# Karakterizacija hlapljivih spojeva salame od mesa istarskog magarca

**Kovačić, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:458525

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

# KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA SALAME OD MESA ISTARSKOG MAGARCA

**ZAVRŠNI RAD**

**DORA KOVAČIĆ**

**Matični broj: 10**

**Split, rujan 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

# KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA SALAME OD MESA ISTARSKOG MAGARCA

**ZAVRŠNI RAD**

**DORA KOVAČIĆ**

**Matični broj: 10**

**Split, rujan 2019.**

**UNIVERSTTY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TEHNOLOGY**

**UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

# CARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM SALAMI MADE OF ISTRIAN DONKY MEET

**BACHELOR THESIS**

**DORA KOVAČIĆ**

**Parent number: 10**

**Split, September 2019.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Sveučilište u Splitu**
**Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu**
**Preddiplomski studij prehrambene tehnologije**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
**Znanstveno polje:**Prehrambena tehnologija
**Tema rada:**je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
**Mentor:**doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

# KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA SALAME OD MESA ISTARSKOG MAGARCA

Dora Kovačić, 10

**Sažetak:**

Uz bioraznolikost lokalnih pašnjaka i specifičnih geofizičkih uvjeta istarskog podneblja razvila se autohtona pasmina istarskog magarca čije je meso jedinstvene kvalitete. U skladu s potrebama tržišta, ali i s uviđajnim povećanjem populacije narasla je potreba za stvaranjem suhomesnatih proizvoda od mesa istarskog magarca. Jedan takav proizvod je trajna sušena salama koja u svom sastavu osim mesa istarskog magarca sadrži i istarsko crno vino. Specifičnosti sirovine, tehnološkog postupka pripreme, fermentacije i zrenja rezultiraju povećanjem koncentracije hlapljivih spojeva arome. Te su komponente proizašle iz biokemijskih procesa prilikom razgradnje masnog, vezivnog i mišićnog tkiva a odgovorne su za okusne i mirisne osobine ovog proizvoda. Hlapljivi spojevi su izolirani dvjema različitim metodama: mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i mikrovalovima potpomognutom destilacijom (MAD), te analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) u cilju usporedbe sličnosti i razlika dobivenih rezultata. SPME metodom identificirana su 23 različita spoja dok je metodom MAD identificirano njih 36. Identificirani spojevi mogu svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, organosumporovi spojevi, terpeni, fenoli, aldehidi, esteri, alkani i masne kiseline.

**Ključne riječi:**salama, Istarski magarac, hlapljivi spojevi, aroma , HS-SPME, MAD, GC-MS

**Rad sadrži:** 38 stranica, 15 slika, 4 tablice, 49 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | predsjednik |
| 2. | Doc. dr. sc. Danijela Skroza | član |
| 3. | Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović | član - mentor |

**Datum obrane:**16 rujan 2019.

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**BACHELOR THESIS**

**University of Split**
**Faculty of Chemistry and Technology Split**
**Undergraduate study of food tecnology**

**Scientific area:**Biotechnical sciences
**Scientific field:**Food technology
**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19th
**Mentor:**Zvonimir Marijanović**,** PhD**,** Assistant professor

# CARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM SALAMI MADE OF ISTRIAN DONKY MEET

Dora Kovačić, 10

**Abstract:**

Biodiversity of the local grazings and specific geophysical conditions of Istrian peninsula contributed in development of the native Istrian donkey with it's unique meat quality. Population increase and market needs have made dry meat of Istrian donkey a popular demand. One of such products is permanent dried salami which, in addition to Istrian donkey meat, in its composition also contains Istrian red wine. Concentration increase of aromatic vapors is direct result of compound specifications, technological procedure preparation, fermentation and ripening. These components are result of the biochemical processes from disintegration of fat, muscle and connective tissue, and are directly responsible for final product smell and flavor. Volatile compounds are isolated using two different methods: headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and microwave-assisted distillation (MAD), and analysed using gas chromatography– mass spectrometry technique (GC-MS) in order to compare the similarities and differences of obtained results. 23 different compounds were identified after isolation using SPME method in contrast to isolation using MAD method where 36 compounds were identified.These compounds can be grouped in following chemical groups: alcohols, organosulfur compounds, terpenes, aldehydes, alkanes and fatty acids.

**Keywords:**salami, Istrian donkey, volatile compounds, aroma, HS-SPME, MAD, GC-MS

**Thesis contains:** 38 pages, 15 figures, 4 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Ivica Blažević-PhD, associate prof. | chair person |
| 2. | Danijela Skroza-PhD, assistant prof. | member |
| 3. | Zvonimir Marijanović-PhD, assistant prof. | supervisor |

**Defence date:** 16thSeptember 2019.

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od prosinca 2018. godine do travnja 2019. godine*

***ZAHVALA***

*Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na ukazanom povjerenju, vodstvu i pomoći pri izradi ovog rada.*

*Također, jedno veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.*

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka trajne salame od mesa istarskog magarca, koristeći dvije različite metode izolacije: mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi i destilaciju potpomognutu mikrovalovima.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spoje mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi, koristeći dva vlakna i to: plavo vlakno dužine 5 cm s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) te sivo vlakno dužine 5 cm s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS).
- Izolirati hlapljive spojeve mikrovalovima potpomognutom destilacijom (MAD) koristeći snagu mikrovalova od 500W pri temperaturi 98°C.
- Analizirati izolirane spojeve spregnutom tehnikom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS).
- Obradom dobivenih podataka usporediti rezultate ispitivanog uzorka te utvrditi razlike i sličnosti u analizi uzorka korištenjem dviju različitih metoda ekstrakcije.

**SAŽETAK**

Uz bioraznolikost lokalnih pašnjaka i specifičnih geofizičkih uvjeta istarskog podneblja razvila se autohtona pasmina istarskog magarca čije je meso jedinstvene kvalitete. U skladu s potrebama tržišta, ali i s uviđajnim povećanjem populacije narasla je potreba za stvaranjem suhomesnatih proizvoda od mesa istarskog magarca. Jedan takav proizvod je trajna sušena salama koja u svom sastavu osim mesa istarskog magarca sadrži i istarsko crno vino. Specifičnosti sirovine, tehnološkog postupka pripreme, fermentacije i zrenja rezultiraju povećanjem koncentracije hlapljivih spojeva arome. Te su komponente proizašle iz biokemijskih procesa prilikom razgradnje masnog, vezivnog i mišićnog tkiva a odgovorne su za okusne i mirisne osobine ovog proizvoda. Hlapljivi spojevi su izolirani dvjema različitim metodama: mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i mikrovalovima potpomognutom destilacijom (MAD), te analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) u cilju usporedbe sličnosti i razlika dobivenih rezultata. SPME metodom identificirana su 23 različita spoja dok je metodom MAD identificirano njih 36. Identificirani spojevi mogu svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, organosumporovi spojevi, terpeni, fenoli, aldehidi, esteri, alkani i masne kiseline.

**Ključne riječi:**salama, Istarski magarac, hlapljivi spojevi, aroma, HS-SPME, MAE, GC-MS

**SUMMARY**

Biodiversity of the local grazings and specific geophysical conditions of Istrian peninsula contributed in development of the native Istrian donkey with it's unique meat quality. Population increase and market needs have made dry meat of Istrian donkey a popular demand. One of such products is permanent dried salami which, in addition to Istrian donkey meat, in its composition also contains Istrian red wine. Concentration increase of aromatic vapors is direct result of compound specifications, technological procedure preparation, fermentation and ripening. These components are result of the biochemical processes from disintegration of fat, muscle and connective tissue, and are directly responsible for final product smell and flavor. Volatile compounds are isolated using two different methods: headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and microwave-assisted distillation (MAD), and analysed using gas chromatography– mass spectrometry technique (GC-MS) in order to compare the similarities and differences of obtained results. 23 different compounds were identified after isolation using SPME method in contrast to isolation using MAD method where 36 compounds were identified.These compounds can be grouped in following chemical groups: alcohols, organosulfur compounds, terpenes, aldehydes, alkanes and fatty acids.

**Keywords:** salami, Istrian donkey ,volatile compounds, aroma, HS-SPME, MAD, GC-MS

# SADRŽAJ

**UVOD** ..... 1
**1.OPĆI DIO** ..... 2
1.1.KONZERVIRANJE TRAJNIH SALAMA ..... 2
1.1.1. FERMENTACIJA I ZRENJE TRAJNIH SALAMA ..... 3
1.2 AROMA TRAJNIH SALAMA ..... 6
1.2.1 HLAPLJIVI SPOJEVI AROME ..... 7
1.3. ISTARSKI MAGARAC ..... 9
1.4. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE TRAJNE SALAME OD MAGAREĆEG MESA ..... 11
1.5. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA MESA ..... 12
1.5.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA ..... 12
1.5.2. MIKROEKSTRAKCIJANA KRUTOJ FAZI ..... 12
1.5.3. DESTILACIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA ..... 13
1.6. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA ..... 14
1.6.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA ..... 14
1.6.2. SPEKTROMETRIJA MASA ..... 15
1.6.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA ..... 16
**2. EKSPERIMENTALNI DIO** ..... 18
2.1. TRAJNA SALAMA OD MESA ISTARSKOG MAGARCA ..... 18
2.2. PRIPREMA UZORKA ..... 19
2.3. KEMIKALIJE I APARATURA ..... 19
2.4. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA ..... 20
2.4.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI ..... 20
2.4.2. DESTILACIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA ..... 21
2.5. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM (GC-MS) ..... 23
**3.REZULTATI** ..... 25
**4.RASPRAVA** ..... 31
**5.ZAKLJUČAK** ..... 34
**6. LITERATURA** ..... 35

# UVOD

Proizvodnja trajne salame čovjeku je poznata kao tisućljetna tradicija prenošena s generacije na generaciju, kroz godine usavršavana, do tehnologija proizvodnje koje se danas primjenjuju.

Ovisno o vrsti trajne salame razlikuje se receptura i tehnologija proizvodnje, promjer finalnog proizvoda, korištena sirovina za proizvodnju (meso) i začini. Specifična senzorska svojstva trajne sušene salame posljedica su bakterijske fermentacije i procesa zrenja u kojem se odvijaju različite enzimske i neenzimatske reakcije koje utječu na formiranje arome. Skupine spojeva koje sudjeluju u stvaranju arome trajnih sušenih salama su mnogobrojne a neke od njih su kratkolančane masne kiseline, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, sumporovi spojevi, aromatski ugljikovodici, terpeni, fenoli, dušikovi spojevi, alkeni i dr. Njihova prisutnost dokazat će se provođenjem eksperimentalnog dijela rada.

U ovom radu za karakterizaciju hlapljivih spojeva korišten je uzorak trajne salame od mesa magarca s istarskim crnim vinom. Uzorak je podvrgnut dvjema različitim metodama izolacije (mikrovalovima potpomognuta destilacija i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi) te analiziran vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Usporedbom dobivenih rezultata utvrđene su sličnosti i razlike u izoliranim aromatskim spojevima.

# 1.OPĆI DIO

## 1.1.KONZERVIRANJE TRAJNIH SALAMA

Konzerviranje mesa fermentacijom jedna je od najstarijih prehrambenih tehnologija koja i danas igra važnu ulogu u očuvanju mesa u mnogim dijelovima svijeta. Fermentacija se u proizvodnji trajnih salama primjenjuje s metodama koje djeluju na smanjenje aktiviteta vode kao što su sušenje i soljenje. Ove tehnike ujedno predstavljaju temelj tradicionalnih postupaka konzerviranja koje su korištene puno prije nego se mogao razumjeti i objasniti princip njihova djelovanja *(1)*.

