

# MOGUĆNOSTI PRIMJENE RAZLIČITIH ATMOSFERA U SMANJENJU MIKROBIOLOŠKOG OPTEREĆENJA SIRA

---

Đuričić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:585547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENATEHNOLOGIJA**  
**PRERADA MLJEKA**

**LUKA ĐURIČIĆ**

**MOGUĆNOSTI PRIMJENE RAZLIČITIH ATMOSFERA U**  
**SMANJENJU MIKROBIOLOŠKOG OPTEREĆENJA SIRA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2023.**



**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Prerada mlijeka

Luka Đuričić

**Mogućnosti primjene različitih atmosfera u smanjenju  
mikrobiološkog opterećenja sira**

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marijana Blažić, prof. struč. stud.

Broj indeksa studenta: 0314618001

Karlovac, 29. rujan 2023.

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Luka Đuričić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Mogućnosti primjene različitih atmosfera u smanjenju mikrobiološkog opterećenja sira** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 29. rujan 2023.

Luka Đuričić:

---

Veleučilište u Karlovcu

Završni rad

Odjel prehrambene tehnologije

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**MOGUĆNOSTI PRIMJENE RAZLIČITIH ATMOSFERA U SMANJENJU MIKROBIOLOŠKOG  
OPTEREĆENJA SIRA**

*Luka Đuričić*

Rad je izrađen na Veleučilištu u Karlovcu

Mentor: izv. prof. dr.sc. Marijana Blažić, prof. struč. stud.

**Sažetak**

Rad razmatra svrhu istraživanja i primjene visokog tlaka, ozonirane atmosfere u zrionama i modificirane atmosfere tijekom procesa proizvodnje i zrenja sira. Uzevši u obzir mogućnosti te tehnološke i tehničke izazove primjene navedenih metoda potkrijepljene poznatim istraživanjima, zaključuje se da u svrhu smanjenja mikrobiološkog opterećenja zrenja sira, promatrane metode imaju opravdani i neporecivi potencijal za primjenu u tehnologiji proizvodnje sira. No, za lakše i intenzivnije uključivanje navedenih metoda u industriju dobrodošla su i dodatna istraživanja utjecaja istih.

**Broj stranica: 21**

**Broj slika: 3**

**Broj tablica: 2**

**Broj literaturnih navoda: 29**

**Broj priloga: -**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi:** *atmosfera, inhibicija, mikroorganizmi, sir, zrenje*

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Marijana Blažić, prof. struč. stud.
2. dr. sc. Bojan Matijević, prof. struč. stud.
3. Elizabeta Zandona pred. struč. stud.
4. dr. sc. Ines Cindrić, prof. struč. stud.

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Karlovac University of Applied Sciences**

**Final paper**

**Department of Food Technology**

**Professional undergraduate study of Food Technology**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**

**Scientific Field: Food Technology**

### **POSSIBILITIES OF DIFFERENT ATMOSPHERE APPLICATION IN REDUCING THE MICROBIOLOGICAL LOAD OF CHEESE**

*Luka Đuričić*

**Final paper performed at Karlovac University of Applied Sciences**

**Supervisor:** *Ph.D. Marijana Blažić, collage prof.*

#### **Abstract**

The paper reviews the purpose of research and application of high pressure processing, use of ozone and modified atmosphere in production and ripening of cheese. Taking into account the possibilities, technological and technical challenges of applying the mentioned methods supported by known researches, it concludes that in order to reduce the microbiological load of cheese, observed methods have a justified and undeniable potential for application in production of cheese. However, for an easier and more intensive inclusion of mentioned methods in the industry, additional research of their impact on cheese is more than welcome.

**Number of pages: 21**

**Number of figures: 3**

**Number of tables: 2**

**Number of references: 29**

**Original in:** Croatian

**Key words:** atmosphere, cheese, inhibition, microorganisms, ripening

**Date of the final paper defense:**

**Reviewers:**

1. *Ph.D. Marijana Blažić, collage prof.*
2. *Ph.D. Bojan Matijević, collage prof.*
3. *Elizabeta Zandona, lecturer.*
4. *Ph.D. Ines Cindrić, collage prof. (substitute)*

**Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, Trg J. J. Strossmayera 9,  
47000 Karlovac, Croatia**

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Problematika pri zrenju sira.....	2
2.2. Primjena visokog tlaka .....	4
2.2.1 Opis metode .....	4
2.2.2. Utjecaji visokog tlaka na sir.....	5
2.2.3. Izazovi i mogućnosti primjene visokog tlaka.....	8
2.3. Primjena ozona.....	8
2.3.1. Opis metode .....	8
2.3.2. Princip mikrobiološki inhibitornog djelovanja ozona.....	9
2.3.3. Proizvodnja ozona .....	10
2.3.4. Nedostaci primjene ozona.....	11
2.4. Zrenje sira u modificiranoj atmosferi .....	11
2.4.1. Opis primjene modificirane atmosfere.....	11
2.4.2. Utjecaj modificirane atmosfere na razvoj mikroorganizama .....	12
2.4.3. Fizikalno-kemijski utjecaji.....	15
2.4.3. Nedostaci zrenja u modificiranoj atmosferi .....	17
<b>3. ZAKLJUČCI</b> .....	18
<b>4. LITERATURA</b> .....	19



## 1. UVOD

Zrenje sira se sastoji od niza biokemijskih i mikrobioloških procesa. Povrh toga, vodi se računa i o fizičkim promjenama u sastavu sira. Pri zrenju sira dolazi do razgradnje laktoze, masti (lipolize), proteina (proteolize) te nastanka mliječne kiseline, plinova, i ostalih produkata, smanjenja aktiviteta vode, te razvoja mikroorganizama. Upravo su mikroorganizmi zaslužni za provođenje zrenja sira jer su promjene u siru uzrokovane metaboličkim reakcijama mikroorganizama. U krajnosti, sve to utječe na senzorska svojstva sira i kvalitetu konačnog proizvoda. Stoga je važno da se sir od samog početka proizvodnje, preko zrenja do konzumacije nalazi u kontroliranim uvjetima kako ne bi došlo do kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima koji negativno utječu na senzorna svojstva te ugrožavaju ljudsko zdravlje. Industrija poznaje brojne metode za osiguranje kvalitete sira, no uvijek ima prostora za napredak. Iz niza alternativnih metoda tretiranja sira tijekom proizvodnje i zrenja neke su pokazale perspektivu zbog mogućnosti koje nude na području smanjenja mikrobiološkog opterećenja proizvodnje i zrenja sira. Proučavanje i korištenje takvih metoda dodatno je potaknuto trendovima na tržištu koji teže ka smanjenoj primjeni aditiva te osiguravanju kvalitete i izvornosti proizvoda. Mehanizmi djelovanja i utjecaji alternativnih metoda zrenja sira poput primjene visokog tlaka, ozona ili modificirane atmosfere opisani su u ovom završnom radu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Problematika pri zrenju sira

Tijekom proizvodnje sireva sa zrenjem suočavamo se sa mnogim izazovima, među kojima se ističu:

- mikrobiološka kvaliteta sirovine;
- higijena proizvodnih pogona tijekom prerade mlijeka;
- higijena zrišta ili komora za zrenje
- dugotrajnost zrenja sira;
- stabilnost sira nakon pakiranja.

