

Održivost svježeg sira pakiranog u vakuumu i modificiranoj atmosferi

Marasović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:681025>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Iva Marasović

750/PI

ODRŽIVOST SVJEŽEG SIRA
PAKIRANOG U VAKUUMU I
MODIFICIRANOJ ATMOSFERI

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Irene Barukčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Katarina Lisak Jakopović, doc. dr. sc. Maria Ščetara i Snježane Šimunić, tehničke suradnice.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Ireni Barukčić na odabranoj temi, stručnim savjetima i vođenju kroz cjelokupni diplomski.

Srdačno se zahvaljujem doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, doc. dr. sc. Mariu Ščetaru te doc. dr. sc. Svenu Karloviću na stručnoj pomoći te korisnim savjetima

Veliko hvala Snježani Šimunić na podršci i pomoći tijekom izrade diplomskog rada u laboratoriju, te tehničarima Darjanu Pipiću i Goranu Bosancu.

Posebna zahvala ide mojim roditeljima te Pauli, Florijanu i Andrei koji su me podržavali i bili uz mene tijekom svih ovih godina, kao i mojim prijateljima koji su podijelili sa mnom sve lijepe i manje lijepe trenutke studentskih dana.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno- biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODRŽIVOST SVJEŽEG SIRA PAKIRANOG U VAKUUMU I MODIFICIRANOJ ATMOSFERI

Iva Marasović 750/PI

Sažetak: Proizvedeni svježi sir od kravljeg mlijeka pakiran je u atmosferi zraka, vakuumu te modificiranoj atmosferi s dva omjera plina (60% N₂:40% CO₂; 70% N₂:30% CO₂) te su uzorci skladišteni u hladnjaku 18 dana. Uzorci su izuzimani i analizirani svaka tri dana. Kiselost je padala (s početnih 4,66 na 4,47), a broj naraslih kolonija mikroorganizama postupno rastao tijekom skladištenja u svim uzorcima, s tim da su te promjene kod uzoraka pakiranih u modificiranoj atmosferi i vakuumu bile znatno usporene (kiselost ne pada ispod 4,50). Svi uzorci postigli su visoke senzorske ocjene (17,63 – 19,73), no uz minimalne razlike najbolje ocjene postigli su uzorci pakirani u modificiranoj atmosferi s omjerom plinova 70% CO₂:30% N₂ (prosječan broj bodova 18,26). Vrijednosti ostalih ispitivanih parametara također su pokazali kako vakuum i modificirana atmosfera znatno produljuju rok trajanja uz očuvanje fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava svježeg sira.

Ključne riječi: svježi sir, vakuum, modificirana atmosfera, pakiranje, trajnost

Rad sadrži: 45 stranica, 16 slika, 9 tablica, 51 literaturnih navoda, 1 shema

Jezik izvornika: hrvatski

Rad u tiskanom i digitalnom (CD) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc. dr. sc. Irena Barukčić*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Katarina Lisak Jakopović, doc. dr.sc. Mario Ščetar*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Mario Ščetar
2. doc. dr. sc. Irena Barukčić
3. prof. dr. sc. Rajka Božanić
4. doc. dr. sc. Sven Karlović (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujan 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology and Engineering
Laboratory of Technology of Milk and Milk Products
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

QUALITY AND SHELF LIFE OF FRESH CHEESE PACKED UNDER VACUUM AND MODIFIED ATMOSPHERE

Iva Marasović 750/PI

Abstract: After production process, the fresh cheese was packed under normal atmosphere, vacuum and modified atmosphere with two types of gases in different ratio (60% N₂:40% CO₂; 70% N₂:30% CO₂) and stored in fridge for 18 days. The analysis was conducted every three days. Results showed that during a storage period acidity (from 4,66 to 4,47) was decreasing steadily, while colonies of microorganisms were multiplying. However, samples of a fresh cheese packed under vacuum and modified atmosphere retard the decrease of acidity (no result under 4,50) and microbiological growth. Scores of sensory evaluations were high for all samples (17,63 – 19,73) but the best result had a sample packed under MA with ratio 70% CO₂:30% N₂ (average score 18,26). Other analysis confirmed that packaging under vacuum and MA can prolonged shelf life of fresh cheese while preserving its physico - chemical and sensory characteristics.

Keywords: fresh cheese, vacuum, modified atmosphere, packaging, shelf life

Thesis contains: 45 pages, 16 figures, 9 tables, 51 references, 1 shema

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and digital version (pdf format) is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Irena Barukčić*, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance: *Katarina Jakopović Lisak* PhD, *Mario Ščetar*, PhD Assistant Professor

Reviewers:

1. *Mario Ščetar*, PhD, Assistant professor
2. *Irena Barukčić*, PhD, Assistant Professor
3. *Rajka Božanić*, PhD, Full, Professor
4. *Sven Karlović*, PhD, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 25. September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 Definicija sira	2
2.2 Svježi sir definicija i proizvodnja.....	2
2.3 Karakteristike svježeg sira.....	3
2.4 Mikrobna kultura.....	4
2.5 Mikrobiologija sira.....	4
2.6 Rok trajanja i kvarenje svježeg sira.....	6
2.7 Pakiranje svježeg sira	6
2.7.1. Pakiranje u normalnoj atmosferi	7
2.7.2. Pakiranje u vakuumu (VA).....	7
2.7.3. Pakiranje u modificiranoj atmosferi (MAP).....	7
2.7.3.1. Plinovi u MAP-u.....	8
2.7.3.2. MAP u siru.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1 Materijali	10
3.1.1 Uzorci mlijeka i sira	10
3.1.2. Kemikalije i reagensi potrebni za provođenje kemijskih i mikrobioloških analiza.....	10
3.2 Metode rada.....	10
3.2.1 Proizvodnja sira.....	11
3.2.2 Analize mlijeka i sira.....	16
3.2.2.1 Određivanje kiselosti pH-metrom	16
3.2.2.2 Određivanje titracijske kiselosti po Soxhlet-Henkelu.....	17
3.2.2.3. Određivanje udjela mliječne masti butirometrijskom metodom po Gerberu	18
3.2.2.4. Određivanje gustoće mlijeka	19
3.2.2.5. Određivanje udjela suhe tvari	19
3.2.2.6. Određivanje udjela pepela	20
3.2.2.7. Određivanje teksture sira	20
3.2.2.8. Određivanje boje sira.....	21
3.2.2.9. Mikrobiološke analize mlijeka i sira	21
3.2.2.10. Senzorska analiza sira	22
3.2.2.11. Ostala mjerenja u pakiranim uzorcima sira	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1 Sastav ishodišnog mlijeka, aktivna i titracijska kiselost uzoraka svježeg sira tijekom 18 dana skladištenja.....	27

4.2. Mikrobiološka analiza svježeg sira kroz 18 dana skladištenja	28
4.2.1 Ukupan broj mikroorganizama.....	28
4.2.2 Enterobacteriaceae.....	29
4.2.2. Kvasci i plijesni	30
4.3 Senzorne analize uzoraka sira	31
4.4 Tekstura sira	35
4.5 Boja sira.....	37
4.6 Sastav modificiranje atmosfere u pakovini svježeg sira.....	38
4.7 Mliječna mast, suha tvar i pepeo svježeg sira	39
5. ZAKLJUČCI	41
6. POPIS LITERATURE.....	42

1. UVOD

Svježi sir je tradicionalna namirnica s područja Sjeverne Hrvatske i Slavonije, ali zbog visoke nutritivne vrijednosti te pogodnog utjecaja na zdravlje ljudi, i danas se često konzumira. Po tradicionalnom postupku proizvodnje sir se dobiva od svježeg, nepasteriziranog mlijeka, dok se industrijski uglavnom koristi pasterizirano mlijeko. U oba slučaja, dobiveni sir ima ograničen rok trajanja od 3-7 dana, što u današnjem svijetu globalne hrane predstavlja problem kako proizvođačima tako i potrošačima. Ipak, svježi sir uživa sve veću popularnost zahvaljujući trendu konzumacije minimalno procesirane hrane. Zato konzerviranje ovog proizvoda predstavlja izazov za prehrambenu industriju. Jedan od načina kako zadržati nutritivna svojstva te očuvati senzorske karakteristike svježeg sira, a istovremeno produljiti rok trajanja je pakiranje sira u vakuum te modificiranu atmosferu.

Modificirana atmosfera se postiže uklanjanjem postojeće atmosfere u pakiranju i zamjenom ili upuhivanjem mješavine plinova u točno određenom omjeru (Rodriguez- Aguilera i Oliveria, 2009). Cilj pakiranja namirnica u vakuum i modificiranu atmosferu je eliminacija kisika koji pogoduje rastu aerobnih bakterija, proteolitičkih bakterija, kvasaca i plijesni te uz pravilan način skladištenja značajno produljuju rok trajanja zapakiranih namirnica (Murcia i sur., 2003).

Upravo je produljenje roka trajanja svježem siru, uz očuvanje nutritivnih i senzorskih karakteristika istog, bio cilj ovog rada. Svježi sir koji se proizveo u laboratoriju od pasteriziranog mlijeka pakiran je u normalnu atmosferu, vakuum te modificiranu atmosferu te skladišten u hladnjak na 18 dana. Kako bi se pratila promjena na siru, uzorci su analizirani svaka 3 dana (s izuzetkom prvih 6 dana) na kemijska (pH, °SH, udio mliječne masti, suhe tvari, te pepela) fizikalna (tekstura, boja, masa sira, volumen sirutke) i mikrobiološka svojstva.