Trajne salame su visokokvalitetni proizvodi mesne industrije i kao takve vrlo su cijenjene i tražene od strane potrošača. Kao sirovina za proizvodnju koristi se najkvalitetnije meso (najčešće svinjetina, kombinacija svinjetine i govedine, piletina, rijetko ovčetina te meso kopitara) *(2)*. Trajne salame, prema pravilniku o mesnim proizvodima, definirane su kao proizvodi od mesa, masnog tkiva i dodanih sastojaka koji se nakon dorade i punjenja podvrgavaju postupcima fermentacije, sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja, sadrže maksimalno 40% vode, minimalno 16% bjelančevina a na tržište se stavljaju pod nazivima kulen, zimska, čajna, srijemska i trajne salame prema specifikaciji *(3)*. Primjesa usitnjenog mesa i dodanih začina nadijeva se u prirodne ili umjetne ovitke. Kao prirodni ovitci koriste se očišćena tanka svinjska, ovčja, goveđa ili konjska crijeva, a umjetni su kolagenski, poliamidni, natronski, pergamenti te celulozni ovitci. Uloga ovitka je višestruka, osim što održava proizvod u željenom obliku, on štiti nadjev od vanjskih utjecaja, omogućava isparavanje vode iz nadjeva kao i prodiranje dima u nadjev ukoliko se dimljenje primjenjuje u postupku proizvodnje *(2,4)*.

Pod konzerviranjem se podrazumijeva sprječavanje kvarenja, očuvanje senzorskih, tehnoloških i nutritivnih svojstava djelujući na mikroorganizme abiotički (uništenje) ili anabiotički (stvaranje nepovoljnih uvjeta za rast i razmnožavanje) čime se povećava trajnost proizvoda *(2)*. Kako bi se postigao optimalan konzervirajući učinak i zadovoljavajuća kvaliteta proizvoda u proizvodnji trajnih salama primjenjuje se tzv. „konzerviranje preprekama“, koje se temelji na kombiniranom, zajedničkom djelovanju nekoliko čimbenika:

- dodavanje nitrata, soli i/ili šećera (antimikrobni učinak)
- smanjenje redoks potencijala
- uvođenje bakterija mliječne kiseline (fermentacija)

- smanjenje pH vrijednosti
- smanjene aktiviteta vode (soljenjem i/ili sušenjem)
- dimljenje *(5)*

Naime, za svaki stabilan i zdravstveno ispravan prehrambeni proizvod postoji određeni sklop svojstvenih «prepreka», koje se razlikuju svojim značajkama i intenzitetom ovisno o vrsti proizvoda, a koji moraju održavati «normalnu» populaciju mikroorganizama u tom proizvodu pod kontrolom. U protivnom, tj. u slučaju prevladavanja tih prepreka, dolazi do kvarenja proizvoda. Tako npr. za usmjeravanje i pravilno vođenje procesa fermentacije u proizvodnji trajnih salama veliki značaj ima dodatak kuhinjske soli koja ima selektivno djelovanje na mikroorganizme. Pojedine bakterije mliječno-kiselog vrenja, kvasci i plijesni podnose i adaptiraju se na otopine soli, za razliku od sporogenih aeroba i anaeroba čija je aktivnost u startu dovoljno potisnuta da bi naknadnom tvorbom kiseline (pod djelovanjem mliječno-kiselih bakterija) bila potpuno inhibirana *(5)*.

### 1.1.1. FERMENTACIJA I ZRENJE TRAJNIH SALAMA

Fermentacija je jedna od metoda konzerviranja mesa tijekom koje dolazi do porasta broja bakterija mliječne kiseline uslijed čega se povećava koncentracija mliječne kiseline koja djeluje bakteriostatski prema bakterijama kvarenja i patogenim bakterijama, a praćena je opadanjem pH vrijednosti, promjenom mirisa i okusa mesa *(2)*. Prema brzini fermentacije trajne salame dijele se na:

- suhe brzofermentirane – s kratkim vremenom sušenja i zrenja uslijed čega se fermentacija odvija kraće pri višim temperaturama što rezultira većom koncentracijom bakterija mliječne kiseline u početnoj fazi fermentacije a gotov proizvod ima kiseliji okus i slabije izraženu aromu, pH vrijednost opada s početnih 5,7 na 4,6 i niže,
- polusuhe sporofermentirane – s dugim vremenom sušenja i zrenja uslijed čega se fermentacija odvija dulje pri nižim temperaturama zbog čega u prvim danima fermentacije prevladavaju koagulaza-negativni stafilokoki, a gotov proizvod ima

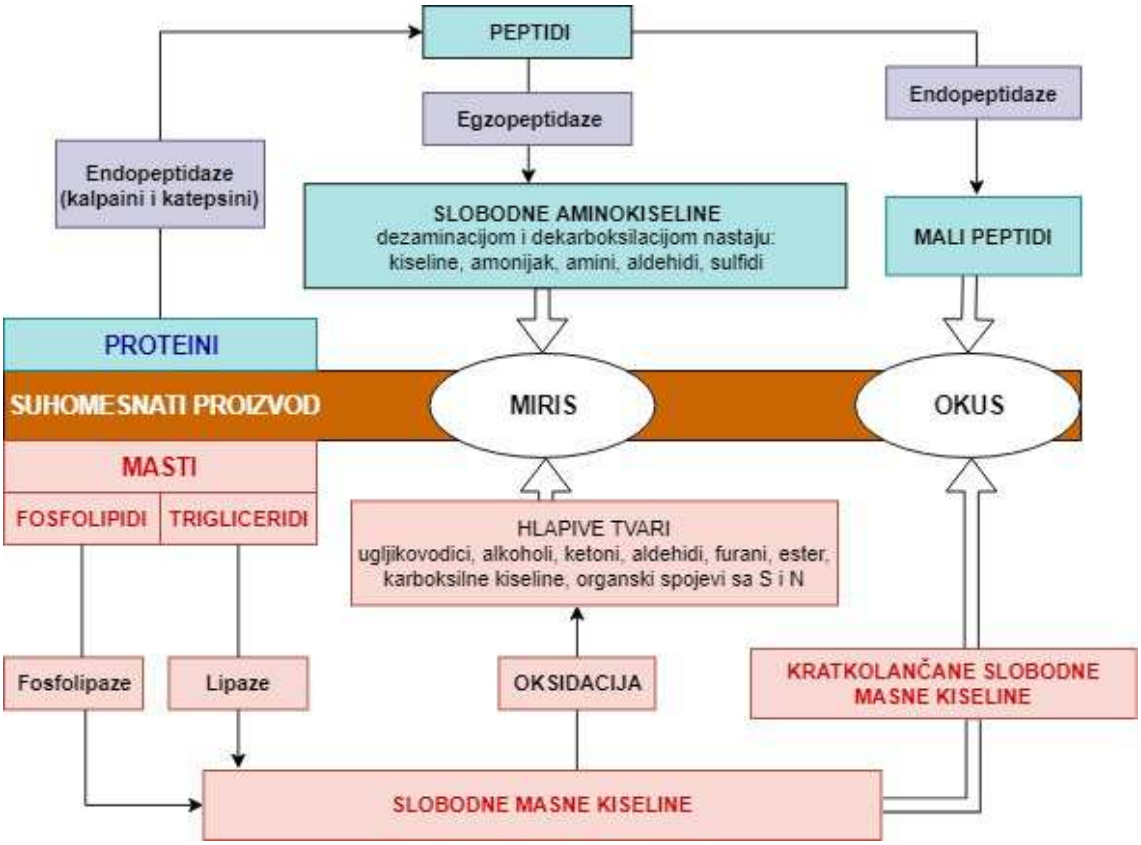
izraženiju specifičnu aromu i manje kiselkast okus, pH vrijednost opada s početnih 5,7 na 5,5 *(2)*.

Ovisno o vrsti proizvoda, tehnologiji proizvodnje, dodacima, temperaturi i relativnoj vlažnosti zraka razlikuje se vrijeme trajanja fermentacije. Fermentacija može trajati od 12 sati do 7 dana i duže, a najintenzivnija je u prvih nekoliko sati kada se temperatura povećava do vrijednosti optimalnih za razvoj bakterija mliječne kiseline. U tradicionalnoj proizvodnji trajnih salama fermentacija se provodi prirodno prisutnom mikroflorom, međutim industrijska proizvodnja okrenula se korištenju starter kultura koje značajno ubrzavaju proces fermentacije i pozitivno djeluju na higijensku sigurnost proizvodnje, proces zrenja, ujednačavanje i poboljšanje kvalitete čime se postiže bolja održivost finalnog proizvoda i veća rentabilnost proizvodnje *(4)*. Najznačajniji mikroorganizmi zastupljeni u komercijalnim starter kulturama za zrenje fermentiranih proizvoda su:

- bakterije iz rodova *Staphylococcus* i *Micrococcus* – one svojom lipolitičkom i proteolitičkom aktivnošću doprinose nastanku specifičnog mirisa i okusa proizvoda te utječu na redukciju nitrata, razgradnju vodikovog peroksida, inhibiciju procesa oksidacije,
- bakterije mliječno-kiselog vrenja iz rodova *Lactobacillus* (*L. sake, L .curvatus, L. plantarum*) i *Pediococcus* – utječu na razvoj i održivost boje i konzistencije, brzinu i sigurnost zrenja te kvalitetu i zdravstvenu ispravnost proizvoda tako da razgrađuju ugljikohidrate do mliječne kiseline, snižavaju pH vrijednost nadjeva,
- bakterija *Streptomyces griseus* – ona se kombinira s *Lactobacillus planatarum* i/ili *Staphylococcus carnosus* čime se postiže pozitivan efekt na razvoj boje i arome proizvoda,
- kvasac *Debaryomyces hansenii* – pospješuje razvitak arome i boje proizvoda,
- plijesan *Penicillium nalgiovense* – doprinosi razvitku specifičnih svojstava fermentiranih proizvoda pokrivenih slojem plemenite plijesni *(4).*

Zrenje je, uz fermentaciju, ključan proces u proizvodnji trajnih salama. Proces zrenja može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci ovisno o vrsti proizvoda. U proizvodnji pršuta faza zrenja može trajati i do dvije godine. Tijekom zrenja dolazi do proteolitičke i lipolitičke aktivnosti enzima mesa i mikroorganizama. Rezultat njihove aktivnosti jest stvaranje specifičnih senzorskih svojstava proizvoda (aroma, boja,

tekstura) te nastajanje spojeva koji imaju konzervirajuće djelovanje (npr. alkoholi, karboksilne kiseline i dr.) (Slika 1).




**Slika 1.** Djelovanje procesa zrenja (proteolize i lipolize) na stvaranje specifičnih mirisa i okusa trajnih mesnih proizvoda *(2)*

Temperatura je tehnološki parametar koji ima najveći utjecaj na proces zrenja te se prema temperaturi korištenoj tijekom procesa zrenja razlikuje:

- sporo zrenje – karakteristično je za tradicionalnu proizvodnju fermentiranih suhih salama, a traje od 2 do 6 ili više mjeseci te se odvija pri temperaturi od 12 do 14 °C,
- brzo zrenje – koristi se u proizvodnji polusuhih salama, a traje nekoliko tjedana te se odvija pri temperaturi od oko 25°C,
- umjereno zrenje – koristi se u proizvodnji suhih i polusuhih salama, a traje od dva tjedna do dva mjeseca te se odvija pri temperaturi od 18 do 24°C *(2)*.

## 1.2 AROMA TRAJNIH SALAMA

Aroma je vrlo važan organoleptički pokazatelj kvalitete proizvoda. Ona se definira kao kombinirana impresija okusa, mirisa i kemijskog osjeta, a očituje se prilikom konzumacije hrane okusnim pupoljcima na jeziku te olfaktornim epitelom u nosu. Aromatične tvari su hlapljivi spojevi mirisa koje detektiraju receptorske stanice za miris u nosnoj šupljini. Hlapljivi spojevi dolaze do receptorskih stanica udisajem kroz nos (ortonazalna detekcija) ili kroz grlo nakon što se otpuste žvakanjem (retronazalna detekcija) *(6)*. Kada molekule hlapljivih spojeva uđu u nosne hodnike, potiču trepetiljke na živčanim stanicama što rezultira slanjem živčanih impulsa kroz njušne pupoljke uzduž njušnog živca u centru za miris u mozgu koji tumači živčane impulse kao poseban miris. Tim procesom ljudi imaju mogućnost raspoznavanja tisuće različitih mirisa. *(7)*.

