

SPME-GC-MS analiza sira iz mišine

Uremović, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:451149>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

SPME-GC-MS ANALIZA SIRA IZ MIŠINE

ZAVRŠNI RAD

IVANA UREMOVIĆ

Matični broj: 53

Split, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STRUČNI STUDIJ
ZAŠTITA I OPORABA MATERIJALA

SPME-GC-MS ANALIZA SIRA IZ MIŠINE

ZAVRŠNI RAD

IVANA UREMOVIĆ

Matični broj: 53

Split, rujan 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE PROFESSIONAL STUDY
MATERIALS PROTECTION AND RECYCLING

SPME-GC-MS ANALYSIS OF CHEESE IN A SACK

BACHELOR THESIS

IVANA UREMOVIĆ

Parent number: 53

Split, September 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski stručni studij Zaštita i uporaba materijala

Znanstveno područje: tehničke znanosti

Znanstveno polje: kemijско inženjerstvo

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

Mentor: doc. dr. sc. Marina Zekić

SPME-GC-MS ANALIZA SIRA IZ MIŠINE

Ivana Uremović, 53

Sažetak:

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Dobiveni uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Svi uzorci sadrže karboksilne kiseline i estere, a u svim uzorcima pronađen je i alkohol etanol. U sva tri uzorka je najveći sadržaj karboksilnih kiselina a zanimljivo je što njihov sadržaj raste sa temperaturom ekstrakcije. Ovakvi rezultati se mogu objasniti time da pri povišenoj temperaturi vjerojatno dolazi do hidrolize estera čime nastaje veći sadržaj kiselina.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 20 slika, 3 tablice, 33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Igor Jerković
2. Doc. dr. sc. Zvonimir marijanović
3. Doc. dr. sc. Marina Zekić -član- mentor

Datum obrane: 27.09.2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate professional study Materials protection and recycling

Scientific area: technical sciences

Scientific field: Chemical engineering

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

Mentor: Marina Zekić, PhD, assistant profesor

SPME-GC-MS ANALYSIS OF CHEESE IN A SACK

Ivana Uremović, 53

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 solid phase microextraction (HS-SPME) using gray fiber at three different temperatures (40, 50 and 60°C). The obtained samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. All samples contain carboxylic acids and esters and alcohol ethanol was found in all samples. All three samples have the highest content of carboxylic acids and it is interesting that their content increases with the extraction temperature. Such results can be explained by the fact that at elevated temperature ester hydrolysis is likely to occur, resulting in a higher acid content.

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

Thesis contains: 38 pages, 20 figures, 3 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Igor Jerković, PhD, Full prof.
2. Zvonimir Marijanović, PhD, Assistant prof.
3. Marina Zekić, PhD, Assistant prof.

Defense date: 27.09.2021.

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. Marina Zekić, u razdoblju od svibnja 2021. do rujna 2021. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici Doc. dr. sc. Marini Zekić na iskazanom povjerenju i uloženom trudu, strpljenju i prenošenju znanja tijekom izrade ovoga rada. Iskrenu zahvalu pripisujem svakom savjetu, pomoći i pristupačnosti, koje sam dobivala tijekom izrade ovoga rada, te zbog kojih ću se truditi težiti napretku u cjeloživotnom učenju, radu i struci kako bih mogla prenositi znanje koje sam primila od mentorice i znanje koje sam postigla na ovom Fakultetu.

Posebnu zahvalu dugujem svojem životnom učitelju, prije svega velikom prijatelju, mojem najvećem uzoru u poštenju, znanosti i struci Dragutinu L. koji nesebično, strpljivo i usrdno prenosi na mene svoje znanje, mudrost i prijateljstvo, čija su podrška, pomoć i razumijevanje bili potpuni i bezrezervni tijekom cijelog studiranja, te zbog kojega se svakodnevno preispitujem biti bolja osoba, napredovati i nikada ne odustajati.

Mojoj dragoj obitelji zahvaljujem što su mi omogućili studiranje i pružali mi ogromnu podršku, neizmjernu ljubav i vjeru, zbog kojih se trudim napredovati i raditi, ne bih li postala dostojna na ponos svojih roditelja, tako i na vlastiti ponos. Njihovo razumijevanje i ljubav vodili su me tijekom cijelog života, tako i studiranja, na putu do uspjeha, te uz puno uloženog truda i strpljenja mogu biti ponosni prvenstveno na sebe, a nadalje na moj uspjeh.

Veliku ulogu na putu do cilja imao je D.D., koji je strpljivo dočekao ovaj dan, uz veliku podršku, ljubav i razumijevanje, koji mi je pružao sigurnost i utjehu kada je to bilo najpotrebnije, na čemu sam mu neizmjerno zahvalna.

Svojim prijateljima koji su bili uz mene i pokazali mi iskreno lice prijateljstva i poštovanja, zahvaljujem na svakoj pomoći i savjetu, te na svemu učinjenom što je uvelike utjecalo na mene kao osobu, kao i na rad i napredak tijekom cijelog studiranja.

Zbog svega navedenog, ovaj rad nije samo moj uspjeh, već uspjeh dostojan Vašeg ponosa i u konačnici uspjeh svih Vas, kojima posvećujem ovaj rad u znak zahvale i međusobnog poštivanja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

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

SAŽETAK

U ovom završnom radu analiziran je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva sira iz mišine. Izolacija hlapljivih spojeva izvršena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Dobiveni uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Svi uzorci sadrže karboksilne kiseline i estere a u svim uzorcima pronađen je i alkohol etanol. U sva tri uzorka je najveći sadržaj karboksilnih kiselina a zanimljivo je što njihov sadržaj raste sa temperaturom ekstrakcije. Ovakvi rezultati se mogu objasniti time da pri povišenoj temperaturi vjerojatno dolazi do hidrolize estera čime nastaje veći sadržaj kiselina.

Ključne riječi: sir iz mišine, hlapljivi spojevi, HS-SPME, 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 solid phase microextraction (HS-SPME) using gray fiber at three different temperatures (40, 50 and 60°C). The obtained samples were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry system on an HP-5MS column. All samples contain carboxylic acids and esters and alcohol ethanol was found in all samples. All three samples have the highest content of carboxylic acids and it is interesting that their content increases with the extraction temperature. Such results can be explained by the fact that at elevated temperature ester hydrolysis is likely to occur, resulting in a higher acid content.

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

SADRŽAJ

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | OPĆI DIO | 2 |
| 1.1 | SIR | 2 |
| 1.2 | SIR IZ MIŠINE | 3 |
| 1.2.1 | MLIJEKO KAO SIROVINSKA BAZA ZA SIR IZ MIŠINE | 4 |
| 1.3 | TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SIRA IZ MIŠINE | 5 |
| 1.4 | BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA IZ MIŠINE | 8 |
| 1.5 | OSNOVNI PROCESI U PROIZVODNJI SIRA | 8 |
| 1.5.1 | GLIKOLIZA | 8 |
| 1.5.2 | LIPOLIZA | 9 |
| 1.5.3 | PROTEOLIZA | 10 |
| 1.6 | AROMA SIRA IZ MIŠINE | 13 |
| 1.6.1 | Peptidi kao čimbenici arome sira | 14 |
| 1.6.2 | Razgradnja aminokiselina u formiranje arome sira | 14 |
| 1.7 | METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA | 17 |
| 1.7.1 | MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI - HS-SPME 17 | |
| 1.8 | IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH HLAPLJIVIH SPOJEVA | 18 |
| 1.8.1 | VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMetriJA MASA (GC-MS) | 18 |
| 2 | EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 2.1 | SIR IZ MIŠINE | 19 |
| 2.2 | KEMIKALIJE I APARATURA | 19 |
| 2.3 | IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA | 20 |
| 2.4 | ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMetriJA MASA GC-MS | 22 |
| 3 | REZULTATI | 25 |
| 4 | RASPRAVA | 32 |
| 4. | ZAKLJUČAK | 36 |
| 5. | LITERATURA | 37 |

UVOD

Sir (*lat. caseus*) je uobičajena hrana općeprihvaćena u svakodnevnom životu. Odlikuje se dugom poviješću, ispunjenom raznim legendama i mitovima koji nisu uvijek povijesno potkrepljeni već predstavljaju dio kulturne tradicije prenošene usmenom predajom, što povijest sira čini vrlo zanimljivom i dinamičnom.

Stoljećima se proizvodnja sira usavršavala s ciljem kvalitetnije prehrane ljudi, ali i čuvanja i konzerviranja mlijeka kroz što duže razdoblje. Sama vještina izrade sira prenosila se s generacije na generaciju, a susreti civilizacija (osvajanja i ratovi) zaslužni su za njeno širenje i razvoj.¹

Sirevi koji sazrijevaju u životinjskoj koži proizvode se u nekoliko zemalja i pripadaju tradicionalnim vrstama sira. Najpoznatije države gdje se proizvode ove vrste sireva su Hrvatska (sir iz mišine), Alžir (bouhezza), Turska (tulum), Libanon (darfiyeh), Bosna i Hercegovina te Crna Gora (sir iz mijeha). Proizvodnja navedenih sireva je slična, ali se ipak razlikuje od vrste do vrste, a i unutar pojedinih vrsta proizvodnja nije standardizirana što rezultira varijacijama u kvaliteti sira.

Specifičnost ovih sireva je da se njihovo zrenje događa u janjećoj ili jarećoj koži gdje sir zrije u anaerobnim uvjetima uz prisutnost prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline, bakterija nestartarske mikroflore te plijesni i kvasca koji zbog permeabilnosti životinjske kože čine sekundarnu mikrofloru sira. Permeabilnost kože omogućava kontrolirano propuštanje zraka i vode. Ovi sirevi se odlikuju pikantnošću, izraženog su mirisa i okusa, specifične teksture i aromatičnosti. Intenzivnost procesa lipolize i proteolize koji se odvijaju u siru tijekom zrenja zaslužni su za navedena svojstva.²

Sam proces sazrijevanja sira iz mišine sastoji se od mikrobioloških i biokemijskih promjena. Nastale mikrobiološke promjene dovode do odumiranja bakterija mliječne kiseline, dolazi do porasta nestartarske mikrobne populacije i povećava se rast sekundarne mikroflore pri čemu dolazi do transformacije složenih organskih spojeva u jednostavnije spojeve djelovanjem različitih enzima koji se nalaze u siru. Biokatalizatori, enzimi, ubrzavaju kemijske reakcije i sudjeluju u primarnim biokemijskim procesima: proteolizi, lipolizi i glikolizi koji se odvijaju u mješini (mišini) tijekom zrenja sira. Ovi procesi uvjetuju promjene u teksturi sira a odgovorni su i za nastanak spojeva arome. Frakcije topljive u vodi daju okus siru, dok je aroma koncentrirana u hlapljivoj frakciji.^{2,3}

1 OPĆI DIO

1.1 SIR

Sir se proizvodi od davnina, u gotovo svim dijelovima svijeta, od mlijeka različitih životinja – koza, ovaca, krava pa čak i od mlijeka soba u Laponiji te jakovog mlijeka u Nepal. Nekada je sir bio dar bogovima ili hrana za povlaštenu klasu, dok u srednjem vijeku nije postao svakodnevna hrana šireg pučanstva.