Osnovna svrha rada bila je utvrditi da li vakuum ili modificirana atmosfera mogu produljiti rok trajanja svježem siru, a da ne izazovu promjene na kemijskim, fizikalnim, mikrobiološkim ili senzorskim karakteristikama svježeg sira.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Definicija sira

Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sireva dozvoljena je upotreba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima i/ili dozvoljenih kiselina za koagulaciju (Pravilnik, 2009).

Riječ „sir“ u svjetskim jezicima potječe od grčke riječi *formos*, *formoi* što znači košara jer se sir cijedio u tim košarama te poprimao njezin oblik (Matijević, 2015). Danas je sir jedna od najpopularnijih namirnica, a kroz povijest se razvio čitav niz vrsta. Radi lakše sistematizacije sirevi se dijele u razne skupine, no najznačajnija je ona po udjelu vode u bezmasnoj tvari sira: ekstra tvrdi sir (<51%), tvrdi sir (49-56%), polutvrdi sir (54-59%), meki sir (>67%), svježi sir (69-85%), te po udjelu mliječne masti u suhoj tvari na ekstramasne ($\geq 60\%$), punomasne (≥ 45 i <60%), masne (≥ 25 i <45%), polumasne (≥ 10 i <25%) i posne (<10%) (Pravilnik, 2009). Pri izradi ovog diplomskog rada provedena su istraživanja na svježem posnom siru.

2.2 Svježi sir definicija i proizvodnja

Svježi sir su sirevi koji sadrže 65-85% vode, a proizvode se mliječno kiselom fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline (Božanić, 2015). Svježi sirevi razvrstavaju se po konzistenciji i prema sadržaju masti u suhoj tvari. Konzistencija im može bit pastozna (kao npr. kod *Quark*), zrnata (npr. *Cottage cheese*) ili lisnata. Prema udjelu masti, svježi sirevi pripadaju svim stupnjevima masnoće, s tim da porastom masnoće raste udio suhe tvari sira, a snižava se udjel proteina i laktoze (Kirin, 2016). Brojne zemlje svijeta imaju svoje inačice svježeg sira pa je tako i tradicionalna namirnica sjeverozapadne Hrvatske poznat pod nazivima poput prgice, turoš, svježi mekani sir, kuhani sir (Tratnik, 2012). Takvi sirevi se proizvode od neobrađenog sirovog punomasnog mlijeka koje se ostavi spontano kiseliti (2-3 dana). Zatim se obere površinski izdvojeno vrhnje, a preostalo mlijeko se blago zagrijava na rubu štednjaka tijekom 2-3 sata kako bi došlo do koagulacije (Sabljak i sur., 2013). Nastali gruš se reže na kockice dimenzija otprilike 5 x 5 cm kako bi se izdvojila sirutka, a potom cijedi preko sirnih gaza ili cijedila (Kalit, 2016)

Industrijski postupci proizvodnje se razlikuju od onih u kućanstvima prije svega u sirovini. U industriji se koristi standardizirano, homogenizirano i pasterizirano mlijeko, ali može se koristiti i mlijeko ugušćeno ultrafiltracijom ili dodavati mlijeko u prahu (Kirin, 2016). Također,

zgrušavanje se ne odvija spontano već se potiče dodatkom određenog soja bakterija mliječne kiseline (mezofilne, termofilne ili kombinirane) te manje količine sirila kako bi se postigla odgovarajuća čvrstoća gruša (Kirin, 2009). Obzirom na primijenjenu temperaturu dva su načina podsiravanja: hladno (20-26 °C) i toplo (27-32 °C). Tijekom podsiravanja prati se kiselost te kad se postigne određena vrijednost fermentacija se prekida, a nastali sirni gruš se reže i ostavlja kako bi se izdvojila potrebna sirutka. Cijeđenje gruša od preostale sirutke se provodi korištenjem jednog od postupaka cijeđenja preko sirne marame, vreće, setova perforiranih posudica, postupkom Schulenberg, itd. (Kirin, 2016) Postupak je gotov kad se dobije udio vode propisan Pravilnikom (2009), nakon čega slijedi pakiranje i skladištenje na +4°C (Kirin, 2009). Zajednička karakteristika svih svježih sireva, bez obzira jesu li proizvedeni tradicionalnim ili industrijskim postupcima je da ne prolaze fazu zrenja nego su nakon proizvodnje odmah spremni na konzumaciju (Božanić, 2015).

2.3 Karakteristike svježeg sira

Istraživanja u ovom radu provođena su na svježem posnom siru (< 10 % mliječne masti u suhoj tvari) koji se konzumira nedugo nakon proizvodnje.

Na konzistenciju utječe omjer stvorene mliječne kiseline i proteina. Kako u svježem siru nastaju visoke koncentracije mliječne kiseline, slabije se veže kalcij za kazein pa je posljedično tekstura sira rastresita, konzistencija lomljiva i krta, a sam sir je izrazito bijele boje (Kirin, 2009; 2016). Zbog visokog udjela mliječne kiseline i niskog pH (ispod 5,0) tekstura sira je manje kohezivna te rastezljiva (Tunick, 2016). Jedna od karakteristika teksture svježeg sira je prozračnost koja se postiže laganim miješanjem gruša (Popović – Vranješ, 2015).

Vrijednost pH svježeg sira iznosi oko 4,8 te je blizu izoelektrične točke kazeina, što konačnom proizvodu daje prepoznatljivu kiselost koja se odražava ne samo u okusu, već i u mirisu (Cindrić, 1997). Kako je svježiji sir zbog visokog udjela vode podložan mikrobiološkoj kontaminaciji, niska kiselost, uz senzorsku analizu, ima važnu ulogu u mikrobiološkoj zaštiti tog sira. Kiselost je glavno senzorsko obilježje okusa, uz umjerenu aromu po mlijeku i blagu slanost. Slična svojstva povezuju se i s mirisom koji je blag i po mlijeku uz miris po kiselosti, bez ikakvih stranih primjesa (Božanić i sur., 2010). Kako bi se postigla karakteristična sensorika svježeg sira, potrebno je koristiti mlijeko dobre kvalitete, pridržavati se higijene i čistoće tijekom tehnološkog procesa proizvodnje i pakiranja te kontrolirati temperaturu fermentacije i koagulacije (Popović- Vranješ, 2015).

2.4 Mikrobna kultura

Svježi sirevi proizvode se uz korištenje odgovarajućih kultura bakterija mliječne kiseline čije su glavne zadaće:

- hidroliza laktoze,
- proteoliza bjelančevina sira,
- lipoliza mliječne masti,
- grušanje mlijeka,
- tvorba plinova za oblikovanje sirnih okašaca,
- tvorba mirisa sira,
- inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama (Tratnik, 2012).

Mikrobne kulture mogu biti sastavljene od jednog soja iste vrste bakterija pa se radi od jednovrsnim kulturama, ili od više vrsta, više različitih sojeva iste vrste ili više sojeva različitih vrsta koje se nazivaju mješovite kulture (Kirin, 2016). Obzirom na optimalne temperature na kojima djeluju, mljekarske kulture se dijele na mezofilne i termofilne. U ovom istraživanju korištena je mezofilna kultura bakterija mliječne kiseline koja može rasti u rasponu temperatura od 10 do 40°C, s tim da joj je optimalna temperatura između 20 i 30°C (Tratnik, 2012). Njezina primarna uloga je grušanje koje nastaje kao posljedica mliječno-kiselog vrenja, a mljekarske kulture korištene u tu svrhu nazivaju se osnovne kulture (Kirin, 2016). U tom procesu dolazi do razgradnje laktoze na mliječnu kiselinu uz djelovanje enzima, ponajviše homofermentativnih vrsta bakterija mliječne kiseline npr. *Lactobacillus* i *Lactococcus*. Kad se stvore uvjeti, heterofermentativne vrste (*Leuconostoc* i *Lactococcus*) počinju s metaboliziranjem tvari arome - diacetila, hlapljive kiseline, pa tako korištena kultura utječe i na sensoriku sira (Tratnik, 1998). Te različite vrste bakterija su u sinergističkom odnosu tj. rast jedne vrste svojim hidrolitičkim metabolizmom uvjetuje rast druge vrste (Havranek i sur., 2010). Nastala mliječna kiselina dovodi do nastajanja kiselog medija spuštajući pH na vrijednost blizu pH vrijednosti izoelektrične točke kazeina dajući mu time stabilnost. Osim toga, tako niske vrijednosti pH štite svježi sir od moguće kontaminacije (Cindrić, 1997).

2.5 Mikrobiologija sira

Sir nije sterilna namirnica, te uz bakterije mliječne kiseline sadrži i druge mikroorganizme koji prvenstveno potječu iz mlijeka. Svježi sir koji se proizvodi iz zdravstveno i mikrobiološko ispravnog mlijeka okarakteriziran je mikrobiološkim kriterijima koji su unutar sadrži zakonski propisanih granica. Do kontaminacije mlijeka, odnosno sira, dolazi u slučaju upale vimena ili

nehigijenske manipulacije, prerade ili skladištenja namirnice (Sabljak i sur., 2013). Na rast mikroorganizama tijekom proizvodnje sira značajno utječu pasterizacija mlijeka, brzina zakiseljavanja i temperatura dogrijavanja grušā. Pasterizacijom se mogu inaktivirati štetni mikroorganizmi ili smanjiti njihov broj na prihvatljivu razinu, a brzim zgrušavanjem uslijed naglog pada pH vrijednosti također dolazi do značajnog opadanja broja potencijalnih kontaminanata u siru. Međutim, temperature grušanja (20-30°C) pogodno utječu na rast svih, pa tako i patogenih mikroorganizama (HAH, 2016).

Enterobakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja, a opasnost za zdravlje predstavljaju endo- i egzotoksini koje luče kad prevladaju mikrofloru domaćina. Najzastupljenije enterobakterije u mlijeku i siru su *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella* sp. (Markov i sur., 2009). U patogene mikroorganizme koji mogu biti prisutni u svježem siru ubrajaju se Gram negativne bakterije kao što su *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Aerobacter*, a koje izazivaju cijeli niz negativnih promjena na siru poput sluzavosti, teksturalnih promjena, neugodnog mirisa i gubitka okusa (Mannheim i Soffer, 1996). Kvasci i plijesni su također česti kontaminanti mlijeka, a kako ne preživljavaju pasterizaciju, njihovo prisustvo u siru znak je naknadne kontaminacije mlijeka (Sobota Šalamon i sur., 2010). S obzirom na takvu mikrobiološku raznolikost, definirani su različiti kriteriji na temelju kojih se određuje zdravstvena ispravnost svježeg sira (Tablica 1 i 2).

Tablica 1. Pregled obaveznih mikrobioloških kriterija za svježi sir (Uredba Komisije, 2005)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentna analitička metoda	Faza u kojoj se kriterij primjenjuje	Mjere u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		N	c	m	M			
Nedozreli meki sirevi (svježi sirevi) dobiveni od mlijeka ili sirutke koji su pasterizirani ili još jače termički obrađeni	Koagulaza-pozitivni stafilocoki	5	2	10 cgu /g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 ili 2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanja higijene proizvodnje. Ako se otkriju vrijednosti > 10 ⁵ cfu/g, serija sira mora se ispitati na prisutnost stafilokoknih enterotoksina.

Tablica 2. Pregled preporučenih mikrobioloških kriterija za svježi sir (Ministarstvo poljoprivrede, 2011)

3.5.2.	Meki (svježi) sirevi od pasteriziranog mlijeka	Preporučeni			
		<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n. u 25g
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g	
	Koagulaza pozitivni stafilocoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g	
	Kvasci	5	1	m=10 ² cfu/g M=10 ³ cfu/g	
	Plijesni	5	1	m=10 ² cfu/g M=10 ³ cfu/g	

2.6 Rok trajanja i kvarenje svježeg sira

Rok trajanja definiran je kao period vremena unutar kojeg će prehrambeni proizvod, skladišten u preporučenim uvjetima, ostati siguran za potrošnju, ali i zadržati svoja poželjna i karakteristična senzorska, kemijska, fizička, mikrobiološka i funkcionalna deklarirana svojstva (Jalilzadeh i sur., 2015). Kod svježeg sira ovisi o brojnim faktorima uključujući kvalitetu sastojaka, sastav i strukturu proizvoda, uvjete procesiranja, karakteristike pakiranja te skladištenje. Posljedično, nastaju promjene koje ograničavaju definirani rok trajanja svježeg sira, a mogu biti kemijsko-fizikalne (izdvajanje masti, želiranje otopine proteina, sinereza, kristalizacija minerala), kemijske (neenzimsko posmeđivanje, oksidacija masti) i biokemijske (rast mikroorganizama, enzimska degradacija, fermentacija) (Jalilzadeh i sur., 2015). Te promjene mogu učiniti sir bezukusnim do neupotrebljivim, čineći ga ekonomski neisplativim, a ukoliko se jave patogeni mikroorganizmi, i potencijalno opasnim za zdravlje ljudi (Rodriguez – Aguilera i Oliveira, 2009a). Rast mikroorganizma uzročnika kvarenja prije svega ovisi o dostupnosti nutrijenata, aktivitetu vode, pH, ionskoj jakosti, temperaturi te sastavu atmosfere u pakiranju. S obzirom na visok udio vode, nisku koncentraciju soli te bogatstvo nutrijentima, svježi sir je pogodna podloga za razvoj mikroorganizama čime se ubrzava kvarenje i ograničava rok trajanja na svega par dana (Dermiki i sur., 2007).

2.7 Pakiranje svježeg sira

Zapakiran sir je svaki pojedinačni proizvod koji se sastoji od sira i ambalaže u koju je sir upakiran prije nego što je stavljen u prodaju. Svježi se sirevi danas pakiraju u različitu ambalažu kao što su plastične folije ili posude različitog oblika (Lisak Jakopović, 2015). Kako bi se omogućila održivost sira tijekom skladištenja, pakiranjem se proizvod nastoji zaštititi od

dehidratacije te mu se reducirati broj nepoželjnih mikroorganizama, a pri tom očuvati nutritivna i senzorska svojstva tog proizvoda (Jalilzadeh i sur., 2015). Donedavno se taj izazov pokušao riješiti uporabom konzervansa, poput sorbata, ili termičkim konzerviranjem, ali zbog sve veće potražnje za minimalno procesiranom hranom, mljekarska industrija je odgovorila novim načinima pakiranja (Mannheim i Soffer, 1996).

Stoga je predmet ovog istraživanja bilo ispitati mogućnost pakiranja svježeg sira primjenom normalne atmosfere, vakuuma i modificirane aktivne atmosfere.

2.7.1. Pakiranje u normalnoj atmosferi

Standardna atmosfera, u kojoj se do sad tradicionalno pakirao svježi sir, sastoji se od oko 78% N₂, 21 % O₂, 0,03 % CO₂, te različite koncentracije vodene pare i tragova inertnih i plemenitih plinova. Ovakav način pakiranja ne uzrokuje nikakve promjene na senzoricima sira, ali dolazi do ubrzanog kvarenja zbog gubitka ili navlačenja vlage, reakcija s kisikom, rasta aerobnih mikroorganizama, primjerice plijesni ili aerobnih bakterija (Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2009b). Unutar 5 do 7 dana ovako zapakiran sir izgubi značajno na svojim funkcionalnim svojstvima, uz promjene na senzoricima te postaje upitne zdravstvene ispravnosti.

2.7.2. Pakiranje u vakuumu (VA)

Vakuumsko pakiranje je metoda pakiranja kod koje dolazi do evakuacije zraka. Na taj način stvaraju se anaerobni/mikroaerofilni sustavi koji onemogućuju rast aerobnim mikroorganizmima. Za ovu metodu pakiranja potrebno je koristiti barijerni ambalažni materijal nepropusan za kisik i vodenu paru, primjerice polipropilen (Vujković i sur., 2007). Ova metoda pakiranja je jeftinija u odnosu na pakiranje u modificiranoj atmosferi, ali glavna mana joj je dehidracija svježeg sira koja se manifestira u tvrđoj teksturi (Murcia i sur., 2003).

2.7.3. Pakiranje u modificiranoj atmosferi (MAP)

Metoda pakiranja u modificiranoj atmosferi (MAP) temelji se na zamjeni plinova iz zraka s atmosferom plinova točno određenog sastava. Vrsta plinove i omjer plinova u pakovini ovisi o brojnim čimbenicima kao što su stopa propusnosti plinova (CO₂ i O₂), temperatura skladištenja, udio vlage u siru, tip proizvoda te njegova težina (Rodriguez- Aguilera i Oliveira, 2009c). Eliminacijom kisika i uvođenjem plinova određenih svojstava (najčešće korišteni CO₂ i N₂) uz odgovarajuće temperature hlađenja, inhibira se rast aerobnih mikroorganizama, proteolitičkih bakterija, itd. čime se suzbijaju kemijske, fizikalno- kemijske te biokemijski uzročnici kvarenja (Murcia i sur., 2003). Smatra se da MAP može produžiti rok trajanja za 50 do 400 % (Pintado i Malcata, 2000) jer plinovi koji okružuju namirnicu smanjuju respiraciju i produkciju etilena,

odgađaju zrenje i omekšavanje proizvoda istovremeno zadržavajući organoleptička i nutritivna svojstva proizvoda. Modificirana atmosfera može se postići pasivno i aktivno. U slučaju pasivne modificirane atmosfere, konačan sastav plinova ovisi o permeabilnosti te vrsti pakirnog materijala pa se konačan omjer plinova postiže s vremenom, što nije pogodno za skladištenje namirnica s kraćim rokom trajanja kao što je svježi sir (Rodriguez- Aguilera i Oliveira, 2009c). Stoga je u ovom istraživanju korištena aktivna modificirana atmosfera koja se postiže u dvije faze - prvo se osigurava vakuum, a potom injektira željena mješavina plinova koja se tijekom skladištenja ne mijenja značajno.

Neke od prednosti korištenja modificirane atmosfere kao načina pakiranja su:

- produljuje rok trajanja što omogućava bolju kvalitetu proizvoda
- mala ili nikakva potreba za kemijskim konzervansima nudeći tako „prirodnije“ i „zdravije“ proizvode
- transport proizvoda na dalje relacije.