Aroma trajnih salama posljedica je sinergije velikog broja hlapivih i nehlapivih spojeva, čija prisutnost u odgovarajućim omjerima rezultira karakterističnim okusom i mirisom finalnog proizvoda. Iako sirovo meso ima jako malo mirisa i blagi krvavi okus ono u svom sastavu sadrži veliku količinu nutrijenata koji služe kao prekursori za nastajanje specifične arome. Hlapljivi spojevi u mesnim prerađevinama uglavnom potječu od ugljikohidrata, lipida i proteina. Najvažnije reakcije koje doprinose razvoju arome trajnih kobasica su lipoliza i proteoliza *(2,8)*.

Proteoliza je proces hidrolize mišićnih proteina djelovanjem proteolitičkih enzima te rezultira:

- omekšavanjem strukture mesa uslijed djelovanja enzima endopeptidaza katepsina (B, D, H, L) i kalpaina (I i II) oslobođenih nakon dezintegracije intracelularnih membrana i sarkoleme mišića,
- stvaranjem i nakupljanjem polipeptida koji služe kao supstrati peptidazama u sintezi još manjih peptida,
- intenzivnim stvaranjem slobodnih aminokiselina pod utjecajem enzima egzopeptidaza (aminopeptidaze, dipeptidaze, karboksipeptidaze i tripeptidilpapeptidaze) pri čemu se razvija specifičan okus i miris *(2)*.

Kao produkti reakcije proteolize nastaju kratkolančani peptidi, slobodne aminokiseline te male količine amonijaka i amina (dezaminacijom i dekarboksilacijom slobodnih masnih kiselina). Razgradni produkti proteolize neutraliziraju mliječnu

kiselinu uslijed čega dolazi do povećanja pH vrijednosti. Produljenim vremenom procesa zrenja povećava se koncentracija kratkolančanih peptida i slobodnih aminokiselina čime specifična senzorska svojstva kobasica postaju izraženija *(2)*.

Lipidi mišićnog tkiva imaju važnu ulogu u razvoju kemijskih i senzorskih karakteristika trajnih salama. Uslijed reakcija lipolize i oksidacije dolazi do postepene razgradnje lipida mišićnog tkiva *(9)*. U početnoj fazi reakcija lipolize uzrokuje nastanak slobodnih masnih kiselina razgradnjom triacilglicerola i fosfolipida djelovanjem enzima lipaze i fosfolipaze. Potom slijedi reakcija oksidacije nezasićenih masnih kiselina u kojoj nastaju kratkolančane slobodne masne kiseline koje su važne za formiranje okusa proizvoda *(2)*. Prekomjernom oksidacijom slobodnih masnih kiselina uslijed djelovanja slobodnih radikala nastaju peroksidi, aldehidi i ketoni koji trajnim kobasicama daju specifičan miris užeglosti i žutu boju masnoga tkiva. Tvari koje induciraju nastanak slobodnih radikala su: metali ($Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$), UV-zračenje, zrak, temperatura itd. Stoga je važno da se proces zrenja odvija u zamračenim prostorijama pri temperaturi oko 16°C i da salame nisu u kontaktu s metalnim površinama. Oksidacija se može spriječiti i dodatkom različith antioksidansa poput tokoferola, lecitina, ekstrakta ružmarina i kadulje, estera galne kiseline itd. *(10)*.

Uz reakcije proteolize i lipolize važno je spomenuti i sekundarne biokemijske reakcije slobodnih masnih kiselina i aminokiselina s drugim spojevima. U Maillardovim reakcijama između reducirajućih šećera i aminokiselina nastaju različiti nusprodukti i međuprodukti, među njima je veliki broj hlapljivih spojeva koji sudjeluju u formiranju arome kao i melanoidni pigmenti koji uzrokuju posmeđivanje mesa *(11)*. Tijekom degradacije aminokiselina tzv Streckerove degradacije dolazi do sinteze razgranatih aldehida koji također doprinose razvoju arome *(12)*.

### 1.2.1 HLAPLJIVI SPOJEVI AROME

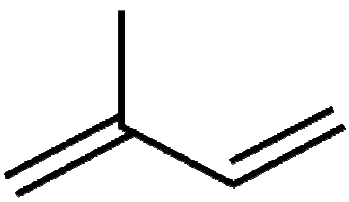
Aroma je izuzetno važna za prihvatljivost mesnih proizvoda. Sastav i kvantiteta hlapivih spojeva ovisi o vrsti mesa, dodanim začinima, korištenom procesu proizvodnje, dužini procesa zrenja i drugim čimbenicima. Tijekom proizvodnje trajnih salama odvijaju se brojne enzimske i neenzimske reakcije poput razgradnje proteina, razgradnje i oksidacije lipida, Maillardove reakcije, Streckerove degradacije. Sve te reakcije dovode do povećanja koncentracije hlapivih komponenata – aldehida, ketona, alifatskih

ugljikovodika, alkohola, estera, alkana, alkena, sumpornih i dušičnih spojeva, aromatskih i cikličkih ugljikovodika i ostalih komponenata koje utječu na samu aromu proizvoda *(13)*. Interakcijom različitih hlapljivih spojeva nastaje konačna specifična aroma trajnih salama.

Oksidativnom razgradnjom nezasićenih masnih kiseina, nastalih u reakciji lipolize, formiraju se linearni aldehidi poput heksanala, heptanala, oktanala i nonanala. Razgranati aldehidi nastaju tijekom degradacije aminokiselina tzv. Streckerove degradacije u kojoj dolazi do oksidativne deaminacijske dekarboksilacije α-aminokiselina uz sudjelovanje α-dikarbonilnih spojeva nastalih u Maillardovoj reakciji *(12)*. Razgradnjom aminokiseline valina, izoleucina, leucina nastaju 2-metil propanal, 2-metil butanal i 3 metil-butanal *(2)*. Uloga zasićenih aldehida je pojačavanje mirisa, dok nezasićeni aldehidi (2-enali i 2,4-dienali) utječu na okus i daju sladak, voćni miris. Aldehidi imaju nizak prag „mirisne detekcije“ te značajno doprinose specifičnoj aromi finalnog proizvoda *(8)*.

Alkoholi uglavnom nastaju kao produkti reakcija oksidacije lipida, a djelomičnu ulogu u njihovoj sintezi ima i mikrobiološka aktivnost. Primarni linearni alkoholi daju arome trave ili drva, a sekundarni alkoholi (1-penten-3-ol, 1-okten-3-ol) daju proizvodima jak miris trave i gljiva. Utjecaj alkohola na aromu manji je nego kod aldehida zbog veće vrijednosti praga „mirisne detekcije“ *(14)*.

Aromatični začini poput lavande, ružmarina, muškatnog oraščića, timijana, papra i mnogih drugih dodanih u primjesu tijekom procesa proizvodnje mogu rezultirati prisustvom terpena. Terpeni su hlapljive tvari koje daju biljkama karakterističan miris a njihovu osnovnu strukturu izgrađuje 2-metil-1,3-butadienska jedinica koja se često naziva izoprenska jedinica (Slika 2) *(6)*. Također, prisustvo limonena i drugih terpena uobičajeno je u trajnim fermentiranim proizvodima jer su oni uobičajeni konstituenti neosaponificirajućih frakcija biljne masti što znači da dolaze ishranom i akumuliraju se u tijelu životinje *(15)*.



**Slika 2.** Izoprenska jedinica(2-metil-but-1,3-dien) *(16)*

Esterifikacijom karboksilnih kiselina i alkohola nastaju esteri. Esteri kratkolančanih kiselina nositelji su voćnih aroma, dok oni nastali iz dugolančanih kiselina imaju blagi masni miris *(17)*.

Sumporovi spojevi imaju jak miris, a nastaju degradacijom aminokiselina koje sadrže sumpor poput metionina, cisteina i cistina iz kojih se sintetiziraju dimetil-sulfidi i tiol *(2,14)*. Dodatak češnjaka kao začina također može doprinijeti većoj koncentraciji sumponih spojeva zbog prisutnosti aliina (derivat aminokiseline cisteina). Kada se češnjak izreže ili zdrobi dolazi do aktivacije enzima aliinaze koji potiče proizvodnju alicina čija je struktura nestabilna te se razgrađuje kroz nekoliko putova a nastali spojevi odgovorni su za njegovu aromu *(18)*.

## 1.3. ISTARSKI MAGARAC

Magarci su sisavci koji se svrstavaju u red kopitara zajedno s konjima, mazgama i mulama *(19)*. Oni su od davnina poznati kao radne životinje zbog svoje izdržljivosti, otpornosti i snage. Napretkom tehnologije njihova osnovna funkcija – prijenos tereta je potisnuta. Danas se magarci uzgajaju zbog proizvodnje mlijeka i korištenja mesa u ljudskoj prehrani.

Magarci su u Republici Hrvatskoj razdijeljeni u tri skupine izvornih i zaštićenih pasmina temeljem fenotipskih i genotipskih svojstava, geografske pozicioniranosti i povijesti nastanka, a to su: Istarski magarac, Sjeverno-jadranski magarac, Primorsko-dinarski magarac *(20)*.

Istarski magarac se uzgaja u centralnom, južnom i zapadnom dijelu poluotoka Istre a može se pronaći i na području Kvarnera. Prema podacima Hrvatske poljoprivredne agencije (HPA, 2017) brojnost populacije je 548 jedinki što je porast u odnosu na podatke Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (MPRRR, 2010) prema kojima je populacija istarskog magarca procijenjena na 200 jedinki zbog čega je uvršten u kritično ugrožene pasmine *(20,21)*. U skladu s potrebama tržišta, ali i s uviđajnim povećanjem populacije, Agencija za ruralni razvoj Istre (AZRRI) aktivno provodi programe zaštite istarskog magarca kroz multidisciplinarnu gastronomsku valorizaciju i promociju mesa Istarskog magarca *(22)*.

Istarskog magarca (Slika 3) karakterizira čvrsta konstitucija i veliki kvadratičan tjelesni okvir po kojem je u odnosu na ostale dvije hrvatske autohtone pasmine najveći.

Boja trupa je većinom crna, rijetko tamno smeđa. Trbuh kao i unutarnja strana bedara mogu biti sive do bijele boje. Križ i zebrice nisu uočljive. Griva je crna, izražena i stršeća, a rijetko pada na stranu. Glava je velika, nezgrapna, ravnog do blago konkavnog profila s dugim ušima koje imaju bijele dlake u unutrašnjosti. Očale su bijele i dobro izražene. Gubica je bijela s crnom regijom nozdrva. Rep je nisko nasađen s čupom dugih dlaka na završetku. Noge su čvrste s jakim kostima. Kopito je srednje veličine, tvrdo s rijetkim deformacijama *(21)*.



**Slika 3.** Istarski magarac *(23)*

Meso magarca slatkastog je okusa zbog visoke koncentracije mišićnog glikogena i glukoze. Količina mioglobina, a samim time i željeza, daje mesu tamno crvenu boju. Meso je čvrsto, konzistentno i laganog mirisa a cijeni se zbog uravnoteženog sadržaja proteina (21g/100g mesa). Udio masnoća vrlo je nizak (2,7g/100g mesa) zbog čega se u proizvodnji trajnih salama meso magarca kombinira sa svinjskim mesom i masnim tkivom svinja. Najveći dio masnoća u magarećem mesu opada na nezasićene masne kiseline, posebice linoleinsku kiselinu *(24)*.

