

# Formiranje mirisa tijekom zrenja Paškog sira

---

Stiperski, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:301247>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

# FORMIRANJE MIRISA TIJEKOM ZRENJA PAŠKOG SIRA

DIPLOMSKI RAD

Josip Stiperski

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

# **FORMIRANJE MIRISA TIJEKOM ZRENJA PAŠKOG SIRA**

DIPLOMSKI RAD

Josip Stiperski

Mentor:

Izv.prof.dr.sc. Nataša Mikulec

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Josip Stiperski**, JMBAG 0178114625, rođen/a 09.10.1997. u Zagreb, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**FORMIRANJE MIRISA TIJEKOM ZRENJA PAŠKOG SIRA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Josip Stiperski**, JMBAG 0178114625, naslova

**FORMIRANJE MIRISA TIJEKOM ZRENJA PAŠKOG SIRA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |  |        |       |
|----|--|--------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec      | mentor | _____ |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić  | član   | _____ |
| 3. | izv. prof. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar | član   | _____ |

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja .....	2
2. Pregled literature .....	3
2.1. Karakteristike Paškog sira.....	3
2.2. Biokemijski procesi u siru.....	5
2.2.1. Metabolizam laktoze, laktata i citrata.....	5
2.2.2. Proteoliza i katabolizam aminokiselina .....	6
2.2.3. Lipoliza i katabolizam slobodnih masnih kiselina.....	7
2.3. Biosinteza hlapljivih organskih spojeva .....	9
2.3.1. Esteri .....	9
2.3.2. Ketoni i alkoholi .....	9
2.3.3. Aldehidi.....	9
2.3.4. Slobodne masne kiseline.....	10
2.3.5. Terpeni .....	10
3. Materijali i metode.....	11
3.1. Uzorkovanje sira .....	11
3.2. Ekstrakcija hlapljivih aromatskih spojeva .....	11
3.3. Plinska kromatografija sa masenim spektrometrom.....	11
4. Rezultati i rasprava .....	13
4.1. Koncentracije pojedinačnih hlapljivih aromatskih spojeva tijekom zrenja Paškog sira .....	13
4.2. Prosječne srednje vrijednosti koncentracija organskih spojeva tijekom zrenja Paškog sira .....	19
5. Zaključak .....	21
6. Popis literature.....	22
Životopis .....	28

## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Josip Stiperski**, naslova

### **FORMIRANJE MIRISA TIJEKOM ZRENJA PAŠKOG SIRA**

Aromatski profil Paškog sira, hrvatskog tvrdog sira s zaštićenom oznakom izvornosti (PDO), proizvedenog od sirovog ovčjeg mlijeka, analiziran je u četiri faze zrenja (0., 30., 60. i 90. dan) primjenom metode SPME-GC/MS. Analizom je identificirano ukupno 73 spoja, uključujući 20 alkohola, 14 ketona, 12 aldehida, 12 kiselina, 10 estera i 5 terpena. Alkoholi su predstavljali najzastupljeniju skupinu spojeva, pri čemu je njihova koncentracija rasla tijekom zrenja, dosegnuvši 15,59% na 60. dan, a potom opadajući na 5,25% na kraju zrenja. Alkoholi čine 27,4% profila hlapljivih aromatskih spojeva (HAS), a najzastupljeniji alkoholi su 3-metil-1-butanol, etanol i 2,7-dimetil-4,5-oktanediol. Esteri čine 27,4% profila HAS i značajno doprinose aromi sira zbog niskih pragova detekcije mirisa. Najzastupljeniji esteri su etil acetat, etil heksanoat i etil laktat, koji siru daju voćnu aromu. Aldehidi čine 16,4% profila HAS i doprinose različitim aromama, uključujući citrusne, zelene i arome kaka. Ketoni čine 19,2% profila HAS, a najzastupljeniji ketoni u siru su acetoin, 2-pentanon i 2-heptanon, koji pridonose karakterističnoj aromi sira. Slobodne masne kiseline čine 12,4% profila HAS, pri čemu su octena, butanska i heksanska kiselina najzastupljenije, dajući oštru i kiselkastu aromu. Terpeni čine 6,9% profila HAS, a među njima su najzastupljeniji D-limonen, 1R- $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -citronelol, koji doprinose citrusnoj aromi s mirisnim notama mente i naranče.

**Ključne riječi:** Paški sir, aromatski profil, hlapljivi spojevi, SPME-GC/MS

## Summary

Of the master's thesis – student **Josip Stiperski**, entitled

### **FORMATION OF AROMA DURING THE RIPENING OF „PAŠKI SIR“ CHEESE FROM ISLAND PAG**

The aromatic profile of „Paški sir“ cheese, a Croatian hard cheese with a Protected Designation of Origin (PDO), made from raw sheep's milk, was analyzed at four aging stages (0, 30, 60, and 90 days) using the SPME-GC/MS method. 73 compounds were identified, including 20 alcohols, 14 ketones, 12 aldehydes, 12 acids, 10 esters, and 5 terpenes. Alcohols were the most prevalent group of compounds, with their concentration increasing during aging, reaching 15.59% on day 60, and then decreasing to 5.25% by the end of aging. Alcohols account for 27.4% of the volatile aromatic compounds (VAC) profile, with the most abundant alcohols being 3-methyl-1-butanol, ethanol, and 2,7-dimethyl-4,5-octanediol. Esters also make up 27.4% of the VAC profile and significantly contribute to the cheese's aroma due to their low odor detection thresholds. The most prevalent esters are ethyl acetate, ethyl hexanoate, and ethyl lactate, which impart a fruity aroma to the cheese. Aldehydes constitute 16.4% of the VAC profile and contribute various aromas, including citrus, green, and cocoa notes. Ketones represent 19.2% of the VAC profile, with the most prevalent ketones being acetoin, 2-pentanone, and 2-heptanone, which contribute to the cheese's distinctive aroma. Free fatty acids make up 12.4% of the VAC profile, with acetic, butyric, and hexanoic acids being the most abundant, providing sharp and acidic aromas. Terpenes account for 6.9% of the VAC profile, with the most prevalent being D-limonene, 1R- $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -citronellol, which contribute citrus aromas with notes of mint and orange.

**Keywords:** „Paški sir“ cheese, aromatic profile, volatile compounds, SPME-GC/MS



# 1. Uvod

Paški sir je tvrdi ovčji sir proizveden od autohtone hrvatske pasmine paške ovce s otoka Paga. To je punomasni sir s jedinstvenim okusom zbog specifične vegetacije na otoku. Proizvodnja Paškog sira je sezonska i odvija se od siječnja do lipnja. Tradicionalna proizvodnja Paškog sira uključuje procese: hlađenje sirovog mlijeka, filtracija, pasterezacija, dodavanje mljekarskih kultura, dodavanje sirila i koagulacija, rezanje gruša, dogrijavanje i sušenje sirnog zrna, oblikovanje sirnog tijesta u kalupe, prešanje, salamurenje, zrenje (Gligora i Antunac, 2007). Paški sir ima čvrstu teksturu i niski cilindrični oblik, a sirno tijesto može biti svijetložute, tamnožute ili boje slame (<https://www.siranamih.hr/hr/povijest>).

Okus sireva pod utjecajem je složenih metaboličkih procesa i mikroorganizama (Zheng i sur., 2021). Enzimi poput sirišnog enzima, plazmina, enzima bakterija mliječne kiseline (BMK), enzima nestarterskih bakterija mliječne kiseline (NSBMK) i dodanih kultura utječu na enzimske reakcije tijekom proizvodnje sira (Fox i sur., 2017). Tijekom zrenja dolazi do kemijsko-biokemijskih promjena koje uzrokuju razgradnju složenih organskih spojeva u jednostavnije (McSweeney i Sousa, 2000). Ove promjene, uključujući glikolizu, lipolizu i proteolizu, doprinose sintezi hlapljivih aromatskih spojeva (HAS), koje izravno utječu na okus sira (Ardö i sur., 2017; McSweeney i Sousa, 2000; Marilley i Casey, 2003).

Esteri su kemijski spojevi koji neizravno doprinose metabolizmu slobodnih masnih kiselina (SMK) (Collins i sur., 2003), a formiraju se putem esterifikacije i alkoholize, te aromi sira pridonose ugodnim notama mirisa s niskim pragovima detekcije mirisa (Liu i sur., 2004). Ketoni i alkoholi proizvode se oksidacijom zasićenih masnih kiselina i hidrolizom triglicerida, što rezultira  $\alpha$ -keto kiselinama i dekarboksiliranim ketonima (Urbach, 1997). Metil-ketoni imaju niske pragove detekcije mirisa u vodi (Bertuzzi i sur., 2018).

Aldehidi su aromatski spojevi povezani s oksidativnim kvarenjem (McSweeney i Sousa, 2000), a nastaju tijekom razgradnje kratkolančanih masnih kiselina (Kilcawley, 2017). Također mogu nastati iz ne-enzimatskih auto-oksidacijskih procesa. Reduktivno okruženje sira doprinosi stvaranju aldehida s linearnim lancem koji imaju ugodne arome (Bertuzzi i sur., 2018). Primjerice sojevi laktokoka mogu proizvoditi razgranate aldehide iz valina, izoleucina i leucina (Christensen i sur., 1999).