Problematika očuvanja mikrobiološke stabilnosti sirovine započinje već pri primarnoj proizvodnji mlijeka na farmama, prilikom koje se teži ka sprečavanju kontaminacije mlijeka stranim tijelima, nepoželjnim mikroorganizmima (MO) i antibioticima. Kontaminacija antibioticima usporava i/ili onemogućuje razvoj bakterija mliječne kiseline (BMK) i ostalih poželjnih MO, stoga se moraju poštivati propisane karence pri mužnji liječenih životinja. Za dodatnu sigurnost, mlijeko koje sadrži antibiotike zakonski je zabranjeno otkupljivati i prerađivati te se obavezno odvaja i pri samoj mužnji. Kontaminacija mlijeka stranim tijelima i nepoželjnim MO sprječava se uvelike higijenom mužnje i muzne opreme. Mlijeko je slabije izloženo riziku kontaminacije uz korištenje izmuzišta ili mlijekovoda, jer tako uopće ne dolazi u kontakt sa zrakom koji je glavni izvor kontaminanata pored muzne opreme. Proizvodnja sira započinje sirenjem mlijeka. Prethodno sirenju mlijeko se može pasterizirati. Pasterizacijom se eliminira većina nepoželjnih MO iz sirovog mlijeka. Mikrobiološkoj ispravnosti sira pomažu i inhibitorni uvjeti u siru kao što su smanjena pH vrijednost, aktivitet vode ( $a_w$ ) te povećani salinitet koji sprječavaju rast i razvoj nepoželjnih mikroorganizama. Aktivitet vode i pH vrijednosti polutvrdih sireva se kreće u rasponu od 0.84-0.92 za  $a_w$ , odnosno 4.8 – 5.9 za pH (Sperat-Czar i sur., 2018). Ovisno o vrsti sira, pasterizacija nije uvijek prihvatljiv korak niti je uvijek moguće postići odgovarajuće inhibitorne uvjete. U tim slučajevima, proces sirenja izložen je većem mikrobiološkom riziku. Metoda primjene visokog tlaka u obradi sirovine (mlijeka) te gotovih mliječnih proizvod istaknula se kao potencijalno rješenje navedenog problema. Dodatni potencijal navedene metode i biokemijska stabilizacija sira koja također ima značajan utjecaj na trajanje zrenja sireva.

Već se pri sirenju mlijeka djelomično određuju senzorna svojstva sira koja naravno ovise i o samoj sirovini, no zrenje je korak u proizvodnji tijekom kojeg nastaje sva poznata raznolikost sireva. Tijekom zrenja se oblikuju aroma, tekstura, boja, okus i ostale karakteristike koje određeni sir čini prepoznatljivim. Procesi razgradnje laktoze, proteoliza, lipoliza i nastanak mliječne kiseline i ostalih metabolita, koji određuju senzorna svojstva sira, posljedice su metaboličkih reakcija inokuliranih MO i biokemijskih reakcija. Stoga je potrebno spriječiti razvoj patogenih MO i kontaminaciju istima tijekom cjelokupnog procesa zrenja. Izazovu dodatno doprinosi i trajanje zrenja koje katkad može biti vrlo dugotrajno, čak i nekoliko godina. Zbog takvih karakteristika proces zrenja je potrebno precizno definirati, osigurati stabilne uvjete te ponovljivost istih. Taj cilj je lakše ostvariv uz pomoć kontroliranih komora za zrenje sira. Dugotrajnost zrenja je posljedica činjenice da mikroorganizmi u siru trebaju vremena za rast i razvoj te provedbu metaboličkih reakcija koje u krajnosti dovode do oblikovanja određenih senzornih svojstava. Proces dodatno produljuju dimljenje određenih sireva te sušenje u svrhu smanjenja aktiviteta vode, stabilizacije, konzerviranja i postizanja željenih senzornih svojstava.

Sir je izložen riziku i u zrionama te komorama za zrenje, koje pružaju pogodne uvjete za rast i razvoj mikroorganizama, pa tako i patogena. Uz nepravilnu higijenu prisutnog osoblja, njega sira može omogućiti križnu kontaminaciju. Dodatnu pozornost treba obratiti na razvoj patogenih plijesni. Na površinama u zrioni koje su u doticaju sa sirom vrlo lako nastaje biofilm (**Slika 1.**) koji je prikladan za rast i razvoj patogenih MO. Kondenzacija vlage pospješuje proces nastanka biofilma i na ostalim površinama u zrioni ili komori za zrenje. Također, s obzirom da zrione i komore trebaju biti kvalitetno ventilirane, u njima je konstantan protok i miješanje zraka. Činjenicom da se spore plijesni mogu širiti i zrakom, nastaju zaista povoljni uvjeti za rast i razvoj plijesni. Stoga je razvoj patogena nužno i vrlo izazovno držati pod kontrolom. Rješenje nalazimo u sprječavanju nastanka biofilma čišćenjem i dezinficiranjem površina i opreme te obraćanjem pozornosti na kakvoću, tj. higijenu zraka. Osim toga, stabilnost sira mogu ugroziti i patogeni MO zaostali nakon proizvodnje. Zbog pogodnih uvjeta tijekom zrenja njihova brojnost može postati značajna i negativno utjecati na mikrobiološku kvalitetu sira. Ostvarivanje inhibitornih uvjeta za rast takvih MO tijekom cijelog procesa zrenja može se umanjiti ili u potpunosti eliminirati taj rizik. Modifikacija atmosferskih uvjeta u zrionama obogaćivanjem zraka plinovima poput ozona (O<sub>3</sub>), ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>) i dušika (N<sub>2</sub>) jedan je od potencijalnih načina rješavanja navedenih problema i održavanja mikrobiološke stabilnosti sira tijekom zrenja.



**Slika 1.** Prikaz površina pogodnih za stvaranje biofilma (Ivanić, 2019).

## 2.2. Primjena visokog tlaka

### 2.2.1 Opis metode

Primjena visokog tlaka zasniva se na inaktivaciji enzima i destabilizaciji stanične membrane bakterija pri visokom tlaku. Primjenom visokog tlaka dolazi do plastične deformacije tj. narušavanja geometrije enzima uslijed čega se enzim inaktivira. Kod bakterija pri nižim tlakovima (do 200 MPa) dolazi do privremene obustave proizvodnje adenozin trifosfata (ATP-a), pri tlakovima iznad 300 MPa dolazi do odvajanja proteina stanične membrane i prestanka unosa hranjivih tvari u stanicu, a pri tlaku većem od 400 MPa dolazi do trajne destabilizacije stanične membrane. Za stabilizaciju primjenom metode visokog tlaka primjenjuju se tlakovi u rasponu 200 – 800 MPa (2 – 8 kbar) . Utjecaj tretmana ovisan je o samom tlaku, trajanju tretmana, fizičkoj strukturi namirnice, temperaturi, vrsti mikroorganizama, te vrsti enzima. Tretman visokim tlakom utječe na fizikalno-kemijska svojstva sira i na mikrobiološka svojstva. Učinkovitost tretmana u smanjenju broja živih stanica

MO proporcionalan je tlaku, temperaturi, trajanju. Optimalni procesni parametri i najbolji trenutak za primjenu mogu varirati ovisno o vrsti sira i potvrđenim ili sumnjivim patogenima prisutnima u siru. Svoju ulogu u mikrobiološkom aspektu proizvodnje ova metoda nalazi pri proizvodnji sireva od svježeg mlijeka, mlijeka s niskom populacijom autohtonih BMK, ili u proizvodnji sireva od pasteriziranog mlijeka izloženima kontaminaciji nakon pasterizacije, osobito ako su proizvedeni bez starter kulture ili u slučaju napada bakteriofaga na starter kulturu. Uglavnom se primjenjuje na svježe i polutvrde sireve (Podolak, 2020).

