u 3 skupine: primarne arome, sekundarne arome i neugodne arome. Primarne arome nastaju enzimski kataliziranim reakcijama u sirovoj hrani. Za razliku od njih, sekundarne arome nastaju termički tijekom procesa prerade hrane ili kao rezultat mikrobne aktivnosti u procesu fermentacije. Neugodne arome mogu biti različitog podrijetla no zajedničko im je da narušavaju prirodnu aromu hrane. Karakterističnom mirisu sira doprinose starter kulture stvarajući arome od laktoze, citrata, proteina i lipida.

Aroma sira definira se kao prisutnost ili odsutnost određenih aminokiselina, masnih kiselina, aldehida, ketona i estera. Okus sira ovisi o količini mliječne i propionske kiseline i soli. Primarno zrenje karakteristično je za polutvrde i tvrde sireve. Proces zrenja sastoji se od biokemijskih i mikrobioloških promjena. Njihova interakcija daje specifična senzorska svojstva siru. Složeni organski spojevi se tijekom biokemijskih promjena razgrađuju na jednostavnije pod utjecajem enzima u siru. Biokemijske promjene mogu biti primarne i sekundarne. Primarne promjene (proteoliza, lipoliza i glikoliza) odgovorni su za promjenu teksture sira i aromu. Sekundarne promjene (metabolizam masnih kiselina i aminokiselina) definiraju konačni miris i okus sira. Proteolizom se razgrađuje kazein što rezultira promjenom strukture sira. Proizvodnjom kratkih peptida i aminokiselina, olakšava se oslobađanje aromatskih spojeva iz unutrašnjosti sira i osiguravaju slobodne aminokiseline koje su supstrati za sekundarne promjene odgovorne za stvaranje arome. Lipoliza razgrađuje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol pod utjecajem lipaza. Dalje, hidrolizom masti nastaju slobodne masne kiseline. Katabolizmom masnih kiselina tijekom zrenja u sirevima nastaju sekundarni alkoholi, laktoni i kiseline koji čine aromu.²

1.5. Ljekovito i aromatično bilje

Aromatično bilje pripada skupini biljaka koje sadrže tvari koje ih čine pogodnima za razne primjene: terapijske svrhe, kemijsko-farmaceutske sinteze te u kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji. Neke od tih biljaka se koriste u proizvodnji lijekova, mirisa, kozmetike, pića, začina te kao konzervansi i sredstva za zaštitu bilja. Karakteristika aromatičnog bilja je da sadrže eterično ulje. Eterična ulja su sekundarni biljni metaboliti čija uloga i dalje nije razjašnjena u potpunosti, no zna se da imaju ekološku ulogu u biljnim interakcijama i smanjuje transpiraciju biljkama. Mogu biti pohranjena u endogenim ili egzogenim spremnicama. Maseni udio eteričnih ulja u aromatičnim biljkama iznosi najmanje 0,1 %, najčešće između 1-2 %, a u iznimnim slučajevima može biti čak i iznad 20 % kao kod lavande.³

1.5.1. Lavanda

Rodu *Lavandula* pripada 48 vrsta, a od toga tri vrste imaju veći gospodarski značaj. Najpoznatija i najduže uzgajana je prava lavanda, *L. angustifolia* Mill., koja je medicinska, mirisna i uskolisna (slika 2). Zatim širokolisna, muškarna *L. latifolia* Medic. te hibridna lavanda ili lavandin *L. intermedia* Emeric ap. Lois. koja je spontani hibrid te dvije vrste. Lavanda je višegodišnji polugrm guste razgranate stabljike smeđe boje. Listovi su izduženi sivozeleni i dlakavi. Modri cvjetovi su na vrhu grančica skupljeni u klas. Glavne aktivne tvari eteričnog ulja lavande su linalil-acetat i linalol. Cvijet sadrži 1-3 % eteričnog ulja (linalil-acetat, linalol, 1,8-cineol, kamfor), trjeslovine (5-10 %), kumarin, flavonoide, sterole, gorke tvari. Lavanda se koristi zbog svojih umirujućih svojstava.⁴



Slika 2. Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.)⁵

1.5.2. Kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je autohtona hrvatska biljka sa ljekovitim svojstvima (slika 3). Razgranato raste u visinu 50-90 cm. Ima odrvenjelu i četverobridnu stabljiku te lancetaste, srebrnozeleno listove. Na vrhovima stabljike nalaze se ljubičasti cvjetovi raspoređeni u pršljenove. Sve dijelove biljke karakterizira jak, aromatičan miris koji se ne gubi niti sušenjem. Nadzemni dio kadulje ima 1-2,5 % eteričnog ulja i to najviše u listovima. Glavne komponente ulja su: tujoni, 1,8-cineol, borneol, kamfor, tanini, glikozidi, smole i gorke tvari.⁴



Slika 3. Kadulja (*Salvia officinalis* L.)⁶

1.5.3. Bosiljak

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je jedna od najznačajnijih vrsta iz porodice usnjača (slika 4). Bogat je eteričnim uljima, ima značajnu primjenu kao začin, u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji i tradicionalnoj medicini. Eterično ulje bosiljka ima antibakterijska i antifugalna svojstva i koristi se kao antioksidans, insekticid i repelent. Glavne komponente eteričnog ulja su fenilpropanoidi: eugenol, kavikol i njihovi derivati i terpeni: linalol, metil-cinamat, estragol i dr.⁷



Slika 4. Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.)⁸

1.6. Metode izolacije hlapljivih spojeva

S obzirom da su hlapljivi spojevi nepolarne molekule, oni su netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Za izolaciju hlapljivih spojeva najčešće se koriste metode poput destilacije i ekstrakcije. Za izolaciju hlapljivih spojeva prehrambenih proizvoda, pa tako i sira, često se koristi metoda destilacija s dušikom i trapovima. Jedna od pogodnih ekstrakcijskih metoda za izolaciju hlapljivih spojeva sira je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME).

1.6.1. Destilacija

Destilacija je metoda kod koje se tekućina zagrijava i prelazi u paru, a para se hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Svrha destilacije je razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, njihova identifikacija, čišćenje tekućih stvari i otparavanje organskih otapala. Tri su vrste destilacije za izolaciju hlapljivih spojeva: vodena destilacija (hidrodestilacija), vodeno-parna destilacija te destilacija vodenom parom (parna destilacija).

1.6.1.1. Destilacija s dušikom i trapovima

Za destilaciju s dušikom i trapovima (engl. *nitrogen purge and steam distillation*, NPSD) koristi se aparatura koja se sastoji od posude s uzorkom na koju su spojene dvije staklene cijevi. Kroz jednu cijev ulazi čisti dušik, a kroz drugu izlazi dušik obogaćen hlapljivim spojevima uzorka. Korištenjem uljne kupelji osigurava se da je uzorak na konstantnoj temperaturi. Kako dušik struji kroz uzorak, tako se izdvajaju najhlapljivije komponentne koje zajedno s vodenom parom kondenziraju u seriji hladnih trapova. U ledenoj kupelji nalaze se tri trapa od kojih je prvi prazan, u drugom je dietil-eter, a u trećem trapu je pentan. Destilacija traje nekoliko sati. Po završetku, uzorak iz prvog trapa se ekstrahira eterom, dok se uzorci iz posljednja dva trapa samo suše.⁹

1.6.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja se koristi za izolaciju te pročišćavanje tvari iz otopine, emulzije, suspenzije ili krute smjese uz pomoć otapala. Otapalo mora biti kemijski inertno, imati visoku moć otapanja, različite gustoće od otopine, ne smije imati previsoko vrelište radi kako bi se lakše uklonilo i mora biti lako dostupno i jeftino. Najčešće korištena otapala su dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan. Dvije su osnovne vrste ekstrakcije: ekstrakcija tekuće-tekuće te ekstrakcija čvrsto-tekuće. Ekstrakcija tekuće-tekuće može biti diskontinuirana i izvodi se u lijevku za odjeljivanje te kontinuirana i izvodi se u komercijalno dostupnim ekstraktorima različite izvedbe. Ekstrakcija čvrsto-tekuće izvodi se zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom ili kao što je aparatura po Soxhlet-u.