Masne kiseline u siru značajno utječu na okus i aromu. One su aromatske komponente i prekursori metil-ketona, alkohola, laktona i estera. Kratkolančane masne kiseline nastaju razgradnjom aminokiselina ili lipolizom mliječne masti tijekom zrenja sira (Urbach, 1993). Koncentracija kratkolančanih masnih kiselina u siru ovisi o pH vrijednosti, a samo slobodni, protonirani oblik doprinosi aromi sira. Dugolančane masne kiseline imaju minimalan utjecaj na okus zbog svog visokog praga detekcije mirisa (Brennand i sur., 1989).

Terpeni, sekundarni metaboliti biljaka, imaju antibakterijska, antifungalna i antivirusna svojstva. Primjenjuju se u hrani i kozmetici kao komponente arome (Ajikumar i sur., 2008). Terpeni, koji se temelje na izoprenim jedinicama, utječu na sastav mlijeka i sira (Cornu i sur., 2005). Čimbenici poput vrste biljaka, faze razvoja, tla, klime i upravljanja pašnjacima utječu na

sadržaj terpena (Poulopoulou i sur., 2011). Sadržaj terpena u siru istražuje se kao biomarker za podrijetlo sira, što je povezano s prehrambenim navikama životinja (Favaro i sur., 2005).

### **1.1. Cilj istraživanja**

Odrediti prisutnost i koncentraciju hlapljivih aromatskih spojeva Paškog sira tijekom zrenja. Dosadašnja istraživanja Paškog sira nisu obuhvatila određivanje prisutnosti hlapljivih aromatskih spojeva ovisno o duljini trajanja zrenja.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Karakteristike Paškog sira

Paški sir je vrsta tvrdog ovčjeg sira koji se proizvodi od sirovog ili pasteuriziranog mlijeka autohtone pasmine paške ovce s otoka Paga, koji ima zaštićenu oznaku izvornosti (*engl.* Protected Designation of Origin – PDO). Prema udjelu masti u suhoj tvari Paški sir pripada kategoriji punomasnih sireva.

Paški sir je jedinstven u Hrvatskoj zbog mlijeka paške ovce koja pase vegetaciju koja obiluje aromatičnim i ljekovitim biljem koja raste na otoku Pagu (Barać i sur., 2008). Dodatno, okusu doprinosi i bura koja nosi posolicu s mora koja daje posebnu slanost.

Proizvodnja Paškog sira je sezonska i odvija se od siječnja do kraja lipnja, usklađeno s razdobljem mužnje ovaca na otoku Pagu. Ovčje mlijeko se nakon mužnje hladi na 4 °C, filtrira, a potom pasteurizira u pločastom pasteurizatoru na temperaturi od 70 do 75°C tijekom 60 do 90 sekundi. U sirarskom kotlu, mlijeku se dodaje kalcijev klorid u prahu (CaCl<sub>2</sub>) i mljekarska kultura. Budući da je Paški sir tvrdi sir, u mlijeko se dodaju termofilne bakterije koje najbolje rastu na temperaturi između 40 i 50°C. Mlijeko se zagrijava u sirarskoj kadi do temperature sirenja od 32 do 35°C nakon dodavanja kemijskih i mikrobioloških sastojaka. Tada se dodaje sirilo u tekućem obliku ili u prahu, a proces koagulacije traje između 40 i 50 minuta. Nakon završetka koagulacije, sirni gruž se ručno reže i drobi na sitna zrna veličine od 2 do 3 milimetra koristeći sirarske harfe. Nakon toga, sirna masa se zagrijava na 43°C tijekom 10 do 15 minuta kako bi se osušila. Kada se sušenje završi, sirni gruševi se sakupljaju na dnu kade, a dio sirutke se izdvaja pomoću crpke za kasniju proizvodnju paške skute. Zatim se sirna masa stavlja u kalupe i preša četiri sata pomoću postupnog pritiska. Soljenje se obavlja u 20%-tnoj vodenoj otopini soli, poznatoj kao salamura, koja mora zadovoljiti određenu gustoću i pH vrijednost. Nakon soljenja, sir se stavlja na police za sušenje u zrionici. Zrenje sira traje 30 dana pri temperaturi od 16 do 18°C i relativnoj vlažnosti od 65%, a nakon toga 60 dana pri temperaturi od 14 do 16°C i relativnoj vlažnosti od 75%. Ako se Paški sir planira čuvati do godinu dana, nakon 90 dana zrenja čuva se pri temperaturi od 12°C i relativnoj vlažnosti od 85% (Gligora i Antunac, 2007).

Paški sir karakterizira čvrsta tekstura i niski cilindrični oblik, a sirno tijesto može biti svijetložute, tamnožute ili boje slame. Tijekom zrenja, njegova glatka, čvrsta korica mijenja boju od zlatnožute do svijetlo crvenkasto smeđe. Mladi sir star 2 mjeseca nudi blagi slatki okus s umjerenom slanošću i ugodnom pikantnošću. S povećanjem broja dana zrenja, okus i tekstura sira postupno se intenziviraju. Prema MIH Sirana Kolan (<https://www.siranamih.hr/hr/povijest>), potpuno zreo Paški sir, stariji od šest mjeseci, ima finu granuliranu strukturu i pikantan okus, a sirno tijesto se topi u ustima dok se sitni kristali osjećaju pod jezikom.



Slika 2.1.1. Paški sir

Izvor: <https://gligora.com/sirevi/cijena/paski-sir>

## 2.2. Biokemijski procesi u siru

Karakterističan okus tradicionalno fermentiranih sireva formiraju složeni metabolički procesi i mikroorganizmi koji imaju ključnu ulogu u razvoju okusa sira (Zheng i sur., 2021). Različiti enzimi poput sirišnog enzima (kimozina), endogenih enzima mlijeka (plazmina), enzima starterske kulture (BMK), enzima nestarterskih bakterija mliječne kiseline (NSBMK) te enzima dodane kulture utječu na enzimske reakcije koje se odvijaju tijekom proizvodnje sira, ovisno o vrsti sira i načinu proizvodnje (Fox i sur., 2017).

Tijekom zrenja sira dolazi do složenih kemijsko-biokemijskih promjena koje uzrokuju razgradnju složenih organskih spojeva u jednostavnije putem primarnog i sekundarnog metabolizma (McSweeney i Sousa, 2000). Metabolizam preostale laktoze, laktata i citrata, poznat kao glikoliza te lipoliza i proteoliza, ključne su promjene. Naknadne biokemijske reakcije koje su uključene u metabolizam masnih kiselina i aminokiselina direktno doprinose sintezi mnogih HAS-a, a za koje se smatra da izravno utječu na okus sira (Ardö i sur., 2017; McSweeney i Sousa, 2000). Primarni metabolizam sira, koji uključuje hidrolizu proteina, razgradnju masti i degradaciju ugljikohidrata, određuje njegov temeljni okus. S druge strane, sekundarni metabolizam, koji uključuje dekarboksilaciju aminokiselina, transaminaciju, deaminaciju, desumporizaciju,  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i esterifikaciju, odgovoran je za specifičnu aromu koja razlikuje različite vrste sira (Marilley i Casey, 2003).

### 2.2.1. Metabolizam laktoze, laktata i citrata

Produkti metabolizma laktoze su L-laktat, DL-laktat ili racemizacijska kombinacija oba, što je ključno za razvoj okusa u svim sirevima. Međutim, bakterije, uključujući *Leuconostoc* vrste, također mogu stvarati druge spojeve poput etanola (Vedamuthu, 1994). Prema McSweeney i sur. (2017), nestarterska mikroflora prisutna u Cheddar, nizozemskim i sličnim sirevima izomerizira L-laktat, koji proizvodi starter bakterija *Lactococcus lactis*, u DL-laktat. S druge strane, povišene koncentracije DL-laktata mogu smanjiti senzornu kvalitetu sira. Nakupljanje galaktoze u siru uzrokuju određene starter bakterije (npr. *Streptococcus thermophilus*) koje egzistiraju s galaktozom-pozitivnim mikroorganizmima, a ne mogu metabolizirati galaktoznu komponentu laktoze. Acetat, acetoin, diacetil, etanol i acetaldehid neki su od kratkolančanih aromatskih spojeva koji se proizvode iz piruvata, međuprodukta metabolizma laktoze (Melchiorson i sur., 2002).

*Propionibacterium* vrste razgrađuju laktat u švicarskom siru na propionat, acetat, ugljični dioksid i vodu, među kojima je ugljični dioksid odgovoran za razvoj karakterističnih sirnih očiju u siru (Duru i sur., 2018). U mnogim vrstama sira, acetat značajno doprinosi razvoju arome. Osim što se metabolizira iz laktoze putem metabolizma BMK, acetat može nastati i putem metabolizma laktoze i citrata (McSweeney i Sousa, 2000).