Tretiranje proizvoda visokim tlakom izvodi na principu hidrauličnog tlačenja. Zapakirani vakuumirani proizvod šaržno se umeće u tlačni prostor (cilindar) koji se puni vodom pod tlakom od 4-10 bara. Posebna pozornost se obraća na to da nigdje ne zaostaju mjehurići zraka. Nakon što je cilindar napunjen, tlak u cilindru se povećava djelovanjem sile koju stvaraju hidraulični klipovi mehanizmom hidrauličnog pojačanja sile koju visokotlačne hidraulične pumpe. Kao medij za tlačenje može se koristiti bilo koja tekućina, no gotovo isključivo se koristi voda. Fizikalno svojstvo tekućina je to da ne mijenjaju svoj volumen pri promjeni tlaka, tj. nisu stlačive. Neovisno o obliku proizvoda koji se tretira, na cijelu površinu proizvoda djeluje identičan tlak prema Pascalovom zakonu koji nalaže da je tlak u zatvorenom sustavu svuda jednak i djeluje u svim smjerovima jednako (Balasubramaniam, 2015).

## 2.2.2. Utjecaji visokog tlaka na sir

### 2.2.2.1. Utjecaj na mikroorganizme

Primjena visokog tlaka učinkovitija je protiv Gram-negativnih bakterija zbog građe njihove stanične membrane koja je tanja i samim time osjetljivija. Patogeni MO u mljekarstvu rodova *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Pseudomonas* su Gram-negativne vrste što ovu metodu čini prikladnom. Povrh toga, BMK koje se koriste u sirarstvu su Gram-pozitivne vrste što ih čini otpornijima na primjenu visokog tlaka (Anonymous, 2022). U istraživanju koje su objavili Rodríguez i sur. (2005) zabilježen je pad broja *E. coli* u polutvrdom siru nakon tretmana tlakom od 300 MPa kroz 10 min i 500 MPa tijekom 5 min, u odnosu na kontrolni sir kada su sirevi tretirani 2. dan. nakon proizvodnje. U sličnom istraživanju De Lamo-Castellví i sur. (2007) ispitana su dva soja *Salmonella enterica* u sirevima proizvedenih bez starter kulture pri čemu se broj smanjio kod 10 min tretmana pri tlaku 400 MPa i početnoj temperaturi od 20°C.

Glavni inhibitorni uvjeti za rast i razvoj MO u siru su smanjene vrijednosti aktiviteta vode i pH. No pri proizvodnji svježih sireva uz pomoć sirila, sirni gruš nastaje enzimskim

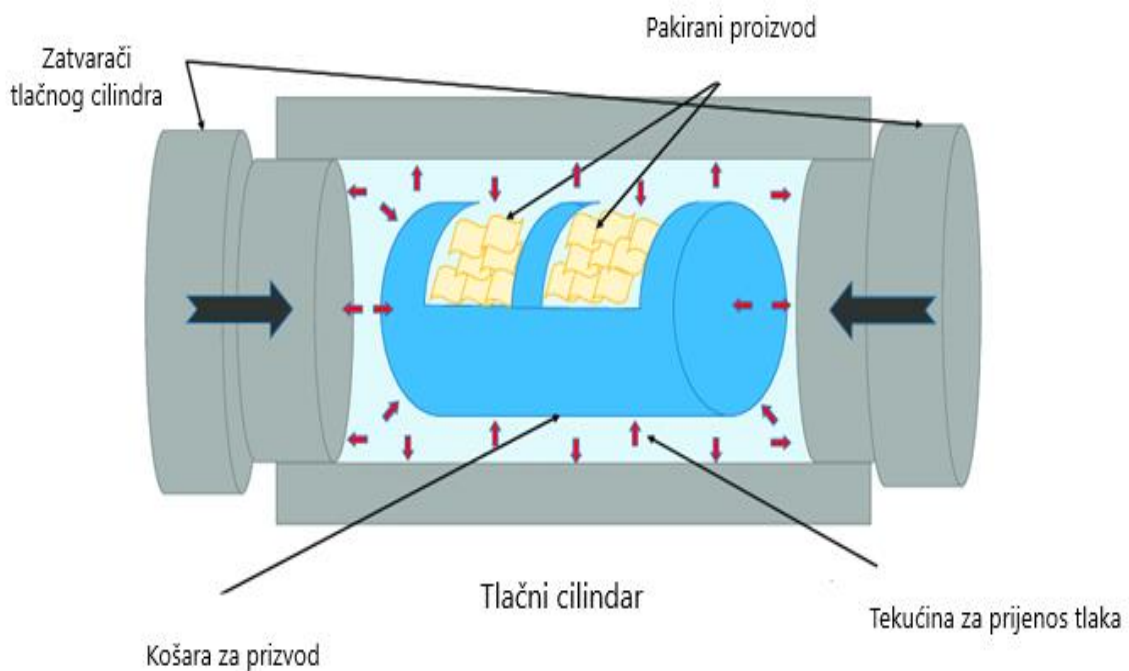
djelovanjem sirila, a ne izoelektričnim djelovanjem zakiseljavanja. Kao takvi, ti sirevi nemaju kisele inhibitorne uvjete. Povrh toga, navedeni sirevi se ne suše niti se intenzivno sole, zbog toga imaju visok aktivitet vode koji ih čini još pogodnijima za rast i razvoj neželjenih MO. Zbog takvih karakteristika ne samo da podržavaju razvoj uobičajenih patogenih bakterija, nego i plijesni. Iako se u industriji koriste sorbinska kiselina ili kalijev sorbat kao antifungalna sredstva, s ciljem smanjenja korištenja aditiva istražuju se alternativne metode poput primjene visokog tlaka.

Mehanizam stabilizacije nestabilnih sireva je zasnovan na mikrobiološkom djelovanju. Utjecaj visokog tlaka na rast i razvoj plijesni je isti kao i kod ostalih MO, destabilizacija stanične membrane i inhibiranje proizvodnje ATP-a. Uz to, visoki tlak djeluje i na spore plijesni prisutne u siru. Kod manje otpornih spora dolazi do destabilizacije membrane, a kod onih otpornijih do morfoloških i strukturnih promjena koje dovode do inaktivacije spora. Svježi sirevi proizvedeni uz pomoć sirila imaju znatno produljeni rok trajanja ako su tretirani visokim tlakom. Prema rezultatima istraživanja na sirevima bez starter kulture tretiranih pri 300 i 400 MPa kroz 5 minuta, rok trajanja tretiranih sireva produljen je do 14, odnosno 24 dana, dok je kontrolni imao sir rok trajanja tek 7 dana (Evert i sur., 2012).