Povijest sira i znanje o početku proizvodnje sira može se pratiti iz arheoloških otkrića. Arheološki nalazi ne mogu točno odrediti kada je prvi sir nastao, ali se može utvrditi da se prerada mlijeka u sir pojavila vrlo brzo tamo gdje je postojala sirovina-mlijeko. Poznata je priča o Arapinu koji je putovao pustinjom i primijetio da mlijeko koje je nosio sa sobom koagulira u osušenom ovčjem trbuhu. To su prvi početci pojave sira iz mješine.⁴

Uklanjanjem vlage stvoreni su tvrdi sirevi koji su trajniji, posebno ako se sole i suše. Pretpostavlja se da ovaj način prerade dolazi od nomada-trgovaca sirom. Ti su postupci prenošeni kroz tradiciju i usavršavani do danas. Već su se na tržištima Rimskog carstva nalazile brojne, različite vrste sira: sir u janjećoj koži, meki, svježi, tvrdi, napravljeni od ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka. Prodorom kršćanstva samostani su postali centri razvoja sirarstva, ljudi su u njima obrađivali polja, čuvali stoku i proizvodili sireve (sir Trapist). Od tada se proizvodnja sira vrlo brzo razvila.^{3,4}

Otkrića na područjima mikrobiologije, kemije i tehnologije omogućila su brzu modernizaciju proizvodnje sira i prerade mlijeka. Justus von Liebig je 1836. objasnio fermentaciju sira u znanstvenom smislu. Luis Pasteur primijenio je svoje otkriće fermentacije cjepiva na fermentaciju mliječnog šećera, a Leah Metchnikov je proučavala bakterije mliječne kiseline, fermentaciju i pasterizaciju mlijeka. Usljedilo je razdoblje velikih otkrića iz područja biokemije, a kulture mikroorganizama i sirila počele su se proizvoditi u laboratoriju.⁵

1.2 SIR IZ MIŠINE

Priprema sira iz mješine, lokalno zvanog sir iz mišine, dugo je prisutna tradicija na području Dalmatinske zagore, Velebita i dijela Like. Područja proizvodnje sira iz mješine su područja u kojima od gospodarske aktivnosti dominira stočarska proizvodnja i to uzgoj stoke sitnog zuba. Nema pouzdanih podataka o vremenu nastajanja sira iz mišine na hrvatskom području, ali je poznato da su Tračani i Iliri uzgajali ovce na pašnjacima Dinare, pa najvjerojatnije od tog vremena započinje njegova proizvodnja. Stočari su usireno mlijeko u kojem je došlo do izdvajanja sirutke i stvaranje sirne grude dalje preradili u sir te proces vremenom usavršili.

Tehnologija izrade sira iz mješine u osnovi se nije puno promijenila od prvih podataka o izradi.⁶

Proizvodnja sira iz mišine-mješine, prikazanog na Slici 1., može se podijeliti u nekoliko faza: odgovarajuća priprema mješine; mužnja i priprema mlijeka; priprema sirila; sirenje i spremanje u mješine te zrenje i čuvanje sira.

Izrada i priprema mješine vrlo je važan trenutak u proizvodnji sira iz mješine, jer samo odgovarajuća mješina osigurava pravilno zrenje sira tijekom kojeg se i formiraju njegova specifična organoleptička svojstva. Starost janjeta čija će se koža koristiti za izradu mješine mora biti najmanje 6 mjeseci. Nakon odvajanja od trupa, koža se prevrne tako da dio kože koji je nalijegao na trup bude unutra, nakon čega slijedi pranje u hladnoj vodi. Svi otvori na mješini se zatim zabrtve i zavežu špagom, a oko zadnjeg otvora se naprave rupice međusobno razmaknute oko 2 cm u koje se uvuče drveni štapić promjera 0,5 cm i duljine 20 cm, koji sprečava klizanje špage prilikom puhanje mješine. Puhanje se vrši sve dok mješina ne poprimi oblik pogodan za brijanje i to kroz šuplje bazgino drvo promjera 1cm, koje se uvuče u stražnju nogu. Nakon brijanja, otvori mješine se sole i stavljaju na sjenovito mjesto radi sušenja, a sušenje traje 15-30 dana. Osušena mješina se zatim provjetrava otvaranjem otvora na vratu i repu, a prije prve upotrebe treba je potopiti u hladnu vodu u trajanju oko 2 sata, te zatim isprati alkoholom, obično rakijom lozovačom.^{7,8}



Slika 1. Sir iz mišine⁹

1.2.1 MLIJEKO KAO SIROVINSKA BAZA ZA SIR IZ MIŠINE

OVČJE MLIJEKO

Ovčje mlijeko je neprozirno, bijele boje, ugodnog okusa i bez mirisa ako su uvjeti mužnje dobri, s tim da brzo upija mirise sredine u kojoj se nalazi. Za 50% je bogatije suhom tvari nego kravlje mlijeko. Zbog većeg sadržaja suhe tvari, posebno masti i proteina, vrlo je podatno za proizvodnju sira. Prosječni sastav ovčjeg mlijeka ovisi o rasi životinje, načinu ishrane, klimatskim uvjetima, načinu držanja životinje a najviše o vremenu laktacije. Mast ovčjeg mlijeka se po sastavu, fizikalnim svojstvima i stupnju disperznosti malo razlikuje od masti kravljeg mlijeka. Odlikuje se većim sadržaj kaprilne i kaprinske kiseline zbog čega mlijeko ima karakterističan okus i miris. Proteini su istog sastava kao i kod kravljeg mlijeka, s tim da je ukupna količina proteina veća u ovčjem mlijeku. U toku laktacije učešće kazeina u ukupnim proteinima se povećava, a učešće proteina u sirutki se smanjuje. Sadržaj mliječnog šećera, laktoze, je kod ovčjeg mlijeka isti kao u kravljem mlijeku. Od minerala treba istaknuti veliki sadržaj kalcija u odnosu na kravlje mlijeko. Ovčje mlijeko bogatije je vitaminima nego kravlje mlijeko. Boja mlijeka je bijela s mogućom svjetložučkastom nijansom. Bijela boja dolazi uglavnom od kazeina, ali i mliječna mast ima svoju ulogu pri odbijanju svjetla od njene površine. Za svjetložučkastu nijansu odgovoran je β -karoten. Kod ovčjeg mlijeka najveći dio β -karotena (provitamin A), oko 80%, se transformira u vitamin A što ovčjem mlijeku daje bijelu boju. Sadrži 2-4 puta više C vitamina od kravljeg. Kiselost mlijeka prikazuje se kao titracijska kiselost i pH vrijednost. Viša titracijska kiselost je posljedica većeg sadržaja kazeina i soli s

pufernim djelovanjem. Ovčje mlijeko pripada grupi kazeinskih mlijeka jer sadrži 75% kazeina. Gustoća ovčjeg mlijeka je veća u odnosu na kravlje. Ovčje mlijeko karakterizira i veća količina mikroorganizama po 1ml u odnosu na kravlje jer je teško postići visok stupanj higijene pri proizvodnji. Poznato je da kod proizvodnje autohtonih sireva, pa tako i sira iz mišine, najznačajniju ulogu igra prirodna mikroflora ovčjeg mlijeka koja stvara specifičnu aromu tijekom njihovog zrenja.^{10, 11, 12}

KOZJE MLIJEKO

Koza je visoko mliječna životinja koja u periodu laktacije proizvede 10-20 puta više mlijeka od svoje težine. Mliječne rase koza u toku laktacije mogu dati od 800-1000 litara mlijeka. Po kemijskom sastavu kozje mlijeko je vrlo slično kravljem mlijeku. Promjene pojedinih sastojaka (masti i bjelančevina) tijekom laktacije slične su onima u kravljem mlijeku. Najvarijabilniji sastojak kozjeg mlijeka je mliječna mast koja može varirati od 2-8% tijekom laktacije. Minimalni prosječni sadržaj mliječne masti iznosi 3,2%. Sastav masti karakterizira viši udio nižih masnih kiselina (oko 20%) u odnosu na kravlje mlijeko (oko 12%). Najznačajnije su niže masne kiseline kapronska, kaprilna i kaprinska, koje su zaslužne za karakterističan „kozji miris“. Kozje mlijeko sadrži bjelančevine slične onima u kravljem mlijeku, a sam sadržaj bjelančevina važan je za količinu i kvalitetu sira. Od ukupne količine, oko 75% otpada na osnovnu bjelančevinu, kazein. Ostalo su bjelančevine mliječnog seruma. Kao i u kravljem mlijeku, laktoza je osnovni ugljikohidrat kozjeg mlijeka (4,3-4,8%). Kozje mlijeko sadrži više kalcija, kalija, magnezija, fosfora, klora i mangana, a manje natrija, željeza, sumpora, cinka i molibdena u odnosu na kravlje mlijeko. Sadržaj vitamina B2 i B12 je manji u odnosu na kravlje mlijeko. Sadržaj karotenoida je neznatan što je uzrok bijele boje kozjeg mlijeka, dok je sadržaj C i D vitamina u kozjem i kravljem mlijeku podjednak.¹¹

1.3 TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SIRA IZ MIŠINE

Postoje određene razlike u tehnologiji proizvodnje sira iz mješine u pet zemalja u kojima se on proizvodi. U Hrvatskoj se proizvodi sir koji se lokalno naziva sir iz mišine. Sir se može praviti iz pasteriziranog ili nepasteriziranog mlijeka. Pasterizacija se provodi u sirarskoj kadi pri 63-65 °C u trajanju od 30 minuta nakon čega ga je potrebno ohladiti. Mlijeko se radi otklanjanja mehaničkih nečistoća procijedi kroz gazu i temperira na 32-37 °C uz dodatak prirodnog ili komercijalnog sirila (Slika 1.1. i 1.2.) Nakon 30-60 minuta, koliko traje period sirenja (Slika 1.3.) gruš se nožem ili prikladnim alatom reže na kocke

veličine cca 4 cm te dogrijava do temperature od 39 °C, nakon čega poprima veličinu oraha ili lješnjaka. Dok je gruš još u sirutci (Slika 1.4.), ručno se oblikuje sirna gruda i stavlja u sirarsku maramu u kojoj se cijedi samoprešanjem vlastite težine (Slika 1.5). Nakon cijedenja, gruš se reže na komade veličine cca 10x10x15 cm (Slika 1.6.), soli krupnom morskom soli (Slika 1.7) i stavlja u prethodno pripremljenu mišinu kako je prikazano na Slici 1.8. (prethodno opisan postupak pripreme mišine), pri čemu je sir u izravnom kontaktu s unutarnjom ili vanjskom stranom kože. Nakon završetka perioda zrenja, dobije se proizvod prikazan na Slici 2. ¹



Slika 2. Hrvatski zreli sir iz mišine ⁹

S obzirom da u jednu mišinu stane cca 15-20 kg sira, ako na dan proizvodnje nema dovoljno sira da se mišina napuni, ista se ostavlja do sutradan kad se napuni novom količinom sira. Da bi se izbjeglo kvarenje sira prilikom stavljanja istog u mišinu sir se mora dobro rukom sabiti kako ne bi ostali prostori ispunjeni zrakom, s obzirom na to da se zrenje odvija u aneorobnim uvjetima. Zrenje sira iz mišine traje 2-3 mjeseca pri temperaturi od 16-20 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 60-80%, a zrenje polutvrdih i tvrdih autohtonih sireva traje od 1-4 mjeseca, ovisno o sastavu i veličini sira. Na početku perioda zrenja mišinu napunjenu sirom, koja je prikazana na Slici 1.9, potrebno je svakodnevno okretati. Stariji se sir okreće svaka 2-3 dana a zreli sir svakih 5 dana uz brisanje vlažnom krpom radi prevencije od pojave plijesni.