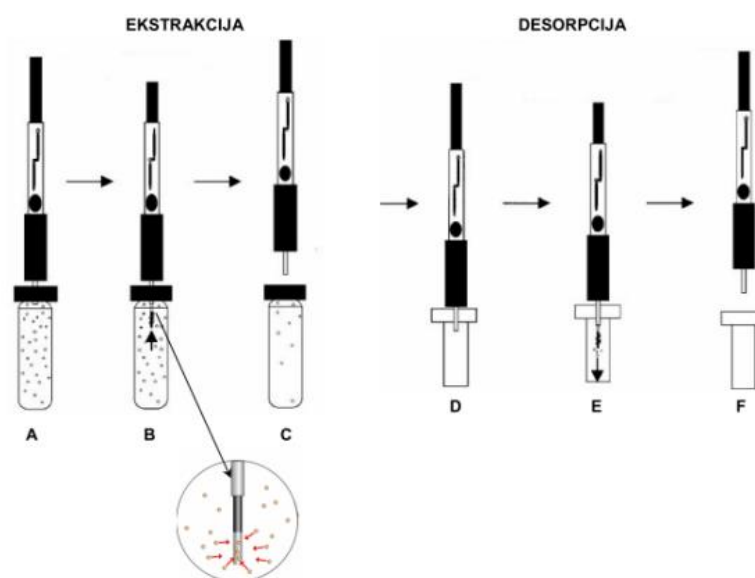
1.6.3. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike temelje se na razdiobi hlapljivih organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Najčešće korištene sorpcijske tehnike su: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.⁵

Najjednostavniji način izolacije aromatičnih spojeva je prikupljanje vršnih para (engl. *headspace*, HS). Vršne pare su hlapljivi spojevi koji se sakupljaju iznad uzorka. Metoda je pogodna za uzorke s intenzivnim mirisima, a za one materijale koji to nisu primjenjuje se blago zagrijavanje.¹⁰

1.6.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) tehnika je koja se najčešće upotrebljava za izolaciju aromatičnih spojeva. Tehnika koristi silikonsko vlakno dugo 1 ili 2 cm prekriveno polimernim filmom za sakupljanje isparljivih spojeva iz uzoraka. Vlakna mogu biti nepolarna, miješana ili polarna. Vlakno se nalazi u sastavu igle postavljene na SPME držač za uzorkovanje i desorpciju. U SPME posudu (tzv. vialicu) se postavlja uzorak i hermetički zatvara septom. U prostoru iznad uzorka se tijekom zagrijavanja sakupljaju hlapljivi spojevi tzv. vršne pare. Vlakno se uvodi u prostor iznad uzorka i adsorbira hlapljive spojeve. Zatim se vlakno uvlači u iglu, a vršne pare se desorbiraju izravnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa (slika 5)



Slika 5. Shematski prikaz osnovnih koraka kod HS-SPME¹¹

Koraci :

A - bušenje septe

B - ekstrakcija hlapljivih spojeva adsorpcijom na SPME vlaknu

C - uvlačenje vlakna u iglu

D - umetanje vlakna u GC injektor

E - desorpcija vršnih para

F - uvlačenje vlakna u iglu

Prednosti HS-SPME tehnike su što je brza i jednostavna za uporabu, nije potrebno otapalo te je dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju neželjenih hlapljivih spojeva u uzorku. Profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisi o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna te temperaturi i vremenu uzorkovanja. Kod usporedbe uzoraka najbolji rezultati se dobiju radom sa istim vlaknom na svim uzorcima.

1.7. Analiza hlapljivih spojeva

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je najčešće korištena i najmoćnija metoda za odjeljivanje smjesa hlapljivih spojeva. Plinski kromatograf sastoji se od: injektora uzoraka, kromatografske kolone u termostatiranom prostoru (peći) i detektora. Mobilna ili pokretna faza je inertni plin, a nepokretna faza je tekućina vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone). Uzorak u injektoru brzo i trenutno ispari, a plin nositelj (He) ga prenese od injektora preko kromatografske kolone do detektora. U kromatografskoj koloni vrši se odjeljivanje smjese. Uzorak mora biti hlapljiv i stabilan na temperaturi rada kolone kako bi analiza bila valjana. Detekcija se izvršava mjerenjima toplinske vodljivosti, plamene ionizacije, fotoionizacije, električne vodljivosti, spektrometrije masa, radioaktivnosti itd.³

Karakteristični podaci za svaki spoj iz kromatografske kolone na plinskom kromatogramu su: vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme, t_R) i površina pika. Retencijski indeks (RI) računa se preko retencijskog vremena i za svaki spoj je konstantan za pojedinu kromatografsku kolonu i jednake uvjete rada. Služi za identifikaciju tvari uz poznati RI standarda.³

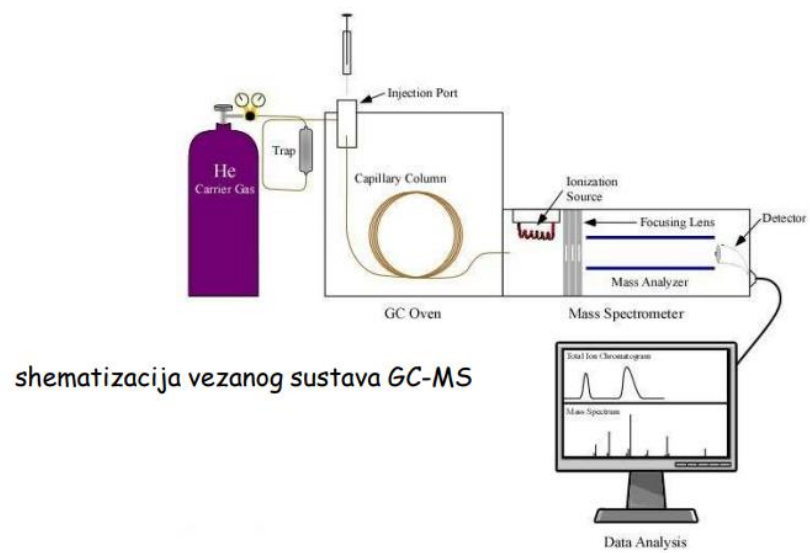
Masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda za identifikaciju i određivanje strukture organskih spojeva. Molekule se moraju ionizirati i potom se razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Svaka tvar ima svoj karakterističan spektar masa. Masenu spektrometriju odlikuju visoka osjetljivost i točnost.

1.7.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je učinkovita instrumentalna metoda za razdvajanje i strukturnu analizu hlapljivih spojeva uz korištenje minimalne količine uzorka. Plinska kromatografija je precizna za kvantitativnu analizu, dok je spektrometrija masa pogodna za kvalitativnu analizu. Povezivanjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa kao detektorom povećana je njihova specifičnost, preciznost te osjetljivost u redu pikogramskih i femtogramskih količina uzorka.¹²

Osnovni dijelovi svakog GC-MS uređaja su (slika 6):

- boca s plinom nositeljem
- injektor uzoraka
- peć s kromatografskom kolonom
- maseni detektor
- računalo.



shematizacija vezanog sustava GC-MS

Slika 6. Shematski prikaz GC-MS uređaja³

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

Za izradu ovog diplomskog rada korišten je punomasni tvrdi sir od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka te isti sir kojemu je dodano aromatično bilje u različitim udjelima, svi izrađeni 20. 10. 2022. (Livanjski sir sirane Puđa d.o.o., Trilj). Uzorci sira bili su:

sir bez dodataka - kontrola

sir s dodatkom lavande (kolekcijski nasad Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša) - 0,05 %, 0,25 % i 0,5 %

sir s dodatkom kadulje (kolekcijski nasad Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša) - 0,05 % i 0,25%

sir s dodatkom bosiljka (Agronomski fakultet u Zagrebu) - 0,05 %, 0,25 % i 0,5 %.