U sklopu programa Agencije za ruralni razvoj Istre dio magarećeg mesa distribuira se ugostiteljima iz Istre dok se drugi dio sirovine prerađuje u trajnu salamu od magarećeg mesa i crnog vina te u kobasice od miješanog magarećeg i svinjskog mesa. Kvaliteta mesa Istarskog magarca proizlazi iz jedinstvene prehrane na istarskim pašnjacima, uz veliku raznolikost biljne mase koju magarci konzumiraju. Osebujnost okusa i istaknuta mesna aroma odlična je podloga za stvaranje novih vrijednosti kroz proizvode od mesa Istarskog magarca, kao dio obaveze očuvanja domaćih okusa i

mirisa svojstvenih Istri *(25)*. Ekskluzivnost i vrhunske nutritivne vrijednosti mesa osiguravaju mu mjesto uz sam vrh ponude najboljih mesa na tržištu *(22)*.

## 1.4. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE TRAJNE SALAME OD MAGAREĆEG MESA

Magareća salama je prema Pravilniku o mesnim proizvodima N.N. 62/2018 (članak 30.) trajna kobasica s minimalnim masenim udjelom proteina od 16% i maksimalnim udjelom vode od 40% *(26)*.

Za proizvodnju salame od magarećeg mesa koristi se meso Istarskog magarca i to rezovi s buta, rebara, prsiju i vrata. Zbog krtosti odnosno niskog udjela masnoće u magarećem mesu neizostavno je korištenje svinjskog mesa, plećke i čvrstog masnog tkiva mesu. U primjesu se dodaje istarski teran, te začinske smjese koje uključuju sol, papar, ružmarin, domaći istarski češnjak, muškatni oraščić, cvijet muškatnog oraščića, piment, karadamom i korijander *(25)*.

Prije početka proizvodnog procesa nabavlja se isključivo svježe svinjsko meso koje se rasijeca i zamrzava. Priprema proizvodnje magareće salame započinje prilikom rasijecanja kada se anatomski rezovi posebno pripremaju, stavljaju na zrenje i skladište. Pripremljeno meso usitnjava se u dvije frakcije, promjera 4mm i 8mm te se zajedno s začinima miješa u miješalici. Potom slijedi punjenje u prirodne ovitke promjera 50-55 mm. Salame se potom vješaju na kolica i cijede nekoliko sati. Kolica, s još uvijek svježim pripravcima, se umeću u komoru za hladno dimljenje koje se provodi 30 minuta s bukovom piljevinom. Po završetku hladnog dimljenja slijedi prva faza fermentacije u komorama pri temperaturama i preko 20°C te relativnom važnosti od 90%. U ovoj fazi na salame se finim prskanjem nanosi otopina koja sadrži plemenite plijesni koje se nakon otprilike 15 dana ručno četkaju s proizvoda. U sljedećim danima temperatura i relativna vlažnost kontrolirano se spuštaju do 15°C odnosno 80% vlage kada se proizvodi sele u komoru za drugu fazu fermentacije gdje ostaju ostavljeni u kontroliranoj atmosferi komora da se suše 45-50 dana. Završetak zrenja proizvoda nije definiran unaprijed već se kontinuiranim kušanjem tijekom svih faza fermentacije utvrđuje najbolje vrijeme za „skidanje“ proizvoda. Nakon završetka procesa zrenja slijedi ručno pakiranje i deklariranje gotovih proizvoda te distribucija sukladno potrebama tržišta *(25)*.

## 1.5. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA MESA

Važan čimbenik u formiranju arome trajnih salama su hlapljivi spojevi koji imaju značajan utjecaj na cjelokupnu kvalitetu finalnog proizvoda. Kvaliteta i komercijalan uspjeh trajnih salama uveliko ovise o aromi koja je često odlučujući faktor prilikom izbora potrošača *(27).*

Klasične metode izolacije hlapljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima. Klasične metode izolacije imaju brojne nedostatke s obzirom na to da su vrlo skupe, dugotrajne i najčešće uzrokuju degradaciju uzorka. Stoga je danas sve češća primjena novih modernijih metoda koje pokazuju brojne prednosti pred klasičnim metodama izolacije npr. ultrazvučna ekstrakcija, mikroekstrakcija na krutoj fazi, mikrovalna ekstrakcija, mikrovalovima potpomognuta destilacija *(28).*

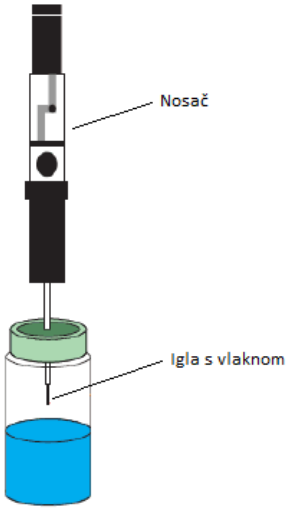
### 1.5.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcije (engl. ultrasound assisted extraction,USE) koristi energiju ultrazvuka koja se širi putem valova pri čemu uzrokuje vibracije molekula medija i prijenos mehaničke energije titranja valova na medij. Komponente se izdvajaju na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima. Vrijeme potrebno za odvajanje željene komponente ovisi o viskoznosti i volumnom protoku otapala, topljivosti komponente u toj otopini, temperaturi ekstrakcije te o površini namirnice izloženoj otapalu. Prednost ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na klasične metode izolacije je smanjeno vrijeme ekstrakcije i poboljšani ekstrakcijski prinos *(29,30).*

### 1.5.2. MIKROEKSTRAKCIJANA KRUTOJ FAZI

Mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. solid phase microextraction, SPME) vrlo je jednostavna i djelotvorna metoda koja ne koristi otapalo te se uspješno primjenjuje na veliki broj hlapljivih spojeva. Obično se SPME koristi u kombinaciji sa spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. gas chromatography–mass spectrometry,GC-MS). Velika prednost SPME metode je pojednostavljen postupak izolacije. Za razliku od uobičajene ekstrakcije tekuće-tekuće koja se sastoji od više koraka, kao što su ekstrakcija, koncentriranje i prijenos do plinskog kromatografa, kod

SPME metode sve je integrirano u jedan korak *(31)*. Aparatura za SPME vrlo je jednostavna, izgleda kao modificirana šprica. Sastoji se od nosača, igle i SPME vlakna (Slika 4). SPME vlakno je tanko optičko vlakno, obavijeno tankim polimernim filmom (npr. polidimetilsiloksan, PDMS) koji apsorbira i koncentrira organske spojeve. Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije, polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna vlakna za nepolarne spojeve. Prije upotrebe vlakno je potrebno kondicionirati, stavljajući ga 0,5-4 h na visoku temperaturu *(32)*.




**Slika 4.** Mikroekstrakcija na krutoj fazi *(33)*

### 1.5.3. DESTILACIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Destilacija potpomognuta mikrovalovima (engl. microwave-assisted distillation, MAD) je metoda koja kombinira mikrovalno zagrijavanje i suhu destilaciju pri atmosferskom tlaku bez korištenja otapala ili vode. Izolacija i koncentriranje hlapljivih spojeva provode se simultano. Zbog toga što voda u uzorku apsorbira mikrovalno zračenje, raspadanje stanica je potaknuto unutarnjim pregrijavanjem što olakšava desorpciju hlapljivih komponenata. Glavne prednosti korištenja destilacije potpomognute mikrovalovima su znatno kraće vrijeme destilacije bez upotrebe organskog otapala. Nedostatak ove metode je primjena povišene temperature koja može negativno utjecati na biološki aktivne spojeve *(34)*.

## 1.6. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

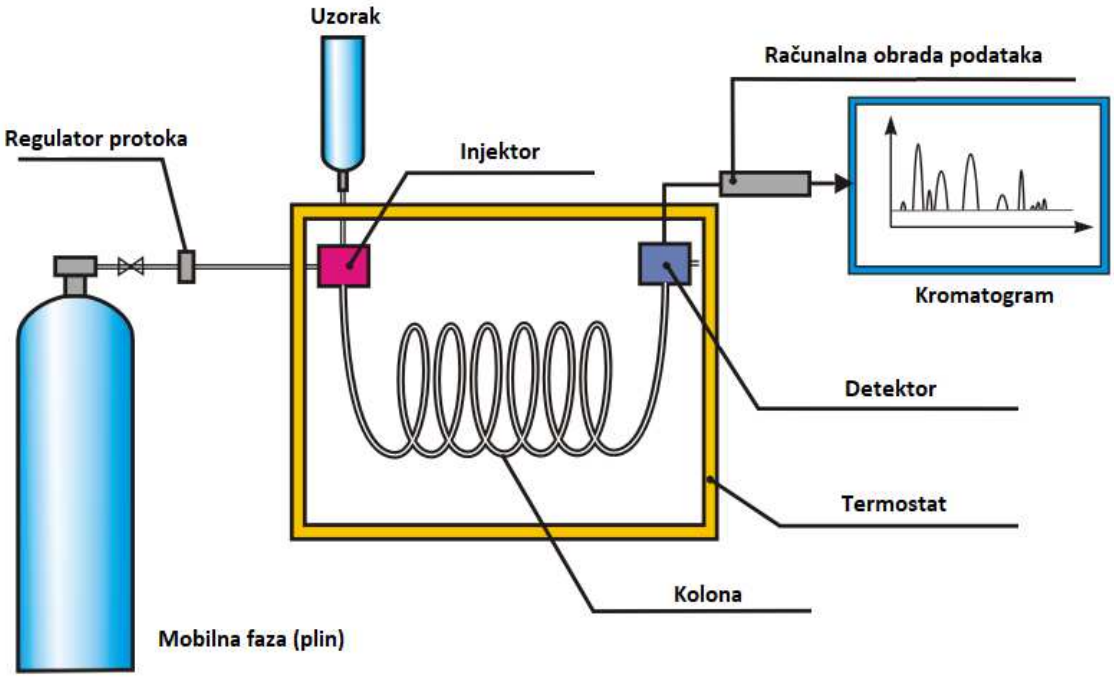
Prilikom analize i identifikacije hlapljivih spojeva mogu se koristiti kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spktrometrijske tehnike. Danas je najčešća upotreba kromatografije i to individualno ili u sprezi sa spektrometrijom masa.

### 1.6.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja smjese koja se zasniva na različitoj raspodjeli tvari između stacionarne i mobilne faze. Ovisno o vrsti korištene mobilne faze razlikuju se tekućinska i plinska kromatografija. Plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography, GC) ne zahtjeva nikakve prethodne operacije stoga predstavlja vrlo brzu tehniku odjeljivanja. Plinski kromatograf sastoji se od injekcijskog bloka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom, termostata, detektora i računala (Slika 5) *(35,36).*

Uzorci koji se analiziraju plinskom kromatografijom moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja. Stacionarna faza najčešće je tekućina vezana za stjenke kapilare ili nanešena na kruti adsorbens. Mobilna faza je inertni plin ($N_2$, Ar, He) koji ne stupa u reakciju sa sastojcima smjese *(36).*

Mala količina uzorka unosi se u injektor smješten na vrhu kolone. Injektor je zagrijani dio uređaja u kojemu temperatura mora biti iznad temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente. Iz tog razloga uzorak tijekom unošenja u kolonu brzo i potpuno ispari. Inertni plin potom prenosi pare uzorka kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom na kojoj se vrši odjeljivanje sastojaka smjese. Detektor utvrđuje prisutnost odijeljenih komponenata smjese u plinu nositelju po izlasku iz kolone. U plinskoj kromatografiji najčešća je upotreba plamenoionizacijskih detektora, detektora toplinske vodljivosti i detektora apsorpcije elektrona *(37).*




