

# Hlapljivi spojevi sira iz mišine određeni pomoću destilacije sa dušikom i trapovima

---

Šaban, Petra

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:730487>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE ODREĐENI POMOĆU  
DESTILACIJE SA DUŠIKOM I TRAPOVIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**PETRA ŠABAN**

**595**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE ODREĐENI POMOĆU  
DESTILACIJE SA DUŠIKOM I TRAPOVIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**PETRA ŠABAN**

**Matični broj: 595**

**Split, rujan 2021.**

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

**VOLATILES FROM CHEESE IN A SACK DETERMINED BY  
NSPD**

**BACHELOR THESIS**

**PETRA ŠABAN**

**Parent number : 595**

**Split, rujan 2021.**

## TEMELJNJA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko - tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

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

**Mentor :** Doc. dr. sc. Marina Zekić

### HLAPLJIVI SPOJEVI SIRA IZ MIŠINE ODREĐENI POMOĆU DESTILACIJE SA DUŠIKOM I TRAPOVIMA

Petra Šaban, 595

#### Sažetak :

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je destilacija s dušikom i trapovima. Hlapljivi spojevi sakupljeni su u tri različita trapa tijekom 3 h i tijekom 6 h. Dobiveni uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Najzastupljeniji spojevi u svim uzorcima su ugljikovodici, bilo da se radi o aromatskim, ravnolančanim ili razgranatim ugljikovodicima.

**Ključne riječ :** sir iz mišine, hlapljivi spojevi, destilacija sa dušikom i trapovima, GC-MS

**Rad sadrži :** 39 strana, 15 slika, 3 tablice, 0 priloga, 16 referenci

**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         | mentor      |

**Datum obrane :** 28. rujna 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom ( pdf format ) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 ( Ruđera Boškovića 35).**

## BASIC DOCUMENTARION 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, session no. 6

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

### VOLATILE FROM CHEESE IN A SACK DETERMINED BY NSPD

Petra Šaban, 595

#### **Abstract:**

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 nitrogen purge and steam distillation. Volatiles were collected in three different traps during 3 h and 6 h. The obtained samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. The most common compounds in all samples were hydrocarbons, whether aromatic, straight-chain or branched hydrocarbons.

**Keywords:** cheese in a sack, volatiles, NSPD, GC-MS

**Thesis contains:** 39 pages, 15 figures, 3 tables, 0 supplements, 16 references

**Original in** Croatian

#### **Defense committee :**

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

**Defense date:** September 28 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 svibnja do rujna 2021. godine.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Zekić na pruženoj prilici, pristupačnosti i korisnim savjetima koji su mi pomogli pri izradi ovog završnog rada. Također se želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na potpori, motivaciji i strpljenju tokom dosadašnjeg studiranja.*

## ***ZADATAK ZAVRŠNOG RADA***

Zadatak rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve kravljeg sira iz mišine odgovorne za aromu sira. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je destilacija s dušikom i trapovima. Hlapljivi spojevi sakupljeni su u tri različita trapa tijekom 3 h i tijekom 6 h. Na taj način je dobiveno 6 uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

## **SAŽETAK**

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je destilacija s dušikom i trapovima. Hlapljivi spojevi sakupljeni su u tri različita trapa tijekom 3 h i tijekom 6 h. Dobiveni uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Najzastupljeniji spojevi u svim uzorcima su ugljikovodici, bilo da se radi o aromatskim, ravnolančanim ili razgranatim ugljikovodicima.

**Ključne riječ :** sir iz mišine, hlapljivi spojevi, destilacija sa dušikom i trapovima,  
GC-MS

## **SUMMARY**

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 nitrogen purge and steam distillation. Volatiles were collected in three different traps during 3 h and 6 h. The obtained samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. The most common compounds in all samples are hydrocarbons, whether aromatic, straight-chain or branched hydrocarbons.

**Keywords :** cheese in a sack, volatiles, nitrogen purge and steam distillation-NSPD, GC-MS

## SADRŽAJ :

UVOD.....	1
1.1. Povijesni razvoj sirarstva .....	2
1.2. Sir kao prehrambeni i zdravstveni fenomen .....	4
1.3. Sir kao kulturni i vjerski fenomen .....	5
1.4. Sir - definicija i podjela .....	5
1.4.1. Podjela i glavne vrste sira.....	6
1.5. Sir iz mišine .....	8
1.6. Biokemijski procesi tijekom zrenja sira .....	10
1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	13
1.8.1. Destilacija sa dušikom i trapovima .....	13
1.8.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	14
1.9. Identifikacija izoliranih hlapljivih spojeva.....	15
1.9.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	16
2. EKSPRIMENTALNI DIO .....	18
2.1. Sir iz mišine .....	18
2.2. Kemikalije i aparatura .....	18
2.2.1. Destilacija sa dušikom i trapovima .....	19
2.2.2. GC/MS analiza hlapljivih spojeva.....	20
3. REZULTATI.....	22
4. RASPRAVA .....	32
5. ZAKLJUČAK .....	37
6. LITERATURA.....	39

## UVOD

Sir je poseban oblik očuvanja mlijeka, namirnica životinjskog podrijetla koja se svakodnevno koristi u prehrani. Prvi sirevi načinjeni su od ovčjeg i kozjeg mlijeka oko 4 000 g. pr. Krista. Važnu ulogu u dugotrajnosti gotovog proizvoda ima pasterizacija mlijeka, ali osnovni proces proizvodnje do danas nije bitno promijenjen. Glavni sastojak sira su proteini, bogat je izvor vitamina i mineralnih tvari. Aroma sira je glavna karakteristika i parametar kvalitete sira tijekom degustacije. Osnovni biokemijski procesi tijekom zrenja sira su : proteoliza, lipoliza, glikoliza i metabolizam citrata.<sup>1-4</sup>

Tehnološka proizvodnja sira ima dva cilja: proizvesti sir željenih senzorskih osobina (vanjski izgled, boja, presjek, konzistencija, miris i okus) te postaviti tehnološki lako ponovljivi protokol koji će davati sir istih osobina. Tijekom proizvodnje sirevi se kategoriziraju prema vrsti mlijeka iz kojeg se proizvedeni, načinu koagulacije, konzistenciji, količini masti u suhoj tvari i prema zrenju.<sup>5,6</sup>

Sir iz mišine je polutvrđi tradicionalni autohtoni hrvatski sir duge tradicije proizvodnje, a najčešće se proizvodi od ovčjeg mlijeka. Tradicionalno se sir iz mišine dobiva koagulacijom sirovog ili pasteriziranog punomasnog ovčjeg mlijeka bez upotrebe mljekarske kulture. U proizvodnji sira koristi se janjeća koža, lokalnog naziva mišina ili mješina, u kojoj sir zrije.<sup>4</sup>

## 1. OPĆI DIO

### 1.1. Povijesni razvoj sirarstva



Slika 1. Sir<sup>7</sup>

Sir (slika 1) je namirnica životinjskog podrijetla koja se svakodnevno koristi u prehrani, a omogućava poseban način očuvanja mlijeka kao osnovnog sastojka. Vještina proizvodnje sira razvijala se stoljećima sa ciljem dobivanja što kvalitetnijeg proizvoda. Prvi sirevi načinjeni su od ovčjeg i kozjeg mlijeka jer su krave, konji i deve pripitomljene kasnije, oko 4 000 g. pr. Krista. Značajnim razdobljem za proizvodnju sira smatra se srednji vijek. Sumerani su ostavili prve pisane i materijalne dokaze o proizvodnji sira na glinenim pločicama ispisanim klinastim pismom. Za sir su koristili riječ *ga-ar*. Poznavali su oko 20 vrsta sira, a dijelili su ih na bijeli, svježi i bogati sir. Babilonci su kao osnovnu riječ za sir koristili *eqidum*, a za sir intenzivnog mirisa *nagabu* ili smrdljivi sir. U sireve su dodavali vino, začinsko bilje i datulje. Egipćani su sir nazivali *rwt*, a pretpostavlja se da su poznavali dvije vrste sira. Rim je civilizacija koja je najviše doprinijela razvoju sira i njegovom širenju.

Većina sireva koje danas poznajemo nastali su u srednjem vijeku, a glavna mjesta proizvodnje bili su grčki otok Kreta i sjeverne planine Grčke. Uglavnom su se proizvodili sirevi od kozjeg i ovčjeg mlijeka, koji su bili slični današnjem feta siru. Veliki utjecaj na povijest sira imala je i Katolička Crkva. U samostanima su se proizvodili sirevi i ljubomorno čuvali njihovi recepti. Samo je glavni opat znao čitav postupak, a znanje je prenosio na svojeg nasljednika.



Svaki samostan i feudalno imanje su razvijali vlastitu proizvodnju, a sirevi su imena dobivali prema nazivu samostana ili mjesta gdje je počela njihova proizvodnja.

Renesansa je jedan od najznačajnijih pokreta u kulturi Europe, ali sirarstvo u ovom razdoblju nije doživjelo promjene. Plemstvo je sir smatralo nezdravom hranom nižih staleža, dok ga je puk konzumirao kao i prije. Crkvena reforma u 16. stoljeću odrazila se i na proizvodnju sira. Pojava protestantizma i nastanak Anglikanske Crkve te sukob Henrika VII. s papom doveli su do raspuštanja samostana u Engleskoj. Redovnici su bili prisiljeni pronaći posao što je doprinijelo širenju receptura sira nižim staležima.

Industrijska proizvodnja sira započela je u drugoj polovici 19. stoljeća. Prva industrijska sirana otvorena je u New Yorku 1851. godine, a u Europi u Londonu 1870. godine. Danski farmaceut Christian D. Ak. Hansen razvio je postupak dobivanja čistog i standardiziranog sirila iz želudca mladih telića 1872. godine, za što je dobio nagradu u obliku zlatne medalje te se smatra prvim osnivačem industrijske proizvodnje sirila.

Moderno doba proizvodnje sira započinje završetkom prve industrijske revolucije. Osnova procesa nije bitno promijenjena, ali je omogućena veća proizvodnja količine sira, ujednačenje kvalitete i veća sigurnost za potrošače. Intenzivan razvoj znanosti objasnio je kemijske, biokemijske i mikrobiološke procese koji se događaju tijekom sirenja i zrenja sira. Brojne tehničke inovacije su olakšale proizvodnju, smanjile potrebu za ljudskom radnom snagom i omogućile dobivanje većih količina sira.