Slika 7. Uzorak sira

2.2. Kemikalije i aparatura

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga ADAM, model PGW 1502i, ADAM®, Velika Britanija
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom sa polimernim slojem sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS, sivo vlakno), Supelco, SAD
- magnetska miješalica Heidolph model MR Hei-End, s termostatom i temperaturnom probom EKT 3001, Heidolph, Njemačka
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS): plinski kromatograf model 7890A i spektrometar masa model 5975C, Agilent Technologies, SAD.

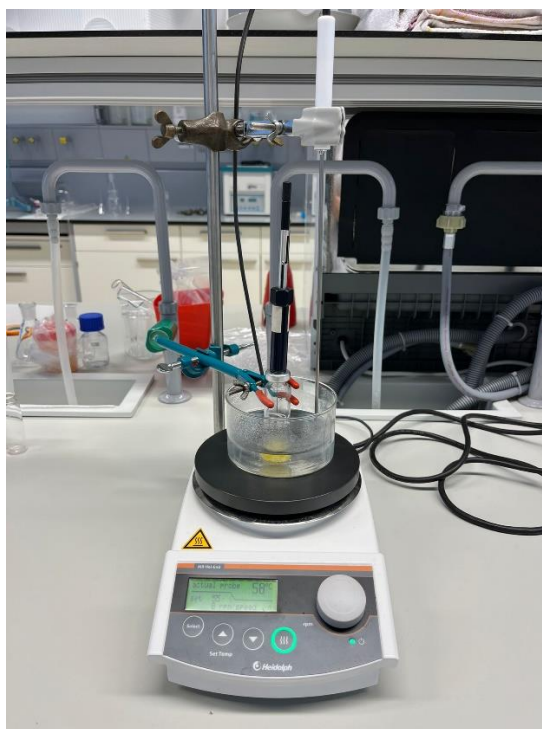
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi iz uzoraka sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna. Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi dobiveni su uzorci vršnih para koji su analizirani GC-MS metodom.

2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Hlapljivi spojevi sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi pri temperaturi od 60 °C. Za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi korišteno je sivo vlakno koje je prije ekstrakcije kondicionirano prema uputama proizvođača. Postupak kondicioniranja sastoji se od postavljanja SPME igle u injektor plinskog kromatografa pri temperaturi od 270 °C na 60 minuta. Svi uzorci pripremljeni su na isti način pri jednakoj temperaturi. U staklenu bočicu (vialicu) stavljeno je po 2 grama sira. Bočica s uzorkom je zatvorena septom i postavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 60 °C. Hlapljivi spojevi (vršne pare) iz uzorka tijekom 15 minuta termostiranja isparili su u prazni prostor iznad uzorka (*headspace* prostor). Kako bi se održala konstantna temperatura vodene kupelji korištena je magnetska miješalica (slika 8). Zatim je u prazni prostor iznad uzorka postavljen SPME držač s iglom sa sivim vlaknom

kako bi se adsorbirale vršne pare. Adsorpcija se odvijala 40 minuta. Nakon adsorpcije, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz staklene bočice i odmah umetnuto u injektor GC-MS uređaja (slika 9). Toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva u GC kolonu trajala je 10 minuta.



Slika 8. Magnetska miješalica s vodenom kupelji



Slika 9. SPME držač s iglom umetnutom u GC-MS injektor

2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih spojeva provedena je spregnutim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Analize uzoraka napravljene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), kemijskog sastava 5 % difenil i 95 % dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm unutarnji promjer te debljine sloja stacionarne faze 0,2 μm . Plin nositelj bio je helij protoka 1 mL/min, temperatura injektora 250 °C, omjer cijepanja 1:5, temperatura detektora 280 °C, energija ionizacije 70 eV. Temperaturni program pri kojem se odvijalo odjeljivanje sastojaka vršnih para na HP-5MS koloni plinskog kromatografa bio je: 2 min pri 70 °C, zatim je temperatura rasla do 200 °C brzinom od 3 °C/min i pri toj temperaturi 2 min.



Slika 10. GC-MS uređaj

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiven je: kromatogram ukupne ionske struje (engl. *total ion chromatogram*, TIC), vrijeme zadržavanja svake komponente (t_R), relativni udio svake komponente (u %) i naziv spojeva čiji je spektar najbližnji spektru nepoznate komponente. Pojedinačne komponente identificirane su usporedbom masenih spektara s masenim spektrima iz dviju komercijalnih baza podataka: Wiley 9 i NIST 17.

3. REZULTATI

Rezultati analiza hlapljivih spojeva arome testnih sireva, sira bez dodatka i sireva s dodatkom aromatičnih biljaka lavande, bosiljka i kadulje, prikazani su u tablicama 1 – 4B. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME. Analiza izoliranih spojeva provedena je plinskom kromatografijom na nepolarnoj koloni (HP-5MS) uz spektrometriju masa kao metodu detekcije. HS-SPME/GC-MS analize svih uzoraka ponovljene su tri puta. U tablicama je dan kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u pojedinim uzorcima testnih sireva. Prikazana je srednja vrijednost udjela identificiranih spojeva i standardna devijacija. Udjeli identificiranih spojeva su relativni, odnosno to su udjeli površine pika identificiranog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Spojevi su poredani prema redoslijedu ispiranja s kromatografske kolone.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja

SD – standardna devijacija

/ - standardnu devijaciju nije moguće izračunati

* - točan izomer nije određen

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

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira bez dodatka (kontrola)

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) \pm SD
1.	etanol	1,445	3,30 \pm 1,063689
2.	octena kiselina	1,557	6,99 \pm 0,502096
3.	propanska kiselina	1,901	9,46 \pm 0,433128
3.	metil-izotiocijanat	2,234	1,48 \pm 0,571664
4.	butanska kiselina	2,602	13,25 \pm 0,321299
5.	pentanska kiselina	3,633	0,26 \pm 0,083267

6.	heptan-2-on	3,917	3,97 ± 0,10116
7.	heptan-2-ol	4,063	1,59 ± 0,600528
8.	benzaldehyd	5,484	0,29 ± 0,115902
9.	sabinen	5,809	1,69 ± 0,642106
10.	heksanska kiselina	6,253	20,56 ± 1,431049
11.	etil-heksanoat	6,423	0,80 /
12.	limonen	7,375	6,59 ± 2,710615
13.	<i>trans</i> -β-ocimen	7,624	0,64 ± 0,295014
14.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,25 ± 0,025166
15.	γ-terpinen	8,346	0,09 ± 0,015275
16.	heptanska kiselina	8,877	0,26 ± 0,047258
17.	non-8-en-2-on	9,159	0,36 ± 0,043589
18.	nonan-2-on	9,471	2,77 ± 0,182483
19.	linalol	9,757	0,51 ± 0,089629
20.	nonanal	9,921	0,12 ± 0,034641
21.	alocimen*	10,864	0,10 /
22.	oktanska kiselina	13,120	18,66 ± 8,7669
23.	etil-oktanoat	13,561	0,44 ± 0,015275
24.	dodekan	13,638	0,29 ± 0,060828
25.	nonanska kiselina	16,598	0,06 /
26.	undekan-2-on	17,551	0,17 ± 0,026458
27.	dekanska kiselina	20,840	3,12 ± 0,756395
28.	etil-dekanoat	21,802	0,07 /
29.	δ-dekalakton	25,732	0,30 ± 0,046188
30.	dodekanska kiselina	28,438	0,10 ± 0,030551
31.	δ-dodekalakton	33,709	0,09 ± 0,015275