Međutim neki od nedostataka MAP-a su:

- potreba za različitim omjerima plinova za svaki tip proizvoda
- zahtjevi za specijaliziranom i skupom opremom
- u slučaju oštećenja pakiranja, svi benefiti se gube (Rodriguez- Aguilera i Oliveira, 2009a).

Do sad su se provodila istraživanja na brojnim vrstama namirnica pakiranih u MAP, ali najbolje rezultate pokazali su meso i riba kao što su: puretina, piletina, krumpir, bakalar i som (Murcia i sur., 2003).

2.7.3.1. Plinovi korišteni u MAP-u

Plinovi koji se koriste za pakiranje u modificiranoj atmosferi moraju biti fungicidni, nezapaljivi, netoksični i bez utjecaja na sensoriku proizvoda. Uz to poželjne karakteristike su pristupačnost, cijena te lakoća raspršivanja (Vujković i sur., 2007) pa se najčešće koriste kombinacije CO₂, O₂ i N₂. Pri tom se može reći da je ugljikov dioksid najvažniji plin jer je njegova glavna uloga inhibicija rasta brojnih mikroorganizama uzročnika kvarenja ponajviše Gram negativnih bakterija i plijesni. No, neki autori naglašavaju loš utjecaj CO₂ na sensoriku namirnica, pa se najčešće koristi u kombinaciji s drugim plinovima (Gonzalez- Fandos i sur., 2000).

2.7.3.2. MAP u siru

Od samih početaka pa do danas, istraživanja provedena na temu pakiranja siru u MAP rezultirala su kontradiktornim zaključcima uglavnom zbog velikog broja ispitivanih vrsta sireva

te različitih omjera korištenih plinova (Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2009b). Pioniri ovih istraživanja bili su Zimmerman i Kester koji su 1960. godine ustanovili da hermetički zatvorena pakiranja, vakuum pakiranja te ona u inertnoj atmosferi odgađaju površinsko kvarenje zrnatog svježeg sira uzrokovanog aerobnim bakterijama. Iste godine, Kosikowski i Tsantilis (1960.) potvrdili su djelovanje navedenih načina pakiranja na usporen rast kvasaca i plijesni. U narednim godinama nije se uspio dokazati utjecaj pakiranja u inertnim atmosferama (100% N₂ i 100% CO₂) već se otkrio i negativan utjecaj korištenih plinova na senzoričku. Mnogo godina kasnije, Maniar i suradnici (1994.) su usporedili konzervirajući učinak tri različite mješavine plinova - 100% CO₂, 75% CO₂/ 25% N₂ i 100% N₂ te pakiranja u zraku na svježem, zrnatom siru. Zaključili su da najbolje rezultate pokazuju pakiranja s visokim udjelima CO₂ (75% i 100%) koji uz produljenje roka trajanja ne uzrokuju diskoloraciju ili bilo kakvo drugo negativno svojstvo okusa koje je do tad bilo zabilježeno. Rezultate tog istraživanja potvrdili su Mannheim i Soffer (1996) koji su osim toga dokazali i da se rok trajanja svježem siru pakiranom u atmosferi od 100% CO₂ i čuvanom na temperaturi hladnjaka produlji za 150%. Dosad su provedena brojna istraživanja na raznim vrstama sira kao što su primjerice Parmigiano Reggiano (Romani i sur., 1999), Cheddar (Taniwaki i sur, 2001), Havarti (Mortensen i sur., 2003) ili Mozzarella (Alam i Goyal, 2007) te se pokazalo kako MAP i vakuum usporavaju rast kvasaca, održavaju konstantan broj soja *E. coli* u uzorku sira, štite od fotooksidacije, itd. Optimalni omjer plinova za pakiranje svježeg sira u modificiranu atmosferu je 67,1% CO₂, 26,3% N₂ i 6,6% O₂, kojim se značajno produljuje rok trajanja siru jer se inhibira rast Gram negativnih bakterija, kvasaca i plijesni, istovremeno ne narušavajući nikakve senzorske karakteristike (Rosenthal i sur., 1991).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1 Materijali

3.1.1 Uzorci mlijeka i sira

Za eksperimentalni dio ovog istraživanja korišteno je sirovo kravlje koje je nabavljeno s dva zagrebačka mlijekomata. Prosječan sastav korištenog mlijeka prikazan je u Tablici 2. Za podsiravanje mlijeka korištena je mezofilna sirarska kulture CHN-22 (Christina Hansen, Hersholm, Danska). Sir je pakiran u plastične vrećice PA 20 µm/ PE 70 µm (DORA PAK, Zagreb, Hrvatska) pri čemu su u pakiranjima modificarnom atmosferom korištene dvije različite smjese plinova u omjerima 40%CO₂ : 60%N₂ i 30%CO₂ : 70%N₂ (Messer d.o.o., Zaprešić, Hrvatska).

3.1.2. Kemikalije i reagensi potrebni za provođenje kemijskih i mikrobioloških analiza

- 0,1 M otopina NaCl (Carlo Erba Group, Cornaredo, Italija)
- 2%-tna alkoholna otopina fenoftaleina (GramMol, Zagreb, Hrvatska)
- 5%-tna otopina kobaltovog sulfata (CoSO₄ x 7H₂O) (Acros Organic, Geel, Belgija)
- 90-91%-tna sumporna kiselina (H₂SO₄) (GramMol, Zagreb, Hrvatska)
- Izoamilni alkohol (Merck- Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- Sumporna kiselina 90% (T. T. T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- 9%-tna fiziološka otopina (NaCl)
- 2%-tna otopina natrijeva citrata (C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O) (GramMol, Zagreb, Hrvatska)
- Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija - Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Milan, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje kvasaca i plijesni - Sabouraud Dextrose Agar CAF 50 (Biolife, Milano, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja bakterija - Tryptic Glucose Yeast Agar (Biolife, Milano, Italija)

3.2 Metode rada

Preliminarno istraživanje

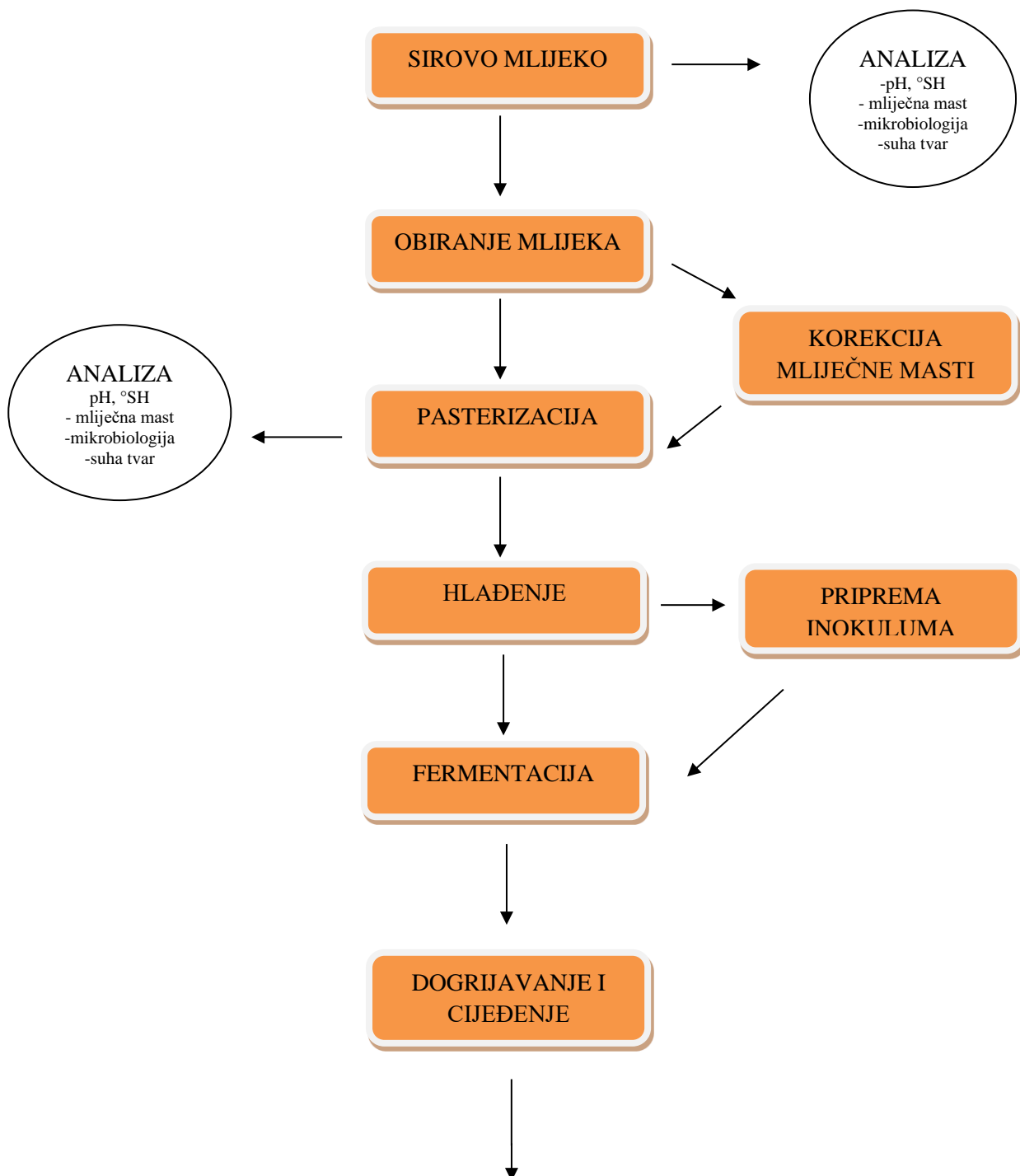
Kako bi se standardizirala proizvodnja svježeg sira za sve provedene paralele u ovom istraživanju, prvo je provedeno preliminarno istraživanje s dvije paralele. Sirovo mlijeko je po samom primitku analizirano te obrano na 1,2 % mliječne masti. Jedna paralela uzorka mlijeka obrađena je niskom pasterizacijom (65 °C/30min), a druga visokom pasterizacijom (85 °C/10