Moderno doba smatra se renesansom sirarstva. Suvremeno sirarstvo karakterizira razvoj kemijskih metoda za kontrolu kvalitete mlijeka, ali i postupaka proizvodnje sira. Prvu metodu za određivanje masti u hrani razvio je Franz Soxhlet (1879.), a Niklaus Gerber je razvio metodu koja se danas smatra standardnom. Proteini su osnovni sastojak sira i o njihovom sadržaju ovisi prinos sira te je glavni cilj znanstvenika bio razviti metodu za određivanje proteina. U tome je uspio Johan Kjeldahl 1883. godine, a metoda se koristi i danas uz djelomičnu modifikaciju. Istraživanja Louisa Pasteura u mikrobiologiji dala su novi smjer razvoju proizvodnje sira. Dokazao je da su mikroorganizmi uzročnici fermentacije, otkrio je bakterije mliječne kiseline koje su značajne za proces sirenja i zrenja te bakterije maslačne fermentacije

koje uzrokuju kvarenje sira. Razvio je postupak zagrijavanja mlijeka kako bi uništio većinu prisutnih patogenih bakterija. U suradnji s Claudeom Bernardom patentirao je postupak pasterizacije. Pasterizacija je standardni postupak obrade mlijeka u proizvodnji sira, provodi se toplinskom obradom na temperaturama nižim od 100 °C. Gustaf de Laval je patentirao separator za vrenje čime je omogućio standardizaciju masti u mlijeku i siru. Separator se koristi i danas u mljekarstvu uz određene modifikacije.

Iako je 20. stoljeće omogućilo industrijsku proizvodnju velikih količina sira i drugih mliječnih proizvoda, u 21. stoljeću se sve više ljudi okreće tradicionalnom načinu proizvodnje sira za kojim je sve veća potražnja na tržištu.<sup>1</sup>

## **1.2. Sir kao prehrambeni i zdravstveni fenomen**

Mlijeko, fermentirano mlijeko i sir su osnova pravilne prehrane, izvor su hranjivih tvari koje organizam može lako probaviti, ali i užitak za brojne gurmane. Sir je koncentrirani izvor proteina visoke biološke vrijednosti te je poželjna svakodnevna konzumacija u prehrani djece i odraslih. Kao glavni sastojak sadrži proteine, bogat je izvor vitamina (vitamini A, D, E, K i vitamini B skupine: B1, B2, B6, B9 i B12), ali i mineralnih tvari osobito kalcija, fosfora i magnezija. Sir pozitivno djeluje na očuvanje zubne cakline te štiti zube od karijesa. U usnoj šupljini dolazi do neutralizacije kiseline koja nastaje nakon razgradnje ugljikohidrata u ustima, potiče se lučenje sline i smanjuje prijanjanje bakterija na zubnu površinu, smanjuje se demineralizacija cakline te dolazi do remineralizacije cakline kazeinom, kalcijem i fosforom. Tijekom proizvodnje sira nastaje i žuto-zelenkasta tekućina, koja se izdvaja iz sirovine nakon koagulacije kazeina od mlijeka, a naziva se sirutka i predstavlja važan prehrambeni proizvod.<sup>2</sup>

### 1.3. Sir kao kulturni i vjerski fenomen

Vrijednost sira prepoznale su brojne vjere. Drevni Grci smatrali su sir hranom bogova, ali i osnovom preživljavanja. Najraniji i najznačajniji zapis o proizvodnji sira spominje se u Odiseji napisanoj oko 700. god. pr. Kr., grčkom epu koji se pripisuje pjesniku Homeru.

U IX. pjevanju epa, opisujući susret Odiseja i Kiklopa Polifema na Siciliji, Homer je napisao: „Hrabro smo ušli u spilju i dobro je razgledali. Kao u nekom spremištu stajale su košare pune sira i sve su posude, bačve i zdjelice bile napunjene ovčjom sirutkom. U stajama su bili kozlići i janjci, brižno raspoređeni prema starosti.”

Kasnije Homer opisuje i kako Polifem izrađuje svježi sir te ga stavlja na sušenje u košaru od rogoza. Sir kao hranu cijene i Židovi i kršćani što se može vidjeti u Starom zavjetu gdje se sir spominje kao vrijedna hrana ali i kao poklon.<sup>2</sup>

### 1.4. Sir - definicija i podjela

Prema „Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva“ (2009.) sirevi se definiraju kao 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 može definirati i kao fermentiran ili nefermentiran proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka, obranog mlijeka ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina te otjecanjem sirutke (uz dodatak sirila ili nekoga drugog zamjenskog enzima zgrušavanja).

S obzirom na sadržaj vode u bezmasnoj suhoj tvari, razlikuju se ekstra tvrdi, tvrdi, polutvrđi, meki i svježi sirevi, a s obzirom na sadržaj masti u suhoj tvari ekstramasni, punomasni, masni, polumasni i posni sirevi. Sirevi se dijele i prema načinu zrenja na sireve koji zriju: pretežno s bakterijama u unutrašnjosti, pretežno s bakterijama na površini, pretežno s plijesnima u unutrašnjosti i pretežno s plijesnima na površini. Postoje i sirevi koji ne zriju.

Tehnološka proizvodnja sira ima dva cilja: proizvesti sir željenih senzorskih osobina (vanjski izgled, boja, presjek, konzistencija, miris i okus) te postaviti tehnološki lako ponovljivi protokol koji će davati sir istih osobina.

U proizvodnji sira, mlijeko se može zgrušati na tri načina:

1. Primjenom sirila ili nekoga drugog zamjenskog proteolitičkog enzima, što se koristi u proizvodnji većine sireva koji zriju i nekih svježih sireva.
2. Prirodnim zakiseljavanjem (izoelektričnom precipitacijom) kod pH 4,6 najčešće proizvodnjom mliječne kiseline djelovanjem bakterija mliječne kiseline, što se koristi u proizvodnji svježih sireva.
3. Dodavanjem organskih kiselina u mlijeko zagrijano na 80 do 96 °C, što se koristi u proizvodnji kuhanih sireva.<sup>5</sup>

#### 1.4.1. Podjela i glavne vrste sira



**Slika 2.** Vrste sira<sup>8</sup>

Brojne vrste sira (slika 2) nazvane su po mjestu podrijetla, razlikuju se po obliku i po dodanim aromama dok su osnovna tehnologija proizvodnje i glavna svojstva vrlo slični. Zbog toga se smatra da, iako se u svijetu proizvodi između 400 i 1000 specifičnih vrsta sira, zapravo postoji samo 18 posve različitih vrsta sira.

Sirevi se mogu podijeliti prema vrsti mlijeka iz kojeg se proizvode, prema načinu koagulacije, prema načinu konzistencije, prema količini masti u suhoj tvari i prema zrenju. Najčešće se rade od kravljeg, zatim od ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka. Također, postoje sirevi od mješavine mlijeka pri čemu se uglavnom kravlje mlijeko miješa s nekom drugom vrstom mlijeka. To se mora deklarirati na samom siru.

Prema načinu koagulacije sirevi se dijele na:

- kisele,
- slatke
- miješane sireve.

Kiseli sirevi proizvedeni su fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline ili dodatkom kiseline u mlijeko za sirenje, slatki sirevi proizvedeni su dodatkom sirila, a miješani kombiniranjem ova dva načina sirenja.

Prema konzistenciji sirevi se razlikuju s obzirom na udio vode, odnosno suhe tvari u masi sira bez masti.

Dijele se na :

- jako tvrde,
- tvrde,
- polutvrde,
- polumeke
- meke, odnosno svježije sireve.

Jako tvrdi sirevi imaju manje od 50 % vode i u ovu skupinu spadaju npr. Parmesan i Paški sir. Tvrđi sirevi imaju između 49 i 56 % vode i tu spadaju Emmentaler i Cheddar. Polutvrđi sirevi imaju između 54 i 63 % vode i tu spada Gouda i Trapist. Polumečki sirevi imaju između 61 i 69 % vode i tu spadaju Brie i Gorgonzola. Meki sirevi imaju više od 67 % vode.

Prema količini masti u suhoj tvari sira dijele se na :

- vrlo masne sireve (više od 60 %),

- punomasne (45 – 60 %),
- polomasne (25 – 45 %),
- malomasne (10 – 25 %)
- posne sireve (manje od 10 %).

Sirevi se mogu podijeliti i prema zrenju. Razlikuju se sirevi bez zrenja, sirevi koji zriju uz pomoć bakterija te sirevi koji zriju uz pomoć plijesni. Sirevi bez zrenja su nakon proizvodnje odmah spremni za konzumaciju. To su svježi sir, Mozzarella te zrnati svježi sir. Sireve sa zrenjem uz bakterije čine gotovo svi sirevi koji prolaze fazu zrenja. Pri tome bakterijske kulture mogu biti aktivne pretežno na površini sira, pretežno u unutrašnjosti sira, a postoji i zrenje u salamuri. Kod sireva sa zrenjem uz plemenite plijesni, one mogu biti na površini sira (bijeke plijesni), u unutrašnjosti sira (plave ili zelene plijesni), a ponekad se istovremeno kombiniraju obje vrste plijesni.<sup>6</sup>

## 1.5. Sir iz mišine

Sir iz mišine (slika 3) je polutvrđi tradicionalni autohtoni hrvatski sir duge tradicije proizvodnje koja se prenosila s koljena na koljeno. Najčešće se proizvodi od ovčjeg mlijeka, ali i kravljeg i kozjeg te mješavina mlijeka. Proizvodnja je usko vezana za područje Dalmacije, točnije za područje Zadarske, Šibensko-kninske i Splitsko-dalmatinske županije. Dalmacija je pogodna za proizvodnju sira iz mišine zbog suhe i vruće sub-mediteranske i mediteranske klime te brdovitog terena sa specifičnim botaničkim sastavom brojnih mediteranskih vrsta. Na spomenutom području najbrojnija pasmina ovaca je dalmatinska pramenka i njeni križanci jer je otporna i prilagodljiva na vremenske uvjete. Mlijeko dobiveno mužnjom dalmatinske pramenke bogatog je kemijskog sastava i odlično je za proizvodnju sira iz mišine.

Prvi pisani dokument o siru iz mišine je „Sirarstvo u Dalmaciji“, autora Ljudevita Tejkala iz 1913. godine.

Tradicionalno se sir iz mišine dobiva koagulacijom sirovog ili pasteriziranog punomasnog ovčjeg mlijeka bez upotrebe mljekarske kulture. U proizvodnji sira koristi se janjeća koža, lokalnog naziva mišina ili mješina, u kojoj sir zrije.



**Slika 3.** Sir iz mišine<sup>9</sup>

Danas se sir iz mišine proizvodi sirenjem punomasnog ili obranog ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka ili njihovih mješavina. Najčešća je proizvodnja na malim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, koja uzgajaju i životinje za proizvodnju mlijeka. Međutim, sir iz mišine se može proizvesti i u industrijskim uvjetima iz pasteriziranog mlijeka uz korištenje mezofilne mljekarske kulture. Sir iz mišine je spreman za konzumiranje nakon 30 do 60 dana, ali najbolju kvalitetu pokazuje nakon 45 dana. Janjeća koža u proizvodnji sira iz mišine ima ulogu medija za zrenje sira, te se posebna pozornost posvećuje njenoj pripremi.

Tehnologija proizvodnje sira iz mišine još uvijek nije standardizirana te zbog toga postoje razlike u određenim fazama proizvodnje ovisno na kojem se gospodarstvu sir proizvodi. Prvi korak u proizvodnji je sirenje iz pasteriziranog ili nepasteriziranog mlijeka. Ako se u proizvodnji koristi pasterizirano mlijeko uglavnom se primjenjuju dvije vrste pasterizacije. Prva je niska pasterizacija koja se odvija na 63-65 °C oko 30 minuta. Druga vrsta pasterizacije vrši se na 72 °C oko 15 minuta. Ako se sirenje vrši iz nepasteriziranog mlijeka ono mora biti odgovarajuće mikrobiološke kvalitete.