#### 2.2.2.2. Fizikalno – kemijski utjecaj primjene visokog tlaka

Fizikalno – kemijski utjecaj primjene visokog tlaka je zanimljiv jer ima potencijal za produljenje ili skraćivanje vremena potrebnog za zrenje. Zrenje sira je biokemijski proces ovisan o aktivnosti enzima. Djelovanje enzima prvenstveno je ovisno o geometriji molekula enzima. Kad su izložene visokom tlaku, oblik tj. geometrija molekula enzima biva elastično ili plastično narušena što dovodi do njihove privremene ili trajne inaktivacije. Veliku ulogu u učinkovitosti enzima tijekom zrenja ima i struktura kazeinskih micela. Pri djelovanju visokog tlaka narušava se struktura kazeinskih micela te se pospješuje učinkovitost djelovanja enzima kroz denaturaciju  $\alpha$ -laktalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina. Ukratko, pospješuju se enzimске reakcije. Međutim djelovanjem visokog tlaka na stanične membrane u siru prisutnih MO, dolazi do povećanja permeabilosti ili pucanja stanične membrane, što rezultira oslobađanjem enzima prisutnih u MO u sirno tijesto. Kao rezultat te pojave dolazi do prolaznog pospješivanja enzimске aktivnosti u siru. Pošto se osjetljivost, odnosno, otpornost na primjenu visokog tlaka, pojedinih MO i enzima razlikuje, potencijalno je moguće osloboditi enzime iz stanica određenih MO, bez da se inaktiviraju neki drugi u siru prisutni enzimi. Suprotno tome, mogu se inaktivirati

određeni enzimi, bez da se eliminiraju neki drugi MO, tj. njihovo djelovanje na proces zrenja. Kako je trajanje zrenja direktno povezano s enzimskom aktivnošću, na ovaj način možemo utjecati na trajanje zrenja (Podolak, 2020). Po pitanju ubrzavanja zrenja provedeno je niz istraživanja. Kao primjer, Kolakowski i sur. (1998) tijekom istraživanja učinka visokog tlaka na aktivnost proteinaza i intenzitet proteolize; demonstrirali su intenzivniju proteolizu u Camembert siru tretiranom na 50 MPa u trajanju od 4 sata, a pri čemu je tretman imao zanemariv utjecaj na senzorska svojstva sira. Inhibicija enzimskih reakcija te rasta i razvoja MO usporava zrenje sira. U tom kontekstu također su provedena brojna istraživanja, kao što je istraživanje Wick i sur. (2004) koje je rezultiralo djelomičnom ili potpunom inaktivacijom enzima i MO pri tlakovima od 600 do 800 MPa u trajanju od 5 min, 30 i 120 dana nakon proizvodnje. Na **slici 2.** je slikovito opisan prikaz tlačnog prostora.



**Slika 2.** Prikaz tlačnog prostora pri primjeni visokog tlaka (Kaushal, 2020).

### 2.2.2.3. Utjecaj na senzorna svojstva sira

S obzirom da je metoda primjene visokog tlaka izuzetno ovisna o teksturi proizvoda, u ovom slučaju sira nameće se pretpostavka da i metoda ima utjecaja na teksturu. U svim prethodno navedenim istraživanjima došlo je do promjene teksture sirnog tijesta. Promjene u teksturi se svode na stvaranje površinski veće tvrdoće i narušavanja elastičnosti (Kolakowski i

sur., 1998). Povrh toga, primjena visokog tlaka ima utjecaja i na aromu sira kroz djelovanje na hlapive komponente. Calzada i sur. (2014) demonstrirali su da je koncentracija aldehida i estera značajno smanjena u sirevima kod tretmana tlakom od 400 MPa ili 600 MPa, koncentracija alkohola samo u sirevima pri 600 MPa, dok se koncentracija ketona, kiselina, aromatskih spojeva i ugljikovodika nije mijenjala.

### 2.2.3. Izazovi i mogućnosti primjene visokog tlaka

Djelotvornost primjene visokog tlaka vrlo je osjetljiva na fizikalna svojstva namirnice, te su fizikalna obilježja namirnice osjetljiva na metodu. To predstavlja izazov pri odabiru parametara tretmana i ograničenja pri kompatibilnosti namirnice. No olakšavajuće je to što je učinkovitost metode selektivna prema Gram podjeli na pogodan način. Učinkovitost metode dodatno pospješuje i termalizacija što dodatno proširuje okvire njene primjenjivosti. Metoda pokriva područje i izvan mikrobiološkog djelovanja stoga je zaista vrijedna razmatranja. Valja napomenuti da za primjenu metode treba vrlo precizno odrediti parametre jer su vrlo specifični. Iz perspektive primjenjivosti to stvara komplikacije koje u nekim slučajevima nisu zanemarive. Unatoč velikoj količini provedenih istraživanja i prikupljenih saznanja, još uvijek ima puno prostora za napredak, kako bi metoda bila jednostavnije primjenjiva u industriji. Jedna od bitnih prednosti je primjenjivost metode na gotov i čak zapakirani proizvod (ukoliko je riječ o vakuumskom pakiranju), što znači da se proizvod može tretirati i naknadno, ako za to postoji potreba. Također, primjenjivost metode na zapakiranom proizvodu eliminira rizik kontaminacije proizvoda od strane opreme koja se koristi.

## 2.3. Primjena ozona

### 2.3.1. Opis metode

Ozon ima široko područje primjene u prehrambenoj industriji. Primjenjuje se kao sredstvo za uklanjanje neugodnih mirisa, kao dezinfekcijsko sredstvo pri čišćenju i kao dezinfekcijsko sredstvo pri pročišćavanju mikrobiološki opterećenih otpadnih voda. Svoju ulogu u procesu zrenja nalazi kao antimikrobno tj. oksidativno sredstvo. Izrazito oksidativno svojstvo ozona i njegova štetnost za žive organizme kao takvog pokazalo se kao vrlo učinkovita metoda za kontrolu porasta patogenih MO u komorama za zrenje, prvenstveno plijesni čije se spore šire zrakom.



### 2.3.2. Princip mikrobiološki inhibitornog djelovanja ozona

Ozon kao izrazito jako oksidacijsko sredstvo stvara slobodne radikale koji su vrlo reaktivni. Velika reaktivnost radikala vrlo je štetna za integritet stanične membrane, djelovanje enzima i strukturu biomolekula poput deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK). Povrh toga, narušavaju ravnotežu između oksidativnih radikala i antioksidansa prisutnih u stanici MO. Djelovanje oksidativnih radikala oštećuje lipide stanične membrane što može rezultirati gubitkom vitalnih tvari i narušavanjem homeostaze. Negativno djelovanje na enzimsku aktivnost zasnovano je na inaktivaciji enzima zbog vezanja na iste ili razaranjem strukture enzima. Negativan utjecaj na strukturu DNK i RNK rezultat je sudjelovanja oksidativnih radikala u procesu transkripcije DNK, što u konačnici onemogućuje uspješnu sintezu proteina potrebnih za pravilno funkcioniranje žive stanice. Narušavanjem ravnoteže između oksidativnih radikala i antioksidansa u stanici, paralizira se sposobnost stanice MO da se brani od negativnog štetnih tvari u okolini i prisutnih u stanici (Sperat-Czar, 2018).