U BiH se sir nakon cijedenja i soljenja sir sprema u kacu dok se ne skupi dovoljna količina za jedan mijeh (aerobna konverzija laktoze u mliječnu kiselinu), zatim se rukama lomi i mrvlji i na kraju stavlja u alkoholom dezinficiran mijeh. Sir zrije na temperaturi od 12-15 °C, što je niže od temperature zrenja u hrvatskoj proizvodnji. ^{13,14}

Sir Tulum (Turska) zrije u kozjoj koži 3-6 mjeseci pri temperaturi od 6-10 °C i relativnoj vlažnosti 65-85%.¹⁵

Kozji Darfiyeh (Libanon) se prije spremanja u kozju kožu oblikuje u loptice mase 400-500 grama. Sir zrije 1-3 mjeseca pri temperaturi 10-12 °C i relativnoj vlažnosti zraka između 85-95% zajedno s albuminskim sirom koji se prije stavljanja u kožu suho soli.¹⁶

Tehnološki proces proizvodnje sira iz mišine opisan je shematskim prikazom (Slike 1.1-1.9.):



Slike 1.1-1.9. Tehnološki proces proizvodnje sira iz mišine¹⁷

1.4 BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA IZ MIŠINE

U postupku sazrijevanja sira iz mišine dolazi do biokemijskih i mikrobioloških promjena čijom se interakcijom razvijaju senzorska svojstva sira. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, rast nestarterске mikrobne populacije (*eng.* NSLAB- Non-Starter Lactic Acid Bacteria), te rast sekundarne mikroflore. Biokemijske promjene tijekom zrenja sira dijele se na primarne i sekundarne. Primarne promjene su odgovorne za osnovne promjene teksture, dok sekundarne promjene formiraju konačni miris i okus sira. Primarni biokemijski procesi tijekom zrenja sira su glikoliza, lipoliza i proteoliza tijekom kojih dolazi do razgradnje laktoze, masti i proteina a u nekih sireva i citrata.¹⁸

1.5 OSNOVNI PROCESI U PROIZVODNJI SIRA

1.5.1 GLIKOLIZA

Osnovni proces u proizvodnji sira iz mišine, ali i drugih vrsta sireva, je fermentacija laktoze. Laktoza ili mliječni šećer je disaharid prisutan u mlijeku sisavaca. Nastaje u mliječnim žlijezdama iz monosaharida glukoze i galaktoze. Laktoza se uz pomoć enzima laktaze u probavnom traktu razgrađuje na sastavne dijelove, koji zatim ulaze u proces glikolize.

Razgradnju laktoze glikolitičim ili fosfoketolaznim putem vrše bakterije mliječne kiseline (npr. roda *Lactobacillus*). Konačni produkt glikolitičkog puta razgradnje laktoze je mliječna kiselina dok su produkti fosfoketolaznog puta razgradnje 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. Zaostala laktoza na početku zrenja metabolizira u L (+) laktat, ovisno o temperaturi i razini soli u grušu. Brzi prodor soli u grušu i niski pH usporavaju glikolizu dok kod previsoke koncentracije soli dolazi do inhibicije bakterija mliječne kiseline. Koji će spojevi nastati kao posljedica odvijanja glikolize ovisit će o vrsti sira.¹⁹

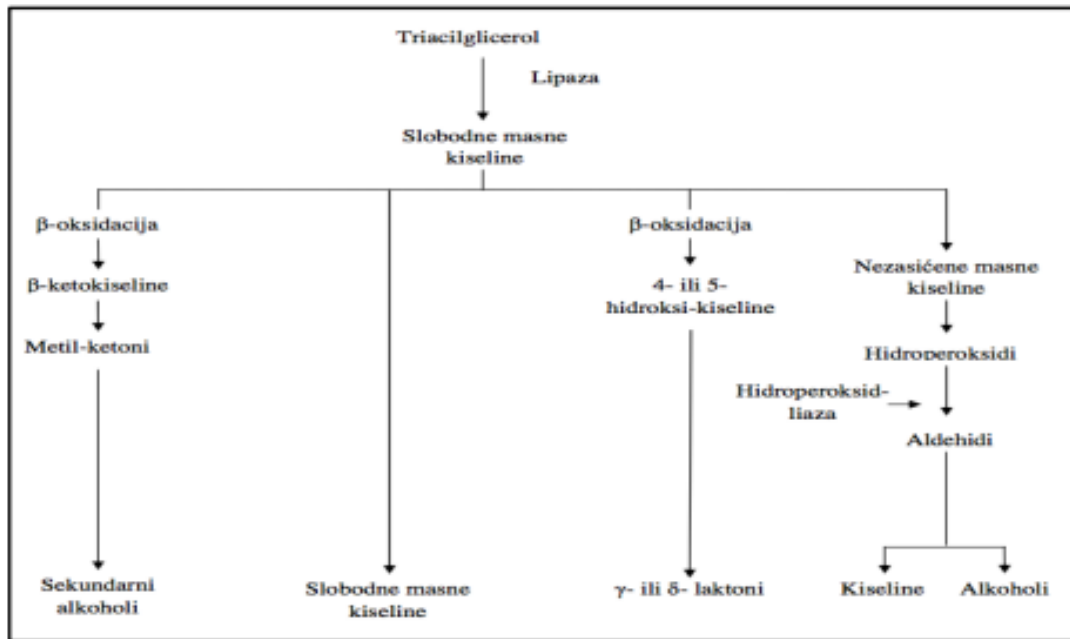
1.5.2 LIPOLIZA

Lipoliza je proces razgradnje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol. Za odvijanje ovog procesa su potrebni enzimi, lipaze. U mlijeku su prirodno prisutne lipoproteinske lipaze dok ostale lipaze, koje se mogu naći u siru, potječu iz sirila, mljekarske kulture, nestarterske mikroflore i sekundarne mikroflore. Mliječna mast je kompleksan spoj različitih lipidnih tvari od kojih su najviše zastupljeni triacilgliceroli (oko 98%) a u manjoj količini su prisutni i diacilgliceroli, monoacilgliceroli, fosfolipidi, kolesterol, cerebrozidi, slobodne masne kiseline, mineralne tvari i vitamini A, D, K, E. Mliječna mast podložna je lipolitičkim i oksidativnim promjenama.

Pod lipolitičkim promjenama podrazumijeva se cijepanje esterskih veza u triacilglicerol molekulama pri čemu dolazi do stvaranja alkohola, glicerola, i slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline su podložne oksidaciji, odnosno vezanju kisika iz zraka na dvostruke kovalentne veze. Ipak, zbog niskog oksidacijsko-redukcijskog potencijala u siru, mliječna mast je više podložna lipolitičkim nego oksidacijskim promjenama. Lipolitičke promjene izraženije su kod sireva proizvedenih od sirovog mlijeka kao što je sir iz mišine. Zbog prisutnosti primarne mikroflore mlijeka i lipoproteinske lipaze te korištenja sirila koje sadrži predželučanu esterazu, sir iz mišine ima pojačanu lipolitičku aktivnost i pikantniji okus bas kao i pojedini talijanski sirevi (romano, provolone, pecorino).²¹ Kod većine polutvrdih i tvrdih sireva s unutarnjim zrenjem intezivna lipoliza je zapravo nepoželjna budući da visoki udio slobodnih masnih kiselina uzrokuje užegao okus sira, posebice kod kratkolančanih kiselina kao što je maslačna kiselina.²¹

Međutim slobodne masne kiseline, čiji je katabolizam prikazan shematski na Slici 3, mogu biti i prekursori za nastajanje drugih spojeva arome pa tako Yilmaz i sur. te Havranek i sur. ističu da su produkti katabolizma slobodnih masnih kiselina koje se odvijaju u sirevima tijekom zrenja sekundarni alkoholi, laktone i kiseline.¹⁵

Slobodne masne kiseline mogu reagirati s alkoholima i slobodnim sulfhidrilnim skupinama, pri čemu nastaju esteri i tioestri koji siru daju jaku aromu. Niske koncentracije slobodnih masnih kiselina imaju poželjan utjecaj na stvaranje arome sira, posebice ako su pravilno izbalansirane s produktima ostalih biokemijskih reakcija tijekom zrenja sira.²



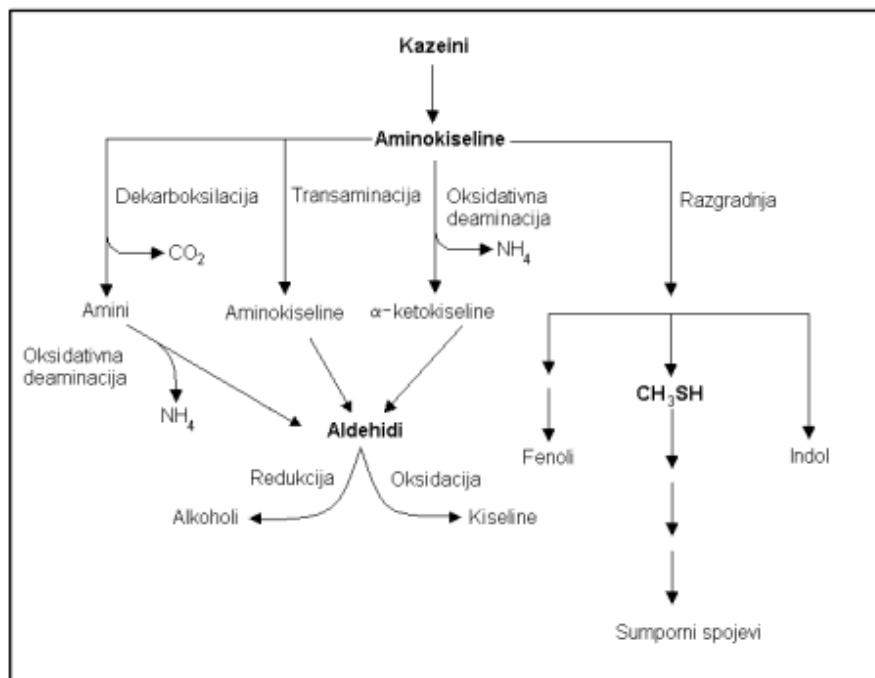
*Slika 3. Shema katabolizma slobodnih masnih kiselina*²²

1.5.3 PROTEOLIZA

Proteoliza predstavlja razgradnju kazeina do peptida i slobodnih aminokiselina (Slika 4. i Slika 5.) djelovanjem proteolitičkih enzima, proteaza. Najsloženiji je i vjerojatno najvažniji biokemijski proces koji se odvija tijekom zrenja sireva s unutrašnjim bakterijskim zrenjem. Rezultat proteolize je promjena strukture sira pri čemu ona postaje mekša, sadržaj vode u siru se smanjuje dok se pH vrijednost sira povećava. Proteoliza direktno utječe i na okus i aromu sira osiguravajući slobodne aminokiseline, supstrate za sekundarne kataboličke promjene odgovorne za nastajanje spojeva arome²³

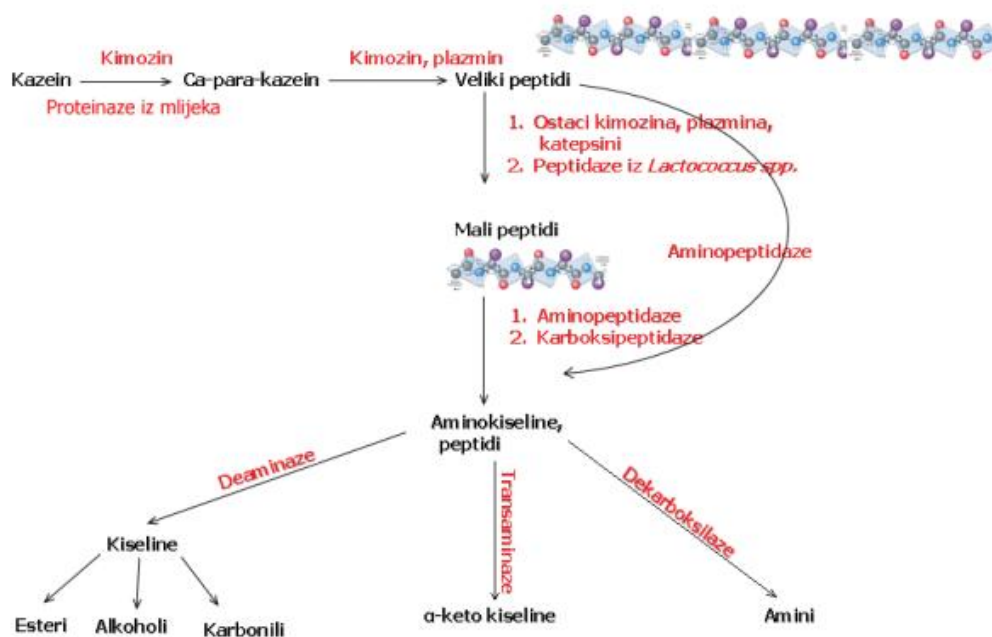
Proteoliza se može podijeliti na primarnu i sekundarnu proteolizu. Primarna proteoliza se odvija djelovanjem kimozina i plazmina a sekundarna djelovanjem endogenih i egzogenih enzima nestarterske populacije i bakterija mliječne kiseline dodanih u formi startera. Primarnom proteolizom se kazein hidrolizira do određenih razgradnih produkata, najviše u ovisnosti o količini i aktivnosti rezidualnog sirila a u manjoj mjeri i o aktivnosti plazmina. Sekundarnom proteolizom dolazi do razgradnje proteina i velikih peptida do aminokiselina i malih peptida.