Mlijeko se prije sirenja filtrira kako bi se uklonio dio mikroorganizama i vidljive nečistoće. Temperatura sirenja, neovisno o tome koje se mlijeko koristi, varira između 32 i 37 °C. Sirilo u prahu potrebno je razmutiti u 200 mL destilirane vode sobne temperature na svakih 100 L mlijeka kako bi se potaknula njegova aktivacija u roku 30 minuta do jednog sata. Nakon približno pola sata potrebno je provjeriti čvrstoću gruša. Sirna lopatica uranja se u grušu i

podigne prema gore. Ukoliko je grušanje gotovo, gruša 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. Nakon završene koagulacije gruša se reže kutljačom u nepravilne oblike ili nožem u pravilne kocke približne veličine 3x3 cm. Zatim se sirno zrno zagrijava kako bi se otpustila zaostala sirutka, a tijekom procesa koristi se temperatura između 34 i 40 °C. Veličina sirnog zrna nakon sušenja ima oblik lješnjaka ili oraha. Slijedi ručno oblikovanje sirne grude u sirutki, njeno zamatanje i cijedenje u sirnoj marami postupkom samoprešanja. Cijeli postupak traje približno 5 sati. Nakon prešanja sir se soli krupnom morskom soli i slaže se u mišinu u slojevima na način da što manje prostora ostane između grumenata sira. Posebno je važno tijekom punjenja u mišinu sir dobro sabiti i istisnuti sav zrak iz mišine te tako prevenirati moguće kvarenje sira. Ako nije napravljena dovoljna količina sira za cijelu mišinu, postupno se puni sljedeći dan. Zrenje sira odvija se na temperaturama između 16 i 18 °C, dok je relativna vlažnost zraka 65- 80 %. Mišinu je potrebno njegovati i svaki dan brisati vlažnom krpom radi skidanja plijesni. Također je potrebno okretati mišinu prvih nekoliko dana nakon punjenja, a kasnije svaka 2 dana.<sup>4</sup>

## **1.6. Biokemijski procesi tijekom zrenja sira**

Procesi koji se odvijaju tijekom zrenja sira obuhvaćaju biokemijske i mikrobiološke promjene čijom kombinacijom nastaju senzorska svojstva sira. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, rast nestarterske mikrobne populacije i rast sekundarne mikroflore. Biokemijske promjene tijekom zrenja sira dijele se na primarne i sekundarne. Primarne promjene u sirevima odgovorne su za osnovne promjene teksture, a sekundarne promjene formiraju konačni miris i okus sira.

Osnovni biokemijski procesi tijekom zrenja sira su :

- proteoliza,
- lipoliza
- glikoliza



- metabolizam citrata ( kod nekih sireva).

Proteoliza, lipoliza i glikoliza uključuju razgradnju masti, proteina i laktoze. Svaki od ovih procesa doprinosi promjeni teksture sira, a odgovorni su i za osnovnu aromu pojedinog sira. Proteoliza je razgradnja kazeina pod utjecajem proteolitičkih enzima (proteaza) i smatra se najvažnijim biokemijskim procesom koji se odvija tijekom zrenja sireva s unutrašnjim bakterijskim zrenjem. Sir podvrgnut proteolizi mijenja strukturu, postaje mekši, smanjuje se udio vode i povećava se pH-vrijednost sira. Ove promjene utječu na promjenu arome sira jer se aromatični spojevi iz unutrašnjosti sira oslobađaju. Proces proteolize sastoji se od primarnog i sekundarnog procesa. Primarna proteoliza odvija se uz djelovanje enzima kimozina i plazmina, a u sekundarnoj proteolizi sudjeluju intracelularni i ekstracelularni enzimi bakterija mliječne kiseline i nestarterske mikroflore bakterija mliječne kiseline.

Lipoliza je biokemijski proces razgradnje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol. Proces lipolize odvija se pod utjecajem enzima lipaza. U mlijeku se nalaze prirodno prisutne lipoproteinske lipaze, a ostale lipaze koje se mogu naći u siru potječu iz sirila, mljekarske kulture, nestarterske mikroflore i sekundarne mikroflore.

Fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu je osnovni proces u proizvodnji sira. Razgradnju laktoze glikolitičkim putem vrše bakterije mliječne kiseline. Krajnji produkt glikolitičkog puta razgradnje laktoze je mliječna kiselina, a produkti fosfoketolaznog puta razgradnje su laktat, acetat, etanol i CO. U proizvodnji sira gotovo sva laktoza iz mlijeka (98 %) prelazi u sirutku dok se u svježoj sirnoj masi zadrži 1-2 % laktoze.<sup>4</sup>

## **1.7. Aroma sira**

Aroma sira je glavna karakteristika i parametar kvalitete sira tijekom degustacije. Ovcje, kozje, kravlje i druge vrste mlijeka imaju posebnu aromu

koja se prenosi na sir i druge mliječne proizvode. U skladu s tim aroma sira će ovisiti o vrsti životinje čije se mlijeko koristilo, podneblju u kojem se životinje uzgajaju te hrani koju konzumiraju. Početni proces obrade je vrlo sličan, ali daljnji utjecaj na aromu imaju dodani aditivi, uvjeti u sušionicama i sami vanjski uvjeti koji će doprinijeti biokemijskim procesima.

Biokemijski, mikrobiološki i kemijski procesi koji se odvijaju tijekom zrenja sira su ključni za formiranje arome sira. Različite vrste sira imaju na početku zrenja blagi i neutralni miris i okus, dok se karakterističan miris i okus formira tijekom zrenja. Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporovi spojevi koji se smatraju odgovornima za specifične arome raznih vrsta sireva. Glavne aminokiseline koje služe kao prekursori u stvaranju arome sira su aminokiseline s razgranatim lancem: valin, izoleucin i leucin, aromatske aminokiseline: triptofan, tirozin i fenilalanin te aminokiseline koje sadrže sumpor: cistin i metionin. S tog aspekta važna je njihova količina i vrsta u siru te enzimi koji ih razgrađuju.

Okus sira se pripisuje frakciji topljivoj u vodi, dok je aroma uglavnom koncentrirana u hlapljivoj frakciji. Praćenjem proteolitičkih promjena i razgradnje peptida dobiva se uvid u formiranje gorkog okusa sira. Enzimskom hidrolizom peptida formiraju se peptidi manje molekulske mase koji su pretežito hidrofobni i imaju gorak okus, osobito kod nepotpune hidrolize peptida. U formiranju gorkih peptida važnu ulogu imaju nestarterske bakterije, enzimi startera i sirila. Izvjesna količina gorkih peptida u zrelih sirevima može biti poželjna, međutim povećanjem njihove koncentracije iznad dozvoljene granice, sir postaje gorak.

Gorak okus može biti posljedica i pogreške u tehnološkim procesima npr. kod proizvodnje Goude, Cheddara i Pecorina koji imaju unutrašnje bakterijsko zrenje. Neki autori navode da se dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus* u nemasne sireve mogu spriječiti pogreške okusa i mirisa budući da bakterije navedene vrste potiču formiranje veće količine slobodnih aminokiselina. Isti autori navode da se udio i omjer pojedinih aminokiselina u punomasnim polutvrđim sirevima također može promijeniti dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus*.

Svaki sir sadrži karakterističan omjer aminokiselina što je posljedica aktivnosti starterskih i nestartertskih bakterija. Sadržaju glutaminske kiseline pripisuje se ugodan okus; izoleucinu, lizinu i tirozinu gorak; prolinu i lizinu slatko-gorak okus; alaninu, glicinu, serinu i treoninu sladak, dok se histidinu i asparaginskoj kiselini pripisuje gorko-kiseli okus.

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži odlikuju se posebnom pikantnom aromom i imaju sličnu tehnologiju proizvodnje. Tijekom zrenja sir poprima specifičnu aromu koja se prenosi s mješine (ovčje ili kozje) na sir. Aromatični profil navedenih sireva je slabo istražen.<sup>3</sup>

## **1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva**

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

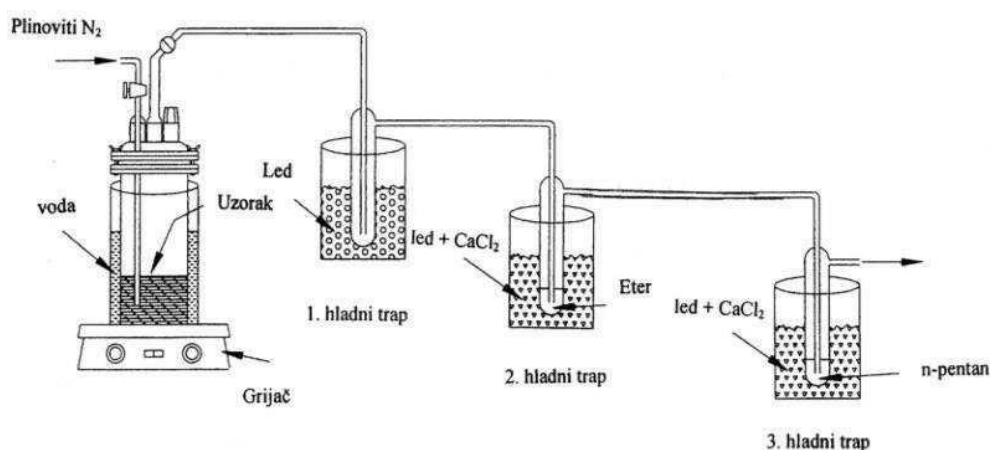
Općenito, destilacija je postupak u kojem se određena tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi te se u hladilu kondenzira (ukapljuje). Kondenzat se prikuplja u zasebnoj posudi. Osnovna svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala, razdvajanje smjese tekućina na temelju različitih vrelišta i identifikacija tekućih tvari određivanjem vrelišta.