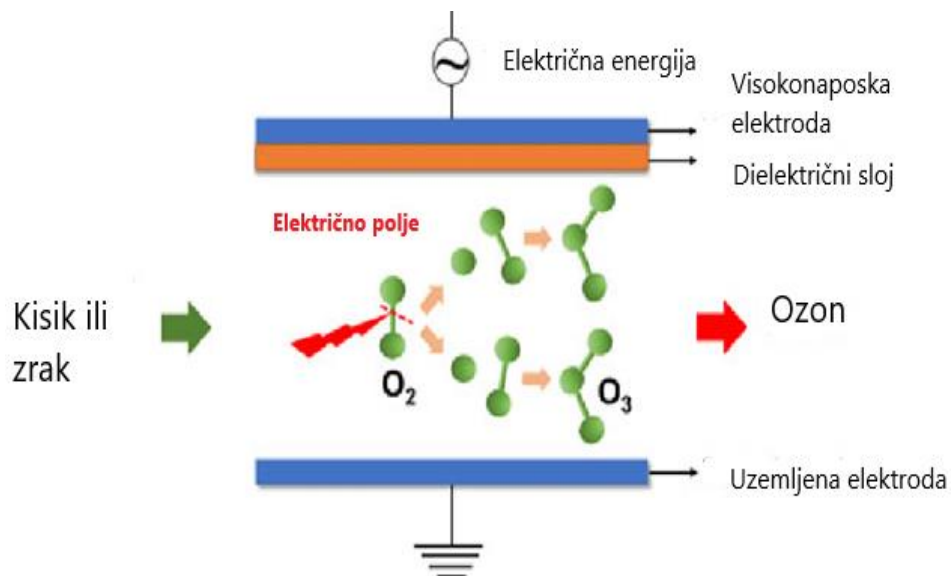
Obogaćivanjem atmosfere zraka u komorama za zrenje sa ozonom, uspješno se eliminiraju patogeni MO u zraku i sprječava se kontaminacija svih površina i samim time i sira. Mora se napomenuti da prisustvo ozona u atmosferi nema nikakva utjecaj na mikroorganizme koji su već prisutni na površinama u komorama za zrenje ili zriionama. Stoga je pravilna higijena i dalje nužna. Pitanje koje se nameće jest utjecaj ozona na MO prisutne u siru te posljedično na teksturalana i senzorska svojstva sira. Utjecaj ozona na MO u siru ovisi o izloženosti MO ozonu. Zbog slabe poroznosti sira, ozon u plinovitom stanju ima doticaja samo sa samom površinom sira. Način na koji bi ozon mogao doprijeti dublje u sirno tijesto je kroz otapanje u slobodnoj vodi u siru. S obzirom na to da je topivost ozona u vodi proporcionalna temperaturi i tlaku, potencijalan negativan utjecaj ozona na MO prisutne u siru je zanemariv kroz otapanje u slobodnoj vodi je ništavan, jer je u komorama za zrenje atmosferski tlak, koji je relativno nizak, te niska temperatura. Kako su to nepovoljni uvjeti za otapanje ozona u vodi, ozon nema utjecaja na svojstva sira, što je u konačnici poželjno. Serra i sur. (2003) prilikom istraživanja primjene ozonirane atmosfere u komorama za zrenje sira, s koncentracijom ozona do 0.3 ppm utvrdili su intenzivno opadanje broja poraslih kolonija MO prisutnih u zraku, te nikakav utjecaj na broj živih MO prisutnih u siru izloženom atmosferi obogaćenoj ozonom.

Svojstvo površinskog djelovanja ozona nudi mogućnost tretiranja sira podložnih razvoju površinskih plijesni. Istraživanja koja su proveli Tabla i sur. (2015) pokazala su značajno opadanje broja poraslih kolonija plijesni *Mycena plumbeus* tijekom 45 dana zrenja sira, pri

koncentraciji ozona od  $2 \text{ mg/m}^3$ . Gustoća plinovitog ozona pri atmosferskom tlaku iznosi  $2,14 \text{ kg/m}^3 = 2.14 \cdot 10^6 \text{ mg/m}^3$ , dakle koncentracija od  $2 \text{ mg/m}^3$  odgovara približno 2 ppm .

### 2.3.3. Proizvodnja ozona

Ozon se proizvodi na mjestu gdje se koristi jer je njegovo skladištenje nepraktično. Poznato je nekoliko načina proizvodnje ozona, prema vrsti reakcije su kemijska sinteza i električna sinteza koja ima 4 podvrste. Za industrijske svrhe se najčešće koristi elektrolitička sinteza ozona. Princip elektrolučne sinteze ozona je sljedeći; kisik u plinovitom stanju protječe između dvije električki nabijene ploče pod visokim naponom (**Slika 3.**). Napon koji se koristi kreće se između 600 V i 20 kV izmjenične struje, ovisno o razmaku između elektroda i masenom protoku kisika. Pri protoku molekularnog kisika kroz električno polje dolazi do pucanja kovalentne veze između atoma kisika. Iz 3 molekule kisika ( $\text{O}_2$ ) nastaju 2 molekule ozona ( $\text{O}_3$ ). Količina ozona koja je potrebna za eliminaciju MO u zraku je od 0.1-0.3 ppm-a, odnosno, 0.0001 % volumenski (Eko, i sur., 2019). Stoga je ukupna potrebna količina ozona relativno mala. Tako da je to još jedna od prednosti ozoniranja atmosfere jer ne zahtijeva opsežna postrojenja za proizvodnju ozona.



**Slika 3.** Prikaz elektrolučne sinteze ozona (Deng i sur., 2019).

#### 2.3.4. Nedostaci primjene ozona

Bitan nedostatak obogaćivanja atmosfere ozonom je to da je takva atmosfera štetna po zdravlje osoblja što omogućuje primjenu ozona isključivo kada ljudi ne borave u prostoru. Zbog toga je pogodniji za male komore za zrenje nego za zrione. Povrh toga, ako se ozon koristi u kombinaciji sa ultraljubičastim (UV) zračenjem treba obratiti pozornost na valnu duljinu UV zračenja jer ozon apsorbira UV zračenje valne duljine 254 nm i oslobađa ga u infracrvenom dijelu spektra kao toplinu, što u konačnici oslabljuje inhibitorno djelovanje UV zračenja na razvoj MO (Parisi i Kimlin, 1997).

#### 2.4. Zrenje sira u modificiranoj atmosferi

Zrenje sira u modificiranoj atmosferi primjenjuje se u svrhu inhibicije rasta eventualno prisutnih patogenih MO u siru, budući da primjena ozona nema utjecaj na MO u siru. Djelovanje modificirane atmosfere tijekom zrenja sira ne svodi se samo na inhibitorni učinak na rast MO, već i na inhibitorni učinak na neke enzimske reakcije. Primjenom tako modificiranih uvjeta zrenja sira teži se preciznijoj kontroli procesa zrenja sira i osiguravanju kvalitete gotovog proizvoda (sira).

##### 2.4.1. Opis primjene modificirane atmosfere

Modificirana atmosfera najčešće se sastoji od čistog ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) ili smjese ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) i dušika ( $\text{N}_2$ ). Utjecaj modificirane atmosfere na tijek zrenja zasniva se na svojstvima primjenjenih plinova. Dušik, za razliku od kisika prisutnog u zraku, mikrobiološki inertan te ne uzrokuje oksidaciju niti razvoj aerobnih MO. Ugljični dioksid je plin koji nastaje nizom biokemijskih reakcija te je topiv u vodi. Također ne podržava rast i razvoj aerobnih MO, no teži ka uravnoteženoj koncentraciji u okolini i u namirnici. Upravo to je svojstvo koje privlači puno pozornosti. Otapanjem  $\text{CO}_2$  u slobodnoj vodi u siru, dolazi do nastanka ugljične kiseline i smanjenja pH okoline, što u krajnosti ima inhibitorni utjecaj na rast MO. Snižavanje pH vrijednosti dovodi do inaktivacije enzima i promjene proteinskih struktura što u konačnici narušava metaboličke reakcije MO i strukturu njihove stanične membrane.

Kako su biokemijske promjene u siru uzrokovane metaboličkim reakcijama MO u siru, prestankom ili usporavanjem istih omogućuje se stabilizacija i produljenje roka upotrebe sira.

#### 2.4.2. Utjecaj modificirane atmosfere na razvoj mikroorganizama MO

**Tablica 1.** Proučavani mikroorganizmi i optimalne smjese plinova za inhibiranje rasta mikroorganizama (Khoshgozaran i sur., 2012).