Najvažniji korak u proizvodnji sira je sinteza mliječne kiseline iz laktoze, što se postiže uvođenjem pažljivo odabranih kultura različitih vrsta BMK u mlijeko neposredno prije

dodavanja sirila. Budući da pokreću proizvodnju kiseline, ove kulture nazivaju se starterima. Njihova glavna uloga je proizvodnja mliječne kiseline. Međutim, njihovi enzimski sustavi također igraju važnu ulogu u razvoju okusa sira tijekom zrenja. Proizvodnja mliječne kiseline smanjuje pH vrijednost sirnog gruša i sirutke tijekom proizvodnje sira, što ima tri pogodnosti: povećava aktivnost sirila, olakšava izbacivanje sirutke iz sirnog gruša, čime se smanjuje vlažnost sira, te sprječava rast nepoželjnih bakterija u siru (Fox i sur., 2017).

Ispiranje ili zamjena sirutkom može dovesti do smanjenja koncentracije laktoze u siru; u tim se situacijama preostala laktoza u sirnom grušu brzo razgrađuje, što dovodi do povećanja pH vrijednosti. Stoga sirevi s niskom koncentracijom laktoze imaju nježan i svjež okus, dok sirevi s visokom koncentracijom laktoze mogu imati oštar i snažan okus zbog niske pH vrijednosti. Citrat se uglavnom nalazi u mlijeku u obliku ionizirane soli u koncentracijama  $\leq 1,8$  g/L, a većina se izgubi u sirutki tijekom proizvodnje sira. Razlog tome je što se skoro 94% citrata nalazi u topljivoj fazi mlijeka (McSweeney i sur., 2017).

Unutar mikroflore NSBMK, samo određeni mezofilni laktokoki mogu metabolizirati citrate. Iz citrata, citrat-pozitivni laktokoki (Cit<sup>+</sup>) i *Leuconostoc spp.* proizvode aromatske spojeve poput acetata, diacetila, acetoina, 2,3-butanediola i ugljičnog dioksida. Diacetil je značajan aromatski spoj koji se u raznim vrstama sireva, uključujući nizozemske sireve, quark i cottage sir, konvertira u acetoin, 2,3-butanediol i 2-butanon (Dimos i sur., 1996). Citrat služi kao primarni supstrat za Cit<sup>+</sup> starter kulture i NSBMK, a preostali citrat metaboliziran od strane NSBMK može dovesti do elastične teksture u nekim sirevima, poput Cheddara (Fox i sur., 2017).

## 2.2.2. Proteoliza i katabolizam aminokiselina

Primarni metabolizam koji se odvija tijekom zrenja sira uključuje hidrolizu proteina, a igra ključnu ulogu u stvaranju i oslobađanju okusa sira (Gan i sur., 2016). Mnoge aromatske komponente sira su prekursori peptida i slobodnih aminokiselina (SAK), koji nastaju kada proteaze sira razgrađuju proteine. Glavni biokemijski mehanizam odgovoran za stvaranje okusa u tvrdim i polutvrdim sirevima jest hidroliza kazeina. SAK nastaju pod utjecajem mikrobnih proteaza i petidaza koje kataliziraju razgradnju polipeptidnih lanaca; gdje djeluju kao prekursori aromatskih spojeva tijekom proizvodnje i zrenja sira (McSweeney, 2004).

Katabolizam SAK predstavlja biokemijski put koji ima važnu ulogu u proizvodnji aldehida, alkohola, karboksilnih kiselina, amina i sumpornih spojeva. Aminotransferaza katalizira transaminacijsku reakciju koja dovodi do pretvorbe aromatskih aminokiselina, razgranatih aminokiselina, metionina i asparaginske kiseline u  $\alpha$ -ketokiseline. Aminokiseline dalje se metaboliziraju kako bi nastale hidroksi kiseline, metanetriol, razgranati i aromatski aldehidi, te acil-CoA (Ganesan i Weimer, 2017). Transaminacija valina, izoleucina i leucina rezultira formiranjem 2-metilpropanala, 2-metilbutanala i 3-metilbutanala; transaminacijska reakcija s asparaginskom kiselinom kao supstratom oslobađa oksaloacetat, koji se potom pretvara u acetoin, diacetil ili 2,3-butanediol (Ardö, 2006).

Primarni izvor aromatskih aldehida su  $\alpha$ -ketokiseline, koje nastaju iz benzaldehida spontanom oksidacijom triptofana i fenilalanina. Prema Klačanová i sur. (2010), temperatura igra značajnu ulogu u uspostavi uvjeta koji potiču redoks reakcije, jer povećanje tog parametra ubrzava katabolizam.

Sir koji podliježe pretjeranoj proteolizi zbog nekontroliranog zrenja, u pogledu okolišnih čimbenika, rezultira visokim koncentracijama SAK koje se mogu dekarboksilirati, uglavnom pomoću NSBMK, s posljedičnim oslobađanjem biogenih amina povezanih s lošim okusom i potencijalnim zdravstvenim rizicima za potrošače. Najznačajniji biogeni amini su putrescin, kadaverin, histamin i tiramin; ovi spojevi sintetiziraju se redom od histidina, tirozina, lizina i ornitina (Schirone i sur., 2018).

Eliminacijski procesi koji kataliziraju enzimi liaze i razdvajaju bočne lance aminokiselina također su važni u katabolizmu SAK. Tijekom vremena, skupljeni su brojni podaci koji povezuju ove reakcije s mogućim negativnim učincima na okus, budući da proizvode spojeve poput p-krezola, feniletanola i indola. Ovaj proces također proizvodi metanetiol iz metionina, koji se može metabolizirati na više načina. Daljnji katabolizam metanetiola odvija se kroz oksidativne reakcije koje provode različite vrste BMK, a odgovorne su za proizvodnju dimetisulfida i dimetiltrisulfida, spojeva karakteriziranih niskim pragom detekcije mirisa, što posljedično utječe na okus sira (Forde i Fitzgerald, 2000; Curioni i Bosset, 2002).

### **2.2.3. Lipoliza i katabolizam slobodnih masnih kiselina**

Prema Voigt i sur. (2012), lipoliza značajno utječe na okus i teksturu sira. Lipaze sira potječu iz mlijeka, sirila, startera, dodanih kultura, NSBMK i egzogenih enzima koje kataliziraju hidrolizu triglicerida, što rezultira nastankom glicerola, di- i monoglicerida, masnih kiselina srednjeg (duljina lanca do 10 ugljikovih atoma) i dugog lanca (duljina lanca više od 10 ugljikovih atoma) (Collins i sur., 2003). Razvoj okusa u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka uglavnom ovisi o lipoproteinu lipazi, dok sirevi proizvedeni od pasteriziranog mlijeka pokazuju manji utjecaj ovog enzima (Sert i sur., 2014).

Udio masnih kiselina i pH vrijednost direktno utječu na okus sira, često međusobno djelujući. Sir s visokim pH vrijednostima oslobađa manje masnih kiselina iz spojeva koji mogu značajno utjecati na okus. U takvim uvjetima, masne kiseline se pretvaraju u ne-hlapljive soli koje potiču razvoj sapunastih aroma. Masne kiseline su dostupne u mliječnoj matrici u hlapljivom obliku kada je pH nizak, a prekomjerno povećanje njihove koncentracije ima za posljedicu intenzivniji okus (Ardö i sur., 2017).

BMK posjeduju lipolitičke enzime koji hidroliziraju supstrat kako bi stvorili triacilgliceride, diacilgliceride, monoacilgliceride i SMK. Prema Holland i sur. (2005), esteraza BMK je neaktivna za  $>C_6$ -diacilgliceride, ali aktivna za  $<C_{18}$ -monoacilgliceride, posebno osjetljiva na  $C_8$ -monoacilglicerid. Bakterije propionske kiseline (BPK) su 10-100 puta efikasnije u razgradnji masti od BMK, ali zbog svoje češće prisutnosti, BMK doprinose lipolizi djelomično.

BPK su ključni za pretvorbu laktoze u acetat, sintezu slobodnih kiselina i stvaranje karakterističnog okusa u švicarskom siru (Schwenninger i sur., 2011). Razgradnja esterskih veza između triglicerida i masnih kiselina pomoću lipaza, koja rezultira stvaranjem monoacilglicerida, diacilglicerida i SMK, odgovorna je za karakterističan okus sira. (Deeth i Touch, 2000).

Na okus sira značajno utječu masne kiseline. Nakon što se mliječna mast razgradi, tijekom fermentacije i zrenja sira stvara se niz srednjih i kratkih lančanih masnih kiselina ( $C > 4$ ), što dovodi do stvaranja arome u siru, a one su pokazatelj zrelosti sira. Jak okus nezasićenih aldehida može nastati oksidacijom masnih kiselina, posebno polinezasićenih masnih kiselina. Kod sira poput Gouda, Cheddara i švicarskog sira, to može dovesti do neugodnog mirisa povezanog s užeglošću (Forde i Fitzgerald, 2000).