**Slika 5.** Shematski prikaz plinskog kromatografa *(38)*

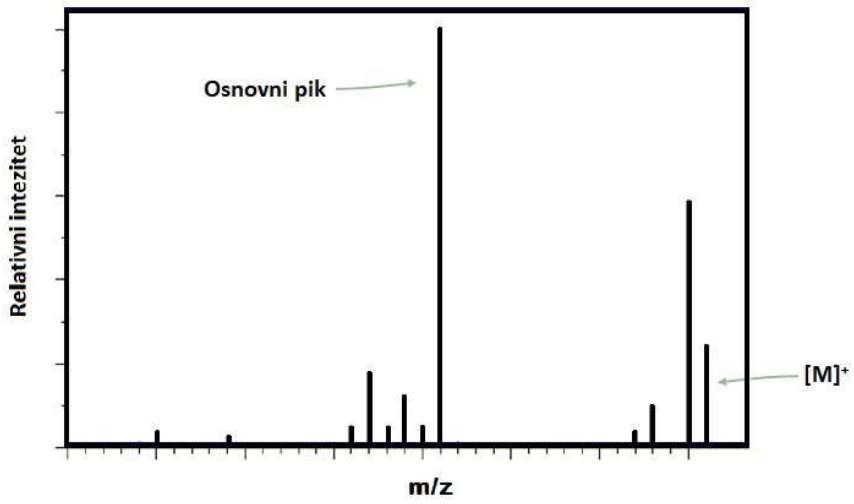
### 1.6.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. Mass spectrometry, MS) je metoda koja se zasniva na ionizaciji plinovitog uzorka, njegovoj fragmentaciji, razdvajanju fragmenata s obzirom na omjer njihove mase i naboja te obradi pojedinih podataka dobivenih u obliku masenih spektara. Glavni dijelovi svakog masenog spektrometra su ionizator, analizator i detektor. U ionizator se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju koji se tijekom elektronske ionizacije bombardira elektronima energije (50-70eV) pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivan ion $M^+$ (molekulski ion) koji se fragmentira:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

$$M^+ \rightarrow M_1^+ + M_2^+ + M_3^+ .....$$

Na taj način nastaju razni fragmenti, a analizom je moguće utvrditi kemijsku strukturu spoja i molekulsku masu. Dobiveni ioni okarakterizirani su veličinom m/z (omjer mase i naboja fragmenta) i intenzitetom. Osjetljivi dio analizatora ione registrira kao električni signal. Signal elektronskim sustavom biva zabilježen u memoriji računala. Kao rezultat analize dobije se spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera mase te naboja (*m*/*z*) nastalih fragmenata (Slika 6) *(36,39)*.

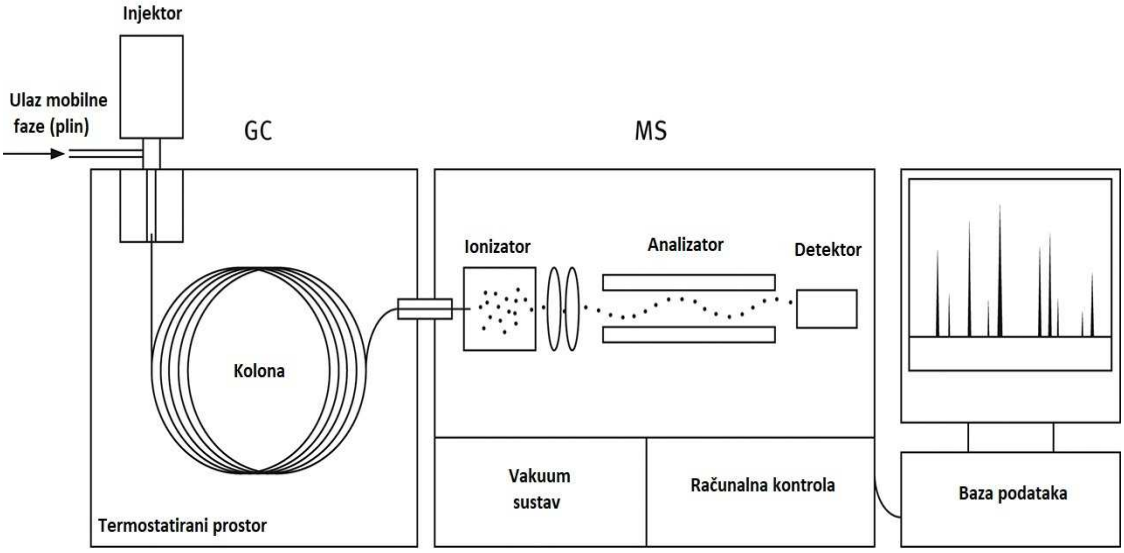



**Slika 6.** Spektar masa *(40)*

### 1.6.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA

Kombinacija tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija je izvrsna tehnika za separaciju i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje te se zato koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom koja anulira taj nedostatak. Kombinacijom dviju metoda postiže se visoka osjetljivost (reda veličine $10^{-12}$ - $10^{-15}$ g) te omogućava analiza smjese s velikim brojem komponenata relativno velikom brzinom. Četveropolni analizator masa omogućava snimanje spektra u nekoliko milisekundi. Iako je GC-MS tehnika vrlo osjetljiva poteškoće u analizi može izazvati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama *(36)*.

Komponente smjese odjeljuju se u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa i kao takve odlaze plinom nositeljem u detektor (spektrometar masa). Dobiveni spektar masa uspoređuje se s računalnom bazom spektra masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj (Slika 7). Međutim, GC-MS metoda daje još jedan važan podatak za identifikaciju spoja, a to je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni odnosno retencijsko vrijeme.




**Slika 7.**Shematski prikaz spregnute tehnike GC-MS *(41)*

# 2. EKSPERIMENTALNI DIO

## 2.1. TRAJNA SALAMA OD MESA ISTARSKOG MAGARCA

Revitalizacijom autohtonih pasmina Istre i kombiniranjem tradicionalnih istarskih okusa i začina s onim suvremenim, Agencija za ruralni razvoj Istre stvorila je brend Istrijana koji ujedinjuje tradicionalne i moderne vrijednosti *(25)*.

Trajna salama od mesa magarca s istarskim crnim vinom (Slika 8) proizvodi se rasijecanjem i miješanjem 50% mesa istarskog magarca i 50% svinjskog mesa uz dodatak istarskog crnog vina sorte teran te istarskog začinskog bilja i drugih začina.




**Slika 8.** Trajna salama od mesa istarskog magarca s istarskim crnim vinom *(43)*

Primjesa se puni u prirodne ovitke promjera 50-55 mm koji se ostavljaju u kontroliranoj atmosferi komora 45 do 50 dana. U komorama se potom odvijaju procesi fermentacije, sušenja i zrenja. Plemenita plijesan koja se upotrebljava u proizvodnji doprinosi intenzivnom okusu, a začinima se postiže snažan i aromatičan miris *(25)*. Korištenjem 185g mesa dobije se 100g gotovog proizvoda, a prosječna hranjiva vrijednost izražena za 100 g proizvoda prikazana je u tablici 1.

**Tablica 1.** Prosječna hranjiva vrijednost izražena za 100g proizvoda

| | |
|---|---|
| Energetska vrijednost | 1830 kJ/437 kcal |
| Masti | 34,1 g |
| od toga zasićene masne kiseline | 14,4 g |
| Ugljikohidrati | < 0,5 g |
| od toga šećeri | < 0,2 g |
| Bjelančevine | 32,6 g |
| Sol | 3,8 g |

## 2.2. PRIPREMA UZORKA

U ovom radu korištena je jedna trajna salama od mesa istarskog magarca uzorkovana u prosincu 2018-te godine. Uzorak je obrađen na način da je usitnjen i podijeljen na dva dijela (po 1 g) a ostatak salame je zamrznut i čuvan u zamrzivaču. Hlapljivi spojevi izolirani su mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi koristeći dva različita vlakna i to plavo vlakno te sivo vlakno. U veljači 2019-te godine ostatak uzorka je odmrznut i odvagana je masa od 50 grama koja je potom također usitnjena te podvrgnuta izolaciji hlapljivih spojeva koristeći metodu destilacije potpomognute mikrovalovima.

## 2.3. KEMIKALIJE I APARATURA

Kemikalije:

- Pentan, Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- Bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska,

Aparatura:

- Tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka,
- Vodena kupelj s termostatom, Heidolph EKT 3001, Njemačka,
- Držač za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi, Supelco Co., SAD,
- Vlakna različite polarnosti:

    - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD),
    - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD),
- Uređaj za destilaciju potpomognutu mikrovalovima, MA196-001 Ethos X; Milestone,
- Uređaj za uparavanje strujom dušika, Dri-Block DB100/3, Techne,
- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS):
    - GC 7820A, Agilent Technologies, SAD
    - MSD 5977E, Agilent Technologies, SAD
    - GC kapilarna kolona HP-5MS, J&W, SAD

Stacionarna faza: 5% difenil-95% dimetilpolisilksan

## 2.4. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

### 2.4.1. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Za izolaciju hlapljivih spojeva iz uzorka trajne magareće salame korišteno je plavo vlakno i sivo vlakno.

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, SPME igla se postavlja u injektor plinskog kromatografa te se vlakna aktiviraju kondicioniranjem 60 min na 300°C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Jedan gram uzorka stavi se u staklenu posudu od 15 mL koja se potom hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C) s termostatom. Na Slici 9 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

Po završetku kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla se postavi u posudu, a vlakno provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 $^{o}$C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za SPME.



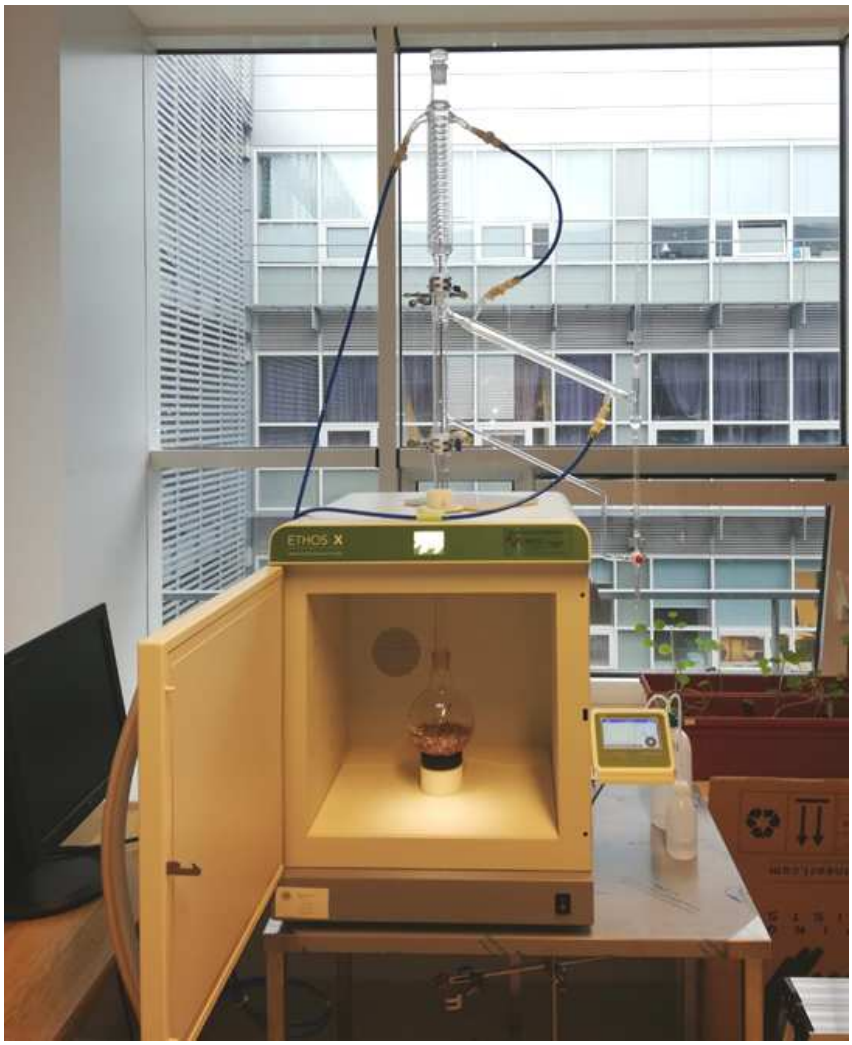

**Slika 9.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

### 2.4.2. DESTILACIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju sastoji se od dva dijela čime su omogućene dvije vrste izolacije uzorka: destilacija potpomognuta mikrovalovima i mikrovalna ekstrakcija. Gornji dio aparature omogućava izolaciju hlapljivih spojeva destilacijom potpomognutom mikrovalovima (Slika 10) koja je korištena za obradu uzorka trajne salame od istarskog magarca.