Produkti **sekundarne proteolize** su niskomolekularni peptidi koji se konvertiraju do aminokiselina a iz kojih biokemijskim procesima dekarboksilacije, transaminacije, deaminacije i desumporizacije nastaju aromatske komponente, što je prikazano na Slici 4.



*Slika 4. Putevi katabolizma slobodnih masnih kiselina putem razgradnje kazeina, pod djelovanjem proteolitičkih enzima*¹³

Za bolje razumijevanje procesa proteolize potrebno istražiti dušične tvari koje nastaju tijekom navedenog biokemijskog procesa. Formiranje dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) tijekom zrenja sira predstavlja opseg i brzinu proteolize. Havranek i sur. 2014. konstatiraju da se procjena sekundarnih proteolitičkih promjena mjeri udjelom dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN) i udjelom dušičnih tvari topljivih u trikloroetanoj kiselini (TCA-SN), u odnosu na ukupni dušik (TN). Dobivene vrijednosti WSN/TN prikazuju količinu polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina te njihovih soli, koje nastaju kao posljedica kimozijske aktivnosti i u manjoj mjeri plazminske aktivnosti, što je predočeno shematskim prikazom na Slici 5 i utječe na nastanak arome sira (Slika 6.).^{8, 23}



Slika 5. Shema enzimske razgradnje kazeina¹⁸

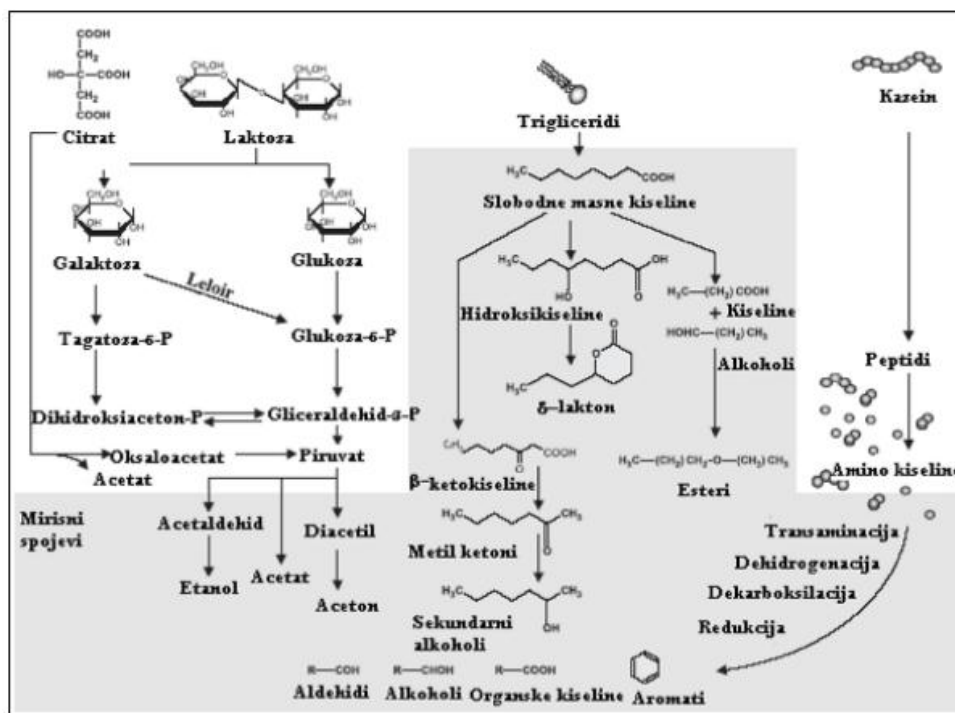
Proteolitičke promjene u mišini

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži prolaze kroz izraženije proteolitičke promjene od sireva koji zriju u kori, te posljedično tome sadrže viši udio WSN%TN. Izraženije proteolitičke promjene rezultat su aneorobnih uvjeta zrenja, temperature zrenja i prirodne mikrobne kulture životinjske kože. Razlika u sadržaju WSN%TN između sireva koji zriju u koži (19,98%) i sireva koji zriju u kori (13,86%) značajna je tek nakon 45. dana zrenja sireva, što ukazuje na to da se proteolitičke reakcije u mišini intenziviraju tek nakon navedenog perioda zrenja.

Usporedba vrijednosti dušičnih tvari s rezultatima provedenima na drugim vrstama sireva, koji ne zriju u životinjskoj koži, ukazuje na intenzivnu proteolizu koja se odvija u životinjskoj koži kao mediju za zrenje sira. Stoga sirevi koji zriju u životinjskoj koži pripadaju skupini sireva s intenzivnim i brzim proteolitičkim procesima što rezultira njihovim specifičnim okusom i teksturom.²²

1.6 AROMA SIRA IZ MIŠINE

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži odlikuju se izraženom pikantnom aromom i okusom. Ove karakteristike rezultat su složenih biokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom zrenja sira u specifičnom mediju, koži, a koji su prikazani shematskim prikazom na Slici 6.



*Slika 6. Shema biokemijskih procesa u nastajanju sira, razgradnje kazeina, slobodnih masnih kiselina i ugljikohidrata do pojave okusa i arome sira, odnosno do nastanka sira*¹³

Najzastupljenije hlapljive komponente koje daju aromu ovim vrstama sira su: esteri, alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni i terpeni. Iako je, zbog prelaska u alkohole ili odgovarajuće kiseline, detektiran manji broj aldehida u sirevima koji zriju u životinjskoj koži, njihov utjecaj na aromu je i dalje značajan. Esteri i terpeni detektirani su u većim koncentracijama, posebice limonen koji daje citrusnu aromu siru. Od aromatskih spojeva najviše su zastupljeni alkoholi. Etanol je pokazao ograničenu ulogu u formiranju arome sira, ali zato sudjeluje u sintezi nekih estera. Uz etanol, 3-metil-butanol je alkohol koji se pojavljuje u siru iz mišine i u tulum siru.²²

Aromatski profili sireva koji zriju u životinjskoj koži su slabo istraženi. Provedena istraživanja obavljena su djelomično na siru iz mišine, tulum siru i manjim djelom na darfiyeh (Libanon) siru.^{18, 24}

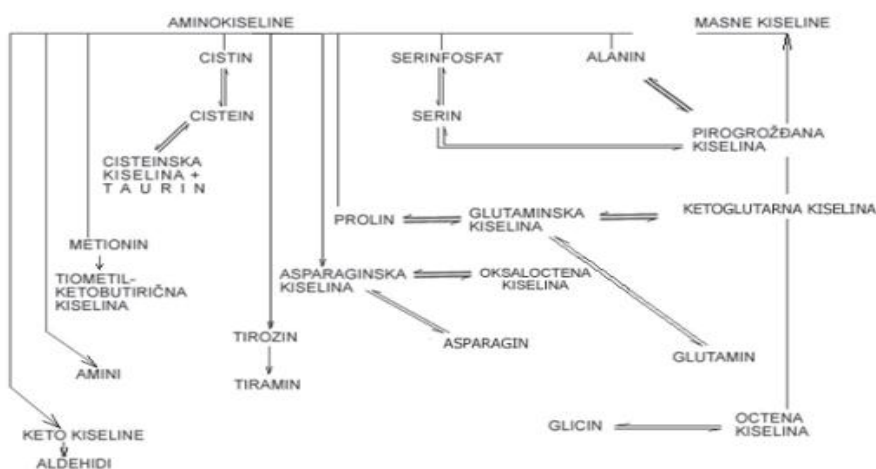
1.6.1 Peptidi kao čimbenici arome sira

Praćenjem proteolitičkih promjena i razgradnje peptida dobiva se uvid u formiranje gorkog okusa sira. Enzimskom hidrolizom proteina formiraju se peptidi manjih molekulskih masa, od kojih neki, pretežno hidrofobni, imaju gorak okus. U slučaju nepotpune hidrolize peptida dolazi do njihovog nakupljanja i sir dobiva gorak okus. Važnu ulogu u stvaranju gorkih peptida imaju bakterije NSLAB, enzimi startera i sirila. Određena 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. Utvrđeno je da dodatak bakterija vrste *Lactobacillus helveticus* u nemasne sireve potiče formiranje veće količine slobodnih masnih kiselina čime se mogu spriječiti pogreške okusa i mirisa.¹⁸

1.6.2 Razgradnja aminokiselina u formiranje arome sira

Aminokiseline imaju važnu ulogu u formiranju arome sira budući da su prekursori za stvaranje drugih spojeva izraženog okusa i mirisa.

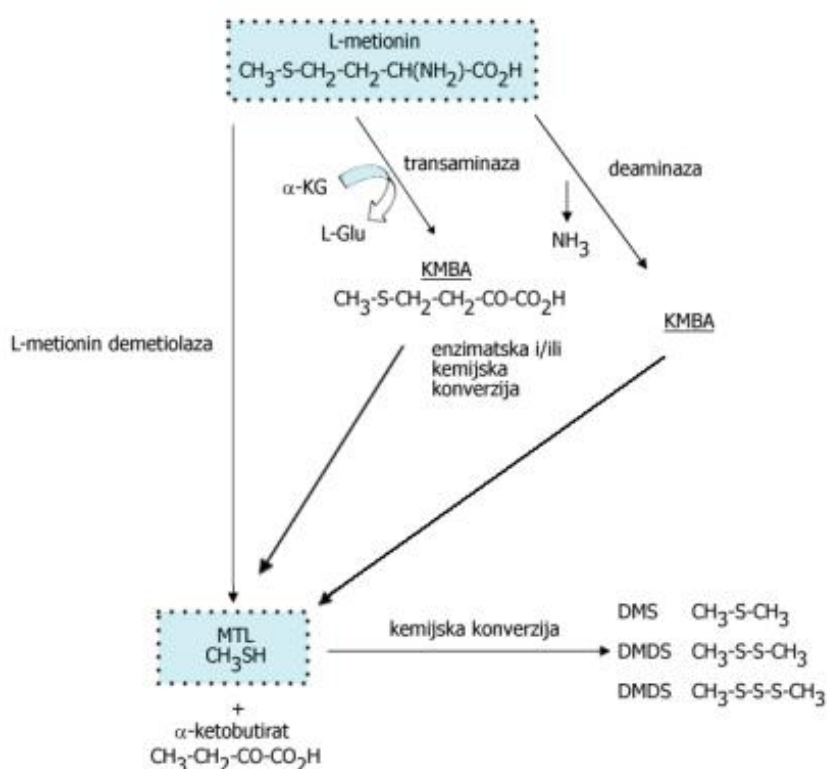
Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi, odgovorni za specifične arome raznih vrsta sireva, a što je shematski prikazano na Slici 7. Poznata su dva glavna puta razgradnje aminokiselina, i to pomoću aminotransferaza i liaza, te rjeđe pomoću deaminaza (Slika 8.) ili dekarboksilaza.