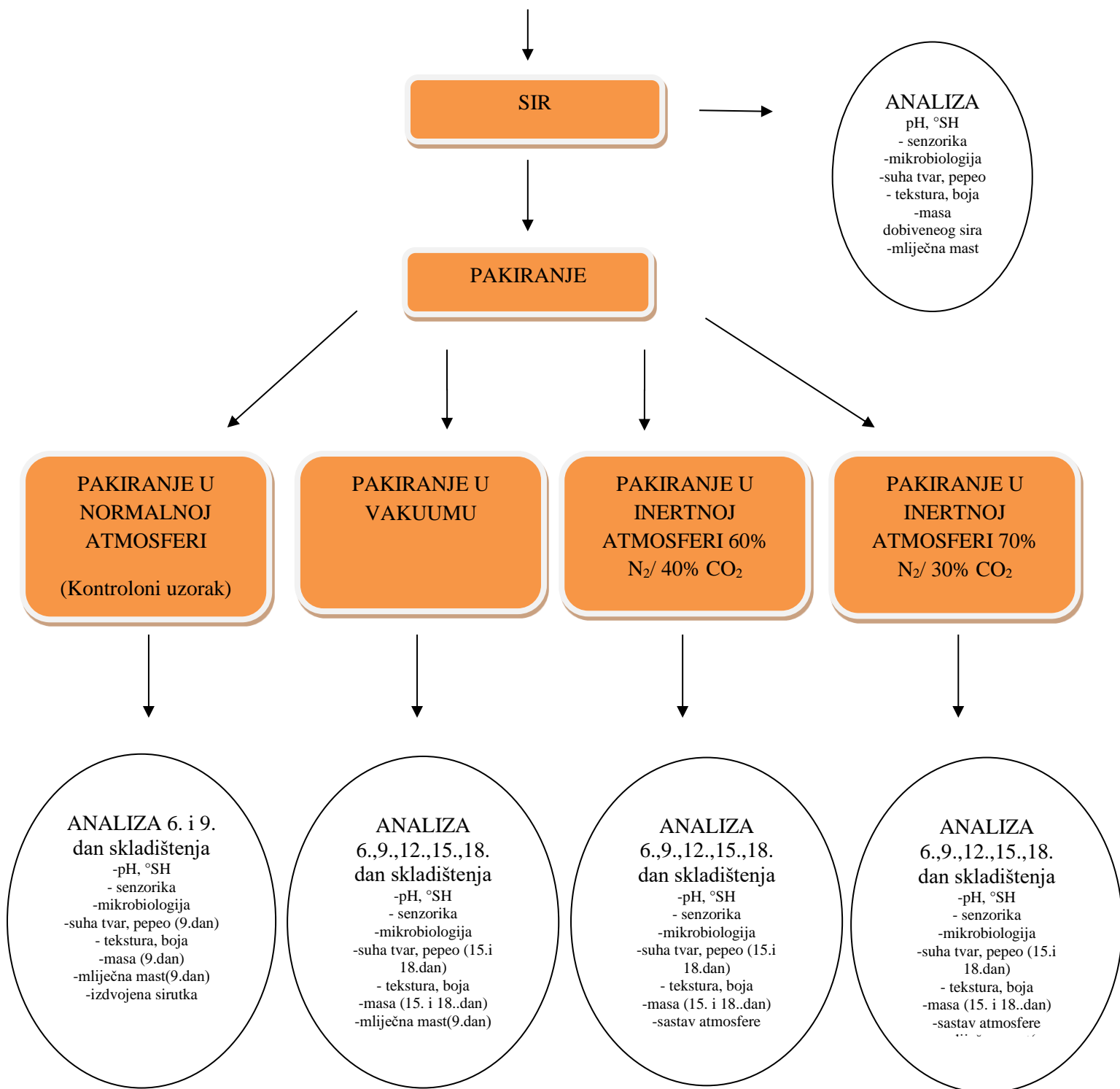
min). Ustanovljeno je kako se visokom pasterizacijom postiže za oko 20 % veći prinos sira. Također, da bi se odredio rok trajanja kontrolnom uzorku, proizvedeni svježi sir zapakiran u normalnu atmosferu čuvan je na temperaturi hladnjaka i analiziran svakih 3 dana. Do kvarenja svježeg sira došlo je u oba slučaja nakon 9 dana.

3.2.1 Proizvodnja sira

Po jednom pokusu se 10 L mlijeka mliječno kiselom fermentacijom pri 30°C uz dodatak mezofilne sirarske starter kulture CHN-22 prerađivalo u sir. Postupak proizvodnje sira prikazan je u Shemi 1.

Shema 1. Proizvodnja svježeg sira





Obiranje mliječne masti

Sirovo mlijeko s prethodno određenim udjelom mliječne masti se zagrije na temperaturu od 40°C kako bi se mliječna mast otopila, kako bi postupak obiranja bio lakši. Mlijeko se ulije u prihvatni bubanj separatora (EP-80, Tehcnica, Dulles, SAD) i tek kada se postigne dovoljan broj okretaja, otvara se ručica separatora čime počinje proces obiranja. U postavljane posude,

na jednom kraju separatora izlazi vrhnje, a na drugom obrano mlijeko. Uzme se uzorak mlijeka na kojem se odredi udio mliječne masti. Željeni postotak masti u obranom mlijeku je 1,2%.

Korekcija mliječne masti

Ako se obiranjem ne postigne udio masti od 1,2 % potrebno je provesti korekciju udjela mliječne masti dodavanjem vrhnja prema formuli (Sabadoš, 1998):

Nakon što su svi parametri poznati, izračuna se masa vrhnja koja se treba dodati u mlijeko kako bi se napravila korekcija udjela mliječne masti:

$$m_{\text{(vrhnja)}} = \frac{\text{željeni udio mliječne masti (\%)} - \text{dobiveni udio mliječne masti (\%)}}{\text{udio masti u vrhnju (\%)} - \text{željeni udio mliječne masti (\%)}} \times m_{\text{(mlijeka)}}$$

Prethodno se udjeli mliječne masti u mlijeku i u vrhnju određuju butimetrijskom metodom kako je opisano dalje u tekstu (vidi 3.2.2.3. c). Masa mlijeka izračunava se pomoću gustoće određivane laktodenzimetrom (vidi 3.2.2.4.).

Pasterizacija mlijeka

Obrano mlijeko se izlije u kotao te se zagrijava plamenicima uz neprestano miješanje (Slika 1.). Provodi se visoka pasterizacija na temperaturi od 85°C u trajanju od 10 minuta kako bi se omogućila interakcija između denaturarnih proteina sirutke i κ -kazeina, te se na taj način povećao prinos sira. Nakon provedene pasterizacije, mlijeko se skida s plamena i postavlja u bazen s hladnom vodom i ledom gdje se hladi do temperature od 30 °C.



Slika 1. Pasterizacija mlijeka u laboratoriju (vlastita fotografija)

Priprema inokuluma i fermentacija

U sterilnim uvjetima pripremi se inokulum tako da se u 100 mL mlijeka doda potrebna količina kulture CHN 22 (Christian Dansen, Hersholm, Danska) izračunata na osnovu uputa proizvođača. Sadržaj se dobro promješa i stavi u termostat (ST 40 L, INKOLAB, Zagreb, Hrvatska) na 30 °C/30 minuta.

Pripremljeni inokulum doda se u obrano, pasterizirano i temperirano mlijeko. Dobro se promiješa, prekrije zaštitnom folijom i stavi na inkubaciju u termostat podešen na 30 °C. Fermentacija traje od 18-22 sata, a zaustavlja se nakon što je postignuta pH vrijednost od 4,6-4,7.

Dogrijavanje i cijedenje gruša

Dobiveni gruš reže se na kockice kako bi otpustio što više sirutke (Slika 2.) nakon čega se sir dogrijava u vodenoj kupelji (MEMory CARD, XL, Memmert, Njemačka) na 45-50 °C u trajanju do 2 sata. Potom se sir pusti da odstoji oko 30 minuta. Slijedi cijedenje gruša od ostatka sirutke na perforiranim sitima (Slika 3.) i odstajavanje u hladnjaku u trajanju 24 h. Slijedeći dan se odredi volumen izdvojene sirutke, a ocijedeni sir se izvaže kako bi se odredio prinos sira. Također, provedu se sve potrebne analize ne dobivenom siru.