Pedeset grama usitnjenog uzorka stavi se u staklenu posudu koja se zatvori poklopcem te se na nju poveže sustav za refluks i hladilo. U desnu vertikalnu cijev se napuni voda koja služi kao medij u kojem će se prikupiti hlapljivi spojevi. Prikupljeni hlapljivi spojevi se po završetku destilacije odvajaju pomoću male količine pentana. Uvjeti pri kojim se izvodi destilacija su snaga od 500W i temperatura 98 °C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije, sloj pentana i hlapljivih spojeva se odvoji propipetom i prebaci u čistu čašu, a ostatak vode ispusti preko pipca. Sadržaj čaše se

posuši s bezvodnim natrijevim sulfatom, u slučaju da ima zaostale vode, zatim se izolat prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Dio organskog otapala zaostalog u uzorku se uklanja uparivačem u struji dušika nakon čega ide na GC-MS analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču.




**Slika 10.**Aparatura za destilaciju potpomognutu mikrovalovima

## 2.5. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM (GC-MS)

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju izoliranih hlapljivih spojeva korišten je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (Slika 11).

Uzorci su analizirani na nepolarnoj kapilarnoj koloni HP-5MS (30 m x 0,25 mm) sa slojem stacionarne faze ((5% fenil)-metilpolisiloksan)) debljine 0,20 µm. Plin nositelj je helij, dok je protok postavljen na 1 mL/min. Zadana temperatura injektora je 250°C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1µL. Temperatura kolone je programirana na sljedeći način: 2 minute na 70$^{o}$C, a zatim se zagrijava do 200 °C brzinom od 3$^{o}$C po minuti. Vrijeme u kojem se ne snima spektar, jer u tom vremenu izlazi otapalo, iznosi 3 minute.



**Slika 11.**Spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Spektometar masa korišten je kao detektor. Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura detektora iona je postavljena na 280°C, dok interval snimanja obuhvaća 30-300 masenih jedinica. Uzorak je dodan odjednom te zbog povišene temperature trenutno ispari. Reproducibilnost je osigurana kada su uspostavljeni stacionarni uvjeti, stabilizirani protoci i temperatura.

Za svaki analizirani uzorak kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,

- vrijeme zadržavanja pojedine komponente koja je na kromatogramu predstavljena pikom,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini),
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na $C_8$-$C_{30}$*n*-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature, kao i uspoređujući njihove spektre masa sa spektrima iz biblioteka masenih spektara *Wiley 09* i *NIST14* (eng. National Institute of Standardsand Technology). Postoci identificiranih komponenti iz uzoraka magareće salame izračunati su iz površine GC pikova.

# 3.REZULTATI

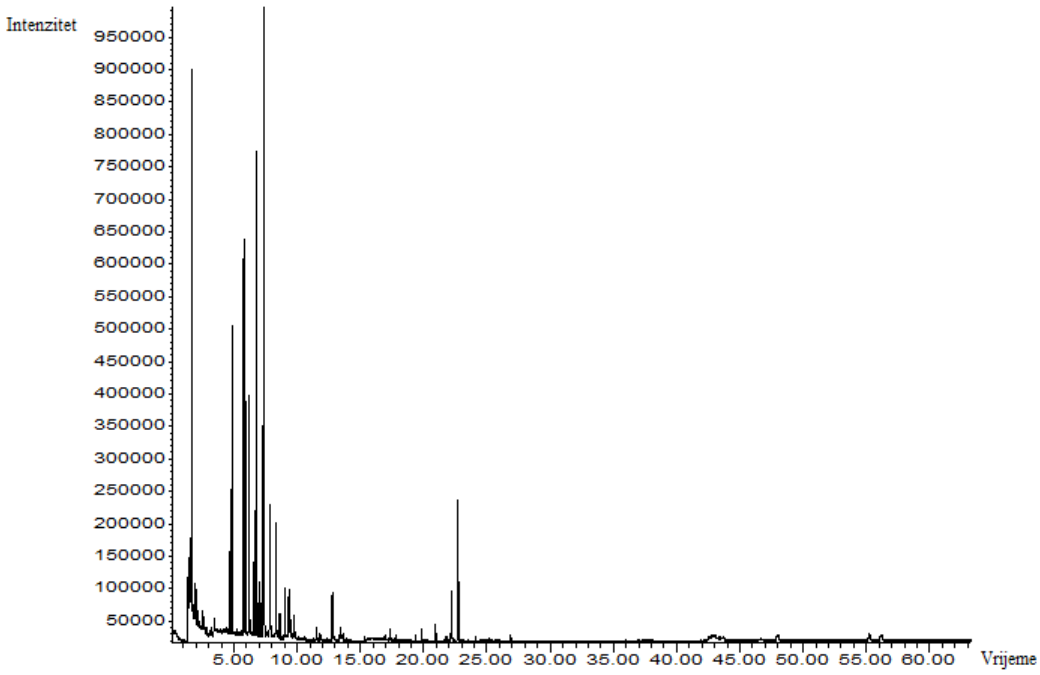
Hlapljivi spojevi salame od mesa istarskog magarca analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na koloni HP-5MS. Rezultati dobiveni analizom prikazani su tablično te u obliku kromatograma.

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izolirani pomoću plavog vlakna

| **Redni broj** | **RI[1]** | **Spoj** | **Udio(%)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | <900 | etanol | 1,3 |
| **2.** | <900 | butan-2-ol | 8,9 |
| **3.** | <900 | dialil-sulfid | 0,4 |
| **4.** | 933 | tujen | 1,6 |
| **5.** | 942 | $\alpha$-pinen | 6,2 |
| **6.** | 981 | sabinen | 8,7 |
| **7.** | 976 | $\beta$-pinen | 6,9 |
| **8.** | 994 | $\beta$-mircen | 5,0 |
| **9.** | 1010 | $\alpha$-felandren | 3,1 |
| **10.** | 1017 | $\delta$-3-karen | 12,3 |
| **11.** | 1021 | $\alpha$-terpinen | 1,3 |
| **12.** | 1031 | *p*-cimen | 1,8 |
| **13.** | 1035 | limonen | 18,3 |
| **14.** | 1065 | $\gamma$-terpinen | 3,2 |
| **15.** | 1082 | dialil-disulfid | 1,5 |
| **16.** | 1092 | $\alpha$-terpinolen | 1,1 |
| **17.** | 1181 | terpinen-4-ol | 1,8 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **18.** | 1195 | 2-metoksi-4-metilfenol | 0,6 |
| **19.** | 1406 | metil-eugenol | 1,9 |
| **20.** | 1422 | *trans-β*-kariofilen | 5,2 |
| ***Ukupno identificirano (%)*** | | | ***91,1*** |

[1] Retencijski indeks na koloni HP-5MS



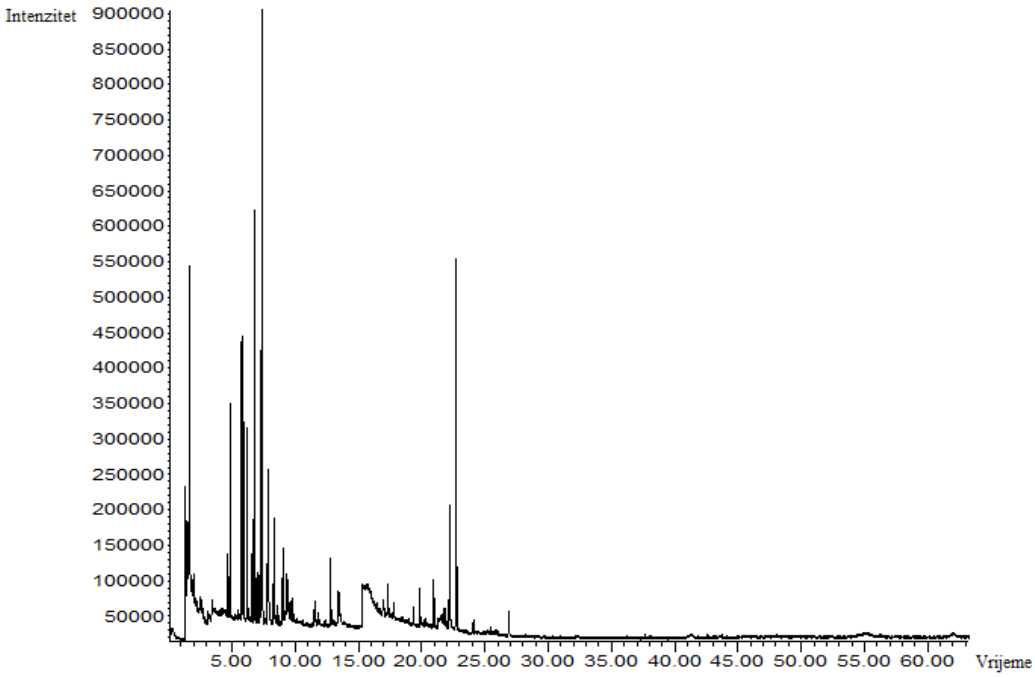

**Slika 12.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izoliran HS-SPME, pomoću plavog vlakna

**Tablica 3**. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izolirani pomoću sivog vlakna

| **Redni broj** | **RI[1]** | **Spoj** | **Udio(%)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | <900 | etanol | 1,9 |
| **2.** | <900 | butan-2-ol | 8,5 |
| **3.** | <900 | dialil-sulfid | 0,6 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **4.** | 933 | tujen | 1,4 |
| **5.** | 942 | $\alpha$-pinen | 4,5 |
| **6.** | 981 | sabinen | 5,9 |
| **7.** | 976 | $\beta$-pinen | 5,0 |
| **8.** | 994 | $\beta$-mircen | 4,4 |
| **9.** | 1010 | $\alpha$-felandren | 2,6 |
| **10.** | 1017 | $\delta$-3-karen | 9,8 |
| **11.** | 1021 | $\alpha$-terpinen | 1,2 |
| **12.** | 1031 | *p*-cimen | 1,8 |
| **13.** | 1035 | limonen | 16,9 |
| **14.** | 1048 | fenilacetaldehid | 5,2 |
| **15.** | 1065 | $\gamma$-terpinen | 2,5 |
| **16.** | 1082 | dialil-disulfid | 1,8 |
| **17.** | 1092 | $\alpha$-terpinolen | 0,9 |
| **18.** | 1181 | terpinen-4-ol | 2,3 |
| **19.** | 1195 | 2-etil-5-metilfenol | 0,2 |
| **20.** | 1379 | $\alpha$-kopaen | 1,6 |
| **21.** | 1406 | metil-eugenol | 3,7 |
| **22.** | 1422 | *trans*-$\beta$-kariofilen | 11,8 |
| ***Ukupno identificirano (%)*** | | | ***94,5*** |