Ekstrakcija je metoda izolacije i pročišćavanja tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću drugog otapala koje se s početnim otapalom ne miješa. Otapalo koje se koristi za ekstrakciju mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ne smije imati previsoko vrelište kako bi se lakše uklonilo nakon ekstrakcije, mora biti jeftino, što manje zapaljivo i otrovno, topljivost ekstrahirane tvari u otapalu mora biti velika, otapalo i otopina iz koje se ekstrahira moraju se što više razlikovati u gustoći.<sup>10</sup>

### **1.8.1. Destilacija sa dušikom i trapovima**

Aparatura za destilaciju s dušikom i trapovima (engl. *nitrogen purge and steam distillation*, NPSD) (slika 4) sastavljena je od posude s uzorkom na koju su spojene dvije staklene cijevi. Jedna služi za ulaz čistog dušika, a druga za izlaz dušika obogaćenog hlapljivim spojevima uzorka. Uzorak se nalazi na

konstantnoj temperaturi (ovisnoj o vrsti uzorka), što se postiže korištenjem termostatisane kupelji. Strujanjem dušika kroz uzorak izdvajaju se hlapljivije komponente koje s vodenom parom destiliraju i ukapljuju se u nizu hladnih trapova. Tri trapa su smještena u termostatisanu ledenu kupelj. Prvi trap je prazan, u drugom se nalazi dietil-eter, a u trećem trapu pentan. Destilaciju je potrebno provoditi nekoliko sati. Po završetku destilacije uzorak iz prvog trapa potrebno je pomiješati s smjesom dietil-etera i pentana, ekstrahirati i osušiti. Uzorci iz drugog i trećeg trapa također se suše, a nakon sušenja se svi uzorci koncentriraju frakcijskom destilacijom.<sup>11</sup>



Slika 4. Aparatura za destilaciju s dušikom i trapovima <sup>11</sup>

### 1.8.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi je često upotrebljavana metoda izolacije hlapljivih spojeva odgovornih za aromu. Za ekstrakciju hlapljivih spojeva iz uzorka koristi se silikonsko vlakno prekriveno polimernim filmom. Postoji više vrsta vlakana i upravo vrsta vlakna je važna za selektivnost ekstrakcije. Napolarna vlakna se koriste za izolaciju nepolarnih spojeva, a polarna za izolaciju polarnih spojeva. Sam postupak je jednostavan i brz. U SPME posudu se postavi uzorak i zatvori sa 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 desorbira direktnim

umetanjem u injektor plinskog kromatograma. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u GC injektoru.

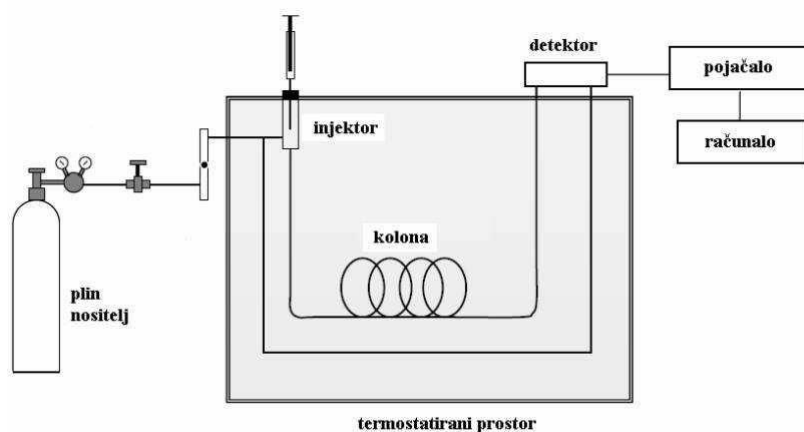
Prednosti mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi su u tome što se ne koristi otapalo, tehnika je brza i jednostavna, primjenjiva za usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih mirisa. Mane su što je aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan o vrsti, debljini i dužini vlakna te temperaturi i vremenu, osim toga neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve. Kod usporedbe uzoraka najbolji rezultate se dobivaju korištenjem istog vlakna na svim uzorcima.<sup>11</sup>

## 1.9. Identifikacija izoliranih hlapljivih spojeva

Za identifikaciju hlapljivih spojeva iz smjese najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa koji omogućava razdvajanje spojeva i njihovu identifikaciju.<sup>10,12</sup>

### Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva. Odjeljivanje na koloni plinskog kromatografa odigrava se na osnovi raspodjele komponenata u plinovitom stanju između mobilne faze, koja je u plinovitom stanju, i stacionarne faze, koja je u tekućem ili čvrstom stanju. Plinski kromatograf sastoji se od: injektora za unošenje uzorka, grijanog dijela s kolonom, detektora te izlaza za plin (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz plinske kromatografije <sup>10</sup>

Za svaku eluiranu komponentu, karakteristično je njeno vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme. Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) mjeri se od trenutka kada se uzorak injektira pa do pojave maksimuma pika. Komponente koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru, na temelju čijeg zapisa je moguće kvantitativno i kvalitativno odrediti eluirane komponente uzorka. Najčešći detektor za plinsku kromatografiju je spektrometar masa.<sup>12</sup>

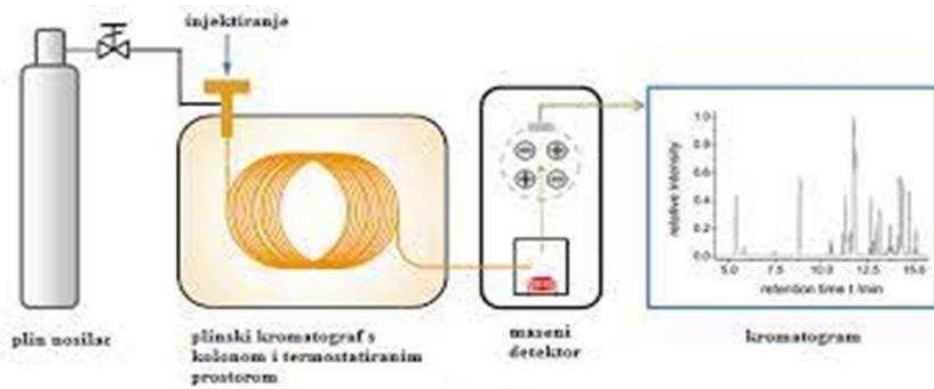
### **Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa (engl. mass spectrometry, MS) je metoda strukturne analize u kojoj se identifikacija vrši na temelju masenog spektra, karakterističnog za svaki spoj. Molekule se ioniziraju, a zatim se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Identifikacija nepoznatog spoja iz uzorka provodi se uspoređivanjem masenog spektara određenog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektra poznatih tvari. Prednost tehnike je visoka osjetljivost i točnost.<sup>13</sup>

#### **1.9.1. 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 koja se koristi za analizu smjese hlapljivih spojeva. Plinska kromatografije omogućuje odjeljivanje spojeva, a spektrometrija masa njihovu identifikaciju. Povezivanje ovih dviju tehnika povećava se njihova pojedinačna specifičnost i osjetljivost čime se omogućuje kvantitativna i kvalitativna analiza.

Osnovne komponente GC-MS uređaja (slika 6) su: boca s plinom nositeljem, injektor, peč s kromatografskom kolonom, maseni detektor i računalo.<sup>13</sup>



**Slika 6.** Shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim spektrometrom (GC-MS)<sup>14</sup>

## 2. EKSPRIMENTALNI DIO

### 2.1. Sir iz mišine

Za izradu ovog završnog rada korišten je kravlji sir iz mišine (slika 7) proizveden na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu u Drnišu 2021. godine.



Slika 7. Sir iz mišine<sup>9</sup>

### 2.2. Kemikalije i aparatura

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće kemikalije :

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature :

- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka
- termostatirana kupelj Huber sa termoregulatorom CC1, Njemačka
- 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.



### 2.2.1. Destilacija sa dušikom i trapovima

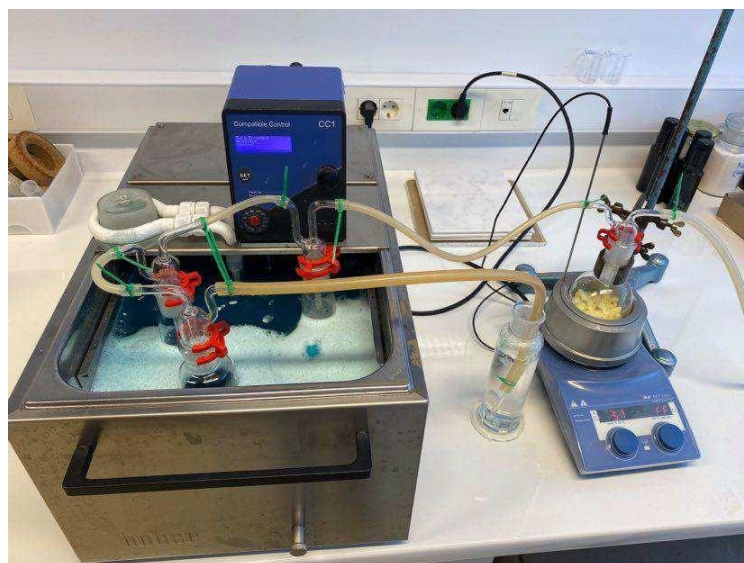
Aparatura za destilaciju sa dušikom i trapovima prikazana je na slici 9. Uzorak (35 g sira) je stavljen u zatvorenu tikvicu iz koje izlaze dvije staklene cijevi, jedna za ulaz plinovitog dušika, a druga za izlaz dušika obogaćenog hlapljivim spojevima uzorka. Uzorak se nalazi na konstantnoj temperaturi (60 °C) što je omogućeno korištenjem termostatisane magnetske miješalice (slika 8).



**Slika 8.** Aparatura za destilaciju sa dušikom i trapovima

Laganim strujanjem kroz uzorak, dušik izdvaja najhlapljivije komponente koje se kondenziraju u seriju hladnih trapova (tri trapa). Trapovi su smješteni u termostatisanoj kupelji na temperaturi  $-18 \pm 2$  °C. Radi lakšeg održavanja potrebne niske temperature kupelj je napunjena smjesom antifrizna i vode (1:1). Prvi trap je prazan i u njemu se sakuplja kondenzirana voda, drugi trap sadrži 30 mL dietil-etera, a treći 30 mL pentana. Hlapljivi spojevi su sakupljeni tijekom 3 h i tijekom 6 h destiliranja sa dušikom. Na kraju eksperimenta kondenzat iz prvog trapa je ekstrahiran smjesom dietil-etera i pentana. Ekstrakti iz sva tri trapa su osušeni dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata i koncentrirani frakcijskom destilacijom. Na ovaj način je dobiveno

6 uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.



**Slika 9.** Aparatura za destilaciju sa dušikom i trapovima

### 2.2.2. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS). Korišten je vezani sustav proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od plinskog kromatografa, model 7820A, u kombinaciji sa spektrometrom masa, model 5977E. Dobiveni rezultati prikazani su na računalu. Analize uzoraka izvršene 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.

Uvjeti rada plinskog kromatografa za odabranu kolonu su:

- temperaturni program: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C min<sup>-1</sup> te zadržavanje 2 min pri 200 °C
- temperatura injektora 250 °C,

- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj helij s protokom 1 mL/min.