Referenca	Vrsta sira	Smjesa plinova (%)						
		BMK	Psihotrofi	Mezofili	Pseudo-monas spp	Kvasci	Plijesni	Entero-bakterije
Garabal (2010)	San Simon da Costa	NA	NA	50CO <sub>2</sub> /50N <sub>2</sub>	NA	≥ 50CO <sub>2</sub>	≥ 50CO <sub>2</sub>	NA
Eliot i sur. (1998)	Mozzarella	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	NA	50CO <sub>2</sub> /50N <sub>2</sub> , 100N <sub>2</sub> , 100CO <sub>2</sub>	10-100% CO <sub>2</sub>	NA
Alves i sur. (1996)	Mozzarella	NA	100CO <sub>2</sub>	NA	NA	100CO <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	NA
Maniar sur. (1994)	Zrnati sir	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	NA	NA	NA	NA	NA
Mannhein i Soffer (1996)	Zrnati sir	NA	NA	NA	NA	100CO <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	NA
Olare i sur. (2002)	Cameros (svježi kozji sir)	NA	100CO <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	NA	NA	NA	NA
Papaioannou i sur. (2007)	Grčki albuminski sir	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	NA	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>
Dermiki i sur. (2008)	Myzithra Kalathaki	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	NA	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub> , 60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub> , 60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub> , 60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub>
Gammarello i sur. (2009)	Stracciatella	BR	BR	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>	75CO <sub>2</sub> /25N <sub>2</sub>	BR	BR	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>
Esmer i sur. (2009)	Crottin de Chavignol	NA	NA	20CO <sub>2</sub> /80N <sub>2</sub>	NA	20CO <sub>2</sub> /80N <sub>2</sub>	20CO <sub>2</sub> /80N <sub>2</sub>	NA
Favati i sur. (2007)	Provolone	30CO <sub>2</sub> /70N <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	100 CO <sub>2</sub> (za aerobne), VP (za anaerobne)	NA	100CO <sub>2</sub>	20CO <sub>2</sub> /80N <sub>2</sub>	NA
Gammarello i sur. (2009)	Apulijski svježi sirevi	50CO <sub>2</sub> /50N <sub>2</sub>	NA	BR	50CO <sub>2</sub> /50N <sub>2</sub> , 90CO <sub>2</sub> /10N <sub>2</sub>	BR	BR	NA
Temiz i sur. (2009)	Lor	60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub> , 70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	NA	60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub> , 70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub> , 70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>
Temiz (2010)	Kashar	NA	NA	100CO <sub>2</sub>	NA	100CO <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	NA
Gonzalez-Fandos i sur. (2000)	Cameros	NA	100CO <sub>2</sub>	100CO <sub>2</sub>	NA	BR	BR	100CO <sub>2</sub>
Del Nobile i sur. (2009)	Ricota	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub>	BR	95CO <sub>2</sub> /5N <sub>2</sub> , 70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>

NA-nije analizirano, BR- bez rezultata

**Tablica 1.** prikazuje proučavane mikroorganizme i optimalne smjese plinova za inhibiranje rasta svakog MO. Modificirana atmosfera ima značajan utjecaj na sir zbog toga što sadrži CO<sub>2</sub> koji je djelotvoran pri sprječavanju mikrobnog kvarenja sireva i produljenja vijeka trajanja, što demonstrira inhibitorni utjecaj CO<sub>2</sub> na rast MO kvarenja. Učinak na kvarenje može se objasniti produljenjem lag faze i smanjenje stope rasta tijekom logaritamske faze jer se mikroorganizmi moraju prilagoditi novim atmosferskim uvjetima (Farber, 1991; Olarte, 2002).

#### 2.4.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK su mikroorganizmi čije metaboličke reakcije stvaraju mliječnu kiselinu, tako da same po sebi zakiseljavaju medij u kojem se nalaze. Optimalan pH za rast i razvoj BMK kreće se između 5,5, i 6,5, no mogu preživjeti i kiseliji medij sa pH vrijednošću do 4,5 (Blackwell, 2018). Takve karakteristike ih čine otpornima na pakiranje u modificiranoj atmosferi čiji je osnovni princip stabilizacije sira upravo inhibicija biokemijskih reakcija snižavanjem pH vrijednosti pomoću ugljične kiseline. Pod slabim utjecajem modificirane atmosfere rasti i razvoj BMK bi trebao biti neometan, a pri intenzivnijim utjecajem, broj BMK ne bi trebao značajno opadati. Navedena očekivanja potvrdilo je istraživanje (Maniar i sur. 1994) gdje je broj BMK u svježem siru ostao nepromijenjen unatoč modificiranoj atmosferi (Maniar i sur., 1994).

#### 2.4.2.2. Psihotrofne bakterije

Utjecaj modificirane atmosfere na psihotrofne bakterije može počivati na tome da je topivost CO<sub>2</sub> u vodi veća pri nižoj temperaturi, a samim time i njegovo inhibitorno djelovanje kroz snižavanje pH. S obzirom na to da su psihotrofne bakterije raznovrsna i složena populacija bakterija, djelovanje modificirane atmosfere ovisi uvelike o vrsti bakterija. Psihotrofne vrste prisutne u siru su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, i *Streptococcus*. Uz to što mogu pridonijeti kvarenju sira ako njihov razvoj nije kontroliran, ti MO su anaerobne prirode (Blackwell, 2018). Takva karakteristika upućuje na to da odsutstvo kisika u modificiranoj atmosferi nema učinka na rast i razvoj u siru prisutnih psihotrofa. U istraživanju učinka različite temperature skladištenja uz modificiranu atmosferu na rast psihotrofa prema, primijećeno je da je modificirana atmosfera uz nisku temperaturu skladištenja (od 4 do 7°C) učinkovita inhibitorna metoda (Moiru i sur., 1993).

#### 2.4.2.3. Stafilocoki

Neke vrste stafilokoka mogu proizvesti toksine štetne za ljudsko zdravlje. Prema potrebi za kisikom su fakultativni anaerobni MO, optimalni pH 6 – 7,5 (Blackwell, 2018). Uzevši navedeno u obzir, očekivani inhibitorni mehanizam modificirane atmosfere zasnovan je na snižavanju pH nastajanjem ugljične kiseline i trebao bi biti dodatno pospješen nižom temperaturom skladištenja. Rezultati istraživanja provedena o utjecaju sastava modificirane atmosfere potkrepljuju očekivane rezultate jer je rast bakterije inhibiran u svim uzorcima (Eliot i sur., 1998)

#### 2.4.2.4. Koliformi

Koliformne bakterije su gotovo sveprisutne bakterije u okolini te su kao takve pokazatelj pravilne, odnosno, nepravilne higijene tijekom cijelog procesa proizvodnje sira. U sirarstvu su opasne jer mogu uzrokovati trovanje hranom i ugrožavaju zdravlje ljudi. Prema pH okoline, preferiraju pH vrijednosti od 6- 7,5 što ih čini osjetljivima na kiselije medije (Blackwell, 2018). Ta karakteristika navedenih bakterija upućuje da je modificirana atmosfera uspješna metoda za inhibiciju rasta ove vrste bakterije. Tvrdnju potkrepljuju rezultati istraživanja u kojem je zabilježeno opadanje broja živih stanica koliforma pri upotrebi modificirane atmosfere sa 95% ili više CO<sub>2</sub> (Gammariello i sur., 2000).