Slika 7. Metabolički putevi razgradnje aminokiselina u siru¹⁸

Glavne aminokiseline u stvaranju arome sira su aminokiseline s razgranatim lancem: valin (Val), izoleucin (Ile) i leucin (Leu), aromatske aminokiseline: triptofan (Trp), tirozin (Tyr) i fenilalanin (Phe) te aminokiseline koje sadrže sumpor: cistin (Cys) i metionin (Met), (Slika 8.). Iz tog razloga je važna njihova količina i vrsta u siru te enzimi koji ih razgrađuju.

Enzimi vezani za proces razgradnje aminokiselina su manje istraženi, ali se zna da su u njega uključeni enzimi koji potječu iz mlijeka, sirila i bakterija mliječno-kisele fermentacije.¹⁸



Slika 8. Putevi razgradnje metionina tijekom zrenja sira¹⁸

Modifikacijom aromatskih aminokiselina nastaju feniloctena kiselina, fenilacetaldehid, benzaldehid, krezol, fenol i indol koji imaju **cvjetni ili miris po fenolu** i ključni su sastojci mirisa u tvrdim i polutvrdim sirevima.

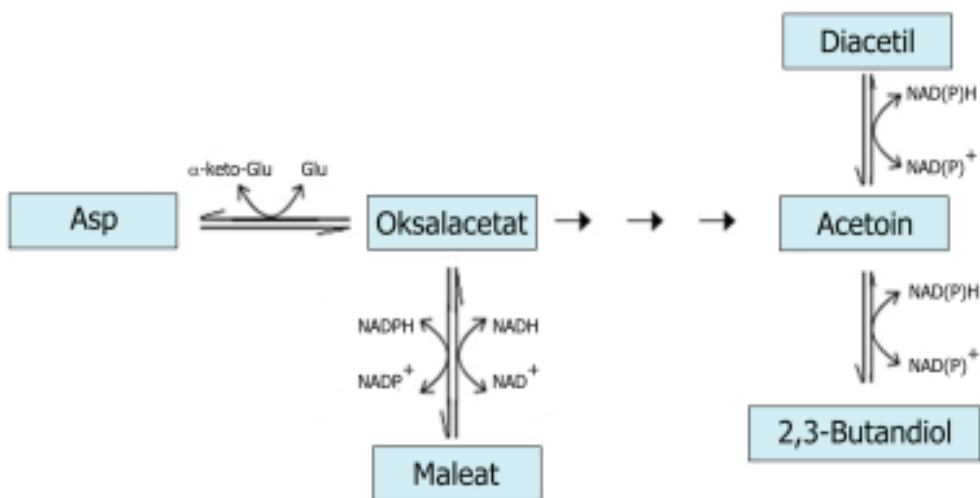
Razgradnjom izoleucina, leucina i valina nastaju izovalerijanska i izomaslačna kiselina (slatkog, kiselog, gorkog, trulog ili maslačnog okusa i mirisa), 2-metilbutan i 3-metilbutan te 2-etilpropan s karakterističnom **voćnom ili alkoholnom aromom**.

Dekarboksilacijom lizina može nastati kadaverin, a razgradnjom ornitina nastaje putrescin. Oba amina imaju fekalni ili **miris po truleži**. Tiramin i histamin su dominantni amini u većini sireva, a nastaju dekarboksilacijom tirozina i histidina. Sadržaj amina doprinosi specifično **oštrom okusu** zrelih sireva.

Pojedini sojevi *Lactobacillus paracasei* razgrađuju asparaginsku kiselinu do diacetila, acetoina i 1,3-butandiola, kako je prikazano shemom na Slici 9., a koji doprinose stvaranju **mirisa po maslacu**.

Sumporni spojevi koji doprinose stvaranju **okusa i mirisa sira po kelju, jajima, bijelom luku i krumpiru** nastaju razgradnjom aminokiselina cistina i metionina (razgradnja Met prikazana je na Slici 8).

Izrazito su bitni u formiranju arome jer se mogu osjetiti pri vrlo niskim koncentracijama. Razgradnjom asparaginske kiseline djelovanjem aminotransferaze nastaje oksalacetat koji se daljnjim reakcijama može katabolizirati do diacetila, karakterističnog mirisa po maslacu, acetoina i 2,3-butandiola (Slika 9).^{25, 18}



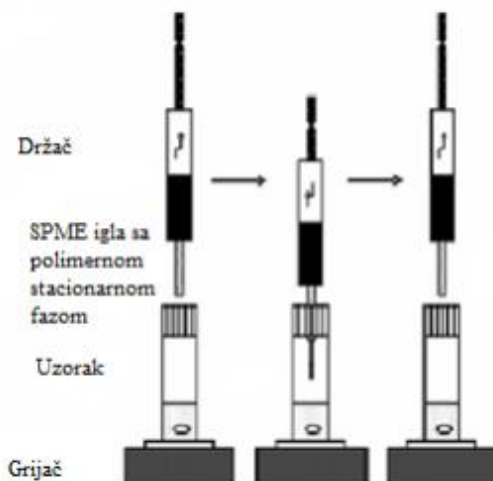
Slika 9. Shema puteva razgradnje asparaginske kiseline tijekom zrenja sira¹⁸

1.7 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Metode koje se koriste za izolaciju hlapljivih spojeva obuhvaćaju razne destilacijske i ekstrakcijske metode. Ipak, za izolaciju hlapljivih spojeva sira najčešće korištena metoda je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.

1.7.1 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI - HS-SPME

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (eng. headspace solid phase microextraction, HS-SPME) je sorpcijska tehnika koja se većinom upotrebljava za izolaciju aromatičnih spojeva (Slika 10). Omogućuje uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje hlapljivih spojeva u jednom koraku i bez upotrebe otapala. Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (dugo 1-2 cm) obloženo polimernim filmom za ekstrakciju hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno se nalazi u sastavu igle smještene na SPME držaču. Tip vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije pa se nepolarna vlakna koriste se ekstrakciju nepolarnih spojeva a polarna za ekstrakciju polarnih spojeva.



Slika 10. Uređaj za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME ²⁷

Uzorak se stavlja u SPME vialicu te se hermetički zatvara septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare.

Zatim se vlakno uvodi u prostor iznad uzorka (headspace) i na vlakno se adsorbiraju hlapljivi spojevi. Vlakno se uvlači, a pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa.

Prednosti metode su što ne koristi otapalo, jednostavna je i brza, pogodna za identifikaciju nepoželjnih mirisa kao i za brzu usporedbu uzoraka. Nedostaci su ovisnost aromatičnog profila sakupljenih spojeva o debljini, vrsti i dužini vlakna te o temperaturi i vremenu uzorkovanja. Osim toga neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve.²⁶

1.8 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH HLAPLJIVIH SPOJEVA

Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se njihovo razdvajanje i identifikacija. U tu svrhu se najčešće koristi vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa, čiji je način rada shematski prikazan Slikom 11.

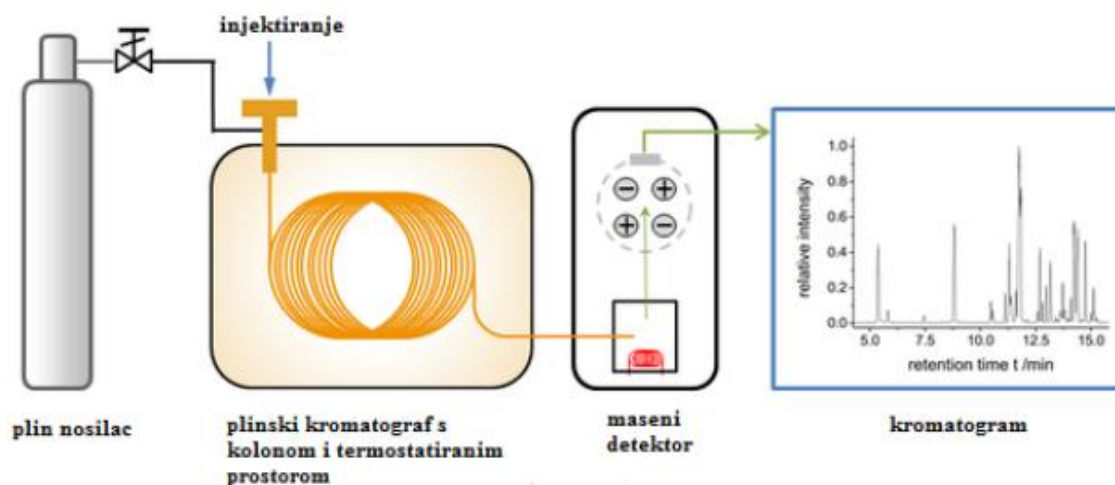
1.8.1 VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (*eng.* gas chromatography-mass spectrometry, GS-MS) je učinkovita instrumentalna metoda koja se najčešće koristi za analizu smjese hlapljivih spojeva. Omogućuje razdvajanje spojeva i njihovu strukturnu analizu uz minimalnu količinu uzorka. Plinska kromatografija služi za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje pa je u tom segmentu nadopunjuje spektrometrija masa. Povezivanjem ovih dviju tehnika povećava se njihova pojedinačna specifičnost i osjetljivost čime se omogućuje kvantitativna i kvalitativna analiza.²⁷

Osnovne komponente uređaja za GC-MS su:

1. Boca s plinom nositeljem
2. Injektor
3. Peć s kromatogramskom kolonom
4. Maseni detektor

5. Računalo



Slika 11. Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa GC/MS²⁸

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 SIR IZ MIŠINE

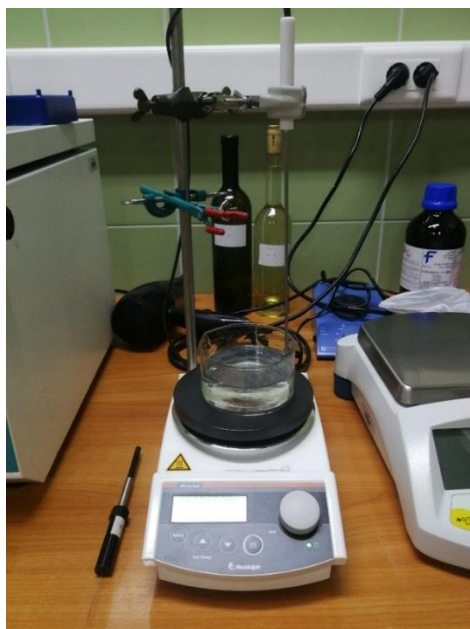
Za izradu ovog završnog rada korišten je sir iz mišine od kravljeg i kozjeg mlijeka proizveden u sirani I-Pak u Pakovom Selu 2021. godine.

2.2 KEMIKALIJE I APARATURA

Za izradu ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka,
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom: sivo vlakno sa ovojnicom divinilbenzen/karboksen/poli(dimetil-siloksan) (DVB/CAR/PDMS), Supelco Co., SAD,

- magnetska miješalica, model MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E. ²⁹



Slika 12. Aparatura potrebna za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi HS-SPME

2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Hlapljivi spojevi sira iz mišine izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature od 40, 50 i 60°C (Slika 12.). Na taj su način dobivena 3 uzorka koja su analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

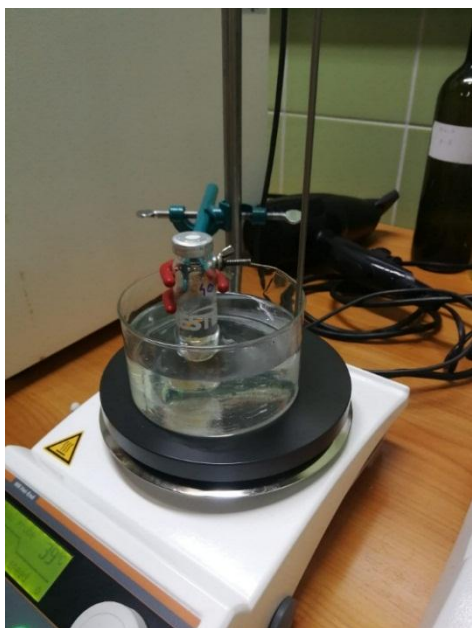
2.3.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI

Hlapljivi spojevi sira izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi korištenjem sivog vlakna pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Vlakno je prije početka rada kondicionirano postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa pri 270 °C na 60 minuta, u skladu sa uputama proizvođača. Sva tri uzorka pripremljena su na isti način, jedino što se mijenjalo je temperatura pri kojoj je vršena mikroekstrakcija. U staklenu bočicu tzv. Vialicu (Slika 13.) stavljen je 1gram kravljeg sira iz mišine.