Uvjeti rada spektrometra masa su:

- energija ionizacije 70 eV,
- temperatura ionskog izvora 230 °C,
- temperatura detektora 280 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiven je kromatogram ukupne ionske struje na kojem je vrijeme zadržavanja svakog sastojka predstavljeno pikom. Relativni udio pojedinog sastojka je izražen u postotcima i predstavlja udio površine pika u ukupnoj površini. Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley<sup>9</sup> i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

### 3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi sira iz mišine pripravljenog od kravljeg mlijeka izolirani su metodom destilacije sa dušikom i trapovima. Postupak pripreme uzoraka opisan je u 2.2.1. poglavlju eksperimentalnog rada. Hlapljivi spojevi sakupljeni su tijekom 3 h i tijekom 6 h destiliranja sa dušikom. Na taj način je dobiveno 6 uzoraka koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani u tablicama 1-3 u kojima su identificirani spojevi poredani prema redoslijedu eluiranja s kolone HP-5MS. S obzirom da kod ove kolone stacionarna faza nije kiralna, nije bilo moguće odrediti izomere za spojeve koji ih imaju. Zbog toga u tablici uz ime spoja nije navedeno o kojem se točno izomeru radi. U radu su prikazani kromatogrami (slike 10-15) ukupne ionske struje za uzorke hlapljivih spojeva. Maseni udio pojedinačnih spojeva u uzorcima izražen je u postocima 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:

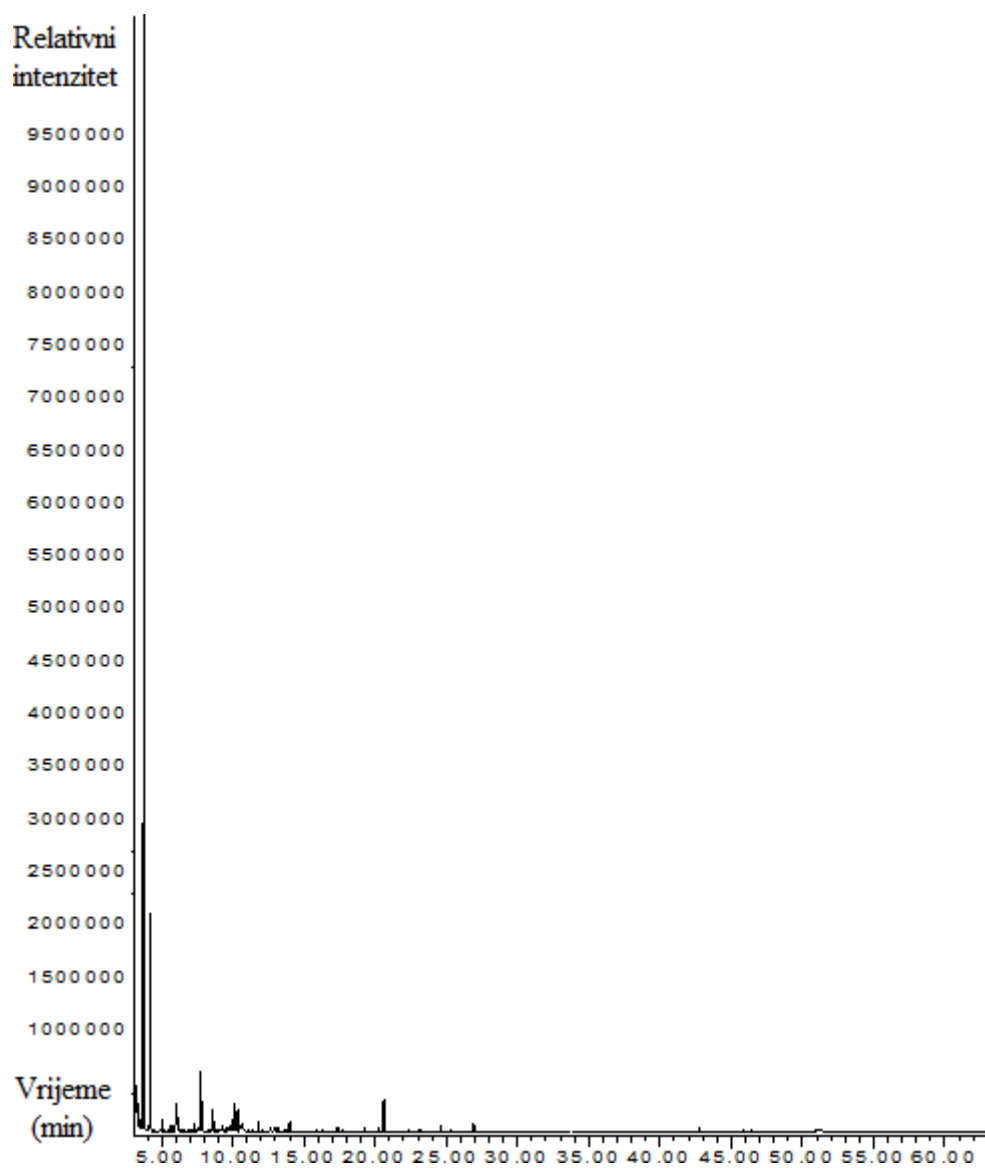
$t_R$  – vrijeme zadržavanja u minutama

tr. – spoj prisutan u tragovima (< 0,1 %)

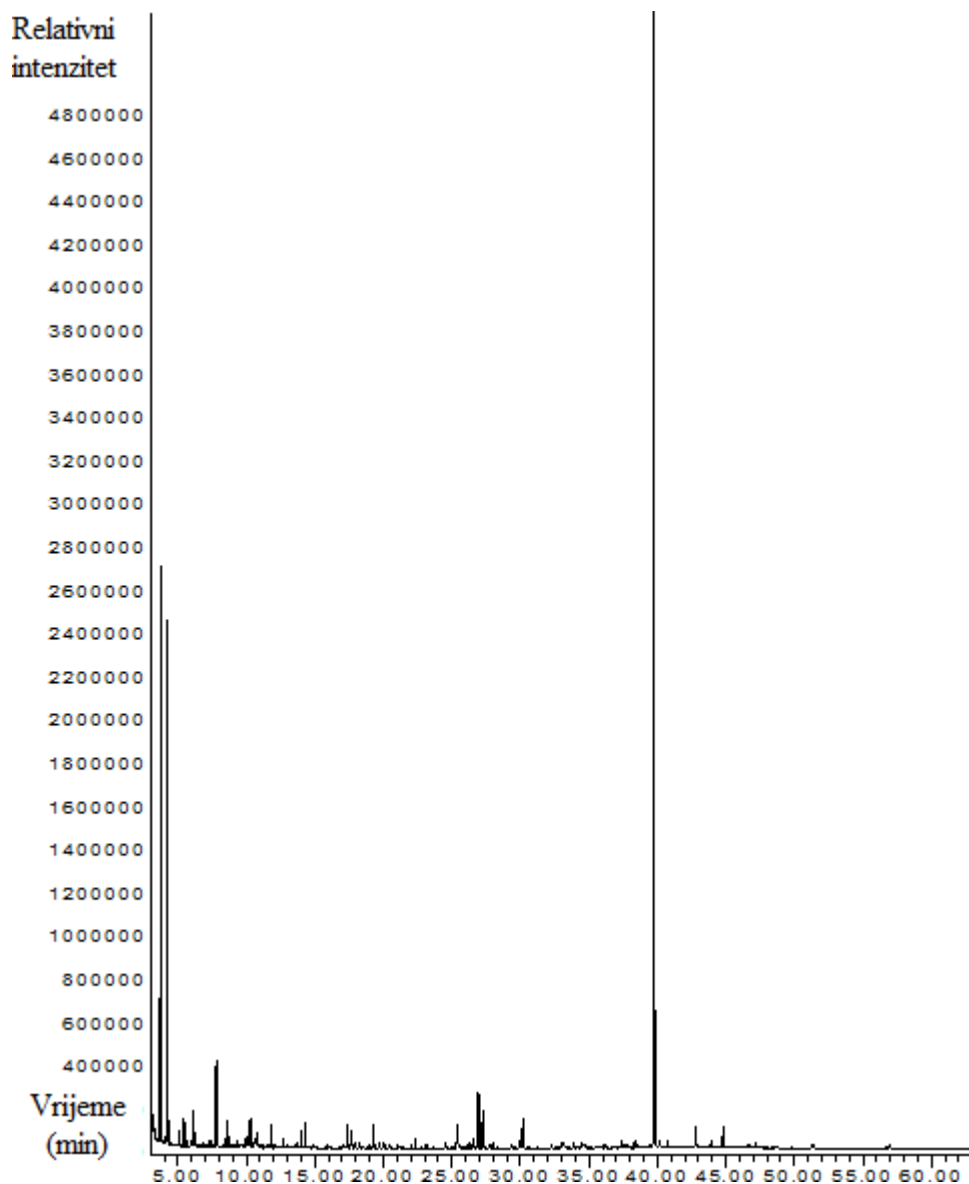
- spoj nije identificiran u uzorku.

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva sira iz mišine u Trapu I nakon 3 h i nakon 6 h destiliranja sa dušikom

Redni broj	Spoj	tr (min)	Udio (%) Trap I (3 h)	Udio (%) Trap I (6 h)
1.	<i>m</i> -ksilen	3,66	13,85	2,99
2.	<i>p</i> -ksilen	3,78	52,30	12,90
3.	<i>o</i> -ksilen	4,21	10,28	-
4.	nonan	4,25	-	12,81
5.	$\alpha$ -pinen	5,06	0,55	0,32
6.	heksanska kiselina	6,04	3,05	-
7.	fenol	6,14	0,94	1,15
8.	benzilni akohol	7,78	5,40	4,47
9.	2,6-dimetilnonan	8,54	1,22	0,76
10.	linalol	10,08	2,52	-
11.	tridekan	10,14	1,19	0,85
12.	nonanal	10,25	-	0,57
13.	tujon	10,35	1,69	0,99
14.	kamfor	11,84	0,86	0,88
15.	fenil-izotiocijanat	14,02	-	0,68
16.	dekanal	14,28	-	0,88
17.	3,7-dimetildekan	17,36	-	0,96
18.	2,6,11-trimetildodekan	19,29	-	0,91
19.	eugenol	20,60	2,84	-
20.	heks-3-il-izobutil-ftalat	39,75	-	48,60
21.	dibutil-ftalat	42,78	-	0,90
22.	izopropil-palmitat	44,80	-	0,80
UKUPNO IDENTIFICIRANO			96,69	92,42



**Slika 10.** Kromatogram ionske struje za uzorak Trap I dobiven nakon 3 h destiliranja sa dušikom.



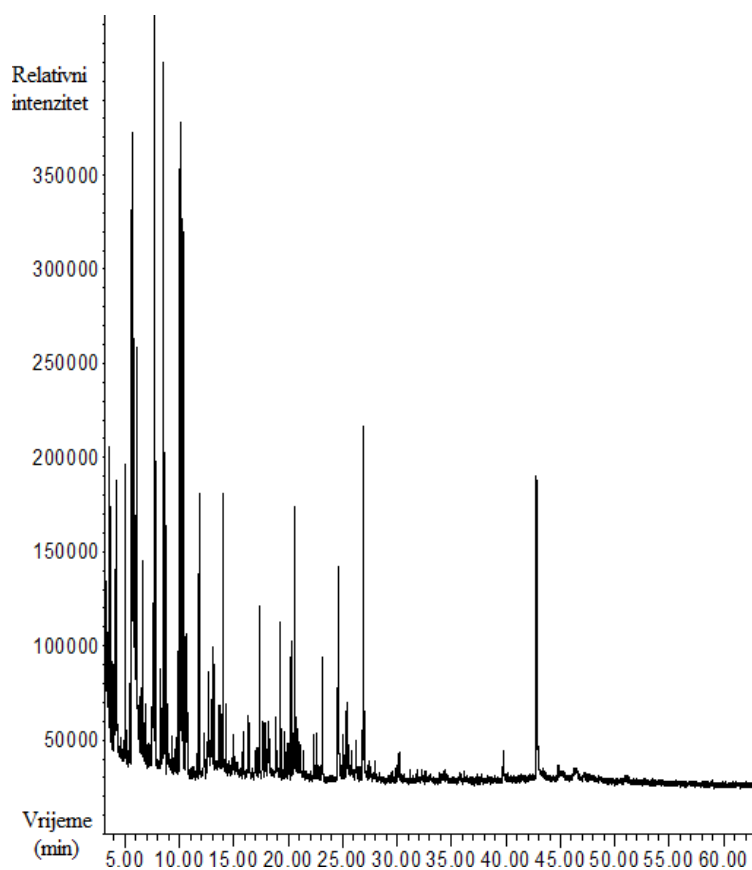
**Slika 11.** Kromatogram ionske struje za uzorak Trap I dobiven nakon 6 h destiliranja sa dušikom.