Kratke lančane masne kiseline proizvode jake, karakteristične arome; neki od tih okusa su prekursori koji se pretvaraju u druge aromatske spojeve, kao što su laktoni i alkoholi (Temizkan i sur., 2015).

Glavni laktoni koji se nalaze u siru i odgovorni su za njegov intenzivan miris su  $\gamma$ - i  $\delta$ -laktoni, koji imaju pet ili šest okolnih prstena. Esteri se sintetiziraju u siru putem esterifikacijskih interakcija između srednjih do dugih lančanih masnih kiselina i kratkih lančanih masnih kiselina koji nastaju tijekom razgradnje mliječne masti, primarnih i sekundarnih alkohola koji se formiraju tijekom fermentacije laktoze ili metabolizma aminokiselina tijekom fermentacije (Fox i sur., 2015).

Esteri su ključni za stvaranje slatke, voćne i cvjetne arome. Međutim, prevelika količina etil kaproata i etil butirata rezultira izrazito voćnim notama mirisa (Castada i sur., 2019). Također, mirisi koji podsjećaju na češnjak, sumpor ili jaja stvaraju se tioesterima, kao što su S-metil tioacetat, tioetil-2-metilpropanoat i S-metil tioacetat, koji nastaju kada SMK reagiraju sa sulfhidrilnim skupinama (Iwasawa i sur., 2014).

Najzastupljeniji metabolički procesi u sazrijevanju sira su lipoliza i katabolizam masnih kiselina (Collins i sur., 2003). Karboksilne kiseline, koje obično uključuju  $C_2$  (octenu) do  $C_{10}$  ili  $C_{12}$  (dekanoičnu ili dodekanoičnu) kiselinu, najčešća su skupina HAS koji se nalaze u sirevima. Ostale skupine spojeva, poput aldehida, laktona, ketona, alkohola, estera i fenolnih spojeva, također su prisutne (Faccia i sur., 2018).



## **2.3. Biosinteza hlapljivih organskih spojeva**

### **2.3.1. Esteri**

Prema Collins i sur. (2003), esteri su skupina kemijskih spojeva koje imaju neizravnu ulogu u metabolizmu SMK. Nastaju putem dvaju enzimskih procesa poznatih kao esterifikacija i alkoholiza. Proces esterifikacije uključuje stvaranje estera reakcijom između alkohola i karboksilnih kiselina. S druge strane, alkoholiza obuhvaća sintezu estera iz alkohola i acilglicerola, ili iz alkohola i acil-koenzima A. Velik broj ovih spojeva široko je povezan s ugodnim notama mirisa koji uključuju slatke, voće i cvjetne note, a imaju niske pragove detekcije mirisa. Također, esteri mogu smanjiti oštrinu i gorčinu sireva, koje su često uzrokovane visokim koncentracijama SMK i biogenih amina (Liu i sur., 2004).

### **2.3.2. Ketoni i alkoholi**

Glavni metabolički procesi koji proizvode ketone i alkohole su oksidacija zasićenih masnih kiselina i liza triglicerida. Ovi procesi rezultiraju stvaranjem  $\alpha$ -ketokiselina, koje se zatim dekarboksiliraju u ketone, koji se dalje mogu reducirati u alkohole (Urbach, 1997). Prema Bertuzzi i sur. (2018), metil-ketoni su spojevi s vrlo niskim pragovima detekcije mirisa u vodi, krećući se od 4,09 do 50,0 mg/100 g za 2-propanon i od 0,09 mg/100 g za 2-heptanon.

### **2.3.3. Aldehidi**

Aldehidi su jaki aromatski spojevi koji se često povezuju s oksidativnim kvarenjem (McSweeney i Sousa, 2000). Nastaju tijekom razgradnje kratkolančanih masnih kiselina te služe kao supstrati za određene dehidrogenaze koje proizvode karboksilne kiseline i alkohole (Kilcawley, 2017). Mogu nastati i razgradnjom nezasićenih masnih kiselina, kako slobodnih tako i esterificiranih, putem ne-enzimskih auto-oksidacijskih procesa. Budući da sir karakterizira reducirajuće okruženje, ove reakcije se ne događaju često. Prema Bertuzzi i sur. (2018), ove promjene doprinose stvaranju aldehida s linearnim lancem, koji su povezani s ugodnim mirisnim notama. Određeni sojevi laktokoka mogu proizvesti razgranate aldehide, 2-metil-1-propanal, 2-metil-1-butanal i 3-metil-1-butanal, iz valina, izoleucina i leucina, putem nekoliko enzimskih puteva (Christensen i sur., 1999).

### 2.3.4. Slobodne masne kiseline

U mnogim vrstama sira, masne kiseline imaju značajnu, pa čak i dominantnu ulogu u profilu okusa. Osim što su aromatske komponente, djeluju kao prekursori metil-ketona, alkohola, laktona i estera. SMK s četiri ili više ugljikovih atoma mogu nastati razgradnjom aminokiselina ili lipolizom mliječne masti tijekom zrenja sira (Urbach, 1993).

Većina masnih kiselina, koje imaju između četiri i dvadeset ugljikovih atoma, nastaje kada plemenita plijesan razgrađuje trigliceride. Manji udio SMK, obično s dva do šest ugljikovih atoma, formira se razgradnjom laktoze i aminokiselina. Kraće masne kiseline mogu se formirati i oksidacijom ketona, estera i aldehida (Molimard i Spinnler, 1996).

Važno je napomenuti da na koncentraciju SMK u siru utječe pH vrijednost. Prema Brennan i sur. (1989) samo slobodni, protonirani oblik masnih kiselina doprinosi okusu i mirisnim notama sira. To su uglavnom kiseline otopljene u masnoj fazi sira. Zbog relativno visokog praga detekcije mirisa, dugolančane masne kiseline (>12 ugljikovih atoma) često imaju malen utjecaj na okus. Masne kiseline s parnim brojem ugljikovih atoma (C<sub>4</sub>–C<sub>12</sub>), kao što navode Preininger i sur. (1996), imaju znatno niže pragove detekcije mirisa i jedinstvene note mirisa.

### 2.3.5. Terpeni

Terpeni su sekundarni metaboliti koje proizvode gljive, alge i više biljke. Dokazano je da ovi spojevi posjeduju antibakterijska, antigljivična, antiparazitska, antivirusna, antialergijska, protuupalna i kemoterapijska svojstva te je poznato da se koriste kao aromatske komponente okusa i arome u hrani i kozmetici (Ajikumar i sur., 2008). Potječu iz biljaka koje čine smjesu paše, zatim se izlučuju kroz mlijeko životinja koje pasu i na kraju u sir (Mariaca i sur., 1997).

Temeljeni su na izoprenoj jedinici, a ovisno o njihovom udjelu u prehrani životinja, imaju značajan utjecaj na količinu i sastav mlijeka te finalni proizvod sir. Profil terpena može se mijenjati tijekom proizvodnje sira i toplinske obrade mlijeka (Cornu i sur., 2005).

Brojni čimbenici poput vrste, faze razvoja, tla, klime, geografske lokacije i upravljanja pašnjacima utječu na količinu i kvalitetu terpena u biljkama (Poulopoulou i sur., 2011). Stoga se sadržaj terpena u siru istražuje kao potencijalni biomarker za identifikaciju podrijetla sira, što je povezano s prehrambenim navikama životinja (Favaro i sur., 2005).

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Uzorkovanje sira

Sirevi su proizvedeni u mini sirani u Kolanu na otoku Pagu. Zrenje Paškog sira pratilo se u 0., 30., 60. i 90. danu. Za potrebe analiza Paški sir je usitnjen (5 g), stavljen u plastične epruvete i pohranjen u zamrzivaču pri temperaturi od -20 °C do početka analize.

#### 3.2. Ekstrakcija hlapljivih aromatskih spojeva

Uz nekoliko manjih izmjena protokola, za ispitivanje hlapljivih aromatskih profila uzoraka Paškog sira korištena je metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi para iznad uzorka (*engl.* Headspace solid phase microextraction – HS-SPME) u kombinaciji s vezanim sustavom plinska kromatografija- sa spektrometar masa (*engl.* Gas chromatography/mass spectrometry –GC/MS) prema Nogueira i sur. (2005). Uzorci su na dan analize izvađeni iz zamrzivača i ostavljeni na sobnoj temperaturi pola sata. Nakon toga, 1,00 g uzorka je izvagano i stavljeno u 15 ml staklenu bočicu s navojnim poklopcem i PTFE/silikonskim septumom (Supelco). Bočice su postavljene na magnetsku miješalicu i ostavljene da se uravnoteže na 200 rpm i 60 °C tijekom 20 minuta. Nakon uravnoteženja, komercijalno SPME vlakno koje sadrži Divinilbenzen/Carboksen/Polidimetilsiloksan (*engl.* Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane – DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Supelco) je uvedeno i pričvršćeno na SPME držač vlakna (Supelco) za ekstrakciju hlapljivih spojeva. Prije svake analize, vlakno je bilo podvrgnuto procesu termičkog čišćenja i kondicioniranja u GC injekcijskom portu tijekom 30 minuta, koristeći posebno dizajniran liner za SPME upotrebu (0.75 mm ID Straight/SPME Inlet Liner, Shimadzu). Vlakno je bilo izloženo jedan centimetar iznad uzoraka, koji su bili kontinuirano miješani na 200 rpm, tijekom 45-minutne ekstrakcije hlapljivih spojeva na 60 °C.