[1] Retencijski indeks na koloni HP-5MS




**Slika 13**. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izoliran HS-SPME, pomoću sivog vlakna

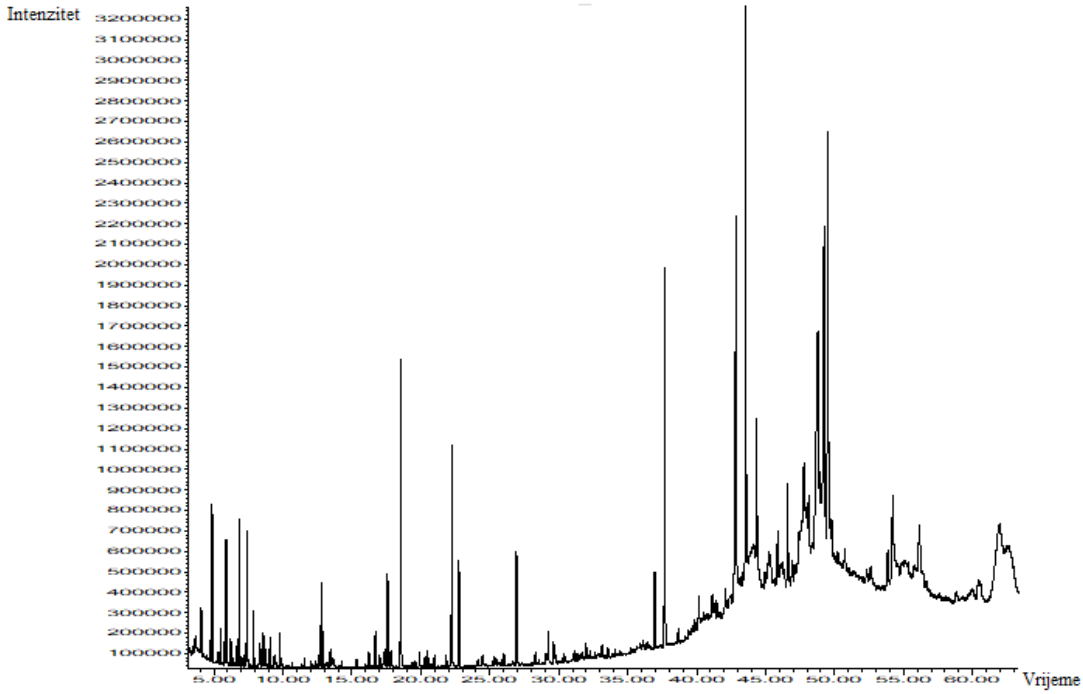
**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izolirani pomoću destilacije potpomognute mikrovalovima

| **Redni broj** | **RI[1]** | **Spoj** | **Udio(%)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | 942 | $\alpha$-pinen | 1,6 |
| **2.** | 964 | benzaldehid | 0,4 |
| **3.** | 981 | sabinen | 1,3 |
| **4.** | 976 | $\beta$-pinen | 1,3 |
| **5.** | 994 | $\beta$-mircen | 0,3 |
| **6.** | 1010 | $\alpha$-felandren | 2,6 |
| **7.** | 1017 | $\delta$-3-karen | 1,6 |
| **8.** | 1031 | *p*-cimen | 0,2 |
| **9.** | 1035 | limonen | 1,5 |
| **10.** | 1048 | fenilacetaldehid | 0,8 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **11.** | 1065 | *γ*-terpinen | 0,4 |
| **12.** | 1071 | *trans*-sabinen hidrat | 0,4 |
| **13.** | 1181 | terpinen-4-ol | 1,7 |
| **14.** | 1318 | deka-2,4-dienal | 5,3 |
| **15.** | 1406 | metil-eugenol | 2,9 |
| **16.** | 1422 | *trans-β*-kariofilen | 1,2 |
| **17.** | 1523 | 4-metoksi-6-(2-propenil)-1,3-benzodioksol | 1,6 |
| **18.** | 1582 | kariofilen-oksid | 0,4 |
| **19.** | 1592 | verdiflorol | 0,3 |
| **20.** | 1827 | izopropil-tetradekanoat | 5,4 |
| **21.** | 1883 | heksadekanol | 0,5 |
| **22.** | 1928 | metil-heksadekanoat | 0,8 |
| **23.** | 1963 | heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina) | 8,1 |
| **24.** | 1992 | etil-heksadekanoat (etil-palmitat) | 8,5 |
| **25.** | 2000 | eikosan | 0,1 |
| **26.** | 2059 | *(Z)*-oktadec-9-en-1-ol | 0,8 |
| **27.** | 2089 | oktadekan-1-ol | 1,9 |
| **28.** | 2100 | heneikosan | 0,6 |
| **29.** | 2113 | benzil-cinamat | 0,3 |
| **30.** | 2123 | metil-stearat | 6,6 |
| **31.** | 2147 | *(Z)*-oktadec-9-enska kiselina | 10,1 |
| **32.** | 2160 | etil-linolat | 9,1 |
| **33.** | 2165 | oktadekanska kiselina | 7,9 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **34.** | 2181 | oleinska kiselina | 3,0 |
| **35.** | 2193 | etil-stearat | 1,5 |
| **36.** | 2200 | dokosan | 0,5 |
| ***Ukupno identificirano (%)*** | | | ***91,5*** |

[1] Retencijski indeks na koloni HP-5MS




**Slika 14**. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca izoliran destilacijom potpomognutom mikrovalovima

# 4.RASPRAVA

Proizvodnja trajne salame od mesa istarskog magarca obuhvaća mnoge biokemijske i kemijske procese koji, ukoliko su sinkronizirani, daju salami posebnu aromu. U ovom radu ispitan je kemijski sastav hlapljivih spojeva iz uzorka trajne salame od mesa istarskog magarca. Hlapljivi spojevi izolirani su dvjema različitim metodama izolacije: mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi i destilacijom potpomognutom mikrovalovima, te analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija – spektrometrija masa u cilju usporedbe sličnosti i razlika dobivenih rezultata.

Nakon izolacije metodom SPME koristeći plavo vlakno ukupno je identificirano 20 spojeva, dok su nakon izolacije pomoću sivog vlakna identificirana 22 spoja (Tablice 2. i 3.) što predstavlja 91,1-92,1% svih izoliranih i identificiranih spojeva. Kemijski sastav hlapljivih spojeva izoliranih metodom MAD prikazan je u tablici 4. Ukupno je identificirano 36 spojeva što predstavlja 91,5% od ukupnih hlapljivih spojeva.

Najzastupljeniji spojevi izolirani pomoću plavog vlakna su limonen (18,3%) i *δ*-3-karen (12,3%). Drugi identificirani za aromu bitni spojevi su: butan-2-ol (8,9%), sabinen (8,7%), *β*-pinen (6,9%), *α*-pinen (6,2%), *trans-β*-kariofilen (5,2%) i *β*-mircen (5%), *γ*-terpinen (3,2%), *α*-felandren (3,1%), metil-eugenol (1,9%), *p*-cimen (1,8%), teprinen-4-ol (1,8%). Svi ostali identificirani spojevi prisutni su u udjelima manjim od 1,6%, iako je važno istaknuti prisutnost organosumporovih spojeva i to dialil-disulfida (1,5%) i dialil-sulfida (0,4%).

Korištenjem sivog vlakna, kao i kod izolacije pomoću plavog vlakna, najzastupljeniji spoj je limonen (16,9%), dok je *δ-3*-karen prisutan u nešto manjem udjelu (9,8%). Drugi najzastupljeniji spoj je *trans-β*-kariofilen (11,8%) čiji je udio značajno veći od onog dobivenog izolacijom pomoću plavog vlakna. Spoj koji nije pronađen korištenjem sivog vlakna je 2-metoksi-4-metilfenol dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani fenilacetaldehid, metilfenol i α-kopaen. Svi ostali spojevi identificirani su u oba slučaja. Uz *trans-β*-kariofilen, pomoću sivog vlakna,u većem udjelu izolirano je samo četiri spojeva i to etanol (1,9%), teripen-4-ol (2,3%), dialil-disulfid (1,8%) i dialil-sulfid (0,6%).

Najzastupljenije komponente izolirane metodom MAD su *(Z)*-oktadec-9-enska kiselina (10,1%), etil-linolat (9,1%), etil-heksadekanoat (8,5%) i heksadekanska kiselina

(8,1%). Drugi kvantitativno bitni spojevi su: oktadekanska kiselina (7,9%), metil-stearat (6,6%), izopropilt-tetradekanoat (5,4%), deka-2,4-dienal (5,3%), oleinska kiselina (3%), metil-eugenol (2,9%), *α*-felandren (2,6%). Zbog velike količine masti u uzorku očekivao se veliki postotak masnih kiselina. Akumulacija slobodnih masnih kiselina rezultat je hidrolize triglicerida. Međutim, slobodne masne kiseline su slabo hlapljive te nemaju značajnog utjecaja na miris trajne salame od mesa istarskog magarca *(29)*.

Kao jedan od produkata lipolitičkog autooksidacijskog procesa nastaju linearni zasićeni ($C_5$-$C_{10}$) i nezasićeni ($C_6$-$C_{11}$) aldehidi. Aldehidi su spojevi koji imaju izrazite mirisne karakteristike i u pravilu pridonose aromi *(44)*. Metodom MAD izoliran je samo jedan zasićeni aldehid i to deka-2,4-dienal (5,3%). Fenilacetaldehid je identificiran metodom MAE (0,8%) i SPME metodom pomoću sivog vlakna (5,2%).

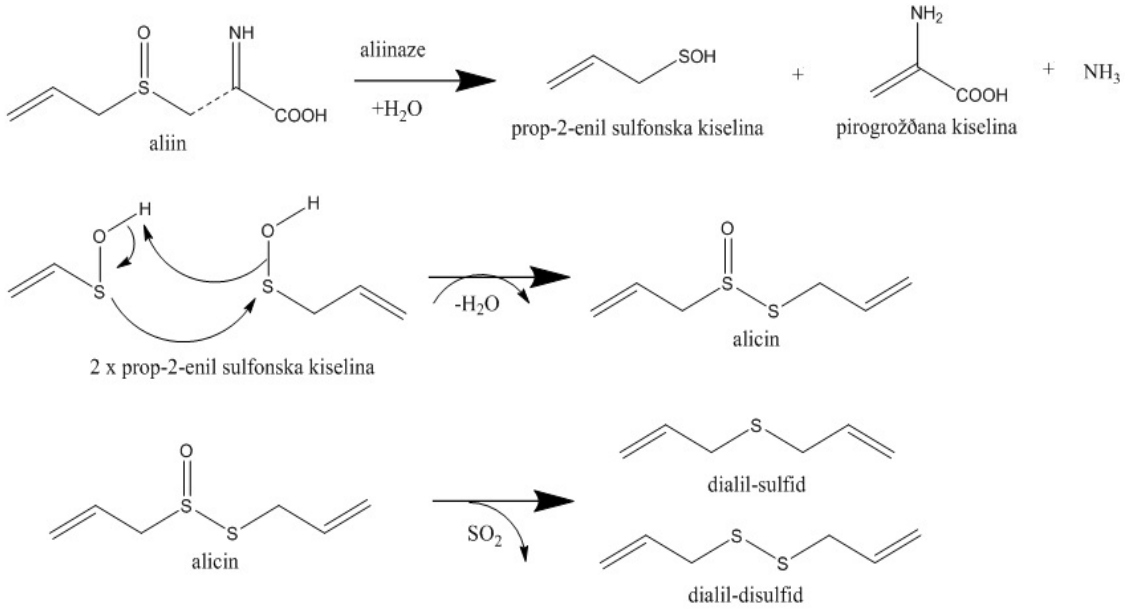
Spojevi koji također potječu od oksidacije lipida su alkani i alkoholi. Oni mogu nastati oksidacijom metil razgranatih masnih kiselina koje su u malim količinama zastupljene u animalnim tkivima *(45)*. Moguća posljedica lipidne oksidacije masnih kiselina jest identifikacija heksadekanola (0,5%), oktadekan-1-ola (1,9%) i *(Z)*-oktadec-9-en-1-ola (0,8%) metodom MAD. Alkoholi također mogu nastati lipolizom, proteolizom, mikrobiološkom aktivnošću te mogu potjecati od začina dodanih magarećoj salami. SPME metodom identificirani su butan-2-ol i etanol koji mogu potjecati od vina dodanog u procesu proizvodnje trajne salame od mesa istarskog magarca. Alkani izolirani MAD su heneikosan (0,6%), dokosan (0,5%) i eikosan (0,1%) međutim, oni imaju niži prag mirisne detekcije od alkohola pa je i njihov utjecaj na aromu izraženiji *(46)*.

Etilni esteri nastaju enzimatski u zadnjem stadiju zrenja reakcijom između kiselina i alkohola *(44)*, a tri su etilna estera izolirana mikrovalnom ekstrakcijom: etil-linolat (9,1%), etil-heksadekanoat (8,5%) i etil-stearat (1,5%).