Slika 2. Rezanje gruša na kockice
(vlastita fotografija)



Slika 3. Cijeđenje gruša (vlastita fotografija)

Pakiranje sira

Dobiveni sir se reže na četvrtine i stavlja u plastične vrećice (Slika 4. i 5.). Pakiranje u normalnoj atmosferi provodi se samo zatvaranjem vrećice na zavarivaču (Audion 421 SK, Weesp, Nizozemska) vrećica dok se ostala pakiranja (u vakuumu i modificiranoj atmosferi) provode na uređaju za vakumiranje s komorom (DORADO , JUNIOR DIGIT, Italija) s mješaćem plinova (Witt, Gasetecnik GmbH & Co, KM 20-3, Njemačka). Sir zapakiran u te vrećice se izvaže te skladišti u hladnjaku tijekom 18 dana.



Slika 4. Sir pakiran u normalnoj atmosferi **Slika 5.** Sir pakiran u vakuumu
(vlastite fotografije)

3.2.2 Analize mlijeka i sira

Svim proizvedenim uzorcima sira određivani su idući parametri:

- Masa sira u pakiranju
- Sastav atmosfere (samo za sir pakiran u modificiranoj atmosferi)
- Volumen izdvojene sirutke
- pH
- °SH
- Mikrobiološka analiza
- Sensorika

a zadnji dan analizira se uz to i:

- Udio suhe tvari
- Udio pepela
- Udio mliječne masti.

3.2.2.1 Određivanje kiselosti pH-metrom (Bajt i sur., 1998)

pH mlijeka

Prije uporabe elektroda je kalibrirana prema uputama proizvođača, nakon čega je isprana destiliranom vodom i osušena staničevinom. Tako pripremljena elektroda uranja se u mlijeko, a vrijednost pH se očita na zaslonu pH-metra (Technische Werkstätten GmbH pH 3110, WTW,

Njemačka). Nakon uporabe elektroda se ponovno ispiru s destiliranom vodom, suši staničevinom i uranja u otopinu KCl-a.

pH sira

Destilirana voda se prokuha te ohladi na 25 °C. U tarioniku se sir otopi s tom destiliranom vodom u omjeru 3:10, te se pH mjeri uranjanjem elektrode u homogenizirnu otopinu sira i vode.

3.2.2.2 Određivanje titracijske kiselosti po Soxhlet-Henkelu (Božanić i sur., 2010)

Ova titracijska metoda je službena titracijska metoda za određivanje kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda u Republici Hrvatskoj (Pravilnik, 2004). Mlijeko se titrira s 0,25 M NaOH, a rezultati se izražavaju u stupnjevima po Soxhlet- Henkelu (°SH) koji odgovaraju broju mililitara 0,25 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenoftalein. No, u važećem Pravilniku navedena je modifikacija te metode u kojoj se koristi 20 mL mlijeka i 1 mL fenoftaleina se titrira do stabilne crvenkaste boje. Kiselost se izračuna po slijedećoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times f \times 2$$

a - broj mL 0,1M NaOH utrošene za neutralizaciju 20 mL mlijeka

f - faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M = 1

a) Postupak za mlijeko :

U dvije Erlenmeyerove tikvice otpipetira se po 20 mL mlijeka. U prvu tikvicu se otpipetira 0,4 mL 5%-tne otopine kobaltova sulfata ($\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) te nastala boja predstavlja standardnu boju, odnosno onu nijansu do koje se treba titrirati u drugoj tikvici. U drugu tikvicu otpipetira se 1 mL fenoftaleina te se titrira 0,1 M NaOH do promjene boje u blijedo ružičastu, odnosno jednaku pripremljenoj standardnoj boji koja se mora zadržati 1 minutu. Prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times f \times 2$$

se izračuna vrijednost kiselosti izračene u stupnjevima po Soxhlet - Henkelu.

b) Postupak za sir

U tarioniku se odvaži 5 g sira te se otopi se destiliranom vodom temperature 50 °C. Pripremljena otopina kvantitativno se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu, nakon čega se doda 1

mL fenoftaleina te se titrira 0,1M NaOH do promjene boje u blijedocrvenu koja se zadržava dvije minute. Titracijska kiselost se izračuna po navedenoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times f \times 8$$

a - broj mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju 20 mL mlijeka

f - faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M = 1

8 – razrijeđenje

3.2.2.3. Određivanje udjela mliječne masti butirometrijskom metodom po Gerberu (Sabadoš, 1998)

Ova butirometrijska metoda temelji se na otapanju kazeina i zaštitne opne globula mliječne masti korištenjem sumporne kiseline. Kako bi se smanjila površinska napetost mlijeka i time olakšalo izdvajanje mliječne masti, dodaje se izoamilni alkohol. Mast se izdvaja centrifugiranjem nakon čega se količina izdvojene masti očitava na skali butirometra pri temperaturi od 65 °C.

a) Udio mliječne masti u mlijeku

Postupak:

U butirometar se otpipetira trbušastim pipetama 10 mL sumporne kiseline, nakon toga 11 mL mlijeka, te na kraju 1 mL izoamilnog alkohola. Pri tome se treba voditi računa da se pipetiranje vrši uz stijeku butirometra kako ne bi došlo do pogrešaka u mjerenju. Butirometar se začepi i dobro promućka kako bi se mlijeko u potpunosti otopilo. Dolazi do razvoja topline te mijenjanja boje u tamnosmeđu. Butirometar se postavlja u centrifugu (Nova Safety, Funke Gerber, Berlin, Njemačka) prethodno zagrijanu na 65 °C i centrifugira 5 minuta. Nakon centrifugiranja očita se rezultat na skali butirometra.

b) Određivanje udjela masti u siru

Postupak:

U staklenu čašu odvaži se 2-2,5 g uzorka sira (masa se zabilježi) i doda se 10 mL sumporne kiseline. Sadržaj se zagrijava na plamenu u vodenoj kupelji dok se u potpunosti ne otopi. Tada se sadržaj prelije u butirometar, a čaša se ispere s 9 mL sumporne kiseline, tako da ukupna količina dodane kiseline ne prelazi 19 mL. Na kraju se doda 1 mL izoamilnog alkohola,

butirometar se začepi, promućka i stavi u centrifugu prethodno zagrijanu na 65 °C te centrifugira 5 minuta. Postotak masti se očita na skali butirometra i izračuna na slijedeći način:

$$\% \text{ masti u siru} = m \times 11,33 / A$$

m – očitani postotak masti na butirometru

A – odvaga sira u gramima

c) Određivanje udjela masti u vrhnju (Carić i sur., 2000)

Postupak:

Uzorak vrhnja potrebno je razrijediti s 4 dijela vode, a dobiveni rezultat pomnožiti s 5 i 1,03. Razrijeđenje se vrši na slijedeći način: u Erlenmeyerovu tikvicu izvaže se 10 g vrhnja te doda 40 mL destilirane vode. Sadržaj tikvice mješa se u vodenoj kupelji na 40 °C. Sadržaj se prebaci u butirometar te je daljni postupak jednak određivanju masti u mlijeku po Gerberu.

3.2.2.4. Određivanje gustoće mlijeka (Bajt i sur., 1998)

Gustoća je fizikalno svojstvo mlijeka te predstavlja omjer mase i volumena. Ovisi o temperaturi pa se uz mjernu jedinicu g/cm³, izražava i referentna temperatura. Određuje je laktodenzimetrom (aerometrom) koji gustoću određuje po načelu Arhimedovog zakona prema kojem svako tijelo uronjeno u tekućinu prirodno gubi od svoje težine onoliko koliko teži njime istisnuti dio tekućine. Ovom metodom direktno se očitavaju rezultati.

Postupak:

Menzura se vrhom napuni mlijekom. Potom se u menzuru uroni laktodenzimetar tako da pliva u njoj. Nakon što se smiri plutanje, očita se laktodenzimetarski broj, odnosno gustoća te temperatura mlijeka.

3.2.2.5. Određivanje udjela suhe tvari (Pravilnik, NN 133/07)

Korištena je direktna metoda za određivanje udjela suhe tvari koja se temelji na isparavanju vode iz uzorka zbog sušenja u sušioniku na konstantnoj temperaturi od 102±2 °C do konstantne mase.

Postupak:

Prvo je potrebno pripremiti posudice u koje se usipa kvarcni pijesak u 1/3 volumena posudice. Nakon toga se posudica zagrije u sušioniku uz poklopac naslonjen na nju te suši barem 30

minuta. Zatvorena posudica premješta se u eksikator gdje se hladi do sobne temperature. Naposljetku se posudica izvaže na analitičkoj vagi (220-4NM, Kern & Sohn, Ballingen, Njemačka) a rezultat se zapiše. U tu posudicu se odvaže uzorak 10 mL mlijeka, odnosno 2-3 g sira i stavlja se u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na dva sata, također, s poklopcem pored posudice. Nakon dva sata posudica s poklopcem se suši u eksikatoru te važe. Postupak se ponavlja do konstantne mase, odnosno dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg. Udio suhe tvari izračunava se po slijedećoj formuli:

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100$$

3.2.2.6. Određivanje udjela pepela (Trajković i sur., 1983)

Prilikom određivanja udjela pepela, određuje se, zapravo, udio mineralnih tvari kojih u mlijeku, pa tako u siru je identificirano preko 40 različitih tvari. Dijele se na mikro- i makroelemente, te u mlijeku dolaze u obliku anorganskih ili organskih soli, dok je njihova zastupljenost između 0,6- 0,8 %.