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva sira iz mišine u Trapu II nakon 3 h i nakon 6 h destiliranja sa dušikom.

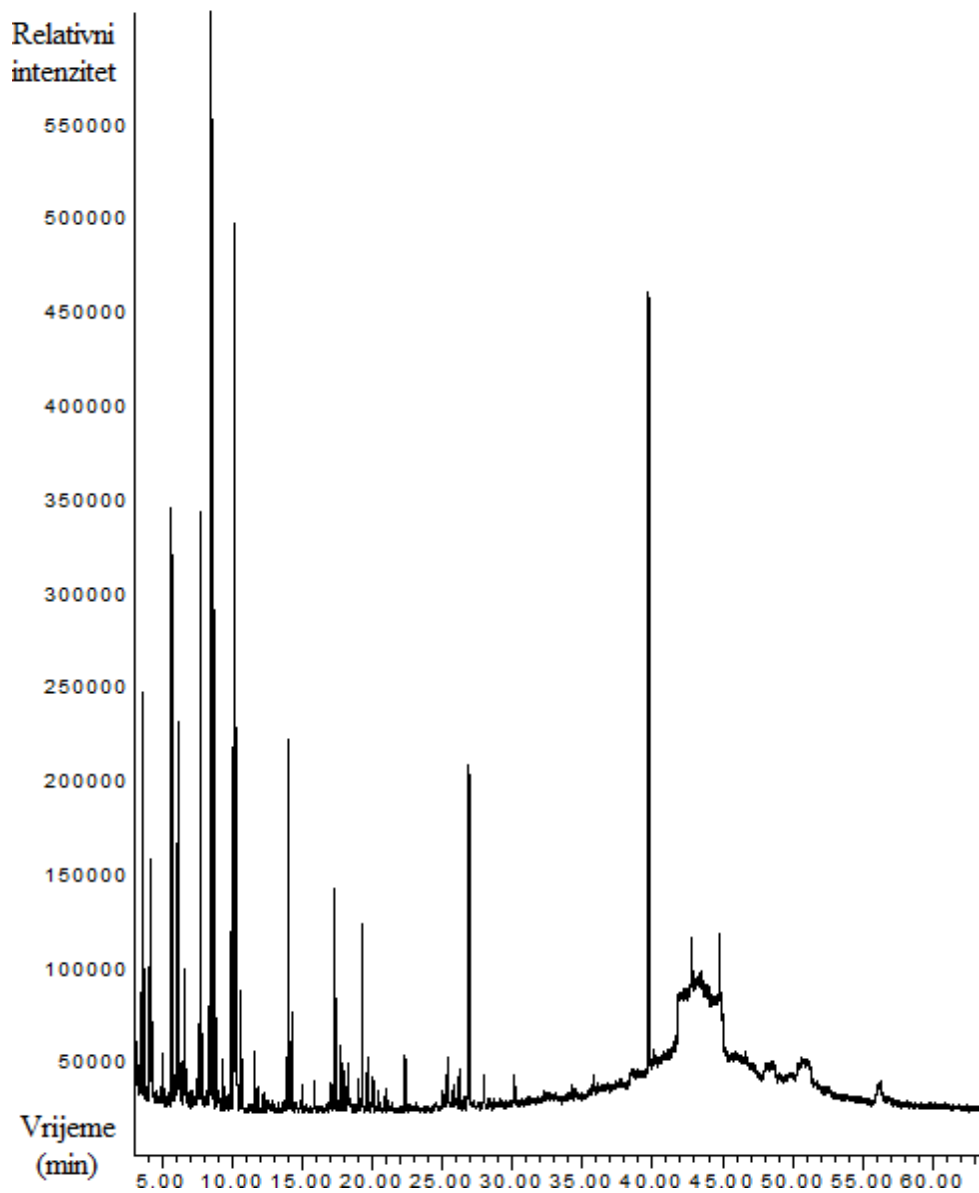
Redni broj	Spoj	tr (min)	Udio (%) Trap II (3h)	Udio (%) Trap II (6h)
1.	4-metiloktan	3,54	1,51	3,37
2.	<i>m</i> -ksilen	3,66	0,84	1,1
3.	<i>p</i> -ksilen	3,78	1,57	1,27
4.	tribrommetan	4,09	tr.	1,15
5.	stiren	4,17	0,98	1,79
6.	$\alpha$ -pinen	5,06	1,85	-
7.	benzaldehyd	5,63	4,54	6,81
8.	glicerol	5,77	8,87	-
9.	sabinen	5,98	1,92	-
10.	fenol	6,14	4,44	5,56
11.	etil-heksanoat	6,61	1,47	1,63
12.	2-etilheksan-1-ol	7,53	0,83	-
13.	D-limonen	7,59	1,42	-
14.	1,8-cineol	7,70	4,94	-
15.	benzilni alkohol	7,78	6,88	9,16
16.	2,6-dimetilnonan	8,54	5,49	13,06
17.	linalol	10,08	6,09	-
18.	3,7-dimetildekan	10,14	4,75	11,70
19.	tujon	10,35	5,06	-
20.	4-metilundekan	10,60	-	0,72
21.	kamfor	11,84	2,74	-
22.	borneol	12,66	1,44	-
23.	terpinen-4-ol	13,12	1,18	-
24.	fenil-izotiocijanat	14,02	3,08	5,72
25.	tridekan	17,36	1,98	3,62



26.	2,6,11-trimetildodekan	19,29	1,49	2,79
27.	eugenol	20,60	2,96	-
28.	kariofilen	23,14	1,23	-
29.	dimetil-ftalat	24,58	2,95	-
30.	heks-3-il-izobutil-ftalat	39,75	-	13,94
31.	dibutil-ftalat	42,78	4,20	-
UKUPNO IDENTIFICIRANO			86,70	83,39



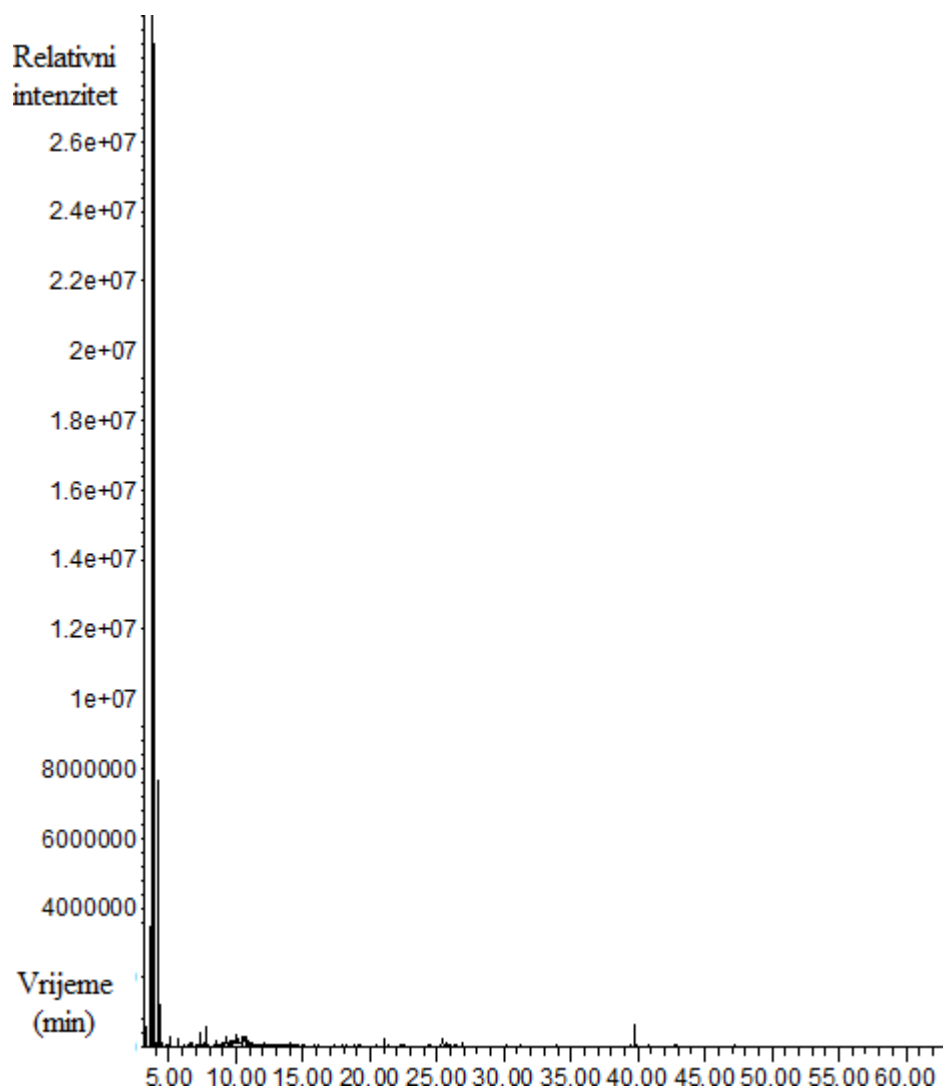
**Slika 12.** Kromatogram ionske struje za uzorak Trap II dobiven nakon 3 h destiliranja sa dušikom.