Slika 13. Vialice pripremljene za postavljanje uzorka

Vialica s uzorkom je zatvorena poli(tetrafluoretilen)/silikonskom septom i postavljena u vodenu kupelj odgovarajuće temperature (40, 50 ili 60°C) te ostavljena na konstantnoj temperaturi 15 minuta. Za održavanje konstantne temperature vodene kupelji korištena je magnetska miješalica s termostatom. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka (Slika 14.) sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare.



Slika 14. Aparatura za HS-SPME prije postavljanja sivog vlakna u zračnu okolinu uzorka



Slika 15. SPME Iгла sa sivim vlaknom

Nakon oslobađanja vršnih para uvedena je SPME igla sivog vlakna (Slika 15.) u vialicu, vlakno je izvučeno i provedena je ekstrakcija hlapljivih spojeva u vremenu od 40 minuta. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vialice i odmah postavljeno u GC-MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.

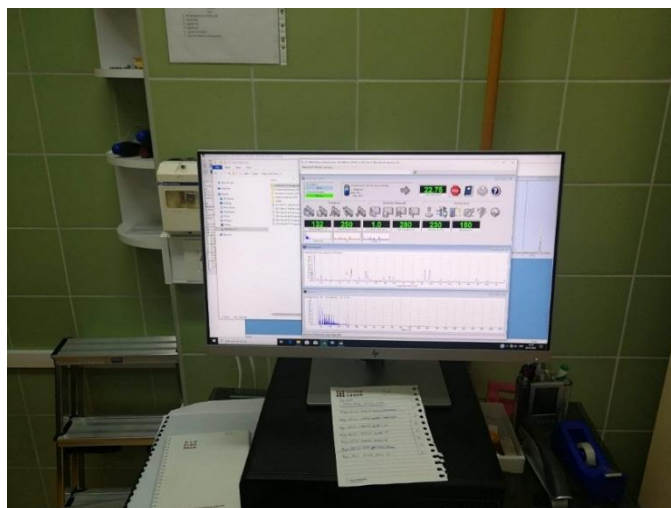
2.4 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA GC-MS

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS), s uređajem prikazanim na Slici 16.



Slika 14. Uređaj vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa GC-MS

Korišten je plinski kromatograf, proizvođača Agilent Technologies, model 7820A, povezan sa spektrometrom masa, proizvođača Agilent Technologies, model 5977E, koji je spojen na računalo (Slika 17.) na kojem se prikazuju rezultati.



Slika 15. Računalo za prikaz rezultata vezanog sustava GC-MS

Analize uzoraka napravljene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies kemijskog sastava 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan i dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm .

Plin nositelj je helij protoka od 1 mL/min, temperatura injektora je bila 250°C, a omjer cijepanja 1:50, temperatura detektora je bila 280°C, energija ionizacije 70 eV, a temperatura izvora ionizacije 230°C. Temperatura peći određena je programom: 2 min izotermno na 70°C, slijedi porast temperature od 70°C do 200°C brzinom od 3°C min⁻¹, te zadržavanje 2 min pri 200°C. Sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije omogućuje razdvajanje komponenata iz smjese i njihovu identifikaciju.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih masenih spektara sa masenim spektrima pohranjenim u biblioteci Wiley9 i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD), kao i usporedbom retencijskih vremena t_R , izraženih u minutama.

Za svaki uzorak koji je analiziran vezanim sustavom GC-MS dobiveni su sljedeći podaci koji omogućuju identifikaciju hlapljivih spojeva sira iz mišine:

- t_R – vrijeme zadržavanja u minutama, odnosno vrijeme zadržavanja pojedine komponente, koja je na kromatogramu izražena pikom
- kromatogram ukupne ionske struje
- relativni udio pojedine komponente, izražen u postotcima (%), koji predstavlja udio površine pika u ukupnoj površini
- naziv spoja ili spojeva, čiji su spektri najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje, pri čemu je vjerojatnost sličnosti spektara koji su dani na uspoređivanje, izražena u postotcima (%).

3 REZULTATI

Hlapljivi spojevi sira iz mišine, pripremljenog od kravljeg i kozjeg mlijeka, izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi na sivom vlaknu pri tri različite temperature (40, 50 i 60°C). Postupak pripreme uzoraka opisan je u poglavlju eksperimentalnog rada 2.3.1. Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati su prikazani tablično (Tablice 1; 2; 3), a identificirani spojevi poredani su u tablicama prema redosljedu eluiranja s kolone HP-5MS. S obzirom da kod HP-5MS 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 18; 19; 20) 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 Wiley⁹ i NIST¹⁷.

Značenje simbola u tablicama (Tablica 1; 2; 3) je:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

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

- spoj nije identificiran u uzorku.

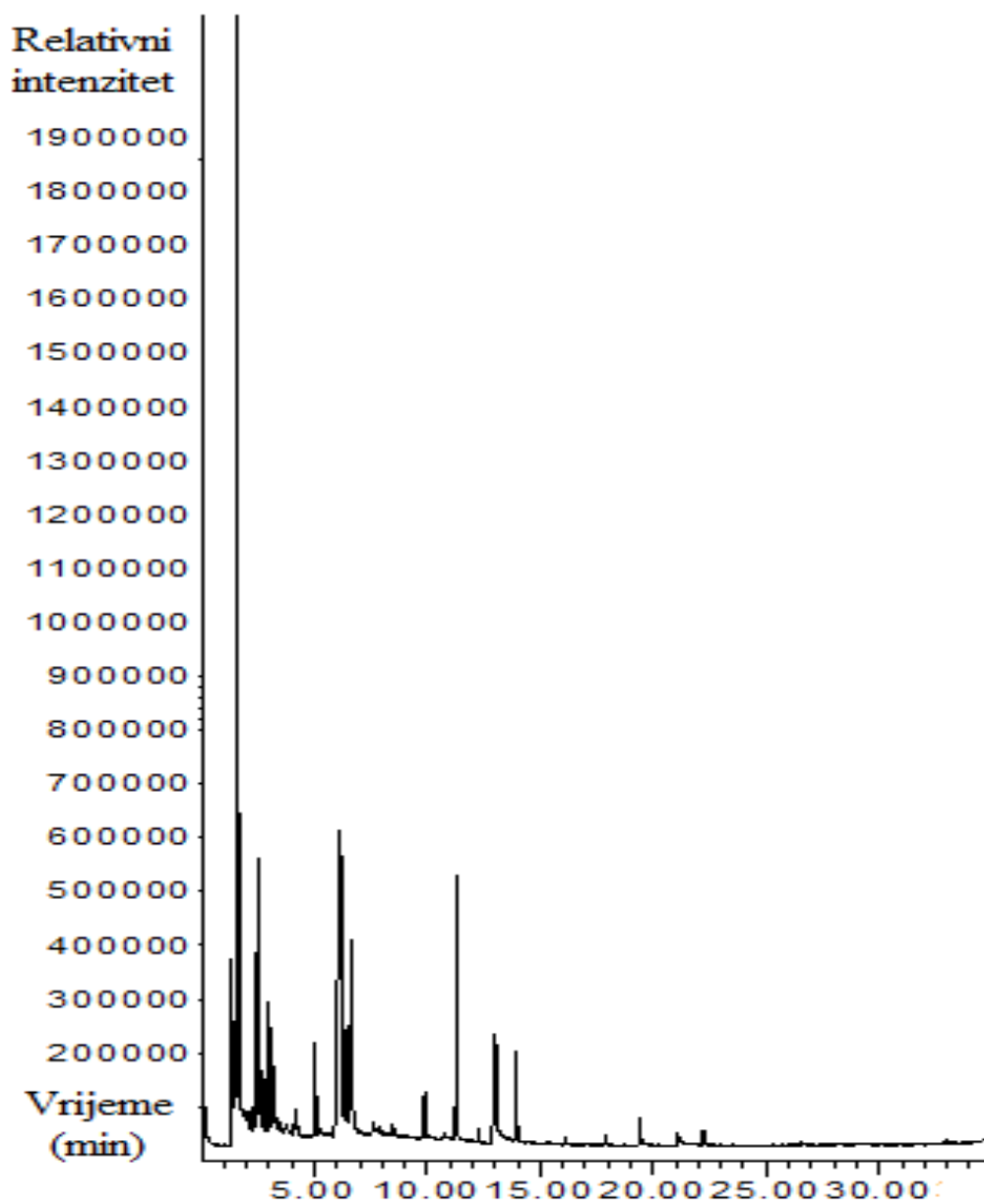
Tablica 1. *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 40 °C.*

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| 1. | etanol | 1,41 | 3,67 |
| 2. | octena kiselina | 1,55 | 2,33 |
| 3. | etil-acetat | 1,61 | 16,80 |
| 4. | butanska kiselina | 2,45 | 9,47 |
| 5. | etil-butanoat | 2,73 | 0,62 |
| 6. | 3-metilbutanska kiselina | 3,08 | 3,16 |
| 7. | 2-metilbutanska kiselina | 3,28 | 1,10 |
| 8. | 1-metilpropil-butanoat | 5,04 | 2,86 |
| 9. | heksanska kiselina | 6,16 | 23,41 |
| 10. | 2,2,4,6,6-pentametilheptan | 6,44 | 3,88 |
| 11. | etil-heksanoat | 6,65 | 5,50 |
| 12. | propil-heksanoat | 9,88 | 1,14 |
| 13. | 2-metilpropil-heksanoat | 11,29 | 7,10 |
| 14. | oktanska kiselina | 13,18 | 5,32 |
| 15. | etil-oktanoat | 13,94 | 2,48 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 88,84 |

Značenje simbola u Tablici 1:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

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



Slika 16. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 40 °C.