Postupak:

Na početku izvođenja pokusa potrebno je napraviti pripremu porculanskih lončića koji se prvo suše u sušioniku na 158 °C, a zatim žare na 650 °C u Mufovoj peći (Iskraterm 3KPD, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska). Ohlađeni lončići do sobne temperature se važu na analitičkoj vagi. Doda se 2-3 g sira u izareni lončić koji se prvo s uzorkom suši u sušionku, a zatim žari u Mufovoj peći. Uzorak se hladi u eksikatoru do sobne temperature i zatim važe. Postupak se ponavlja do konstantne mase. Izračun se udjel pepea po formuli:

$$\% \text{ pepela} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100$$

3.2.2.7. Određivanje teksture sira (Foegeding i sur., 2003)

Tekstura svježeg sira određivana je analizom teksturalnog profila (engl. Texture Profile Analysis, TPA) ili metodom dvostrukog zagrizava. Ovom metodom se simulira dvostruki zagriz odnosno žvakanje na način da se uzorak stavlja na bazu analizatora i podvrgava dvostrukoj kompresiji pri čemu se sonda zadržava određeno vrijeme između ciklusa. Promjenu sile

potrebnu za kompresiju uzorka u podešenom vremenu mjeri računalni program koji rezultat zapisuje u obliku krivulje. Za određivanje teksture korišten je uređaj TA.HD Plus (SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer, Surrey, England) sa sondom promjera 6 mm. Dobiveni podaci su analizirani s Texture Exponent 32 softverom (verzija 3.0.5.0.). Uzorci sireva su rezani na kockice otprilike 5 x 5 cm, te kao takvi postavljeni na mjernu plohu instrumenta. Mjerenja su obavljena pri sobnoj temperaturi. Uzorci se podvrgavaju dvostrukoj kompresiji prema slijedećim parametrima: kalibracija visine: 40 mm brzina mjerenja: 1,0 mm/s brzina prije mjerenja: 1,0 mm/s brzina nakon mjerenja: 0.5 mm/s. Računalni program zapisuje krivulju prema promjeni sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu. Iz dobivenih rezultata očitava se tvrdoća, elastičnost i rad.

3.2.2.8. Određivanje boje sira

Mjerenje boje provedeno je pomoću uređaja Spectrophotometer CM-3500d (Konica Minolta, Nizozemska). Određivana su tri parametra boje: L (svjetlina), a (zeleno) i b (žuto). Prije svakog mjerenja instrument je standardiziran s bijelom i crnom keramičkom pločicom. Mjerenje je provedeno postavljanjem uzorka sira veličine otprilike 1 x 1 cm. Uzorak se poklopi te se na računalnom programu pokrene očitavanje.

3.2.2.9. Mikrobiološke analize mlijeka i sira (Bajt i sur., 1998)

U ovom istraživanju određivala se mikrobiološka kvaliteta (broj enterobakterija, kvasci i plijesni, te ukupan broj bakterija) sirovog mlijeka, pasteuriziranog mlijeka i svježeg sira. Uzorci svježeg sira analizirani su 1. dan te tijekom skladištenja odnosno 6., 9., 12., 15., 18. dan.

Mikrobiološka analiza navedenih uzoraka provodila se primjenom direktne metode naciepljivanja decimalnih razrijeđenja na odgovarajuće hranjive podloge i inkubacijom na prikladnim temperaturama.

Decimalna razrijeđenja pripravljena su tako da se 1 mL uzorka mlijeka, odnosno 1 mL homogeniziranog razrijeđenog uzorka sira sterilnim nastavkom mikropipete prenesio u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Dobiveno razrijeđenje u epruveti bilo je potrebno dobro promiješati na rotacijskoj mješalici (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka). Novim sterilnim nastavkom mikropipete uzme se 1 mL pripremljenog razrijeđenja i prenese u slijedeću epruvetu koja sadrži 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavlja dok se ne dobije željeni broj decimalnih razrijeđenja. Kod analiza sira bilo je potrebno prethodno pripremiti uzorak tako da se odvaga od 20 g svježeg sira usitni u tarioniku uz postupno dodavanje prethodno pripravljene

i na 45 °C zagrijane 2% -tne otopine natrijeva citrata. Homogenizirana otopina sira se prelije u steriliziranu i ohlađenu Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima te koristi kao ishodišno razrijeđenje za pripremu svih ostalih.

Uzorci namijenjeni za određivanje broja enterobakterija naciepljivani su ravnomjernim razmazivanjem 100µL decimalnog razrijeđenja pomoću štapića po Drigalskom po podlozi razlivenoj na Petrijevu ploču. Naciepljene ploče okreću se dnom prema gore i postavljaju na inkubaciju u termostat (Tip 14.02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na temperaturu od 37 °C/ 3 dana.

Metoda za određivanje broja kvasaca i plijesni započinje pipetiranjem 1 mL uzorka određenih decimalnih razrijeđenja, koristeći se pritom sterilnim nastavkom mikropipete, na sterilnu plastičnu Petrijevu zdjelicu. Uzorci se preliju s 10-12 mL prethodno pripremljene hranjive podloge (otopljena na 100 °C i ohlađena u vodenoj kupelji na temperaturi od 43 do 45 °C. Ploče se pažljivo, kružnim potezima, izmiješaju te nakon što se ohlade, okreću se i stavljaju u termostat na 30 °C.

Naciepljivanje uzoraka za određivanje ukupnog broja bakterija provodi se na isti način kao i kod određivanja broja kvasaca i plijesni u uzorku, Također, pripremljene podloge se inkubiraju u termostatu na 30 °C u trajanju od 72 sata.

Očitavanje rezultata

Po završetku zadane inkubacije broje se narasle kolonije. Za brojenje se odabiru one podloge na kojima je naraslo od 30 do 300 kolonija. Izračuna se broj naraslih kolonija po mL odnosno CFU (colony forming unit)/mL po formuli:

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nasaden volumen}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja}$$

3.2.2.10. Senzorska analiza sira (Božanić i sur., 2010)

Senzorsku analizu u ovom istraživanju provodila je skupina sastavljena od 4 panelista koja su ocjenjivali uzorke sira na prvi dan proizvodnje, te uzorke sira iz različitih pakiranja (normalna atmosfera, vakuum, atmosfera 60% N₂/ 40% CO₂ i 70% N₂ / 30% CO₂) tijekom skladištenja tj. 6., 9., 12., 15., 18. dan skladištenja. Ocjenjivani su boja, miris, konzistencija i okus, po slijedećem obrascu:

Tablica 3. Primjer obrasca za senzorsku analizu svježeg sira

DATUM:				
OCJENJIVAČ:				
OCJENJIVANO SVOJSTVO	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>			
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4
BOJA				
KONZISTENCIJA				
MIRIS				
OKUS				
UKUPNO				

Postupak:

Za svako svojstvo daje se ocjena od 1 do 5 s obzirom na kvalitetu tog svojstva, odnosno u slučaju uočavanja pogrešaka ili mana na pojedinom svojstvu sira, broj bodova se umanjuje ovisno o stupnju izraženosti te mane ili pogreške. Za svako svojstvo računa se srednja ocjena koja se zatim množi s faktorom za to svojstvo, te se tako dobiju ponderirani bodovi. Zbroj svih bodova pomnoženih s odgovarajućim faktorom uzimaju se kao ocjena senzorske analize, a maksimalan broj iznosi 20 (Tablica 4.).

Tablica 4. Obrazac za senzorsku ocjenu sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (sastavljeno prema Božanić i sur., 2010)

SENZORSKO SVOJSTVO	OPISNI PARAMETRI	OCJEN A	FAKTOR ZNAČAJNOSTI	MAX. BODOVI
Okus	Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma po kuhanom mlijeku, umjereno slan	4-5	2,0	10
	Preizražen okus mlijeka, preslaba aroma, nedovoljno slan, tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, kredast okus, tragovi stranih okusa	3		
	Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, preslan, potpuno neslan (bljutav), okus po plijesni	1-2		
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan po mlijeku, diskretan blago kiselkast miris, bez ikakvih stranih mirisa	4-5	0,6	3

	Prenaglašen miris, nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris mlijeka, tragovi užglosti	3		
	Potpuno nekarakterističan za proizvod, stran, užegao, po plijesni, preizražena kisleost	1-2		
Konzistencija	Sir kompaktnan, homogen, tvrdoća karakteristična za proizvod, bez grudica, gladak, nasumična pojava sirnih rupica/pukotina	5	0,8	4
	Neznatno tvrđi ili mekši, neznatno ljepljiv	3-4		
	Pretvrd ili premekan sir, pjeskovit ili gječav, osjetno se lijepi za usta	1-2		
Boja	Karakteristična, bijela sa laganim krem do žućkastim odsjajem, jednolična po cijeloj površini	5	0,4	2
	Zamjetno neujednačene boje, malo žuće nijanse, blago prošaran	3-4		
	Zamjetna zona različitih boja površine sira, strana i nekarakteristična boja	1-2		
Izgled	Karakterističan, bez formirane kore, gladak, bijele boje, bez sluzi, na prerezu umjeren broj pukotina, jednolika boja	5	0,2	1
	Blago formirana naznaka kore na površine, neznatno nejednolika boja, naboranost površine, premalo ili previše sirnih pukotina na prerezu, urušenost, napuhnutost	3-4		
	Sluzava/ vlažna/pljesniva površina, pojava zaušenog sloja nalik kori ispod kojeg je krto i ratsresito tijelo, ljepljiva površina, pojava crvene ili narančaste boje,	1-2		