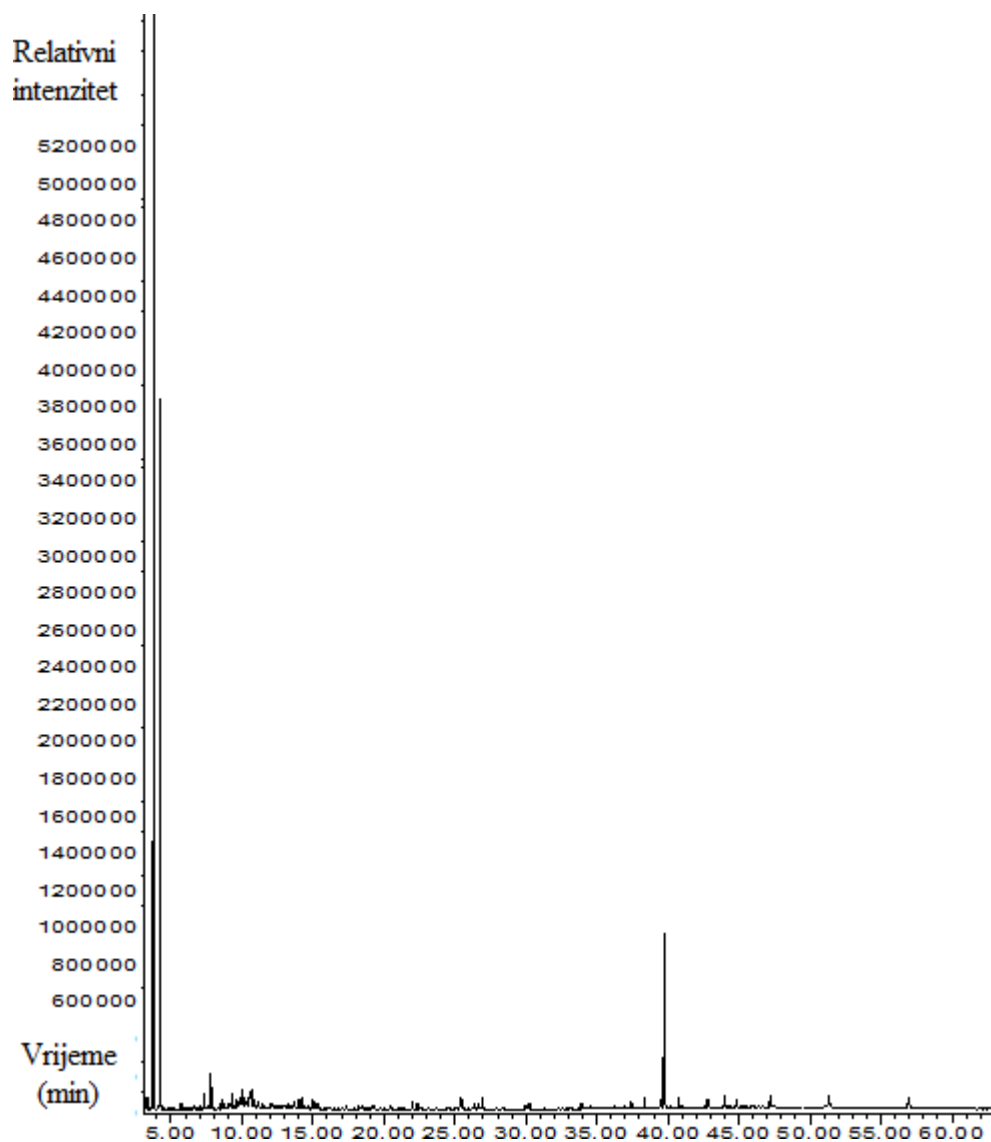
**Slika 13.** Kromatogram ionske struje za uzorak Trap II dobiven nakon 6 h destiliranja sa dušikom.

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva sira iz mišine u Trapu III nakon 3 h i nakon 6 h destiliranja sa dušikom.

Redni broj	Spoj	t <sub>R</sub> (min)	Udio (%) Trap III (3h)	Udio (%) Trap III (6h)
1.	<i>m</i> -ksilen	3,66	16,50	8,31
3.	<i>p</i> -ksilen	3,78	54,31	35,32
4.	<i>o</i> -ksilen	4,21	13,23	-
5.	nonan	4,25	-	28,04
6.	$\alpha$ -pinen	5,06	0,49	-
7.	benzaldehyd	5,63	0,50	-
8.	1,3,5-trimetilbenzen	6,59	0,25	-
9.	etil-heksanoat	6,61	0,32	-
10.	diizopropil disulfid	7,35	0,79	0,75
11.	benzilni alkohol	7,78	1,36	2,04
12.	2,6-dimetilnonan	8,54	0,30	0,40
13.	3,7-dimetildekan	10,14	0,48	-
14.	dekanal	14,28	-	0,66
15.	benzotiazol	15,00	-	0,93
16.	2-butoksietil-acetat	21,05	0,56	-
17.	ciklododekan	25,36	0,26	0,23
18.	izopropil-miristat	38,35	-	0,72
19.	heks-3-il-izobutil-ftalat	39,75	2,11	11,00
20.	nonadekan	40,77	-	0,67
21.	eikosan	43,97	-	0,73
22.	heneikosan	47,20	-	0,92
23.	dokosan	51,33	-	1,21
UKUPNO IDENTIFICIRANO			91,46	91,93



**Slika 14.** Kromatogram ionske struje za uzorak Trap III dobiven nakon 3 h destiliranja sa dušikom.



Slika 15. Kromatogram ionske struje za uzorak Trap III dobiven nakon 6 h destiliranja s dušikom.

## 4. RASPRAVA

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži ističu se jedinstvenom aromom i okusom za što je zaslužan upravo proces njihovog zrenja. Proces zrenja sira sastoji se od biokemijskih i mikrobioloških promjena čijom zajedničkom interakcijom nastaju senzorska svojstva sira. Tijekom biokemijskih promjena se iz složenih organskih molekula (proteina, mliječne masti i laktoze) posredstvom različitih enzima formiraju jednostavniji spojevi odgovorni za svojstva sira. Primarne biokemijske promjene (proteoliza, lipoliza i glikoliza) odgovorne su za formiranje poželjne teksture, dok su sekundarne promjene (katabolizam aminokiselina i slobodnih masnih kiselina) odgovorne za formiranje specifične arome sira. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje (lizu) bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, rast nestarterske mikrobne populacije te rast sekundarne mikroflore.

Karakteristična aroma sira ovisi o brojnim spojevima te o njihovim specifičnim omjerima i koncentracijama što se objašnjava Teorijom balansnih spojeva (engl. *Component Balance Theory*). Po ovoj teoriji su organoleptičke karakteristike različitih vrsta sireva na početku zrenja vrlo slične, a specifična aroma se formira tijekom zrenja sireva. U konačnici, većina sireva sadrži iste ili slične spojeve, ali u različitim koncentracijama i odnosima što daje specifičnost svakoj pojedinoj vrsti sira.

Kompleksni hlapljivi i nehlapljivi kemijski spojevi koji se oslobađaju u siru tijekom zrenja potječu od mliječne kiseline, proteina i ugljikohidrata. Smatra se da su za okus sira odgovorni spojevi topljivi u vodi (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri), dok su nosioci arome uglavnom hlapljivi spojevi.<sup>3,4</sup>

Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve kravljeg sira iz mišine odgovorne za aromu sira. Za izolaciju hlapljivih spojeva sira korištena je destilacija s dušikom i trapovima. U ovoj metodi se laganim strujanjem dušika kroz uzorak koji se nalazi na konstantnoj temperaturi izdvajaju najhlapljivije komponente te sakupljaju u seriji hladnih trapova. Hlapljivi spojevi sakupljeni su u tri različita trapa ovisno o njihovoj hlapljivosti i topljivosti tijekom 3 h i tijekom 6 h.

Na taj način je dobiveno 6 uzoraka (Trap I, Trap II i Trap III nakon 3 h i nakon 6 h) koji su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Prvi hladni trap služi za kondenzaciju vodene pare i sakupljanje u vodi topljivih tvari, dok

drugi hladni trap (sadrži dietil-eter) i treći hladni trap (sadrži pentan) služe za sakupljanje hlapljivih komponenti koje se nisu izolirale u prvom trapu.

## TRAP I

Kemijski sastav i udio sastojaka sakupljenih u Trapu I nakon 3 h i nakon 6 h destilacije s dušikom prikazani su u tablicama X-X. U Trapu I dobivenom nakon 3 h destilacije sa dušikom identificirano je 13 spojeva, što predstavlja 96,69% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi u ovom uzorku su aromatski ugljikovodici: *p*-ksilen (52,30%), *m*-ksilen (13,85%) i *o*-ksilen (10,28%). Ostali kvantitativno značajniji sastojci su: benzilni alkohol (5,40%), heksanska kiselina (3,05%), monoterpenski fenol eugenol (2,84%) i monoterpenski alkohol linalol (2,52%). U malom postotku prisutni su razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6-dimetilnonan (1,22%) i 3,7-dimetildekan (1,19%), monoterpenski ugljikovodik  $\alpha$ -pinen (0,55%), monoterpenski ketoni tujon (1,69%) i kamfor (0,86%) te fenol (0,94%).

U Trapu I dobivenom nakon 6 h identificirano je 18 spojeva, odnosno 92,42% uzorka. Glavni spoj u uzorku je diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (48,60%). Ostali identificirani spojevi su aromatski ugljikovodici *p*-ksilen (12,90%) i *m*-ksilen (2,99%), ravnolančani ugljikovodici nonan (12,81%) i tridekan (0,96%), benzilni alkohol (4,47%), fenol (1,15%), razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6,11,-trimetildodekan (0,91%), 3,7-dimetildekan (0,85%) i 2,6-dimetilnonan (0,76%), monoterpenski ketoni tujon (0,99%) i kamfor (0,88%), aldehidi dekanal (0,88%) i nonanal (0,57%), diester ftalne kiseline dibutil-ftalat (0,90%), ester heksadekanske kiseline izopropil-palmitat (0,80%), fenil-izotiocijanat (0,68%) i monoterpenski ugljikovodik  $\alpha$ -pinen (0,32%).

## TRAP II

Kemijski sastav i udio sastojaka sakupljenih u Trapu II nakon 3 h i nakon 6 h destilacije s dušikom prikazani su u tablicama X-X. GC-MS analizom spojeva sakupljenih u Trapu II nakon 3 h identificirano je 29 spojeva što predstavlja 86,70% uzorka. Najzastupljeniji u uzorku je alkohol glicerol (8,87%), dok su kvantitativno značajniji spojevi benzilni alkohol (6,88%), monoterpenski alkohol linalol (6,09%), monoterpenski keton tujon (5,06%), razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6-dimetilnonan (5,49%) i 3,7-dimetildekan (4,75%), monoterpenski cikloeter 1,8-cineol

(4,94%), benzaldehid (4,54%), fenol (4,44%), diester ftalne kiseline dibutil-ftalat (4,20%) i fenil-izotiocijanat (3,08%). Ostali spojevi, identificirani u postotku < 3%, su razgranati ravnolančani ugljikovodici 4-metiloktan (1,51%) i 2,6,11-trimetildodekan (1,49%), aromatski ugljikovodici *p*-ksilen (1,57%), stiren (0,98%) i *m*-ksilen (0,84%), ravnolančani ugljikovodik tridekan (1,98%), diester ftalne kiseline dimetil-ftalat (2,95%), ester etil-heksanoat (1,47%), alkohol 2-etilheksan-1-ol (0,83%), seskviterpen kariofilen (1,23%) te monoterpenski spojevi: fenol eugenol (2,96%), keton kamfor (2,74%), alkoholi borneol (1,44%) i terpinen-4-ol (1,18%), ugljikovodici sabinen (1,92%),  $\alpha$ -pinen (1,85%) i limonen (1,42%).