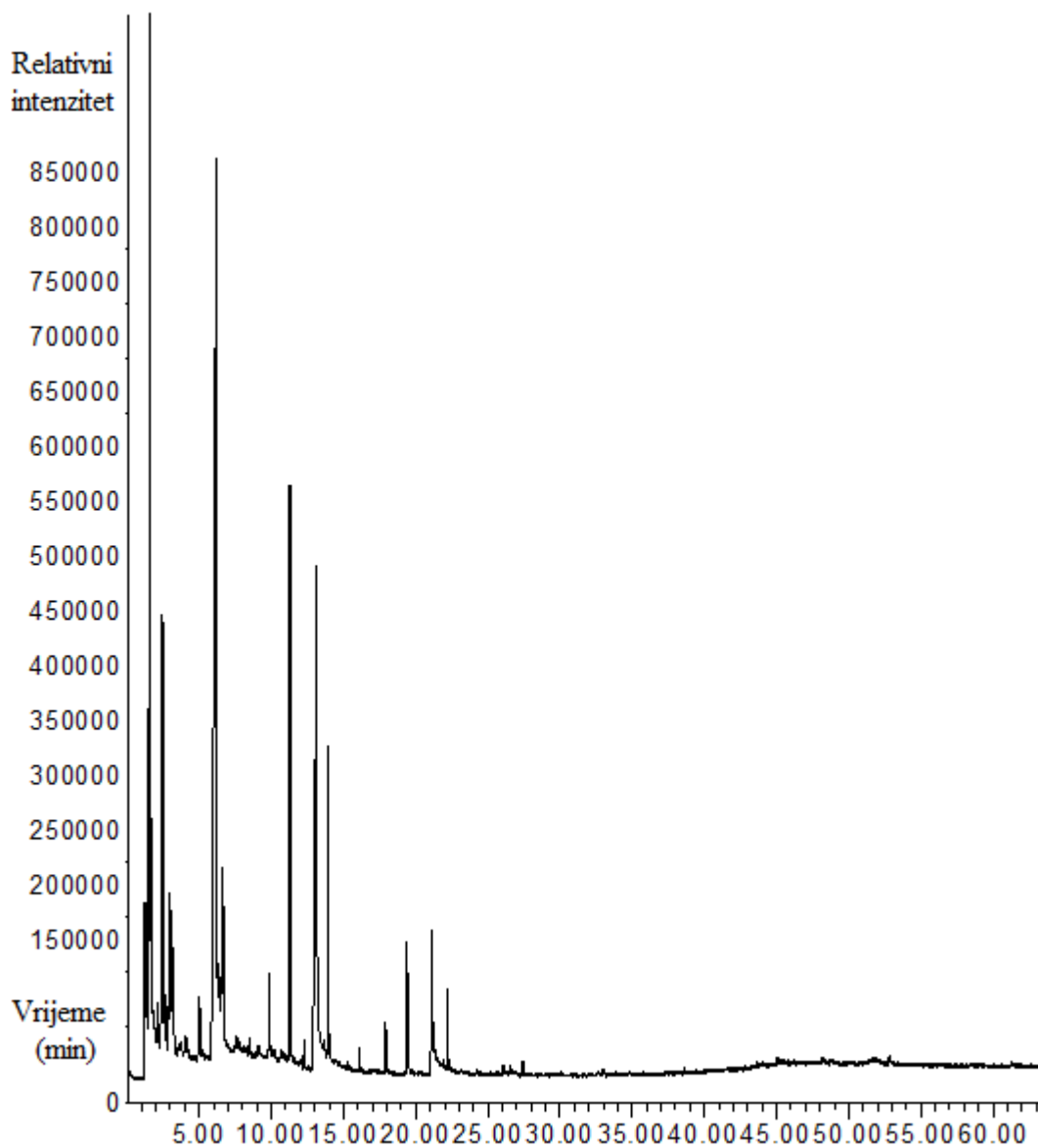
Tablica 2.. *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 50°C*

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|
| 1. | etanol | 1,41 | 1,97 |
| 2. | octena kiselina | 1,55 | 2,05 |
| 3. | etil-acetat | 1,61 | 11,01 |
| 4. | butanska kiselina | 2,45 | 9,06 |
| 5. | 3-metilbutanska kiselina | 3,08 | 1,38 |
| 6. | heksanska kiselina | 6,16 | 34,85 |
| 7. | etil-heksanoat | 6,65 | 4,49 |
| 8. | 2-metilpropil-heksanoat | 11,29 | 8,04 |
| 9. | oktanska kiselina | 13,18 | 15,95 |
| 10. | etil-oktanoat | 13,94 | 3,92 |
| 11. | propil-oktanoat | 17,19 | tr. |
| 12. | 2-butil-oktanoat | 19,40 | 1,47 |
| 13. | dekanska kiselina | 21,14 | 2,49 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 96,68 |

Značenje simbola u Tablici 2:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

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



Slika 17. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 50°C

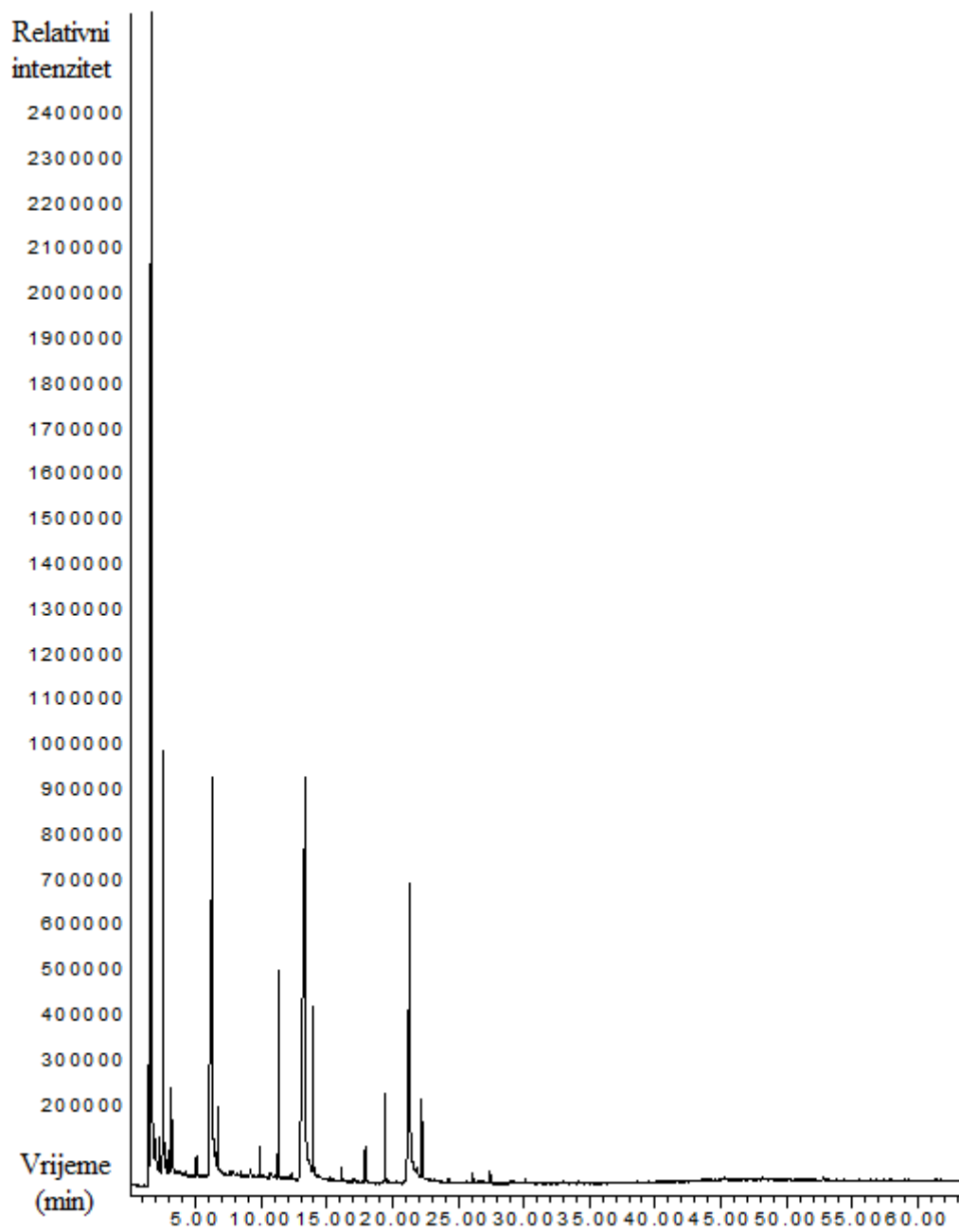
Tablica 3.. *Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sira iz mišine izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 60°C.*

| Redni broj | Spoj | t_R (min) | Udio (%) |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|
| 1. | etanol | 1,41 | 0,43 |
| 2. | octena kiselina | 1,55 | 6,83 |
| 3. | etil-acetat | 1,61 | 7,75 |
| 4. | butanska kiselina | 2,45 | 8,34 |
| 5. | 3-metilbutanska kiselina | 3,08 | 1,50 |
| 6. | 2-metilbutanska kiselina | 3,28 | 0,88 |
| 7. | heksanska kiselina | 6,16 | 22,38 |
| 8. | etil-heksanoat | 6,65 | 1,01 |
| 9. | propil-heksanoat | 9,88 | 0,43 |
| 10. | 2-metilpropil-heksanoat | 11,29 | 3,02 |
| 11. | oktanska kiselina | 13,18 | 25,19 |
| 12. | etil-oktanoat | 13,94 | 2,58 |
| 13. | propil-oktanoat | 17,19 | 0,62 |
| 14. | 2-butil-oktanoat | 19,40 | 1,45 |
| 15. | dekanska kiselina | 21,14 | 12,50 |
| 16. | etil-dekanoat | 22,23 | 1,28 |
| UKUPNO IDENTIFICIRANO | | | 96,19 |

Značenje simbola u Tablici 3:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

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



Slika 18. Kromatogram ionske struje za uzorak sira iz mišine dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pri 60°C

4 RASPRAVA

Sir iz mišine proizvodi se na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima Šibensko-kninske županije, uglavnom od ovčjeg mlijeka, ali i od kozjeg i kravljeg mlijeka ili njihovih mješavina. Glavna specifičnost ove vrste sira je anaerobno zrenje u janjećoj koži, što ga u potpunosti razlikuje od ostalih sireva, te ima izravan utjecaj na njegov okus, aromu, miris i konzistenciju. Upravo zbog toga se u procesu proizvodnje velika pozornost pridaje samoj pripremi janjeće kože koja se opisuje kao „mišina“ ili vreća napravljena od kože cijelog janjeta.¹³

Smatra se da su sa proizvodnjom ove vrste sira započeli Tračani i Iliri i to slučajno koristeći mješine za čuvanje i prenošenje mlijeka pri čemu je došlo do njegove spontane fermentacije.

30

Formiranje arome sira rezultat je složenih mikrobioloških, biokemijskih i kemijskih procesa koji se odvijaju tijekom zrenja sira. Na početku zrenja sirevi se odlikuju blagim i neutralnim, najčešće sličnim, organoleptičkim svojstvima dok se karakteristični mirisi i okusi razvijaju upravo tijekom zrenja. Biokemijske promjene tijekom zrenja sira mogu se podijeliti na primarne (proteoliza, lipoliza i metabolizam rezidualne laktoze) i sekundarne promjene (metabolizam masnih kiselina i aminokiselina). Primarne su odgovorne za osnovne promjene teksture a sekundarne za konačni miris i aromu sira. Kao glavni prekursori za formiranje spojeva odgovornih za aromu sireva navode se aminokiseline i to aminokiseline sa razgranatim lancem: valin, izoeleucin i leucin, aromatske aminokiseline: triptofan, tirozin i fenilalanin, te aminokiseline koje sadrže sumpor: cistin i metionin. Zbog toga je važna njihova količina i vrsta u siru te enzimi koji ih razgrađuju. Razgradnjom aminokiselina u siru nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi odgovorni za specifične arome raznih sireva.¹⁸

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži odlikuju se izraženom i pikantanom aromom koja se razlikuje od sireva koji zriju u prirodnoj kori. Razlog tome je taj da u životinjskoj koži sir zrije u anaerobnim uvjetima uz prisustvo prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline, drugih bakterija nestarterske mikroflore te kvasaca i plijesni koji zbog propusnosti životinjske kože čine sekundarnu mikrofloru sira.²²

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

VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 40 °C

U tablici 1 je prikazan kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama sira iz mišine izoliranih korištenjem sivog vlakna pri 40 °C. Identificirano je ukupno 15 spojeva, koji čine 88,84% uzorka vršnih para. Najzastupljeniji spojevi u uzorku su heksanska kiselina (23,41%) i ester etil-acetat (16,80%). Karboksilne kiseline i njihovi esteri i inače prevladavaju pa su u uzorku pronađene još i karboksilne kiseline: butanska (9,47%), oktanska (5,32%), 3-metilbutanska (3,16%), octena (2,33%) i 2-metilbutanska kiselina (1,10%) te esteri: 2-metilpropil-heksanoat (7,10%), etil-heksanoat (5,50%), 1-metilpropilbutanoat (2,86%), etil-oktanoat (2,48%), propil-heksanoat (1,14%) i etil-butanoat (0,62%). Od ostalih spojeva identificiran je ravnolančani razgranati ugljikovodik 2,2,4,6,6-pentametilheptan (3,88%) i alkohol etanol (3,67%)

VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 50 °C

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama sira iz mišine izoliranih korištenjem sivog vlakna pri 50 °C prikazan je u tablici 2. Identificirano je ukupno 13 spojeva što predstavlja 96,68% uzorka vršnih para. U uzorku su najzastupljenije karboksilne kiseline heksanska (34,85%) i oktanska (15,95%) kiselina a visoko je zastupljen i ester etil-acetat (11,01%). Kao i u prethodnom uzorku i ovdje prevladavaju karboksilne kiseline i njihovi esteri pa su u uzorku identificirane još butanska (9,06%), dekanska (2,49%), octena (2,05%) i 3-metilbutanska kiselina (1,38%) te esteri: 2-metilpropil-heksanoat (8,04%), etil-heksanoat (4,49%), etil-oktanoat (3,92%), 2-butil-oktanoat (1,47%) i propil-oktanoat u tragovima. U uzorku je pronađen i alkohol etanol (1,97%).