#### 2.4.2.5. *Listeria monocytogenes*

Od 1970-ih, *Listeria monocytogenes* prepoznata je kao uzročnik bolesti prenošen u određenim vrstama sireva. Prijavljene epidemije listerioze povezane s konzumacijom sira izazvale su veliku zabrinutost prema *L. monocytogenes*. Psihrofilna svojstva bakterije i činjenica da preferira blago kiselo okruženje čine sir idealnim medijem za njen rast i razvoj. No činjenica da je *L. monocytogenes* aerobna bakterija čini ju osjetljivim na odsutstvo kisika koje je svojstvo pakiranja u modificiranoj atmosferi. Prema tome, modificirana atmosfera može negativno utjecati na rast i razvoj dotične bakterije. Zapaženo je da je povećanje koncentracije CO<sub>2</sub> do 20% bilo učinkovitije u sprječavanju rasta od jednostavnog smanjenja koncentracije O<sub>2</sub> u siru *Stilton* sa plemenitom plijesni, pri temperaturama skladištenja temperaturama (2–8 °C) (Whitley i sur., 2000).

#### 2.4.2.6. *Clostridium sporogenes*

Chen i Hotchkiss (1991) su istražili rast *Clostridium sporogenes* inokulirane u svježem siru, primjenom otopljenog ugljičnog dioksida, u čemu nisu uočili značajan učinak CO<sub>2</sub> na rast *C. sporogenes*. Nije primijećen rast u skuti u atmosferi koja sadrži/ne sadrži CO<sub>2</sub>. Zaključili su da je izostanak rasta kod *C. sporogenes* vjerojatno je bio povezan s učinkom nepovoljnog pH i temperature u kombinaciji, ne s CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.3. Fizikalno-kemijski utjecaji

Studije su pokazale da različite smjese plinova usporavaju fizikalno-kemijsku degradaciju kao što su oksidacija, lipoliza i proteoliza, koji su sažeti u **Tablici 2**.

**Tablica 2.** Promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući pH, oksidaciju, lipolizu i proteolizu (Khoshgozaran i sur., 2012).

Referenca	Vrsta sira	Smjesa plinova (%)			
		pH	Oksidacija	Lipoliza	Proteoliza
Maniar i sur. (1994)	Cottage	100CO <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Pintado i Malcata (2000)	Requeijão	NA	NA	100CO <sub>2</sub> za tretmane na svim temp., 50CO <sub>2</sub> /50N <sub>2</sub> i 100N <sub>2</sub> na 4°C	NA
Olarte i sur. (2002)	Cameros (svježi kozji sir)	100CO <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Demini i sur. (2008)	Myzithra Kalathaki	60CO <sub>2</sub> /40N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>
Gammariello i sur. (2009)	Stracciatella	30CO <sub>2</sub> /70N <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Esmer i sur. (2009)	Crottin de Chavignol	30CO <sub>2</sub> /65N <sub>2</sub> /5O <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Rodriguez-Aguilera i sur. (2011)	Sir sa zrenjem površinskim plijesnima	0O <sub>2</sub> /27±6CO <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Favati i sur. (2007)	Provolone	100CO <sub>2</sub> i 20CO <sub>2</sub> /80N <sub>2</sub>	NA	30CO <sub>2</sub> /70N <sub>2</sub>	VP
Gammariello i sur. (2009a)	Giuncata (svježi sir)	VP	NA	NA	NA
	Primosale (svježi sir)	90CO <sub>2</sub> /10N <sub>2</sub>	NA	NA	NA
Temiz i sur. (2009)	Lor	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	70CO <sub>2</sub> /30N <sub>2</sub>	40CO <sub>2</sub> /60N <sub>2</sub>	NA
Temiz (2010)	Kashar	100CO <sub>2</sub>	NA	NA	NA

NA – nije analizirano, VP – vakumirano pakiranje

#### 2.4.3.1. Promjene u pH

Po pitanju promjene pH vrijednosti u modificiranoj atmosferi, može se pretpostaviti da bi pH vrijednost trebala težiti ka smanjivanju. Između ostalog to je jedna od mehanizama inhibitornog djelovanja modificirane atmosfere. No unatoč tome treba uzeti u obzir i poroznost proizvoda, jer u nekim slučajevima do očekivanih promjena može doći samo na površini uzorka, ukupno gledano ne bi dalo očekivane rezultate primjene metode. Usporedba između vakuumiranih uzoraka, uzoraka u atmosferi zraka i modificiranoj atmosferi, na 4 °C pokazala je veće pH vrijednosti u sirutkinim sirevima u modificiranoj atmosferi koje su se smanjivale proporcionalno koncentraciji CO<sub>2</sub> (Dermiki i sur., 2008).

#### 2.4.3.2. Oksidacija

Oksidacija kao proces prisutan kod svih vrsta sireva donosi nepoželjne promjene u okusu, mirisu i izgledu. Proces oksidacije može se spriječiti uklanjanjem kisika i izloženosti svjetlu koje ju pospješuje. Što se tiče usporene oksidacije, pakiranje u vakuumu je jedna od najzastupljenijih metoda, no nije uvijek prihvatljiva za sir jer narušava fizičku strukturu sira. Umjesto toga, modificirana atmosfera predložena je kao pouzdana metoda za minimizirati sve nepoželjne promjene senzornih karakteristika, zajedno s produljenjem roka trajanja proizvoda. U provedenom istraživanju primijećeno je da su turski sirevi od sirutke (Lor) skladišteni na 4 °C, u svim tretmanima na 31. dana skladištenja, u atmosferi od 60% i 70% CO<sub>2</sub>, pokazali nižu oksidaciju (Temiz i sur., 2009).

#### 2.4.3.3. Lipoliza

Značajan biokemijski proces u stvaranju konačnog okusa sira. Lipolitički enzimi potječu iz mlijeka, mikroorganizama, i vjerojatno sirila. Tijekom lipolize dolazi do razgradnje masti triglicerida koji su većinski zastupljenih u mlijeku. Produkti lipolize su masne kiseline i glicerol koji nose ključnu ulogu u oblikovanju mirisa, okusa i arome sira. Oslobođene masne kiseline su osnova za stvaranje brojnih aromatskih spojeva prisutnih u zrelim sirevima. Istraživanje demonstrira da su na kraju skladištenja, zračno i vakuumirano pakirani uzorci, u usporedbi sa sirom izloženom modificiranoj atmosferi u pakiranju (ispod 40%, 60% i 70% CO<sub>2</sub>), imali su višu indeks kiselosti (IK), a od tri modificirane atmosfere najveći IK odredili su plinskoj smjesi (40% CO<sub>2</sub> / 60% N<sub>2</sub>). Indeks kiselosti je vrijednost dobivena izražavanjem količine u miligramima, kalijeva hidroksida (KOH) potrebnog za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina koje su produkti lipolize. Autori su povezali dobivene rezultate s razgradnjom



slobodnih masnih kiselina, prvenstveno putem oksidacije koja je umanjena u pakiranju s modificiranom atmosferom (Temiz i sur., 2009).

#### 2.4.3.4. Proteoliza

Proces proteolize uvelike utječe na senzorna svojstva sira. Razgradnjom kazeina oslobađaju se aminokiseline koje utječu na aromu i okus sira, a razgradnja kazeina mijenja teksturu sirnog tijesta. Stupanj proteolize izražava se slobodnim aminokiselinama prisutnim u uzorku. Do proteolize u siru dolazi utjecajem enzima prisutnih u mlijeku i enzima mikrobiološkog podrijetla. Utjecaj modificirane atmosfere na proces proteolize uglavnom je zasnovan na smanjenu broja i aktivnosti MO. Istraživanje je pokazalo da je u vakuumiranom siru stupanj proteolize bio veći nego kod sira pakiranog u modificiranoj atmosferi, no to su pripisali većem broju MO u vakuumskom pakiranju (Gonzalez-Fandos i sur., 2000).