#### 3.3. Plinska kromatografija sa masenim spektrometrom

Nakon ekstrakcije, vlakno s ekstrahiranim hlapljivim organskim spojevima ručno je ubrizgano u splitless način rada GC injekcijskog porta na 250 °C (GC/MS QP2020 NX, Shimadzu). Hlapljivi organski spojevi su se desorbirali tijekom deset minuta. Za separaciju je korištena Rtx-Wax kolona (60 x 0,25 x 0,25, Restek), koja je trajala 57 minuta prema sljedećem temperaturnom programu: 40 °C tijekom dvije minute, nakon čega je temperatura povećana za 4 °C svaku minutu do 240 °C, gdje je zadržana pet minuta. Kao plin nosioc korišten je helij s protokom od 1,0 ml min<sup>-1</sup>. MS je bio podešen sa sljedećim parametrima: temperatura injektora 250 °C, temperatura ionskog izvora 200 °C, i elektronska ionizacija na 70 eV. Snimljen je ukupni ionski kromatogram u rasponu m/z 33,00 – 330,00. Kriteriji korišteni za kvalitativnu

analizu hlapljivih organskih spojeva bili su: a) maseni spektri i retencijsko vrijeme temeljeni na podacima softvera Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (NIST); b) redosljed eluiranja prema podacima iz literature; te c) usporedba masenih spektara sa spektrima standardnih otopina.. Omjer površine pikova u odnosu na ukupnu površinu svih hlapljivih spojeva korišten je za izražavanje udjela svakog identificiranog hlapljivog organskog spoja. Ispitan je odziv linearnosti detektora. Kalibracijske krivulje dobivene iz standardnih otopina aromatskih spojeva u 5 točaka pokazale su dobru linearnost u rasponu 10–1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  uz korelacijski koeficijent ( $r = 0,94$ ). Standardne otopine spojeva pripravljene su u 96% etanolu. U 750  $\mu\text{L}$  standardne otopine dodano je 10  $\mu\text{L}$  internog standarda 2-oktanol (50  $\text{mg L}^{-1}$  u diklorometanu). Granica detekcije (LOD) kretala se od 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  do 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a granica kvantifikacije (LOQ) bila je od 63 do 98  $\mu\text{g L}^{-1}$  za pojedine spojeve.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Koncentracije pojedinačnih hlapljivih aromatskih spojeva tijekom zrenja Paškog sira

Tablica 4.1.1. Koncentracije estera izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Esteri	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
3-metil-butil butanoat	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
Etil laktat	0,25	0,24	0,39	0,05	0,93
1-metil-butil butanoat	0,04	0,04	0,08	0,01	0,17
2-metil-etil butanoat	0,15	0,15	0,09	0,02	0,41
2-metil-etil propanoat	0,05	0,04	0,04	0,02	0,14
Butil acetat	0,08	0,08	0,04	0,00	0,21
Etil acetat	0,78	0,88	0,79	0,39	2,85
Etil dekanooat	0,00	0,00	0,19	0,06	0,25
Etil heksanoat	0,11	0,11	0,78	0,45	1,45
Etil pentanoat	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
Ukupni esteri	1,46	1,53	2,41	1,02	6,43

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Deset estera identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.1.) predstavlja 13,7% profila HAS te, zbog svojih niskih pragova detekcije mirisa, doprinosi aromi sira.

Najzastupljeniji esteri u Paškom siru su etil acetat, etil heksanoat i etil laktat, što je u skladu s istraživanjem Coda i sur. (2006), gdje su slični rezultati zabilježeni u sirevima Pecorino Marchigiano, Pecorino Piemontese, Pecorino Sardo i Pecorino Leccese, osim za koncentraciju etil laktata. Najveće koncentracije etil heksanoata utvrđene su kod sireva Nanos, Montasio i Reggiano Argentino (Boltar i sur., 2014; Innocente i sur., 2013; Wolf i sur., 2010). Prema Singh i sur. (2003), etil acetat i etil heksanoat spadaju među najvažnije aromatske spojeve u siru. Etil laktat koji je identificiran u uzorcima Paškog sira, nije dokumentiran u prethodnim studijama.

Etil acetat doprinosi voćnoj aromi (Liu i sur., 2004) poput mirisnih nota naranče i ananasa (Štefániková i sur., 2020). Etil laktat također doprinosi voćnoj aromi (Liu i sur., 2004). Etil heksanoat odgovoran je za prisutnost mirisnih nota ananasa (Liu i sur., 2004) i doprinosi izraženoj voćnoj aromi (Qian i Reineccius, 2002), uključujući mirisne note jabuke i banane (Moio i sur., 2000).

Tablica 4.1.2. Koncentracije alkohola izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Alkoholi	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
1-oktanol	0,15	0,14	0,09	0,03	0,42
Izobutil alkohol	0,78	0,76	0,37	0,08	1,99
2-pentanol	0,57	0,55	1,70	0,86	3,68
1-butanol	0,43	0,41	0,30	0,06	1,20
1-heptanol	0,23	0,22	0,11	0,03	0,59
1-nonanol	0,09	0,09	0,09	0,03	0,30
1-okten-3-ol	0,07	0,07	0,07	0,01	0,22
2,7-dimetil-4,5-oktanediol	4,36	4,20	0,41	0,27	9,24
2-etil-1-heksanol	0,24	0,23	0,14	0,04	0,65
2-heksanol	0,55	0,62	0,60	0,15	1,92
2-heksen-1-ol	0,03	0,03	0,01	0,01	0,07
2-izopropil-5-metil-1-heptanol	0,79	0,76	0,52	0,09	2,16
2-metil-1-penten-3-ol	0,44	0,50	0,21	0,88	2,04
2-nonanol	0,04	0,04	0,28	0,40	0,76
2-nonen-1-ol	0,03	0,02	0,02	0,01	0,07
2-okten-1-ol	0,02	0,02	0,02	0,00	0,06
3-metil-2-pentanol	0,00	0,00	0,03	0,01	0,04
3-metil-1-butanol	6,94	6,69	3,00	0,81	17,45
Etanol	1,22	1,38	7,49	1,39	11,48
Feniletil alkohol	0,15	0,15	0,12	0,09	0,51
Ukupni alkoholi	17,13	16,87	15,59	5,25	54,84

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Dvadeset alkohola identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.2.) predstavlja 27,4% profila HAS i dominantna je grupa spojeva u uzorcima Paškog sira.

Najzastupljeniji alkoholi u Paškom siru su 3-metil-1-butanol, etanol i 2,7-dimetil-4,5-oktanediol. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Fernandes-García i sur. (2004a) te Engles i sur. (1997), gdje je zabilježeno da 3-metil-1-butanol ima ključnu ulogu u aromi sireva Castelano i Proosdij. Preostala dva alkohola nisu bila detektirana u tim istraživanjima. 2,7-dimetil-4,5-oktanediol identificiran je u slovačkom siru Bryndza, gdje je, prema Štefániková i sur. (2020), opisan kao sekundarni metabolit BMK. U ovoj studiji etanol je identificiran kao drugi najzastupljeniji alkohol. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Innocente i sur. (2013) te Wolf i sur. (2010), koji su također utvrdili da je etanol bio najzastupljeniji spoj u uzorcima sireva Montasio i Reggianito Argentino.

3-metil-1-butanol doprinosi vrlo slaboj zelenoj i voćnoj aromi (Qian i Reineccius, 2002) te može pridonijeti sa alkoholnom i zrnatom aromom (Singh i sur., 2003). Etanol je povezan sa slabom alkoholnom aromom (Qian i Reineccius, 2002). Prema dosadašnjim istraživanjima, nije identificirano kojoj aromi pridonosi 2,7-dimetil-4,5-oktanediol.

Tablica 4.1.3. Koncentracije aldehida izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Aldehidi	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
Izovalealdehid	0,19	0,21	0,07	0,02	0,48
2-heksenal	0,03	0,03	0,06	0,01	0,12
2-nonenal	0,00	0,00	0,04	0,00	0,04
2-oktenal	0,00	0,00	0,35	0,01	0,36
3-metil-butanal	2,38	2,70	0,22	0,08	5,37
Acetaldehid	0,07	0,07	0,06	0,02	0,22
Benzaldehid	0,08	0,08	0,13	0,03	0,31
Heptanal	0,27	0,26	0,79	0,00	1,32
Heksanal	0,32	0,30	0,74	0,00	1,36
Nonanal	0,16	0,15	0,21	0,06	0,58
Oktanal	0,04	0,04	0,11	0,02	0,22
Propanal	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02
Ukupni aldehidi	3,53	3,84	2,79	0,24	10,40

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Dvanaest aldehida identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.3.) predstavlja 16,4% profila HAS te zajedno sa SMK dijeli treće mjesto po zastupljenosti u uzorcima Paškog sira.