Terpeni su spojevi koji potječu od dodanih začina. U ovom radu izolirano je 16 različitih terpena u udjelima od 0,2% do 18,3%. Najzastupljeniji terpeni izolirani SPME metodom su limonen, *δ*-3-karen, *trans*-*β*-kariofilen, sabinen, *β*-pinen (5,0-18,3%) dok su metodom MAD u najvećem udjelu izolirani *α*-felandren, *α*-pinen, *δ*-3-karen i limonen (1,5-2,6%). Pojavljivanje terpena u ovako visokom postotku nije iznenađujuće budući da se u procesu proizvodnje upotrebljavaju začini sa značajnim udjelom terpena kao što su crni papar, muškatni oraščić, ružmarin, korijander, piment i karadamom. Nadalje, prisustvo limonena i drugih terpena uobičajeno je u trajnim fermentiranim

proizvodima jer su oni konstituenti neosaponificirajućih frakcija biljne masti što znači da dolaze ishranom i akumuliraju se u tijelu životinje *(15)*.

Drugi važni spojevi koji potječu od začina su organosumporovi spojevi čija prisutnost je vjerojatno uzrokovana dodatkom češnjaka. Organosumporovi spojevi izolirani su samo SPME metodom te su identificirana dva spoja: dialil-disulfid i dialil-sulfid. Kada se češnjak izreže ili zdrobi dolazi do aktivacije enzima aliinaze koji djeluje na aliin i nastaje alicin čija je struktura nestabilna te se razgrađuje kroz nekoliko putova. Tako su dialil-disulfid i dialil-sulfid najvjerojatnije direktni produkti razgradnje alicina *(18)*.




**Slika 15.** Shema nastajanja dialil-sulfida i dialil-disulfida *(47,48)*

Najmanje zastupljena kemijska skupina spojeva u analiziranom uzorku su fenoli. SPME metodom izolirana su dva spoja i to 2-metoksi-4-metilfenol (0,6%, korištenjem plavog vlakna) 2-etil-5-metilfenol (0,2%, korištenjem sivog vlakna). Fenoli i metoksifenoli su aromatski spojevi s aromom po dimu, paljevini i zagorenome *(49)*. S obzirom na to da se trajna salama od mesa istarskog magarca u procesu proizvodnje izlaže hladnom dimljenju u trajanju od 30 minuta njihova identifikacija u ovako niskom postotku je očekivana.

Hlapljive komponente izolirane SPME metodom mogu se podijeliti u alkohole, terpene, organosumporove spojeve, fenole i aldehide, dok spojevi izolirani metodom MAD pripadaju grupama masnih kiselina, aldehida, estera, alkana, terpena i alkohola.

# 5.ZAKLJUČAK

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

- Dobiveni rezultati pokazuju veliku raznolikost identificiranih hlapljivih spojeva ovisno o korištenoj metodi izolacije.

- Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi selektivno se izoliraju hlapljivi spojevi vršnih para trajne salame od mesa istarskog magarca.

- U SPME analizi najzastupljeniji spojevi su limonen, $\delta$-3-karen, butan-2-ol i trans-$\beta$-kariofilen. Spoj koji nije izoliran korištenjem sivog vlakna je 2-metoksi-4-metilfenol dok korištenjem sivog vlakna nisu identificirani fenilacetaldehid, metilfenol i $\alpha$-kopaen.

- Destilacijom potpomognutom mikrovalovima izoliraju se hlapljivi i poluhlapljivi spojevi.

- Glavni spojevi identificirani MAD metodom su: *(Z)*-oktadec-9-enska kiselina (10,1%), etil-linolat (9,1%), etil-heksadekanoat (8,5%) i heksadekanska kiselina (8,1%).

- Metodom MAD izolirani su poluhlapljivi spojevi koje nisu izolirani korištenjem SPME metode jer je ona kvalitativna tehnika koja hvata vršne pare uzorka.

Uzevši u obzir da se SPME metodom selektivno izoliraju hlapljivi spojevi vršnih para dok se metodom MAD izoliraju hlapljivi i poluhlapljivi spojevi u daljnjim istraživanjima bilo bi potrebno analizirati više uzoraka korištenjem različitih analitičkih tehnika kako bi se dobio što precizniji kemijski profil hlapljivih spojeva trajne salame od mesa istarskog magarca.

# 6. LITERATURA

*1.* Zeuthen P. A Historical Perspective of Meat Fermentation. U: Toldrá F, urednik. Handbook of Fermented Meat and Poultry. Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2007. str. 3-7.

*2.* Kovačević D. Tehnologija kulena i drugih fermentiranih kobasica. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2014; ISBN 978-953-7005-35-1.

*3.* Pravilnik o mesnim proizvodima NN 131/12. Zagreb, Hrvatska: Narodne Novine Republike Hrvatske; 2012. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_11_131_2801.html.

*4.* Kovačević D. Kemija i tehnologija mesa i ribe. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2001; ISBN 953-97478-6-4.

*5.* Lovrić T. Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inžinerstva. Zagreb, Hrvatska: Hinus; 2003: ISBN 987-953-6904-25-9.

*6.* Belitz HD., Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. 4th revised and extended edition. Heidellberg, Berlin; Springer; 2009.

*7.* URL: http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-mozga-i-zivcanog-sustava/poremecaji-mirisa-i-okusa (pristupljeno: 24.04.2018.) .

*8.* Ordonez JA, Hierro EM, Bruna JM, Hoz L. Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. Kritički osvrt u Food Science and Nutrition. 1999; 39(4):329-367.

*9.* Veiga A, Cobos A, Ros C, Díaz O. Chemical and fatty acid composition of ‘‘Lacón gallego” (dry-cured pork foreleg): Differences between external and internal muscles. Journal of Food Composition and Analysis. 2003;16(2): 121–132.

*10.* Kovačević D, Mastanjević K. Tehnologija proizvodnje konjske salame. Poduzetnički centar Pakarac d.o.o., Pakarac; 2013.

*11.* Weizheng S, Mouming Z, Chun C, Qiangzhong Z, Bao Y. Effect of Maillard reaction products derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant,textural and sensory properties of Cantonese sausages.Meat Sci.2010;86:276-282.

*12.* Villaverde A, Ventanas J, Estévez M.Nitrite promotes protein carbonylation and Strecker aldehyde formation in experimental fermented sausages: Are both events connected?. Meat Science. 2014;98:665-672.

*13.* Marušić Radovčić N, Brekalo A, Janči T, Vidaček S, Kušec G, Medić H. Određivanje hlapivih komponenata arome kulena. Meso. 2015;17:338-344.

*14.* Siek TJ, Albin IA, Sather LA, Lindsay RC. Comparison of Flavor Thresholds of Aliphatic Lactones with Those of Fatty Acids, Esters, Aldehydes, Alcohols, and Ketones. Journal of Dairy Science. 1971;54 (1):1-4.

*15.* Buscailhon S. Influence des caractéristiques de la matière première sur les qualités organoleptiques du jambon sec. Doktorski rad. Clermont-Ferrand, Francuska: Sveučilište Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II; 1992.

*16.* URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Izopren#/media/Datoteka:Isoprene.svg (pristupljeno: 27.08.2019.).

*17.* Mottram D S. Meat. U: Maarse H, urednik. Volatile Compounds in Foods and Beverages. New York, USA: Stigma & Cognition; 1991. str. 107.

*18.* Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). Ultrasonics Sonochemistry. 2006;13:54-60.

*19.* URL: http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=2409 (pristupljeno: 03.05.2019.).

*20.* HPA. Konjogodojstvo - Godišnje izvješće o uzgoju kopitara za 2017. godinu. Križevci, Hrvatska: Hrvatska poljoprivredna agencija (HPA); 2018.

*21.* Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Nacionalni program očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj.; 2010. Dostupno na:http://www.europski-fondovi.eu/content/nacionalni-program-o-uvanja-izvornih-i-za-ti-enih-pasmina-doma-ih-ivotinja-u-republici.

*22.* URL: http://www.regionalexpress.hr/site/more/projekt-gastronomske-valorizacije-mesa-istarskog-magarca (pristupljeno: 02.05.2019.).

*23.* URL: http://bag.mps.hr/hrvatske-izvorne-i-zasticene-pasmine/istarski-magarac/ (pristupljeno: 03.05.2019.).

*24.* Karatosidi D, Marsico G,Tarricone S. Modern Use of Donkeys. Osvrt u Iranian Journal of Applied Animal Science. 2013;3(1):13-17.

*25.* Šuran E. Kreiranje visoko vrijednih proizvoda od mesa autohtonih pasmina Istre. Meso. 2018;3(20):170-173.

*26.* Pravilnik o mesnim proizvodima NN 62/18. Zagreb, Hrvatska: Narodne Novine Republike Hrvatske; 2018. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_07_62_1292.html.

*27.* Tartaglia S. Utjecaj dozrijevanja i prženja na hlapljive spojeve dalmatinskog pršuta. Diplomski rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Spltu; 2007.

*28.* Kadam SU,Tiwari BK, O'Donnell CP. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. Osvrt u Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013;61,4667−4675.

*29.* Jerković I. Kemija aroma. Recenzirana interna skripta. Kemijsko-tehnološki fakultet Split. Sveučilište u Splitu. 2011.

*30.* Drmić H, Ražek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Pregledni rad u Croatian Journal of Food Science and Technology. 2010;2(2):22-33.

*31.* Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2014.

*32.* Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. New York, SAD; Wiley VCH; 1997.

*33.* URL: https://www.omicsonline.org/open-access/solid-phase-microextraction-spme-method-development-in-analysis-ofvolatile-organic-compounds-vocs-as-potential-biomarkers-of-cancer-2155-9929-1000253.php?aid=64169 (pristupljeno: 21.07.2019.).

*34.* Mohamadi M, Shamspur T, Mostafavi A. Comparison of microwave-assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers Rosa damascena Mil. Journal of Essential Oil Research. 2013;25(1):55-61.

*35.* Jerković I, Radonić A. Praktikum iz Organske kemije. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2009.

*36.* Silić A. Glukozinolatni profil u biljkama Diplotaxis tenuifolia (L.) DC. i Matthiola incana (L.) BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima. Diplomski rad. Split, Hrvatska; Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.

*37.* Radić Nj. Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb, Hrvatska; Školska knjiga; 2016.

*38.* URL: https://docplayer.cz/docs-images/26/7300261/images/37-0.png (pristupljeno: 21.07.2019.).

*39.* Šola M. Isparljivi spojevi meda amorfe (Amorphia fruticosa L.). Završni rad. Split, Hrvatska: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet Split; 2018.

*40.* Blažević I. Masena spektroskopija (MS). Nerecenzirani materijali za predavanje kolegija Organska kemija. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet Split; 2017.

*41.* Sutherland K. Gas chromatography/mass spectrometry techniques for the characterisation of organic materials in works of art. Physical Sciences Reviews. 2018:4(6):3.

*42.* URL: http://www.istrijana.azrri.hr/ (pristupljeno: 24.07.2019.).

*43.* URL: https://webshop.gligora.com/shop/cijena/tovar (pristupljeno: 24.0.2019).

*44.* Fay LB, Brevard H. Contribution of mass spectrometry of the Maillard reaction in food. Mass Spectrometry Reviews. 2005;24:487-507.

*45.* Berdagué JL, Denoyer C, Le Quéré JL, Semon E. Volatile componentes of dry cured ham. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1991;39,1257–1261.

*46.* Marušić N. Karakterizacija hlapivih spojeva i parametara kvalitete tradicionalnoga istarskoga i dalmatinskoga pršuta. Doktorski rad. Zagreb, Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2013.

*47.* URL: https://de.cleanpng.com/png-6a0y6s/ (pristupljeno: 04.08.2019.).

*48.* URL: https://www3.hhu.de/biodidaktik/Blattgewuerze/images/chemie/allicinbildung.jpg (pristupljeno: 04.08.2019.).

*49.* Guillén MD, Manzanos MJ. Study of the volatile composition of aqueous oak smoke preparation. Food Chemistry. 2002;79(3):283–292.