U Trapu II dobivenom nakon 6 h identificirano je 16 spojeva, odnosno 83,39% uzorka. Najzastupljeniji spojevi u uzorku su diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (13,94%) te razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6-dimetilnonan (13,06%) i 3,7-dimetildekan (11,70%). Ostali kvantitativno značajniji spojevi su benzilni alkohol (9,16%), benzaldehid (6,81%), fenil-izotiocijanat (5,72%), fenol (5,56%), ravnolančani ugljikovodik tridekan (3,62%) i razgranati ravnolančani ugljikovodik 4-metiloktan (3,37%). U uzorku su, u postotku manjem od 3%, identificirani razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6,11-trimetildodekan (2,79%) i 4-metilundekan (0,72%), aromatski ugljikovodici stiren (1,79%), *p*-ksilen (1,27%) i *m*-ksilen (1,1%), ester etil-heksanoat (1,63%) te halogenirani ugljikovodik tribrommetan (1,15%).

### TRAP III

Kemijski sastav i udio sastojaka sakupljenih u Trapu III nakon 3 h i nakon 6 h destilacije s dušikom prikazani su u tablicama X-X. U Trapu III dobivenom nakon 3 h destilacije sa dušikom identificirano je 14 spojeva, što predstavlja 91,46% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi u ovom uzorku su aromatski ugljikovodici: *p*-ksilen (54,31%), *m*-ksilen (16,50%) i *o*-ksilen (13,23%). Ostali spojevi, identificirani u postotku < 3%, su diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (2,11%), benzilni alkohol (1,36%), diizopropil disulfid (0,79%), esteri 2-butoksietil-acetat (0,56%) i etil-heksanoat (0,32%), benzaldehid (0,50%), ravnolančani razgranati ugljikovodici 3,7-dimetildekan (0,48%) i 2,6-dimetilnonan (0,30%), monoterpenski ugljikovodik  $\alpha$ -pinen (0,49%), ciklički ugljikovodik ciklododekan (0,26%) te aromatski ugljikovodik 1,3,5-trimetilbenzen (0,25%).



U Trapu III dobivenom nakon 6 h identificirano je 15 spojeva, odnosno 91,93% uzorka. I u ovom uzorku su glavni spojevi ugljikovodici: aromatski *p*-ksilen (35,32%) i *m*-ksilen (8,31%) te ravnolančani nonan (28,04%). Kvantitativno značajan je i diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (11,00%). Ostali spojevi, zastupljeni u postotku <3%, su: benzilni alkohol (2,04%), ravnolančani ugljikovodici dokosan (1,21%), heneikosan (0,92%), eikosan (0,73%) i nonadekan (0,67%), benzotiazol (0,93%), diizopropil disulfid (0,75%), ester tetradekanske kiseline izopropil-miristat (0,72%), aldehid dekanal (0,66%), razgranati ravnolančani ugljikovodik 2,6-dimetilnonan (0,40%) i ciklički ugljikovodik ciklodekan (0,23%).

Iz analize uzoraka vidljivo je da su najzastupljeniji spojevi u svim uzorcima uglavnom ugljikovodici, bilo da se radi o aromatskim, ravnolančanim ili razgranatim ravnolančanim ugljikovodicima. Ugljikovodici su sekundarni produkti autooksidacije lipida i prekursori su za stvaranje aromatskih spojeva. Sami imaju visoke pragove detekcije pa je njihov doprinos aromi sira mnogo manji od doprinosa ostalih hlapljivih spojeva. Aromatski ugljikovodici stiren, toluen i *p*-cimen su identificirani kao najzastupljeniji ugljikovodici u Tulum siru, tradicionalnom turskom siru koji zrije u janjećoj koži.<sup>15</sup>

U nekim uzorcima su u visokim postocima identificirani diesteri ftalne kiseline – ftalati. U samom procesu proizvodnje plimernih materijala, radi dobivanja njenih boljih i novih svojstava dodaju se različita sredstva: omekšivači – plastifikatori, punila, stabilizatori i pigmenti. Unazad nekoliko desetaka godina najčešće korišteni plastifikatori su upravo ftalati. Budući da ftalati nisu kovalentno vezani unutar molekule PVC-a, po principu slično otapa slično, male količine masne hrane ili ulja, dovoljne su za potpunu ekstrakciju lipofilnih omekšavala u hranu.<sup>3</sup>

Zbog svojstva lipofilnosti, najveće razine ftalata nađene su u masnoj hrani, kao što su mlijeko i mliječni proizvodi, riba, meso i biljna ulja. Izvori kontaminacije ftalatima u hrani najčešće su ambalažni materijal, ali i dijelovi tehnološkog procesa proizvodnje. U našem slučaju možemo pretpostaviti da su uzorci sira kontaminirani ftalatima iz PVC-cijevi koje su se koristile tijekom postupka destilacije. Tome ide u prilog i činjenica da je identificiran znatno veći postotak ftalata kod uzoraka koji su podvrgnuti destilaciji s dušikom u vremenu od 6 h u odnosu na one koji su analizirani nakon 3 h.

U uzorcima su pronađeni i terpeni spojevi za koje se općenito smatra da u mlijeko dopijevaju iz biljaka kojima se životinje hrane. Terpeni spojevi su identificirani i u Tulum siru, najviše monoterpeni  $\alpha$ -pinen,  $\gamma$ -terpinen, limonen, i kariofilen.<sup>15</sup>

Spojevi nastali razgradnjom aminokiselina u siru: alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporovi spojevi, za koje se smatra da su odgovorni za formiranje arome sira, identificirani su u malom postotku u analiziranim uzorcima.<sup>3</sup>

Budući da je cilj rada bio identificirati hlapljive spojeve sira iz mišine odgovorne za aromu ovog tradicionalnog sira, može se zaključiti da odabrana metoda izolacije hlapljivih spojeva nije bila adekvatna, posebno zbog sumnje na kontaminaciju uzorka ftalatima u procesu destilacije. Zbog toga je u daljnjim istraživanjima arome sira iz mišine, potrebno metodu modificirati ili nadopuniti istraživanja primjenom drugih metoda. Kao logičan odabir, nameće se primjena metode mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME), koja se naveliko koristi kod izolacije hlapljivih spojeva odgovornih za aromu.

## 5. ZAKLJUČAK

S obzirom na rezultate i raspravu može se zaključiti sljedeće:

- U Trapu I dobivenom nakon 3 h destilacije sa dušikom identificirano je 13 spojeva, što predstavlja 96,69% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi u uzorku su aromatski ugljikovodici: *p*-ksilen (52,30%), *m*-ksilen (13,85%) i *o*-ksilen (10,28%).
- U Trapu I dobivenom nakon 6 h identificirano je 18 spojeva, odnosno 92,42% uzorka. Glavni spoj u uzorku je diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (48,60%).
- GC-MS analizom spojeva sakupljenih u Trapu II nakon 3 h identificirano je 29 spojeva što predstavlja 86,70% uzorka. Najzastupljeniji u uzorku je alkohol glicerol (8,87%).
- U Trapu II dobivenom nakon 6 h identificirano je 16 spojeva, odnosno 83,39% uzorka. Najzastupljeniji spojevi u uzorku su diester ftalne kiseline heks-3-il-izobutil-ftalat (13,94%) te razgranati ravnolančani ugljikovodici 2,6-dimetilnonan (13,06%) i 3,7-dimetildekan (11,70%).
- U Trapu III dobivenom nakon 3h destilacije sa dušikom identificirano je 14 spojeva, što predstavlja 91,46% od ukupnog uzorka. Glavni spojevi u uzorku su aromatski ugljikovodici: *p*-ksilen (54,31%), *m*-ksilen (16,50%) i *o*-ksilen.
- U Trapu III dobivenom nakon 6 h identificirano je 15 spojeva, odnosno 91,93% uzorka. I u ovom uzorku su glavni spojevi ugljikovodici: aromatski *p*-ksilen (35,32%) i *m*-ksilen (8,31%) te ravnolančani nonan (28,04%).
- Iz analize uzoraka vidljivo je da su najzastupljeniji spojevi u svim uzorcima uglavnom ugljikovodici, bilo da se radi o aromatskim, ravnolančanim ili razgranatim ravnolančanim ugljikovodicima. Ugljikovodici su sekundarni produkti autooksidacije lipida i prekursori su za stvaranje aromatskih spojeva.

Sami imaju visoke pragove detekcije pa je njihov doprinos aromi sira mnogo manji od doprinosa ostalih hlapljivih spojeva.

- U nekim uzorcima su u visokim postocima identificirani diesteri ftalne kiseline – ftalati. Možemo pretpostaviti da su uzorci sira kontaminirani ftalatima iz PVC-cijevi koje su se koristile tijekom postupka destilacije. Tome ide u prilog i činjenica da je identificiran znatno veći postotak ftalata kod uzoraka koji su podvrgnuti destilaciji s dušikom u vremenu od 6 h u odnosu na one koji su analizirani nakon 3 h.
- S obzirom na navedeno, može se zaključiti da odabrana metoda izolacije hlapljivih spojeva nije adekvatna, posebno zbog sumnje na kontaminaciju uzorka ftalatima u procesu destilacije. Zbog toga je u daljnjim istraživanjima arome sira iz mišine, potrebno metodu modificirati ili nadopuniti istraživanja primjenom drugih metoda. Kao logičan odabir, nameće se primjena metode mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME), koja se naveliko koristi kod izolacije hlapljivih spojeva odgovornih za aromu.

## 6. LITERATURA

1. B. Matijević i G. Šarić, *History.info*, **14** (2017) 78-81.
2. B. Matijević, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015, str. 12-14.
3. N. Mikulec, I. Habuš, N. Antunac, Lj. Vitale, J. Havranek, *Mljekarstvo* **60** (2010) 219-227.
4. T. Lojbi, *Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, 2019.
5. S. Kalit, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015, str. 29-30.
6. R. Božanić, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015, str. 48-49.
7. <https://www.etratika.net/moze-i-drugacije/69381/foto-prica-proizvodnja-kozjeg-sira-na-imanju-klekovaca/> (pristupljeno 15. 8. 2021.)
8. <https://ultra.ba/top-10-najpoznatijih-sireva-koje-moras-probat/> (pristupljeno 17. 8. 2019.)
9. <https://www.agroklub.com/stocarstvo/mrvljeni-sir-iz-mjesine-prema-ilirskom-receptu/14124/> (pristupljeno 20. 8. 2021.)
10. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
11. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
12. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
13. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, F. Burčul, *Instrumentne metode analize*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
14. <https://repozitorij.mefst.unist.hr/islandora/object/mefst%3A654/datastream/PDF/view> (pristupljeno 1. 9. 2021.)
15. S. Demerci, H. İ Öztürk, D. S. Akit, C. Koçak, T. Demirci, N. Akin, *Eur.Food Res.Technol.* **247** (2021) 2097-2108.
16. <https://www.bib.irb.hr/759768> (pristupljeno 4. 9. 2021.)