Tablica 2A. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % lavande

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) \pm SD
1.	etanol	1,445	4,24 \pm 2,118498
2.	octena kiselina	1,557	8,77 \pm 0,525579
3.	propanska kiselina	1,901	9,84 \pm 0,35171
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,50 \pm 0,513907
5.	butanska kiselina	2,602	13,58 \pm 1,338108
6.	etil-butanoat	2,651	1,08 /
7.	3-metilbutanska kiselina ^{a,*}	3,050	0,54 \pm 0,285132
8.	2-metilbutanska kiselina ^{a,*}	3,172	0,36 /
9.	pentanska kiselina	3,633	0,36 \pm 0,15308
10.	heptan-2-on	3,917	2,65 \pm 0,633114
11.	heptan-2-ol	4,063	1,18 \pm 0,244404
12.	benzaldehyd	5,484	0,23 \pm 0,026458
13.	heksanska kiselina	6,253	22,26 \pm 1,445902
14.	limonen	7,375	5,67 \pm 1,891278
15.	<i>trans</i> - β -ocimen	7,624	0,53 \pm 0,200749
16.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,38 \pm 0,095349
17.	heptanska kiselina	8,877	0,33 \pm 0,028868
18.	non-8-en-2-on	9,159	0,15 \pm 0,040415
19.	nonan-2-on	9,471	1,42 \pm 0,337244
20.	linalol	9,766	0,56 \pm 0,087369
21.	nonanal	9,921	0,14 \pm 0,045826
22.	2-feniletanol	10,257	0,11 /
23.	borneol	12,309	0,15 \pm 0,025166
24.	oktanska kiselina	13,120	14,99 \pm 3,694121
25.	etil-oktanoat	13,576	0,63 \pm 0,092376
26.	dodekan	13,651	0,24 \pm 0,040415
27.	nonanska kiselina	16,598	0,13 \pm 0,01
28.	undekan-2-on	17,551	0,15 \pm 0,015275

29.	dekanska kiselina	20,840	4,68 ± 1,236986
30.	etil-dekanoat	21,802	0,20 ± 0,040415
31.	tetradekan	21,933	0,10 ± 0
32.	δ -dekalakton	25,732	0,33 ± 0,06245
33.	dodekanska kiselina	28,438	0,20 ± 0,161967
34.	δ -dodekalakton	33,709	0,11 ± 0,030551

Tablica 2B. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,25 % lavande

Redni Broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) ± SD
1.	etanol	1,445	3,97 ± 0,510033
2.	octena kiselina	1,557	7,03 ± 1,540433
3.	propanska kiselina	1,901	7,31 ± 1,160014
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,10 ± 0,401123
5.	butanska kiselina	2,602	11,45 ± 1,591446
6.	etil-butanoat	2,651	0,89 ± 0,374477
7.	pentanska kiselina	3,633	0,29 ± 0,045092
8.	heptan-2-on	3,917	2,67 ± 0,348186
9.	heptan-2-ol	4,063	0,95 ± 0,410041
10.	benzaldehyd	5,484	0,19 ± 0,023094
11.	heksanska kiselina	6,253	19,92 ± 0,28746
12.	etil-heksanoat	6,423	1,17 /
13.	limonen	7,375	3,57 ± 1,852278
14.	1,8-cineol	7,464	0,29 ± 0
15.	<i>trans</i> - β -ocimen	7,624	0,40 ± 0,217945
16.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,69 ± 0,098489
17.	<i>cis</i> - β -ocimen	7,955	0,10 ± 0,01
18.	γ -terpinen	8,351	0,09 ± 0,026458

19.	oktan-1-ol*	8,680	0,11 ± 0,025166
20.	<i>cis</i> -linalol-oksid	8,818	0,39 ± 0,132791
21.	non-8-en-2-on	9,159	0,27 ± 0,078102
22.	<i>trans</i> -linalol-oksid	9,373	0,25 ± 0,04
23.	nonan-2-on	9,471	1,94 ± 0,25
24.	linalol	9,766	8,97 ± 0,810021
25.	kamfor	11,476	0,20 ± 0,017321
26.	borneol	12,309	1,65 ± 0,109697
27.	terpinen-4-ol	12,760	3,65 ± 0,105987
28.	oktanska kiselina	13,120	11,79 ± 6,377
29.	α -terpineol	13,302	0,69 /
30.	etil-oktanoat	13,576	0,80 ± 0,110151
31.	dodekan	13,651	0,21 ± 0,043589
32.	linalil-acetat	15,985	2,15 ± 0,101527
33.	nonanska kiselina	16,598	0,06 ± 0,005774
34.	lavandulil-acetat	17,452	0,10 ± 0,02
35.	undekan-2-on	17,551	0,19 ± 0,07
36.	heksil-tiglat ^{a,*}	19,098	0,11 /
37.	dekanska kiselina	20,840	3,30 ± 1,091238
38.	etil-dekanoat	21,802	0,22 ± 0,025166
39.	kariofilen	22,693	0,12 ± 0,015275
40.	kumarin	23,278	0,10 ± 0,02
41.	β -farnezen*	24,249	0,09 ± 0
42.	δ -dekalakton	25,732	0,26 ± 0,017321
43.	dodekanska kiselina	28,438	0,15 ± 0,051316
44.	δ -dodekalakton	33,709	0,10 ± 0,005774

Tablica 2C. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,5 % lavande

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) \pm SD
1.	etanol	1,445	2,26 \pm 0,418609
2.	octena kiselina	1,557	6,31 \pm 1,710039
3.	propanska kiselina	1,901	6,80 \pm 1,296765
4.	metil-izotiocijanat	2,234	0,94 \pm 0,472864
5.	butanska kiselina	2,602	7,32 \pm 1,159325
6.	etil-butanoat	2,651	0,35 \pm 0,125033
7.	heptan-2-on	3,917	2,19 \pm 0,646555
8.	heptan-2-ol	4,063	0,59 \pm 0,198578
9.	benzaldehyd	5,484	0,23 \pm 0,056569
10.	heksanska kiselina	6,253	11,19 \pm 0,920942
11.	etil-heksanoat	6,423	0,53 \pm 0,232451
12.	limonen	7,375	2,66 \pm 1,580854
13.	1,8-cineol	7,464	0,43 \pm 0,055076
14.	<i>trans</i> - β -ocimen	7,624	0,35 \pm 0,185831
15.	2-fenilacetaldehyd	7,844	1,04 \pm 0,300721
16.	<i>cis</i> - β -ocimen	7,955	0,17 \pm 0,050332
17.	γ -terpinen	8,351	0,11 \pm 0,017321
18.	oktan-1-ol*	8,680	0,15 \pm 0,017321
19.	<i>cis</i> -linalol-oksidi	8,818	0,61 \pm 0,07
20.	non-8-en-2-on	9,159	0,25 \pm 0,034641
21.	<i>trans</i> -linalol-oksidi	9,373	0,49 \pm 0,020817
22.	nonan-2-on	9,471	1,74 \pm 0,314802
23.	linalol	9,766	18,18 \pm 3,220254
24.	kamfor	11,476	0,61 \pm 0,105987
25.	borneol	12,309	2,83 \pm 0,215948
26.	terpinen-4-ol	12,760	4,41 \pm 0,545008
27.	oktanska kiselina	13,120	7,15 \pm 2,037212
28.	α -terpineol	13,302	0,74 \pm 0,070711

29.	heksil-butanoat	13,371	0,65 ± 0,106066
30.	etil-oktanoat	13,576	0,52 ± 0,014142
31.	heksil-2-metilbutanoat ^{a,*}	15,202	0,23 ± 0,041633
32.	heksil-3-metilbutanoat ^{a,*}	15,404	0,12 ± 0,094516
33.	linalil-acetat	15,985	6,14 ± 0,848842
34.	lavandulil-acetat	17,452	0,28 ± 0,036056
35.	undekan-2-on	17,551	0,15 ± 0,045826
36.	heksil-tiglat ^{a,*}	19,098	0,25 ± 0,079373
37.	neril-acetat ^a	20,506	0,16 ± 0,100167
38.	dekanska kiselina	20,840	3,23 ± 1,028931
39.	geranil-acetat ^a	21,298	0,11 ± 0,056862
40.	etil-dekanoat	21,802	0,17 ± 0,036056
41.	kariofilen	22,693	0,25 ± 0,045826
42.	kumarin	23,278	0,16 ± 0,015275
43.	β -farnezen*	24,249	0,25 ± 0,096437
44.	δ -dekalakton	25,732	0,22 ± 0,075056
45.	dodekanska kiselina	28,438	0,17 ± 0,10116
46.	δ -dodekalakton	33,709	0,07 ± 0,040415