VRŠNE PARE EKSTRAHIRANE NA 60 °C

Kemijski sastav i udio sastojaka u vršnim parama sira iz mišine pripravljenog od mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka izoliranih korištenjem sivog vlakna pri 60 °C prikazan je u tablici 3. U vršnim parama ekstrahiranim na 60 °C identificirano je 16 spojeva, odnosno 96,19% uzorka. Najzastupljeniji spojevi su oktanska (25,19%), heksanska (22,38%) i

dekanska kiselina (12,50%). Ostali identificirani spojevi su butanska kiselina (8,34%), etil-acetat (7,75%), octena kiselina (6,83%), 2-metilpropil-heksanoat (3,02%), etil-oktanoat (2,58%), 3-metilbutanska kiselina (1,50%), 2-butil-oktanoat (1,45%), etil-dekanoat (1,28%), etil-heksanoat (1,01%), 2-metilbutanska kiselina (0,88%), propil-oktanoat (0,62%) i propil-heksanoat (0,43%). Kao i u prethodnim uzorcima i u ovom je pronađen alkohol etanol (0,43%).

Usporedbom rezultata uočljivo je da sva tri uzorka sadrže karboksilne kiseline i estere a u svim uzorcima pronađen je i alkohol etanol. Ravnolančani razgranati ugljikovodik 2,2,4,6,6-pentametilheptan pronađen je samo u uzorku ekstrahiranom na 40 °C. U sva tri uzorka je najveći sadržaj karboksilnih kiselina a zanimljivo je što njihov sadržaj raste sa temperaturom ekstrakcije pa na 40 °C ukupan sadržaj karboksilnih kiselina iznosi 44,79%, na 50 °C iznosi 65,78% a na 60 °C iznosi 77,62%. Suprotno, ukupan sadržaj estera opada sa porastom temperature ekstrakcije pa na 40 °C iznosi 36,5%, na 50 °C iznosi 28,93%, a na 60 °C je 18,14%. Ovakvi rezultati se mogu objasniti time da pri povišenoj temperaturi vjerojatno dolazi do hidrolize estera čime nastaje veći sadržaj kiselina. Visoko zastupljene karboksilne kiseline u uzorcima su heksanska ili kapronska, oktanska ili kaprilna i butanska ili maslačna a pri temperaturi ekstrakcije na 60 °C i dekanska kiselina. Od estera su najzastupljeniji u svim uzorcima etil-acetat i 2-metilpropil-heksanoat.

Dobiveni rezultati su u skladu sa literaturom. Hayaloglu i Karabulut su istraživali aromatski profil 11 turskih sireva i u svojim istraživanjima kao najzastupljenije kiseline u Tulum siru koji zrije u životinjskoj koži, ali i u drugim turskim sirevima, navode: butansku (maslačnu), octenu i heksansku (kapronsku) kiselinu. Osim spomenutih kiselina Hayaloglu i Karabulut identificirali su još oktansku (kaprilnu), 3-metilbutansku i 2-metilbutansku kiselinu.^{31, 32}

Tijekom zrenja sira karboksilne kiseline mogu nastati na tri primarna biokemijska načina: lipolizom, proteolizom i fermentacijom laktoze. Octena kiselina nastaje fermentacijom laktoze i katabolizmom aminokiselina te ima oštar (kiseo) miris. Kapronska kiselina, otkrivena kao glavna frakcija slobodnih masnih kiselina u mnogim sirevima, uključujući i sireve koji sazrijevaju u životinjskoj koži, je odgovorna za bockav (ljut) okus. Kaprilna i butanska kiselina vjerojatno nastaju lipolizom i fermentacijom laktoze ili mliječne kiseline. Butanska kiselina daje užegao okus, dok kaprilna kiselina može dati voštani, sapunast,

užegao i voćni okus. 3-Metilbutanska kiselina nastaje metabolizmom izoleucina i daje neugodan znojni miris.³²

Esteri u siru nastaju kroz dvije enzimske reakcije, esterifikaciju i alkoholizu. U sir donose arome koje se opisuju kao voćne (etil-acetat: ananas, žvakače gume, jabuke; etil-butanoat: jabuka, ananas, banana; etil-heksanoat: ananas, jabuka; etil-oktanoat: kruška, banana, ananas, cvijeće...). Hayloglu i suradnici navode estere: etil etanoat, etil-butanoat, etil-laktat, propil-etanoat i 3-metilbutil-etanoat kao glavne hlapljive spojeve Tulum sira koji zrije u životinjskoj koži.^{33, 32} Vrdoljak u svojim istraživanjima sira iz mišine navodi da su dominantni esteri tijekom svih faza 45-dnevnog zrenja bili etil-acetat, etil-butanoat, etil-heksanoat i 3-metilbutil-etanoat.³²

4. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate i raspravu ovog završnog rada, može se zaključiti sljedeće:

- U uzorku vršnih para izoliranih korištenjem sivog vlakna pri 40°C identificirano je ukupno 15 spojeva, koji čine 88,84% uzorka vršnih para. Pri 50°C identificirano je ukupno 13 spojeva, koji čine 96,68% uzorka vršnih para a pri 60°C je identificirano 16 spojeva odnosno 96,19% uzorka vršnih para.
- Usporedbom rezultata uočljivo je da sva tri uzorka sadrže karboksilne kiseline i estere a u svim uzorcima pronađen je i alkohol etanol.
- U sva tri uzorka je najveći sadržaj karboksilnih kiselina a zanimljivo je što njihov sadržaj raste sa temperaturom ekstrakcije pa na 40 °C ukupan sadržaj karboksilnih kiselina iznosi 44,79%, na 50 °C iznosi 65,78% a na 60 °C iznosi 77,62%. Suprotno, ukupan sadržaj estera opada sa porastom temperature ekstrakcije pa na 40 °C iznosi 36,5%, na 50 °C iznosi 28,93% a na 60 °C je 18,14%. Ovakvi rezultati se mogu objasniti time da pri povišenoj temperaturi vjerojatno dolazi do hidrolize estera čime nastaje veći sadržaj kiselina.
- Visoko zastupljene karboksilne kiseline u uzorcima su heksanska ili kapronska, oktanska ili kaprilna i butanska ili maslačna a pri temperaturi ekstrakcije na 60 °C i dekanska kiselina. Od estera su najzastupljeniji u svim uzorcima etil-acetat i 2-metilpropil-heksanoat .
- Budući da je cilj rada bio izolirati i identificirati hlapljive spojeve arome sira iz mišine, možemo zaključiti da se mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi pokazala kao dobra metoda izolacije spojeva jer identificirane klase spojeva (karboksilne kiseline, njihovi esteri i alkoholi) spadaju u spojeve odgovorne za aromu sira.

5. LITERATURA

1. B. Matijević, I. Barukčić, R. Božanić, S. Kalit, K. Lisak, Jakopović, V. Magdić, B. Perko, I. Rogelj i D. Stručić, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015.
2. M. Tudor Kalit, S. Kalit i J. Havranek, *Mljekarstvo* **60** (2010) 149-155.
3. <https://hrcak.srce.hr/mljekarstvo?lang=hr> (Pristupljeno 20.9.2021.)
4. <https://foodietrend.com/povijest-proizvodnje-sira/> (Pristupljeno 20.9.2021.)
5. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Glikoliza> (Pristupljeno 20.9.2021.)
6. <http://najboljeuhrvatskoj.info/ideje/sir-iz-misine-opg-slavko-petrovic-pakovo-selo-2690.html> (Pristupljeno 20.9.2021.)
7. <https://hrvatskakuhinja.info/sir-iz-mjesine/> (Pristupljeno 20.9.2021.)
8. M. Tudor Kalit, *Mljekarstvo* **70** (2020) 225-241.
9. <https://www.agroklub.com/stocarstvo/mrvljeni-sir-iz-mjesine-prema-ilirskom-receptu/14124/> (Pristupljeno 6.9.2021.)
10. R. Božanić, K. Lisak, Jakopović i I. Barukčić, *Vrste mlijeka*, Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, Zagreb, 2018, 16-29.
11. N. Antunac i J. Havranek, *Mljekarstvo* **49** (1999) 241-254.
12. N. Antunac i D. Samaržija, *Mljekarstvo* **50** (2000) 53-66.
13. Petrović D., *Proteoliza i promjene teksture sira iz mišine tijekom zrenja*, Diplomski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017.
14. J. Adžić, *Tehnologija proizvodnje autohtonog sira Prlja*, Enciklopedija, BIH, 2013.
15. G. Yilmaz, A. Ayar i A. Akin, *J. Food Eng.* **69** (2005) 269-274.
16. <https://www.fondazione Slow Food.com/en/ark-of-taste-slow-food/darfi-yeh-2/> (Pristupljeno 20.9.2021.)
17. <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-autohtonog-sira-prlja> (Pristupljeno 6.9.2021.)
18. N. Mikulec, *Mljekarstvo* **60** (2010) 219-227.
19. P. McSweeney, *Int J Dairy Technol.* **57** (2004) 127-144.
20. J. Havranek, S. Kalit, N. Antunac i D. Samaržija, *Sirarstvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 2014.
21. Lj. Tratnik i R. Božanić, *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 2012.

22. T. Lojbl, *Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži*, Diplomski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
23. M. Tudor Kalit, S. Kalit, I. Delaš, N. Kelava, D. Karoly, D. Kaić, M. Vrdoljak i J. Havranek, *Int J Dairy Technol.* **67** (2014) 255-264.
24. M. Serhan, M. Linder, C. Hosri i J. Fanni, *Small Rumin Res.* **90** (2010) 75-82.
25. P. McSweeney i M. Sousa, *A review. Le Lait* **80** (2000) 293-324.
26. I. Jerković, *Kemija aroma*, Skripta za internu uporabu, Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
27. M. Zenčić, *Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja*, Diplomski rad, Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
28. A. Perković, *Kvantitativno određivanje fenola iz uzoraka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode*, Diplomski rad, Medicinski fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split 2018.
29. J. Pupačić, *Karakterizacija hlapljivih spojeva iz trajne kobasice Bosanski sudžuk*, Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
30. https://www.hah.hr/arhiva/sir_mjesina.php (Pristupljeno 6.9.2021.)
31. A. Hayaloglu i I. Karabulut, *Int. J. Food Prop.* **16** (2013b) 1663-1675.
32. M. Vrdoljak, N. Mikulec, K. Markov, S. Kalit i J. Frece, *J. Cent. Eur. Agric.* **19** (2018.) 318-334.
33. A. Hayaloglu, S. Cakmakci, E. Brechany, K. Deegan i P. McSweeney, *JDS* **90** (2007b) 1102-1121.