Najzastupljeniji aldehidi u Paškom siru su 3-metil-butanal, heksanal i heptanal. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Hayaloglu i Karabulut (2013), koji su također identificirali 3-metil-butanal i heksanal u turskom siru Ezine. Prema Coda i sur. (2006), 3-metil-butanal i heksanal su identificirani u više vrsta talijanskih sireva, uključujući Pecorino del Tarantino, Pecorino Leccese, Pecorino di Filiano, Pecorino del Reatino, Pecorino Sardo, Pecorino Umbro, Pecorino Marchigiano i Pecorino Piemontese.

Prema Delgado i sur. (2010), 3-metil-butanal je detektiran na početku zrenja sira Torta del Casar, ali nije bio prisutan 60. i 90. dana zrenja. Slični rezultati dobiveni su u ovom istraživanju, gdje je 3-metil-butanal bio prisutan u malim koncentracijama 60. i 90. dana. Prema Boltar i sur. (2014), najveće koncentracije heksanala i heptanala zabilježene su u Nanos siru.

3-metil-butanal doprinosi kakaovoj ili sladnoj aromi (Mariaca i sur., 2001), dok se također može opisati kao biljna ili aroma zelene trave (Boltar i sur., 2014). Heksanal je povezan s aromom zelene pokošene trave (Mariaca i sur., 2001; Singh i sur., 2003), a heptanal doprinosi citrusnoj, zelenoj i dimljenoj aromi (Štefániková i sur., 2020) ili sapunastoj aromi (Boltar i sur., 2014).

Tablica 4.1.4. Koncentracije ketona izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Ketoni	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
Acetol	0,02	0,02	0,00	0,01	0,06
3-metil-4-metilen- 2-heksanon	0,00	0,00	0,09	0,01	0,10
2,3-pentandion	0,16	0,15	0,26	0,02	0,60
2,5-oktadion	0,11	0,10	0,33	0,03	0,57
2-butanon	0,23	0,26	0,08	0,06	0,62
2-dodekanon	0,01	0,01	0,03	0,01	0,06
2-heptanon	4,34	4,18	1,01	3,92	13,45
2-heksanon	0,00	0,00	2,15	0,20	2,35
2-nonanon	1,87	1,80	1,01	1,94	6,61
2-oktanon	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07
2-pentanon	12,04	5,53	2,25	2,17	21,99
2-undekanon	0,00	0,00	0,06	0,08	0,14
Acetoin	21,52	20,73	5,32	0,43	48,01
5-metil-2-heksanon	2,16	2,44	0,63	0,36	5,59
Ukupni ketoni	42,45	35,23	13,23	9,30	100,21

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Četrnaest ketona identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.4.) predstavlja 19,2% profila HAS te je druga najzastupljenija grupa spojeva u uzorcima Paškog sira. Ketoni imaju niske pragove detekcije mirisa što pridonosi karakterističnoj aromi sira (McSweeney i Fox, 2004; Delgado i sur., 2010).

Najzastupljeniji ketoni u Paškom siru su acetoin, 2-pentanon i 2-heptanon, što je u skladu s istraživanjem Del Olmo i sur. (2019), u kojem je najveća koncentracija 2-pentanona zabilježena u Iberico siru inokuliranom dehidiranom morskom algom (*Himanthalia elongata*), dok je najveća koncentracija 2-heptanona zabilježena kod inokulacije s *Porphyra umbilicalis*. Prema istraživanju Delgado i sur. (2010), 2-heptanon bio je najzastupljeniji keton tijekom zrenja sira Torta del Casar.

Koncentracija acetoina u uzorcima Paškog sira bila je visoka u ranim fazama zrenja (0. i 30. dan), ali je postupno opadala tijekom zrenja. Takvi rezultati su u skladu s istraživanjem Delgado i sur. (2010), koji su zabilježeni za sir Torta del Casar. Prema Nájera-Domínguez i sur. (2014), u Chihuahua siru proizvedenog od pasteriziranog mlijeka, acetoin je bio glavna aromatska komponenta.

Acetoin doprinosi aromi koja podsjeća na maslac (Hatipoğlu i sur., 2023) ili kiselo mlijeko (Boltar i sur., 2014). 2-pentanon pridonosi voćnoj aromi, aromi koja podsjeća na sir (Mariaca i sur., 2001) i narančinu koru (Boltar i sur., 2014). 2-heptanon se opisuje kao aroma sira s plemenitim plijesnima i pridonosi pikantnoj aromi (Mariaca i sur., 2001) ili kao aroma laka (Boltar i sur., 2014).



Tablica 4.1.5. Koncentracije SMK izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Kiseline	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
Izomaslačna kiselina	0,11	0,10	2,50	0,60	3,32
2-etil heksanska kiselina	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
3-metil maslačna kiselina	1,00	0,96	4,93	1,44	8,32
Octena kiselina	11,35	16,00	24,05	6,19	57,60
Butanska kiselina	0,73	0,70	11,30	6,54	19,27
Heptanska kiselina	0,04	0,04	0,07	0,05	0,21
Heksanska kiselina	1,00	0,96	6,86	5,48	14,29
Dekanska kiselina	0,08	0,07	0,10	0,30	0,56
Nonanska kiselina	0,00	0,00	0,02	0,01	0,03
Oktanska kiselina	0,47	0,45	1,85	1,48	4,24
Pentanska kiselina	0,03	0,03	0,10	0,07	0,23
Propionska kiselina	0,04	0,04	0,21	0,09	0,38
Ukupne kiseline	14,84	19,35	52,01	22,26	108,46

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Dvanaest SMK identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.5.) predstavljaju 16,4% profila HAS te zajedno s aldehidima dijele treće mjesto po zastupljenosti u uzorcima Paškog sira.

Najzastupljenije SMK u Paškom siru su octena, butanska (maslačna) i heksanska kiselina, što je u skladu sa istraživanjem Hayaloglu i Karabulut (2013), koji su utvrdili da je butanska kiselina bila dominantna, uz prisutnost octene i heksanske kiseline u različitim vrstama turskih sireva. Studija koju su proveli Wolf i sur. (2010) pokazuje da na okus sireva tipa Grana značajno utječu SMK, posebno kratkolančane kiseline. Octena, maslačna i heksanska kiselina identificirane su kao dominantni spojevi u siru Parmigiano-Reggiano (Qian i Reineccius, 2002), Cheddar sirevima, te sirevima s plemenitim plijesnima (Frank i sur., 2004).

Octena kiselina povezana je s oštrom, ocatnom i kiselom aromom (McSweeney i Sousa, 2000; Qian i Reineccius, 2002), dok maslačna kiselina se opisuje kao jaka aroma po siru koju odlikuju oštri, užegli mirisni tonovi (Boltar i sur., 2014). Istraživanja Qian i sur. (2002), Štefániková i sur. (2020) i Boltar i sur. (2014) zabilježila su da heksanska kiselina doprinosi jakoj aromi po siru te kozjoj aromi sa trulim i užeglim mirisnim tonovima.

Tablica 4.1.6. Koncentracije terpena izraženih u % tijekom zrenja Paškog sira

Terpeni	0. dan	30. dan	60. dan	90. dan	<sup>1</sup> Ukupna vrijednost
β-citronelol	0,34	0,33	1,54	0,83	3,03
1R-α-pinen	1,25	1,21	0,57	0,11	3,14
β-kariofilen	0,10	0,09	0,06	0,03	0,28
D-limonen	9,52	9,17	0,19	0,05	18,93
Linalol	0,03	0,03	0,02	0,01	0,08
Ukupni terpeni	11,24	10,83	2,38	1,02	25,47

<sup>1</sup>Ukupna vrijednost predstavlja zbroj koncentracija svakog pojedinačnog spoja tijekom zrenja Paškog sira

Pet terpena identificiranih u uzorcima Paškog sira (tablica 4.1.6.) predstavlja 6,9% profila HAS te se po zastupljenosti nalazi na zadnjem mjestu u uzorcima Paškog sira.

Najzastupljeniji terpeni u Paškom siru su D-limonen, 1R-α-pinen i β-citronelol. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Di Cagno i sur. (2003), koji su zabilježili prisutnost limonena u talijanskim sirevima poput Canestrato Pugliese, Fiore Sardo i Pecorino Romano, proizvedenim od sirovog ovčjeg mlijeka, dok su Barron i sur. (2005) otkrili prisutnost limonena u Manchego siru. Prema Del Olmo i sur. (2019), 1R-α-pinen je bio glavni terpen u Iberico sirevima inokuliranim morskim algama poput *Himanthalia elongata*, *Porphyra umbilicalis*, *Laminaria ochroleuca*, *Ulva lactuca* i *Undaria pinnatifida*. β-citronelol koji je identificiran u uzorcima Paškog sira, nije dokumentiran u prethodnim studijama.