Tablica 3A. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % bosiljka

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) ± SD
1.	etanol	1,445	4,32 ± 0,405832
2.	octena kiselina	1,557	6,93 ± 1,985925
3.	propanska kiselina	1,901	8,38 ± 2,93869
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,43 ± 0,226789
5.	butanska kiselina	2,602	9,43 ± 1,617354
6.	etil-butanoat	2,651	0,94 ± 0,39
7.	heptan-2-on	3,917	4,27 ± 1,019035

8.	heptan-2-ol	4,063	1,44 ± 0,511566
9.	benzaldehyd	5,484	0,71 ± 0,286182
10.	sabinen	5,801	1,88 /
11.	heksanska kiselina	6,253	16,13 ± 2,730513
12.	etil-heksanoat	6,423	2,97 ± 1,13697
13.	limonen	7,375	5,96 ± 3,345211
14.	1,8-cineol	7,464	0,18 ± 0,077675
15.	<i>trans</i> -β-ocimen	7,624	0,59 ± 0,312623
16.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,49 ± 0,233524
17.	<i>cis</i> -β-ocimen	7,955	0,09 /
18.	γ-terpinen	8,351	0,10 /
19.	heptanska kiselina	8,877	0,21 ± 0,02
20.	non-8-en-2-on	9,159	0,26 ± 0,047258
21.	nonan-2-on	9,471	2,06 ± 0,451331
22.	linalol	9,766	1,95 ± 0,545008
23.	nonanal	9,921	0,25 /
24.	α-tujon	10,014	0,14 ± 0,055076
25.	aloocimen*	10,864	0,10 ± 0,026458
26.	kamfor	11,476	0,09 /
27.	oktanska kiselina	13,120	19,69 ± 14,04437
28.	etil-oktanoat	13,576	1,64 ± 0,162583
29.	dodekan	13,651	0,29 ± 0,110151
30.	nonanska kiselina	16,598	0,04 ± 0
31.	undekan-2-on	17,551	0,16 ± 0,047258
32.	eugenol	20,170	0,12 ± 0,011547
33.	dekanska kiselina	20,840	3,35 ± 0,547753
34.	etil-dekanoat	21,802	0,39 ± 0,098658
35.	δ-dekalakton	25,732	0,26 ± 0,025166
36.	γ-kadinen*	26,473	0,13 /
37.	dodekanska kiselina	28,444	0,11 ± 0,037859
38.	δ-dodekalakton	33,709	0,09 /

Tablica 3B. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,25 % bosiljka

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) \pm SD
1.	etanol	1,445	3,29 \pm 1,081403
2.	octena kiselina	1,557	6,76 \pm 1,140234
3.	propanska kiselina	1,901	9,20 \pm 0,592312
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,45 \pm 0,28006
5.	butanska kiselina	2,602	10,38 \pm 0,727942
6.	etil-butanoat	2,651	0,61 \pm 0,092916
7.	heptan-2-on	3,917	3,21 \pm 0,497896
8.	heptan-2-ol	4,063	0,57 \pm 0,250067
9.	benzaldehyd	5,484	0,69 \pm 0,232451
10.	sabinen	5,801	1,80 /
11.	heksanska kiselina	6,253	13,32 \pm 3,620331
12.	etil-heksanoat	6,423	8,20 \pm 5,798209
13.	limonen	7,375	5,04 \pm 3,408269
14.	1,8-cineol	7,464	0,45 \pm 0,092916
15.	<i>trans</i> - β -ocimen	7,624	0,50 \pm 0,350428
16.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,98 \pm 0,22053
17.	<i>cis</i> - β -ocimen	7,955	0,11 /
18.	γ -terpinen	8,351	0,11 /
19.	heptanska kiselina	8,877	0,28 \pm 0,032146
20.	non-8-en-2-on	9,159	0,29 \pm 0,096437
21.	nonan-2-on	9,471	2,01 \pm 0,144338
22.	linalol	9,766	5,05 \pm 1,247117
23.	nonanal	9,921	0,15 \pm 0,07
24.	alocimen*	10,864	0,11 /
25.	oktanska kiselina	13,120	17,49 \pm 9,076145
26.	α -terpineol	13,302	0,35 /

27.	etil-oktanoat	13,576	1,13 ± 0,041633
28.	dodekan	13,651	0,29 ± 0,091652
29.	nonanska kiselina	16,598	0,08 /
30.	bornil-acetat	17,223	0,10 ± 0,020817
31.	undekan-2-on	17,551	0,24 ± 0,02
32.	eugenol	20,170	0,49 ± 0,047258
33.	dekanska kiselina	20,840	4,31 ± 1,669341
34.	β -elemen	21,611	0,06 /
35.	etil-dekanoat	21,802	0,38 ± 0,020817
36.	α -bergamoten*	23,372	0,08 ± 0,020817
37.	germakren D	25,169	0,04 /
38.	δ -dekalakton	25,732	0,34 ± 0,060277
39.	γ -kadinen*	26,473	0,09 /
40.	dodekanska kiselina	28,438	0,21 ± 0,147309
41.	δ -dodekalakton	33,709	0,10 ± 0,064291

Tablica 3C. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,5 % bosiljka

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) ± SD
1.	etanol	1,445	3,19 ± 0,285015
2.	octena kiselina	1,557	5,96 ± 0,823954
3.	propanska kiselina	1,901	8,57 ± 1,028251
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,24 ± 0,109697
5.	butanska kiselina	2,602	9,19 ± 0,965263
6.	etil-butanoat	2,651	0,92 ± 0,183576
7.	3-metilbutanska kiselina ^{a,*}	3,050	0,25 ± 0,15695
8.	heptan-2-on	3,917	5,25 ± 1,531415
9.	heptan-2-ol	4,063	0,58 ± 0,12
10.	benzaldehyd	5,484	0,57 ± 0,040415

11.	sabinen	5,801	1,3 ± 0,200083
12.	heksanska kiselina	6,253	14,91 ± 2,356275
13.	etil-heksanoat	6,423	2,40 ± 0,518588
14.	limonen	7,375	4,84 ± 0,933292
15.	1,8-cineol	7,464	1,10 ± 0,193132
16.	<i>trans</i> -β-ocimen	7,624	0,50 ± 0,090738
17.	2-fenilacetaldehid	7,844	1,06 ± 0,28006
18.	<i>cis</i> -β-ocimen	7,955	0,12 ± 0,032146
19.	γ-terpinen	8,351	0,10 /
20.	heptanska kiselina	8,877	0,23 ± 0,052915
21.	non-8-en-2-on	9,159	0,60 ± 0,175024
22.	nonan-2-on	9,471	4,02 ± 0,930448
23.	linalol	9,766	10,19 ± 1,647979
24.	nonanal	9,921	0,15 ± 0,030551
25.	2-feniletanol	10,257	0,12 /
28.	alocimen*	10,864	0,09 /
27.	kamfor	11,476	0,08 /
28.	oktanska kiselina	13,120	12,95 ± 5,703183
29.	α-terpineol	13,302	0,36 /
30.	etil-oktanoat	13,576	1,28 ± 0,064291
31.	dodekan	13,651	0,26 ± 0,043589
32.	nonanska kiselina	16,598	0,08 /
33.	bornil-acetat	17,223	0,21 ± 0,032146
34.	undekan-2-on	17,551	0,30 ± 0,072111
35.	eugenol	20,170	1,07 ± 0,315647
36.	dekanska kiselina	20,840	2,60 ± 0,627402
37.	β-elemen	21,611	0,13 ± 0,055678
38.	etil-dekanoat	21,802	0,36 ± 0,080208
39.	tetradekan	21,933	0,08 ± 0
40.	α-bergamoten*	23,372	0,19 ± 0,085049
41.	germakren D	25,169	0,10 /
42.	δ-dekalakton	25,732	0,25 ± 0,064291