#### 2.4.3. Nedostaci zrenja u modificiranoj atmosferi

Zrenje sira u modificiranoj atmosferi kao i ozoniranje atmosfere komplicira postupak osoblju koje vrši njegu sira, ako su u pitanju zrione. Prema tome, modifikacija atmosfere pogodnija je za male komore za zrenje. Plinovi koji se koriste za stvaranje modificirane atmosfere moraju biti izdvojeni iz zraka, pročišćeni, ukapljeni i punjeni u posebne visokotlačne spremnike što zahtjeva posebne uvjete skladištenja plinova u posebnim postrojenjima te iziskuje dodatne troškove koji posljedično imaju utjecaj i na cijenu procesa proizvodnje sira te konačnog proizvoda.. Osim to, utjecaj modificirane atmosfere nije uvijek u potpunosti predvidiv što predstavlja rizik i zahtijeva precizno definirane uvjete i održavanje istih kroz relativno duge vremenske periode zrenja sira.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju dosad objavljenih publikacija u području primjene modificiranih uvjeta zrenja sira te činjenica istaknutih u ovom završnom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Primjena visokog tlaka učinkovita je u eliminaciji MO bez toplinske obrade i može ju zamijeniti.
2. Intenzitet tretmana ograničen je fizikalnim svojstvima sira i nije pogodna za sve vrste sireva.
3. Primjena visokog tlaka ima koristan i primjenjiv utjecaj na trajanje zrenja sira, no dodatna istraživanja su dobrodošla.
4. Ozoniranje atmosfere u zrionama sira uspješno je u sprječavanju nastajanja biofilma i kontroli mikrobiološke kvalitete zraka te ima zanemariv utjecaj na senzorna svojstva sira.
5. Korištenjem modificirane atmosfere tijekom zrenja sira može se kontrolirati razvoj senzornih svojstava u siru iz biokemijske i mikrobiološke perspektive.
6. Sve spomenute metode doprinose smanjenju mikrobiološkog opterećenja sira i procesa proizvodnje, te produljenju roka trajanja gotovog proizvoda.
7. Svaka od metoda može se primjenjivati zasebno, no mogućnost kombinirane primjene nudi precizniju i raznovrsniju kontrolu procesa proizvodnje i zrenja sira.

## 4. LITERATURA

1. Alfio Parisi, Michael G. Kimlin (1997), Ozone and ultraviolet radiation, <https://core.ac.uk/download/pdf/11035413.pdf> [Pristup 22.9.2023.]
2. Alves RMV i sur. (1996) Stability of sliced Mozzarella cheese in modified-atmosphere packaging.. *J Food Prot* 59(8):838–844
3. Anonymous (2022), Difference between Gram-Positive and Negative Bacteria Gram-Negative vs. Gram-Positive Bacteria, *Microbiologynote.com*, <https://microbiologynote.com/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/> [Pristup: 18. rujna 2023.]
4. Balasubramaniam, V. M., Martinez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 6(1), 435–462. DOI: [10.1146/annurev-food-022814-015539](https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539). [pristup: 22.9.2023.]
5. Blackwell W. *Microbiology in Dairy Processing Challenges and Opportunities*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2018.
6. Del Nobile MA. i sur. (2009), Modified atmosphere packaging to improve the microbial stability of Ricotta, *African J Microbiol Res* 3(4):137–142
7. Deng L. I sur. (2019) Ozone generation process by means of dielectric barrier discharge Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review, [https://www.researchgate.net/figure/Ozone-generation-process-by-means-of-dielectric-barrier-discharge\\_fig1\\_335023644](https://www.researchgate.net/figure/Ozone-generation-process-by-means-of-dielectric-barrier-discharge_fig1_335023644) [pristup: 24.9.2023.]
8. Dermiki M. i sur, (2008), Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese, *LWT Food Sci Technol* 41(2):284–29
9. Eko Y. I sur., Characteristics of Ozone Generation in Air Fed Cylindrical DBD Using Low Frequency, *Advances in Social Science, Education and Humanities Research*, volume 474 (2019)
10. Eliot S.C. i sur.,(1998) Stability of shredded Mozzarella cheese under modified atmospheres *J Food Sci* 63(6):1075–1080
11. Esmer O.K. i sur.(2009). The effect of modified atmosphere and vacuum packaging on the physicochemical, microbiological, sensory and textural properties of Crottin de Chavignol cheese. *Food Sci Technol Res* 15(4):367–376
12. Favati F, Galgano F, Pace AM (2007). Shelf-life evaluation of portioned Provolone cheese packaged in protective atmosphere, *LWT Food Sci Technol* 40(3):480–488

13. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health, <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006> [Pristup: 22. rujna 2023.]
14. Gammariello D. i sur. (2009), Shelf life of Stracciatella cheese under modified-atmosphere packaging *J Dairy Sci* 92(2):483–490
15. Garabal JI. i sur. (2010.) Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: effects of storage under vacuum and different modified atmospheres *J Dairy Sci* 93(5):1868–1881
16. Gonzalez-Fandos E. i sur. (2000), Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmospheres.. *Food Microbiol* 17 (4):407–414
17. Kasandra – Zorica Ivančić (2019), Protecting birds and people - story of Livno cheese production, <https://panorama.solutions/en/solution/protecting-birds-and-people-story-livno-cheese-production> [Pristup 24.9.2023.]
18. Kaushal A. i sur. (2020.) Schematic representation of a high pressure processing (HPP) vessel. *A Review on the Effect of High Pressure Processing (HPP) on Gelatinization and Infusion of Nutrients*, [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-a-high-pressure-processing-HPP-vessel\\_fig1\\_341534398](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-a-high-pressure-processing-HPP-vessel_fig1_341534398) [Pristup: 24.9.2020.]
19. Khoshgozaran S., Azizi M.H., Bagheripoor-Fallah N. Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. *Dairy Science & Technology*. 2012; 92 (1):1-24.
20. Maniar A.B. i sur.(1994), Modified atmosphere packaging to maintain direct set Cottage cheese quality. *J Food Sci* 59(6):1305–1308
21. Mannheim C.H., Soffer T (1996), Shelf-life extension of Cottage cheese by modified atmosphere packaging. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technol* 29(8):767–771
22. Nuñez M., Calzada J., del Olmo A. High pressure processing of cheese: Lights, shadows and prospects. *International Dairy Journal*. 2019.
23. Olarte C. i sur.(2002), The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres , *Food Microbiol* 19 (1):75–82
24. Papaioannou G. I sur.(2007), Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging., *Int Dairy J* 17(4):358–364
25. Podolak, R., Whitman, D., & Glenn Black, D. (2020). Factors Affecting Microbial Inactivation during High-Pressure Processing in Juices and Beverages: A Review. *J Food Prot.* 83(9), 1561–1575. [doi.org/10.4315/JFP-20-096](https://doi.org/10.4315/JFP-20-096). [Pristup: 22.9.2023]

26. Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venancio A., Lima N., Use of Ozone To Reduce Molds in a Cheese Ripening Room. *Journal of Food Protection*. 2003; 66 (12): 2355–2358
27. Sperat-Czar A., Roustel S., Periera D. *Cheese ripening guide*. Francuska, Profession fromager; 2018.
28. Temiz H. (2010), Effect of modified atmosphere packaging on characteristics of sliced Kashar cheese. *J Food Proc and Pres* 34(5):926–943
29. Temiz H. i sur,(2009), Shelf life of Turkish whey cheese (Lor) under modified atmosphere packaging, *Int J Dairy Technol* 62(3):378–386