D-limonen doprinosi citrusnoj aromi te aromi koja podsjeća na metvicu i naranču (Štefániková i sur., 2020; Boltar i sur., 2014), 1R-α-pinen doprinosi aromi borovih iglica (Boltar i sur., 2014; Singh i sur., 2003), a β-citronelol karakterizira aroma ruže (Carpino i sur., 2004).

## 4.2. Prosječne srednje vrijednosti koncentracija organskih spojeva tijekom zrenja Paškog sira

Tablica 4.2.1. Prosječne srednje vrijednosti koncentracija organskih spojeva tijekom zrenja Paškog sira (n=12) izražene u %

Dani zrenja	Esteri	Alkoholi	Aldehidi	Ketoni	SMK	Terpeni
0.	1,47±1,02	17,13±9,33	3,53±1,96	42,45±15,90	14,83±12,82	11,24±5,26
30.	1,53±1,09	16,87±9,25	3,85±2,16	35,23±13,76	19,35±8,80	10,83±5,07
60.	2,41±0,68	15,60±7,27	2,78±1,89	13,23±6,34	52,01±8,69	2,39±1,06
90.	1,02±0,52	5,25±3,39	0,24±0,09	9,29±4,82	22,26±5,85	1,02±0,37

Rezultati izražavaju srednju vrijednost sa standardnom devijacijom ( $\pm$ SD) od 12 uzoraka sireva u različitim fazama zrenja

Esteri su prisutni u visokim koncentracijama na početku zrenja, čineći 2,41% ukupnih HAS detektiranih 60. dana. Do kraja zrenja njihova koncentracija pada na 1,02% (tablica 4.2.1.). Ovaj pad može biti rezultat smanjene aktivnosti esteraza te esterifikacije, koja može biti povezana s prisutnošću bakterije *Streptococcus thermophilus* i aktivnošću kratkolančanih masnih kiselina, što zajedno može doprinijeti smanjenju razine estera (Liu i sur., 2003).

Na početku zrenja, alkoholi su bili prisutni u visokoj koncentraciji, čineći 16,87% ukupnih HAS detektiranih 30. dana. Međutim, njihova koncentracija se smanjila na 5,25% na kraju zrenja (tablica 4.2.1.). Ovi rezultati odstupaju od prethodnih istraživanja zabilježenih u španjolskim sirevima od sirovog ovčjeg mlijeka, u kojima su alkoholi predstavljali dominantnu kemijsku grupu u sirevima Castellano i Zamorano (Fernández-García i sur., 2004a; Fernández-García i sur., 2004b)

Tijekom početne faze zrenja, koncentracija aldehida bila je u porastu, dosegnuvši 3,85% na 30. dan zrenja (tablica 4.2.1.). Međutim, ovaj trend opada prema kraju zrenja, kada koncentracija aldehida iznosi samo 0,24%. Ovaj promatrani trend može se objasniti istraživanjem Delgado i sur. (2011), koji navode da su aldehidi prijelazni spojevi u siru jer se brzo reduciraju u primarne alkohole ili oksidiraju u odgovarajuće kiseline.

Na početku zrenja, koncentracija ketona iznosi 42,45%. Iako se u početku bilježi rastući trend, taj trend opada prema kraju zrenja, dosegnuvši konačno 9,29% (tablica 4.2.1.). Ovo odstupanje može se objasniti istraživanjem Delgado i sur. (2011), koji ističu da metil ketoni služe kao prekursori nekih sekundarnih alkohola.

Slobodne masne kiseline prisutne su u povišenim koncentracijama tijekom cijelog procesa zrenja i zadržavaju se na tim razinama do 60. dana, kada koncentracija dostiže 52,01%. Na kraju zrenja njihov udio opada na 22,26% (tablica 4.2.1.). Ovi rezultati usklađeni su s istraživanjem Molimarda i Spinnlera (1996), gdje je zabilježeno da lipoliza igra ključnu ulogu u stvaranju karboksilnih kiselina s više od četiri atoma ugljika. Osim toga, oksidacija ketona, estera i aldehida može rezultirati stvaranjem kratkih lančanih kiselina.

Koncentracija terpena na početku zrenja, 0. dan, iznosi 11,24% i ostaje konstantna do 30. dana zrenja. Međutim, na kraju zrenja, koncentracija terpena opada na 1,02% (Tablica

4.2.1.). S obzirom na to da se proizvodnja Paškog sira odvijala tijekom zimskih mjeseci, smanjenje koncentracije terpena može se pripisati smanjenom sadržaju terpena u hrani koju su životinje konzumirale zimi. Ova opažanja su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala smanjenje razina terpena u dehidriranim biljkama-sijeno, silaža (Tomba, 2005).

## 5. Zaključak

Istraživanje je pokazalo da se tijekom zrenja Paškog sira odvijaju složeni biokemijski procesi koji utječu na formiranje njegovog aromatskog profila i to 20 alkohola, 14 ketona, 12 aldehida, 12 kiselina, 10 estera te 5 terpena.

Pritom najzastupljeniji esteri, etil acetat, etil heksanoat i etil laktat daju siru voćnu aromu, aldehidi doprinose citrusnim, zelenim i aromama kakaa dok ketoni pridonose karakterističnoj aromi sira.

Slobodne masne kiseline daju oštru i kiselkastu aromu, a terpeni citrusnu aromu s mirisnim notama mente i naranče.

Utvrđene su razlike između srednjih vrijednosti koncentracija spojeva.

Esteri i ketoni, zbog svojih niskih pragova detekcije mirisa, doprinijeli su aromi Paškog sira. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja usmjerena na poboljšanje kvalitete Paškog sira.

## 6. Popis literature

1. Ajikumar, P. K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T. H., Stephanopoulos, G. (2008). Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Molecular pharmaceuticals*, 5(2), 167-190. <https://doi.org/10.1021/mp700151b>
2. Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology advances*, 24(2), 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>
3. Ardö, Y., McSweeney, P. L., Magboul, A. A., Upadhyay, V. K., Fox, P. F. (2017). Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. In *Cheese* (pp. 445-482). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
4. Barać, Z., Mioč, B., Havranek, J., Samaržija, D. (2008). Paški sir. U: Paška ovca-hrvatska izvorna pasmina. Grad Novalja; Ogranak Matice hrvatske u Novalji, (Barać, Z., ur.), 65-72.
5. Barron, L. J. R., Redondo, Y., Flanagan, C. E., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., Nájera, A. I., de Renobales, M., Fernández-García, E. (2005). Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet. *International Dairy Journal*, 15(4), 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.005>
6. Bertuzzi, A. S., McSweeney, P. L., Rea, M. C., Kilcawley, K. N. (2018). Detection of volatile compounds of cheese and their contribution to the flavor profile of surface-ripened cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 371-390. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12332>
7. Boltar, I., Čanžek Majhenič, A., Jarni, K., Jug, T., & Bavcon Kralj, M. (2015). Volatile compounds in Nanos cheese: Their formation during ripening and seasonal variation. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 608-623. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1565-6>
8. Brennand, C. P., Ha, J. K., Lindsay, R. C. (1989). Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and meat lipids 1. *Journal of Sensory Studies*, 4(2), 105-120. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1989.tb00461.x>
9. Carpino, S., Mallia, S., La Terra, S., Melilli, C., Licitra, G., Acree, T. E., Barbano, D. M., Van Soest, P. J. (2004). Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 816-830. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73226-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73226-9)
10. Castada, H. Z., Hanas, K., Barringer, S. A. (2019). Swiss cheese flavor variability based on correlations of volatile flavor compounds, descriptive sensory attributes, and consumer preference. *Foods*, 8(2), 78. <https://doi.org/10.3390/foods8020078>
11. Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217-246. <https://doi.org/10.1023/A:1002001919720>
12. Coda, R., Brechany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2006). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4126-4143. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72458-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72458-4)

13. Collins, Y. F., McSweeney, P. L., Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
14. Cornu, A., Kondjoyan, N., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Berdagué, J. L., Coulon, J. B. (2005). Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurised milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12), 2040-2046. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2214>
15. Curioni, P. M. G., Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959-984. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00124-3)
16. Deeth, H. C., Touch, V. (2000). Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Methods*, 5(5), 555.
17. del Olmo, A., López-Pérez, O., Picon, A., Gaya, P., Nuñez, M. (2019). Cheese supplementation with five species of edible seaweeds: Effect on proteolysis, lipolysis and volatile compounds. *International Dairy Journal*, 90, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.11.012>
18. Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2010). Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese PDO Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*, 118(1), 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.081>
19. Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R. (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 129(3), 1156-1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.096>
20. Di Cagno, R., Banks, J., Sheehan, L., Fox, P. F., Brechany, E. Y., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2003). Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 13(12), 961-972. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00145-6)
21. Dimos, A., Urbacha, G. E., Miller, A. J. (1996). Changes in flavour and volatiles of full-fat and reducedfat cheddar cheeses during maturation. *International Dairy Journal*, 6(10), 981-995. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)84214-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)84214-8)
22. Duru, I. C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O. P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International journal of food microbiology*, 281, 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017>
23. Engels, W. J. M., Dekker, R., De Jong, C., Neeter, R., Visser, S. (1997). A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7(4), 255-263. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00003-4)
24. Faccia, M., Trani, A., Natrella, G., Gambacorta, G. (2018). Chemical-sensory and volatile compound characterization of ricotta forte, a traditional fermented whey cheese. *Journal of dairy science*, 101(7), 5751-5757. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14424>
25. Favaro, G., Magno, F., Boaretto, A., Bailoni, L., Mantovani, R. (2005). Traceability of Asiago mountain cheese: a rapid, low-cost analytical procedure for its identification based on solid-phase microextraction. *Journal of dairy science*, 88(10), 3426-3434. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73026-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73026-5)