43.	γ -kadinen*	26,473	0,16 /
44.	dodekanska kiselina	28,438	0,11 \pm 0,017321
45.	δ -dodekalakton	33,709	0,08 /

Tablica 4A. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % kadulje

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) \pm SD
1.	etanol	1,445	1,99 \pm 0,720625
2.	octena kiselina	1,557	7,26 \pm 0,991077
3.	propanska kiselina	1,901	10,43 \pm 1,556931
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,36 \pm 0,210792
5.	butanska kiselina	2,602	11,53 \pm 1,900272
6.	etil-butanoat	2,651	0,52 /
7.	heptan-2-on	3,917	4,88 \pm 0,921466
8.	heptan-2-ol	4,063	0,89 \pm 0,288271
9.	α -pinen	4,893	0,29 \pm 0,159478
10.	kamfen	5,248	0,47 \pm 0,225389
11.	benzaldehyd	5,484	0,18 \pm 0,047258
12.	sabinen	5,801	1,46 \pm 0,315119
13.	heksanska kiselina	6,253	15,39 \pm 1,31371
14.	etil-heksanoat	6,423	0,82 \pm 0,005774
15.	<i>p</i> -cimen	7,258	0,17 \pm 0,051316
16.	limonen	7,375	7,41 \pm 1,594125
17.	1,8-cineol	7,464	0,67 \pm 0,165025
18.	<i>trans</i> - β -ocimen	7,624	0,78 \pm 0,250599
19.	2-fenilacetaldehyd	7,844	0,88 \pm 0,266896
20.	<i>cis</i> - β -ocimen	7,955	0,10 \pm 0,015275
21.	γ -terpinen	8,346	0,11 \pm 0,015275

22.	heptanska kiselina	8,877	0,20 ± 0,037859
23.	non-8-en-2-on	9,159	0,70 ± 0,159478
24.	nonan-2-on	9,471	4,65 ± 0,822131
25.	linalol	9,766	0,63 ± 0,037859
26.	nonanal	9,921	0,13 ± 0,015275
27.	α -tujon	10,014	2,73 ± 0,896456
28.	β -tujon	10,416	0,32 ± 0,147309
29.	alocimen*	10,864	0,10 ± 0,035119
30.	kamfor	11,476	2,00 ± 0,461122
31.	borneol	12,309	0,34 ± 0,085049
32.	oktanska kiselina	13,120	13,63 ± 2,302803
33.	etil-oktanoat	13,576	1,13 ± 0,590028
34.	dodekan	13,651	0,31 ± 0,060828
35.	dekanal	13,896	0,07 /
36.	nonanska kiselina	16,598	0,13 ± 0,092376
37.	bornil-acetat	17,223	0,26 ± 0,086603
38.	undekan-2-on	17,551	0,30 ± 0,060277
39.	dekanska kiselina	20,840	3,02 ± 0,975551
40.	etil-dekanoat	21,802	0,16 ± 0,017321
41.	tetradekan	21,933	0,07 /
42.	kariofilen	22,693	tr /
43.	α -humulen	24,049	0,23 ± 0,135769
44.	δ -dekalakton	25,732	0,23 ± 0,045092
45.	dodekanska kiselina	28,438	0,14 /
46.	δ -dodekalakton	33,709	0,09 /

Tablica 4B. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira s dodatkom 0,25 % kadulje

Redni broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) ± SD
------------	------	-------------	---------------

1.	etanol	1,445	2,28 ± 0,22301
2.	octena kiselina	1,557	6,72 ± 1,105004
3.	propanska kiselina	1,901	8,60 ± 1,312593
4.	metil-izotiocijanat	2,234	1,07 ± 0,566657
5.	butanska kiselina	2,602	9,05 ± 0,596769
6.	etil-butanoat	2,651	0,79 ± 0,299555
7.	heptan-2-on	3,917	2,56 ± 0,922894
8.	heptan-2-ol	4,063	0,67 ± 0,20502
9.	α-pinen	4,893	0,88 ± 0,073711
10.	kamfen	5,248	1,40 ± 0,104403
11.	benzaldehyd	5,484	0,15 ± 0,07
12.	sabinen	5,801	1,03 ± 0,408207
13.	heksanska kiselina	6,253	10,65 ± 0,875386
14.	etil-heksanoat	6,423	1,63 ± 0,72148
15.	α-terpinen	6,958	0,08 ± 0,02
16.	<i>p</i> -cimen	7,258	0,51 ± 0,133167
17.	limonen	7,375	6,32 ± 2,952643
18.	1,8-cineol	7,464	2,03 ± 0,500233
19.	<i>trans</i> -β-ocimen	7,624	0,56 ± 0,37072
20.	2-fenilacetaldehyd	7,844	1,15 ± 0,388887
21.	<i>cis</i> -β-ocimen	7,955	0,09 /
22.	γ-terpinen	8,346	0,21 ± 0,036056
23.	heptanska kiselina	8,877	0,16 ± 0,065064
24.	non-8-en-2-on	9,159	0,28 ± 0,045826
25.	α-terpinolen	9,349	0,30 ± 0,073711
26.	nonan-2-on	9,471	2,08 ± 0,517333
27.	linalol	9,766	0,80 ± 0,132035
28.	nonanal	9,921	0,13 /
29.	α-tujon	10,014	8,10 ± 1,571189
30.	β-tujon	10,416	1,01 ± 0,196977
31.	alocimen*	10,864	0,09 /
32.	kamfor	11,476	5,67 ± 0,837397

33.	borneol	12,309	1,02 ± 0,176163
34.	oktanska kiselina	13,120	11,20 ± 7,295768
35.	α-terpineol	13,302	0,21 /
36.	etil-oktanoat	13,576	1,45 ± 0,049329
37.	dodekan	13,651	0,22 ± 0,075056
38.	nonanska kiselina	16,598	0,10 /
39.	bornil-acetat	17,223	0,66 ± 0,072111
40.	undekan-2-on	17,551	0,24 ± 0,06245
41.	dekanska kiselina	20,840	2,54 ± 1,91374
42.	etil-dekanoat	21,802	0,31 ± 0,100167
43.	kariofilen	22,693	0,09 /
44.	α-humulen	24,049	0,65 ± 0,255343
45.	δ-dekalakton	25,732	0,20 ± 0,137477
46.	dodekanska kiselina	28,438	0,15 /
47.	veridiflorol	29,435	0,12 /
48.	etil-dodekanoat	29,632	0,06 /
49.	δ-dodekalakton	33,709	0,12 /

4. RASPRAVA

Sir je jedan od najpopularnijih fermentiranih mliječnih proizvoda koji se proizvodi širom svijeta. Jedan od najvažnijih kriterija na temelju kojeg potrošači biraju pojedini sir je njegova aroma. Općenito, aroma se definira kao kombinirana impresija okusa i mirisa. Spojevi koji su odgovorni za aromu, nositelji arome, mogu se podijeliti u dvije skupine: one koji su odgovorni za okus i one odgovorne za miris. Spojevi odgovorni za okus su općenito nehlapljivi pri sobnoj temperaturi, dok su za miris odgovorni hlapljivi spojevi.¹³

U ovom radu istražen je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva nositelja arome punomasnog tvrdog sira od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka te istog sira kojemu je dodano aromatično bilje, lavanda, bosiljak i kadulja, u različitim udjelima. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi, a njihova analiza plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa. Sve analize ponovljene su tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

4.1. Hlapljivi spojevi sira

Kemijski sastav i sadržaj, odnosno udio hlapljivih spojeva izoliranih HS-SPME metodom iz punomasnog tvrdog sira od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka prikazan je u tablici 1. Identificiran je trideset jedan (31) spoj. Glavni sastojci vršnih para ovog sira su karboksilne kiseline. Najzastupljenije karboksilne kiseline su heksanska (20,56 %), oktanska (18,66 %), butanska (13,25 %), propanska (9,46 %) i octena kiselina (6,99 %). Butanska, heksanska i oktanska kiselina spadaju u skupinu zasićenih masnih kiselina kratkog ugljikovodičnog lanca ($C_4 - C_8$). Ove kiseline se češće nazivaju trivijalnim imenima. Tako je trivijalno ime butanske kiseline maslačna kiselina, heksanska je kapronska kiselina, a oktanska kaprilna kiselina. Osim navedenih masnih kiselina identificirane su i zasićene masne kiseline srednje dugog ugljikovodičnog lanca ($C_{10} - C_{12}$), dekanska ili kaprinska kiselina (3,12 %) te dodekanska ili laurinska kiselina (0,10 %). Navedene masne kiseline uobičajeni su, važni, a često i dominantni, sastojci spojeva arome mnogih sireva. Većina ih nastaje lipolizom mliječne masti ili procesom fermentacije laktoze ili mliječne kiseline. Slobodne masne kiseline kratkog i srednje dugog ugljikovodičnog lanca ($C_4 - C_{12}$) direktno pridonose aromi sireva, ali su i prekusori drugih hlapljivih spojeva arome kao što su alkoholi, karbonilni spojevi (metilketoni i aldehidi), laktioni i esteri.^{14,15} Propanska i octena kiselina ne spadaju u skupinu masnih kiselina, ali su također

uobičajeni hlapljivi spojevi nositelji arome sireva. U uzorku su identificirane i druge karboksilne kiseline, ali s udjelima < 1,0 %. To su pentanska, heptanska i nonanska kiselina. Ostali kvantitativno važni spojevi u ovom uzorku su ketoni heptan-2-on (3,97 %) i nonan-2-on (2,77 %) te alkohol etanol (3,30 %).

Među hlapljivim spojevima sira od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka identificirano je šest (6) terpena: monoterpeni ugljikovodici sabinen, limonen, *trans*- β -ocimen, γ -terpinen i aloocimen te monoterpeni alkoholi linalol. Najzastupljeniji među njima je limonen (6,59 %), a slijedi sabinen (1,69 %). Terpenski spojevi vjerojatno su dospjeli u mlijeko iz aromatičnog bilja koje životinje pojedu zajedno s travom.

4.2. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom lavande

U tablicama 2A – 2C dan je profil hlapljivih spojeva punomasnog sira od miješanog kravljeg i ovčjeg mlijeka kojemu je dodana lavanda u udjelu 0,05 %, 0,25 %, odnosno 0,5 %. Što je udio lavande u siru veći, veći je i broj identificiranih hlapljivih spojeva. Tako su u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % lavande identificirana trideset četiri (34) spoja, u siru s dodatkom 0,25 % lavande četrdeset četiri (44) spoja, a u siru s dodatkom 0,5 % lavande četrdeset šest (46) hlapljivih spojeva.

Glavni spojevi u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % lavande su isti spojevi kao i u uzorku sira bez dodatka, masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca heksanska (22,26 %), oktanska (14,99 %) i butanska kiselina (13,58 %) te propanska (9,84 %) i octena kiselina (8,77 %). Identificirane su i masne kiseline srednje dugog ugljikovodičnog lanca, dekanska i dodekanska kiselina s udjelom 4,68 %, odnosno 0,21 %. Interesantno i neočekivano je da su u ovom uzorku identificirana samo četiri spoja iz skupine terpena i to monoterpeni ugljikovodici limonen i *trans*- β -ocimen te monoterpeni alkoholi linalol i borneol. Najzastupljeniji, kao i u siru bez dodatka lavande, je limonen s udjelom 5,67 %. Udio ostalih terpena bio je manji od 1 %.

Među hlapljivim spojevima sira s dodatkom 0,25 % lavande također dominiraju masne kiseline, heksanska (19,92 %), oktanska (11,79 %) i butanska kiselina (11,45 %), a slijede propanska (7,31 %) i octena kiselina (7,03 %). I u ovom uzorku su identificirane dekanska i dodekanska kiselina s udjelom 3,30 %, odnosno 0,15 %. Međutim, u ovom uzorku sira identificirano je šesnaest (16) terpena: limonen, 1,8-cineol, *trans*- i *cis*- β -ocimen, γ -terpinen, *cis*- i *trans*-linalol-oksid, linalol, kamfor, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, linalil-acetat, lavandulil-acetat,

kariofilen i β -farnezen. Najzastupljeniji terpeni bili su monoterpenski alkoholi linalol (8,97 %) i terpinen-4-ol (3,65 %), monoterpenski ugljikovodik limonen (3,57 %) i monoterpenski ester linalil-acetat (2,15 %).

Za razliku od sireva s dodatkom 0,05 % i 0,25 % lavande, glavni spoj identificiran u siru s dodatkom 0,5 % lavande je monoterpenski alkohol linalol (18,18 %). Kvantitativno važni hlapljivi spojevi i u ovom siru su masne kiseline heksanska (11,19 %), oktanska (7,15 %) i butanska kiselina (7,32 %) te propanska (6,80 %) i octena kiselina (6,31 %). Udio dekanske kiseline bio je 3,23 %, a dodekanske 0,17 %. U ovom uzorku identificirano je osamnaest (18) terpena: limonen, 1,8-cineol, *trans*- i *cis*- β -ocimen, γ -terpinen, *cis*- i *trans*-linalol-oksid, linalol, kamfor, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, linalil-acetat, lavandulil-acetat, neril-acetat, geranil-acetat, kariofilen i β -farnezen. Osim linalola, količinski važni terpeni su i linalil-acetat (6,14 %), terpinen-4-ol (4,41 %) borneol (2,83 %) i limonen (2,66 %).

Što se tiče terpena, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da što je udio lavande u siru veći, veći je i broj i udio hlapljivih spojeva iz skupine terpena.

4.3. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom bosiljka

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih iz sira s dodatkom 0,05 %, 0,25 % i 0,5 % bosiljka prikazan je u tablicama 3A – 3C. Kao i prethodno, što je udio bosiljka u siru veći, veći je i broj identificiranih hlapljivih spojeva. Tako je u vršnim parama sira s dodatkom 0,05 % bosiljka identificirano trideset osam (38) spoja, u siru s dodatkom 0,25 % bosiljka četrdeset jedan (41) spoj, a u siru s dodatkom 0,5 % bosiljka četrdeset pet (45) hlapljivih spojeva.

Što se tiče kemijskog sastava, i u sirevima s dodatkom bosiljka prevladavaju karboksilne kiseline i to posebno masne kiseline. Glavni hlapljivi spojevi u siru s 0,05 % bosiljka su oktanska (19,69 %), heksanska (16,13 %) i butanska kiselina (9,43 %), a slijede ostale karboksilne kiseline propanska (8,38 %) i octena kiselina (6,93 %). Identificirane su i dekanska (3,35 %) i dodekanska kiselina (0,11 %). Glavni spojevi u siru u koji je dodano 0,25 % bosiljka također su oktanska (17,73 %), heksanska (13,32 %) i butanska kiselina (10,38 %) te propanska (9,20 %) i octena kiselina (6,76 %). Udio dekanske kiseline bio je 4,31 %, a dodekanske 0,21 %. Udio masnih kiselina u siru s 0,5 % bosiljka je: heksanska 14,91 %, oktanska 12,95 % i butanska 9,19 %, dekanska 2,60 % i dodekanska kiselina 0,11 %. Heksanska i oktanska

kiselina su ujedno i glavni hlapljivi spojevi u ovom siru. Udio propanske i octene kiseline je također visok i iznosi 8,57 %, odnosno 5,96 %.