26. Fernández-García, E., Carbonell, M., Gaya, P., Nuñez, M. (2004b). Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14(8), 701-711. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.12.011>
27. Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (2004a). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14(1), 39-46. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00148-1)
28. Forde, A., Fitzgerald, G. F. (2000). Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 484-489. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00130-0)
29. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Fundamentals of cheese science. 391-442. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
30. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. (2017). Fundamentals of cheese science, 121-183. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
31. Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., O'Mahony, J. A. (2015). Chemistry and biochemistry of cheese. *Dairy chemistry and biochemistry*, 499-546. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_12)
32. Frank, D. C., Owen, C. M., Patterson, J. (2004). Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 37(2), 139-154. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00144-0](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00144-0)
33. Gan, H. H., Yan, B., Linforth, R. S., Fisk, I. D. (2016). Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. *Food Chemistry*, 190, 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.096>
34. Ganesan, B., Weimer, B. C. (2017). Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes. In *Cheese* (pp. 483-516). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
35. Gligora, Š., Antunac, N. (2007). Primjena HACCP sustava u proizvodnji Paškog sira. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 57(2), 127-152.
36. Hayaloglu, A. A., Karabulut, I. (2013). SPME/GC-MS characterization and comparison of volatiles of eleven varieties of Turkish cheeses. *International Journal of Food Properties*, 16(7), 1630-1653. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.587625>
37. Holland, R., Liu, S. Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 711-718. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>
38. <https://www.siranamih.hr/hr/povijest> MIH Sirana Kolan, pristupljeno: 12.2.2024.
39. Innocente, N., Munari, M., Biasutti, M. (2013). Characterization by solid-phase microextraction-gas chromatography of the volatile profile of protected designation of origin Montasio cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 26-32. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5689>
40. Iwasawa, A., Suzuki-Iwashima, A., Iida, F., Shiota, M. (2014). Effects of flavor and texture on the desirability of Cheddar cheese during ripening. *Food Science and Technology Research*, 20(1), 23-29. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.23>
41. Kilcawley, K. N. (2017). Cheese flavour. *Fundamentals of cheese science*, 443-474. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_13)



42. Klačanová, K., Fodran, P., Rosenberg, M. (2010). The possible production of natural flavours by amino acid degradation. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 141, 823-828. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0331-3>
43. Liu, S. Q., Holland, R., Crow, V. L. (2003). Ester synthesis in an aqueous environment by *Streptococcus thermophilus* and other dairy lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 63, 81-88. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1355-y>
44. Liu, S. Q., Holland, R., Crow, V. L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14(11), 923-945. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.010>
45. Mariaca, R. G., Fernández-García, E., Mohedano, A. F., Nufiez, M. (2001). Volatile fraction of ewe's milk semi-hard cheese manufactured with and without the addition of a cysteine proteinase. *Food science and technology international*, 7(2), 131-139. <https://doi.org/10.1177/108201320100700205>
46. Mariaca, R., Bosset, J. O. (1997). Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Le lait*, 77(1), 13-40. <https://doi.org/10.1051/lait:199712>
47. Marilley, L., Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International journal of food microbiology*, 90(2), 139-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0)
48. McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International journal of dairy technology*, 57(2-3), 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
49. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, 1, 361-371.
50. McSweeney, P. L., Fox, P. F., Ciocia, F. (2017). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese* (pp. 411-421). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00016-8>
51. McSweeney, P. L., Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293-324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
52. Melchiorson, R. C., Jokumsen, V. K., Villadsen, J., Israelsen, H., Arnau, J. (2002). The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 338-344. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0892-5>
53. Moio, L., Piombino, P., Addeo, F. (2000). Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *Journal of Dairy Research*, 67(2), 273-285. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004106>
54. Molimard, P., Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of dairy science*, 79(2), 169-184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
55. Nájera-Domínguez, C., Gutiérrez-Méndez, N., Nevárez-Moorillon, G., Caro-Canales, I. (2014). Comparison of volatile compounds produced by wild *Lactococcus lactis* in miniature Chihuahua-type cheeses. *Dairy Science & Technology*, 94, 499-516. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0175-4>
56. Nogueira, M. C. L., Lubachevsky, G., & Rankin, S. A. (2005). A study of the volatile composition of Minas cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.019>

57. Pouloupoulou, I., Zoidis, E., Massouras, T., Hadjigeorgiou, I. (2012). Terpenes transfer to milk and cheese after oral administration to sheep fed indoors. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(2), 172-181. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01128.x>
58. Preininger, M., Warmke, R., Grosch, W. (1996). Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202, 30-34. <https://doi.org/10.1007/BF01229680>
59. Qian, M., Reineccius, G. (2002). Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1362-1369. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74202-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74202-1)
60. Rychlik, M., Bosset, J. O. (2001). Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal*, 11(11-12), 903-910. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00109-1)
61. Schirone, M., Tofalo, R., Perpetuini, G., Manetta, A. C., Di Gianvito, P., Tittarelli, F., Battistelli, N., Corsetti, A., Suzzi, G., Martino, G. (2018). Influence of iodine feeding on microbiological and physico-chemical characteristics and biogenic amines content in a raw ewes' milk cheese. *Foods*, 7(7), 108. <https://doi.org/10.3390/foods7070108>
62. Schwenninger, S. M., Meile, L., Lacroix, C. (2011). Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation. In *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* (pp. 27-62). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857090522.1.27>
63. Sert, D., Akin, N., Aktumsek, A. (2014). Lipolysis in Tulum cheese produced from raw and pasteurized goats' milk during ripening. *Small ruminant research*, 121(2-3), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.06.006>
64. Singh, T. K., Drake, M. A., Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(4), 166-189. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x>
65. Štefániková, J., Ducková, V., Miškeje, M., Kačániová, M., Čanigová, M. (2020). The impact of different factors on the quality and volatile organic compounds profile in "Bryndza" cheese. *Foods*, 9(9), 1195. <https://doi.org/10.3390/foods9091195>
66. Temizkan, R., Yasar, K., Hayaloglu, A. A. (2014). Changes during ripening in chemical composition, proteolysis, volatile composition and texture in Kashar cheese made using raw bovine, ovine or caprine milk. *International journal of food science & technology*, 49(12), 2643-2649. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12597>
67. Tompa, G. (2005). Terpeni v tradicionalnih slovenskih sirih. *Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Oddelek za živilstvo, Ljubljana*.
68. Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3(4-6), 389-422. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90025-U](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90025-U)
69. Urbach, G. (1997). The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology*, 50(3), 79-89. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01743.x>
70. Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy Leuconostoc: use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2725-2737. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77215-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77215-5)
71. Voigt, D. D., Chevalier, F., Donaghy, J. A., Patterson, M. F., Qian, M. C., Kelly, A. L. (2012). Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture

- and functionality of Cheddar cheese during ripening. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.004>
72. Wolf, I. V., Perotti, M. C., Bernal, S. M., Zalazar, C. A. (2010). Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43(4), 1204-1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.018>
73. Zheng, X., Shi, X., Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>

## Životopis

Josip Stiperski rođen je 09.10.1997. u Zagrebu. Nakon završetka osnovne škole u Zaprešiću, Josip je upisao srednju strukovnu školu – Zdravstveno učilište u Zagrebu, smjer sanitarni tehničar. Odmah nakon toga, zaposlio se u Toxikon d.o.o., gdje je proveo godinu dana pružajući usluge dezinfekcije, dezinfekcije i deratizacije. U 2017. godini počinje studirati na Agronomskom fakultetu, s fokusom na Animalne znanosti. Nakon tri godine studija, postaje prvostupnik inženjer animalnih znanosti. U 2021. godini, nastavlja svoje obrazovanje na istom fakultetu, upisujući diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka. U 2024. godini je uspješno kompletirao edukaciju za Senzorskog analitičara na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Iste godine, odradio je stručnu praksu u Domžale, Slovenija na Biotehničkom fakultetu/Institutu za mljekarstvo i probiotike, Zavodu za mljekarstvo; dodatno proširujući svoje praktično iskustvo u području mljekarstva. Pored hrvatskog jezika, samostalno govori i engleski jezik. Slobodno vrijeme rado provodi u ugodnom društvu obitelji i prijatelja, uživajući u zajedničkim trenucima.