Što se tiče terpenskih spojeva, vrijedi isto što je navedeno prethodno za sireve s dodatkom lavande; što je udio bosiljka u siru veći, veći je i broj i udio hlapljivih spojeva iz skupine terpena. Tako je u siru s 0,05 % bosiljka identificirano jedanaest terpena (11), u siru s 0,25 % bosiljka četrnaest (14) terpena, a u siru s 0,5 % bosiljka petnaest (15) terpena. Terpeni identificirani u siru s najmanjim udjelom bosiljka su: sabinen, limonen, 1,8-cineol, *trans*- i *cis*- β -ocimen, γ -terpinen, *cis*- i *trans*-linalol-oksid, linalol, α -tujon, aloocimen, kamfor i γ -kadinen. Najzastupljeniji terpen u ovom siru je monoterpenski ugljikovodik limonen (5,96 %), a slijede sabinen (1,88 %) i linalol (1,95 %). Udio ostalih terpena je manji od 1,0 %. U siru s 0,25 % bosiljka identificirani su sljedeći terpeni: sabinen, limonen, 1,8-cineol, *trans*- i *cis*- β -ocimen, γ -terpinen, linalol, aloocimen, α -terpineol, bornil-acetat, β -elemen, α -bergamoten, germakren D i γ -kadinen. Najzastupljeniji terpeni u ovom uzorku su monoterpenski ugljikovodik limonen (5,04 %) i monoterpenski linalol (5,05 %), dok su ostali terpeni identificirani s udjelima manjim od 1,0 %. U siru s 0,5 % bosiljka identificirani su isti terpeni kao i u siru s 0,25 % bosiljka te još i kamfor, ali u vrlo maloj količini, gotovo u tragovima. Glavni terpen u ovom uzorku je linalol (10,19 %), a slijede limonen (4,84 %), sabinen (1,33 %) i 1,8-cineol (1,10 %). Ostali terpeni identificirani su s udjelima manjim od 1,0 %.

4.4. Hlapljivi spojevi sira s dodatkom kadulje

U tablicama 4A i 4B dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u siru s dodatkom 0,05 % i 0,25 % kadulje. U siru s dodatkom 0,05 % kadulje identificirano je četrdeset šest (46) hlapljivih spojeva, a u siru s 0,25 % kadulje četrdeset devet (49) spojeva. Kao i prethodno, što je udio kadulje u siru veći, veći je i broj identificiranih hlapljivih spojeva. Kao i u svim uzorcima sira, bilo bez dodatka ili s dodatkom aromatičnog bilja, glavni hlapljivi spojevi sira s 0,05 % kadulje su masne kiseline heksanska (15,39 %), oktanska (13,63 %) i butanska kiselina (11,53 %), a visok je i udio propanske (10,43 %) i octene kiseline (7,26 %). Udio preostale dvije masne kiseline, dekanska i dodekanska bio je 3,02 %, odnosno 0,14 %. U ovom uzorku sira identificirano je osamnaest (18) terpena: α -pinen, kamfen, sabinen, *p*-cimen, limonen, 1,8-cineol, *trans*- i *cis*- β -ocimen, γ -terpinen, linalol, α - i β -tujon, aloocimen, kamfor, borneol, bornil-acetat, kariofilen i α -humulen. Glavni spojevi iz ove skupine su monoterpenni i to

ugljikovodici limonen (7,41 %) i sabinen (1,46 %) te ketoni α -tujon (2,73 %) i kamfor (2,00 %).

U siru s 0,25 % kadulje također dominiraju karboksilne kiseline. Kao i u svim istraženim sirevima glavni hlapljivi spojevi su masne kiseline oktanska (11,20 %), heksanska (10,65 %) i butanska kiselina (9,05 %) te propanska (8,60 %) i octena kiselina (6,72 %). I u ovom uzorku identificirane su dekanska (2,54 %) i dodekanska kiselina (0,15 %). U ovom siru identificiran je najveći broj terpena od svih istraženih uzoraka sira, dvadeset dva (22) spoja. I ukupni udio terpena je veći nego u ostalim sirevima i iznosi 31,83 %. Glavni terpeni su α -tujon (8,10 %), limonen (6,32 %) i kamfor (5,67 %). Terpeni s udjelima iznad 1,00 % su 1,8-cineol (2,03 %), kamfen (1,40 %), sabinen (1,03 %), β -tujon (1,01 %) i borneol (1,02 %). I za sireve s dodatkom kadulje vrijedi prethodno navedeno; što je udio kadulje u siru veći, veći je i broj i udio hlapljivih spojeva iz skupine terpena.

5. ZAKLJUČAK

- Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi u kombinaciji s plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (HS-SPME/GC-MS) je pogodna za istraživanje profila hlapljivih spojeva, odnosno kemijskog sastava i udjela hlapljivih spojeva odgovornih za aromu sira.
- U sirevima s dodatkom aromatičnog bilja identificiran je veći broj hlapljivih spojeva nego u siru bez dodatka. Općenito vrijedi: što je udio aromatične biljke u siru veći, veći je i broj identificiranih hlapljivih spojeva.
- Glavni hlapljivi spojevi u svim ispitanim punomasnim sirevima od miješanog ovčjeg i kravljeg mlijeka, kako siru bez dodatka tako i sirevima s dodatkom aromatičnih biljaka lavande, bosiljka i kadulje u količini od 0,05, 0,25 i 0,050 %, su karboksilne kiseline. U svim uzorcima prevladavaju zasićene masne kiseline kratkog ugljikovodičnog lanca (C₄ – C₈) butanska, heksanska i oktanska kiselina, a identificirane su i zasićene masne kiseline srednje dugog ugljikovodičnog lanca (C₁₀ – C₁₂) dekanska i dodekanska. Navedene masne kiseline uobičajeni su, važni, a često i dominantni, sastojci spojeva arome mnogih sireva.
- Osim masnih kiselina, kvantitativno važni sastojci svih ispitanih sireva su i propanska i octena kiselina. Propanska i octena kiselina ne spadaju u skupinu masnih kiselina, ali su također uobičajeni hlapljivi spojevi nositelji arome sireva.
- Među hlapljivim spojevima sira bez dodanog aromatičnog bilja identificirano je šest terpena. Terpenski spojevi vjerojatno su dospjeli u mlijeko iz aromatičnog bilja koje životinje pojedu zajedno s travom.
- Očekivano, u sirevima s dodatkom aromatičnih biljaka identificiran je veći broj terpena nego u siru bez dodatka. Izuzetak je sir s 0,05 % lavande.
- Što se tiče terpena, za sve sireve s dodatkom aromatičnog bilja vrijedi isto: što je udio pojedine aromatične biljke u siru veći, veći je i broj i udio hlapljivih spojeva iz skupine terpena.

6. LITERATURA

1. *B. Matijević*, Sirarstvo u teoriji i praksi, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015.
2. *T. Lojbl*, Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
3. *I. Jerković*, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirani nastavni materijal (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.
4. *B. Dorbić, E. Friganović, M. Slipčević, M. Davitovska, Z. Bogevska, A. Vujošević*, Senzorska procjena oparaka od aromatičnog bilja, Glasilo future, (2019) **2** str. 1-76.
5. URL: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0284/2450/products/lavendar_580x.jpg?v=1501098611 (4.9.2023.)
6. URL: <http://www.val-znanje.com/images/stories/ljekovitobilje/132-kadulja.jpg> (4.9.2023)
7. *K. Carović-Stanko, M. Petek, M. Grdiša, T. Karadžija, I. Kolak, Z. Šatović*, Utjecaj folijarne gnojidbe na prinos kultivara bosiljka (*O. Basilicum L.*), **1** Glasnik zaštite bilja, (2011).
8. URL: <https://3.bp.blogspot.com/-7nXFe3KcgbU/UyVR7icRgNI/AAAAAAAAASGU/oNQus-vfj64/s1600/IMG2649.JPG> (4.9.2023.)
9. *I. Jerković*, Kemija aroma, recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
10. *M. Zekić*, Kemija aroma, nerecenzirani nastavni materijal (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.
11. *I. Jerković, A. Radonić*, Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2009.
12. *K. Magdalenić*, Analiza hlapljivih spojeva iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2020.
13. *H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle*, Food Chemistry, Springer, Berlin, 2009, str. 340.
14. *Y. W Park*, Proteolysis and Lipolysis of Goat Milk Cheese, *J. Dairy Sci.* **84** (2001) E84-E92, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70202-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70202-0).

15. *Y. F. Collins, P. L. H. McSweeney, M. G. Wilkinson*, Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge, *Int. Dairy J.* **13** (2003) 841–866, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2).