3.2.2.11. Ostala mjerenja u pakiranim uzorcima sira

a) Masa sira u pakiranju

Kako bi se odredile promjene u masi sadržaja plastične vrećice, sir je potrebno odmah nakon pakiranja izvagati na tehničkoj vagi (KB 3600 RN, Kern & Sohn, Ballingen, Njemačka) te isto ponoviti i na dan uzorkovanja u svrhu provođenja analiza. Razlika u masi između ta dva pakiranja upućuje na eventualne pogreške u pakiranju.

b) Sastav atmosfere u pakiranju s modificiranom atmosferom

Atmosfera u pakiranju određuje se s plinskim analizatorom (OXIBABY 6.0 O₂/CO₂, Wittgass, Witten, Njemačka). Mjerenje se provodi preko tanke igle na uređaju kojim se probuši pakiranje te nakon par sekundi na zaslonu se očita sadržaj atmosfera. Uređaj mjeri udio CO₂ i O₂, a N₂ se izračuna prema slijedećem izrazu

$$\% \text{ N}_2 = 100 - [\% \text{ CO}_2 + \% \text{ O}_2]$$

c) Volumen izdvojene sirutke

Nakon otvaranja pakiranja, izdvojena sirutke se izlije u menzuru, te joj se tako odredi volumen.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je produljiti rok trajanja svježem siru pakiranjem u vakuum i modificiranu atmosferu. Svježi sir je proizveden od svježeg mlijeka koje je, prije fermentacije mliječnom kiselinom, pasteurizirano. Sastav mlijeka korištenog za proizvodnju sira prikazan je u Tablici 2. Kako bi se odredio rok trajanja sira u normalnoj atmosferi, napravljeno je preliminarno istraživanje. Tako proizveden sir je zapakiran u plastične vrećice u normalnu atmosferu, vakuum i modificiranu atmosferu te je skladišten na temperaturu hladnjaka. Prvi uzorci analizirani su nakon 6 dana jer je preliminarnim istraživanjem utvrđeno kako do tad nema značajnih promjena na siru, a zatim svaka 3 dana. Prva serija pokusa odrađena je do 15.-og dana, a kako se pokazalo da ne dolazi do kvarenja sira, skladištenje je u naredne dvije serije produljeno na 18 dana. Provedene su kemijske, fizikalne, mikrobiološke i senzorske analize.

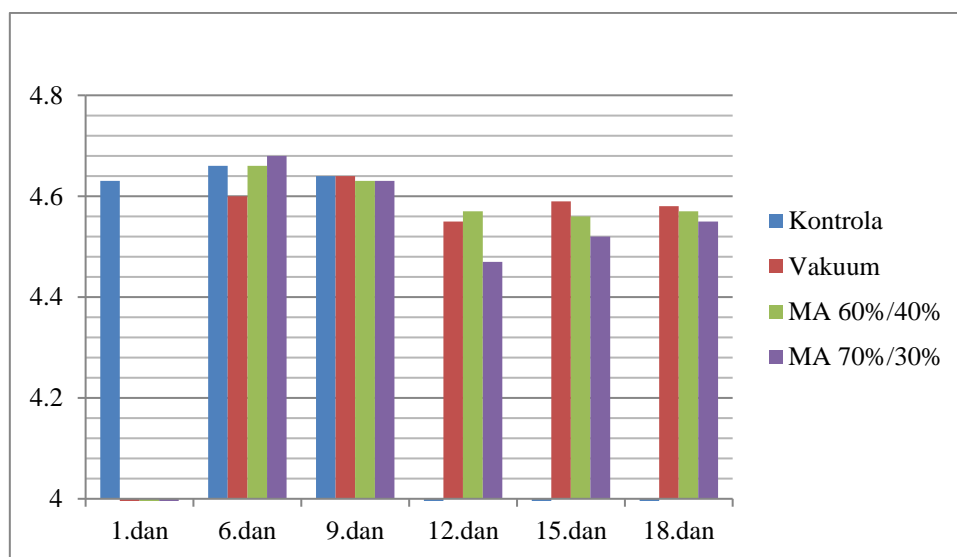
Rezultati koji se pokazuju kiselost tijekom 18 dana skladištenja izraženi kao prosječne vrijednosti tri serije pokusa (pH i °SH) prikazani su u grafovima 1. i 2. Mikrobiološke analize prikazane su u Grafu 3. za ukupan broj mikroorganizama izbrojenih tijekom 18 dana skladištenja, a u Tablici 5. i 6. prosječan broj enterobakterija te kvasaca i plijesni. Graf 4. prikazuje prosječne ukupne ocjene za sva senzorska svojstva bilježena kroz 18 dana skladištenja, a Graf 5. i 6. donose prosječene ocjene za pojedinačna senzorna svojstva sireva pakiranih u normalnoj atmosferi, vakuumu i MA s dva različita omjera plinova. Tekstura je izražena kroz svojstva tvrdoće i elastičnosti čiji su rezultati prikazani u grafovima 6. i 7., a u Grafu 8. prikazani su rezultati izdvojene sirutke iz svježeg sira tijekom skladištenja. Tablica 7. prikazuje rezultate boje svježeg sira izraženi kroz tri svojstva boje (L, a i b) dok Tablica 8. prikazuje prosječne vrijednosti mliječne masti, suhe tvari te pepela mjerene prvi i posljednji dan analiza, odnosno prvi dan za sve uzorke je isti, zatim deveti dan, koji je ujedno posljednji za kontrolne uzorke, petnaesti dan koji je posljednji dan analiza iz prve serije pokusa, a osamnaesti dan kao posljednji za drugu i treću seriju pokusa.

4.1 Sastav ishodišnog mlijeka, aktivna i titracijska kiselost uzoraka svježeg sira tijekom 18 dana skladištenja

Tablica 5. Kemijski sastav sirovog mlijeka korištenog za proizvodnju sira

Određivani parametar	Min. – Max.
Udjel vode (%)	83,88-89,50
Udjel suhe tvari (%)	10,54-16,12
Mast (%)	3,5-5,2
pH	6,73-6,93

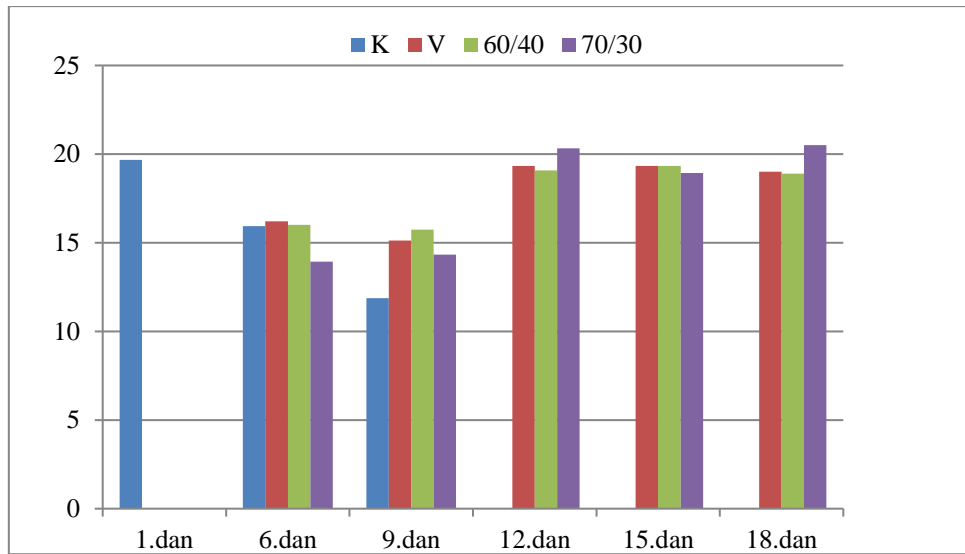
Sastav mlijeka korištenog za proizvodnju sira u skladu je s uobičajenim vrijednostima za kravlje mlijeko navedenim u stručnoj literaturi (Tratnik i Božanić, 2012) bez većih odstupanja.



Slika 6. pH vrijednost svježeg sira

Prilikom svakog uzorkovanja svježeg sira, provedeno je mjerenje pH vrijednost, a srednja vrijednost svih mjerenja prikazana je na Slici 6. Kroz 18 dana skladištenja sira pH vrijednost je opadala, što je u skladu s prethodno provedenim istraživanjima (Mannheim i Soffer, 1996). Pad pH vrijednosti sira tijekom skladištenja najvjerojatnije uzrokuje prisutan CO₂ koji se povezuje s nastankom karbonske kiseline koja snižava pH. Kiseli spojevi (npr. aminokiseline, slobodne masne kiseline) nastali proteolizom i lipolizom tijekom skladištenja, dodatno snižavaju pH vrijednost sira. Osim toga, pad pH uzrokuje i mliječna kiselina prisutna u visokim koncentracijama, pogotovo u vakumskom pakiranju i MAP-u (Dermiki i sur., 2008). U pojedinim slučajevima vidljivo je da dolazi do povećanja pH što se može objasniti aktivnošću kvasaca i plijesni koji metaboliziraju mliječnu kiselinu u alkalne komponente i na taj način

podižu cjelokupnu vrijednost pH u svježem siru (Kizilirmak Esmer i sur., 2009). Iz Slike 7. vidljivo je da pad pH vrijednosti proporcionalno prati porast °SH vrijednosti.

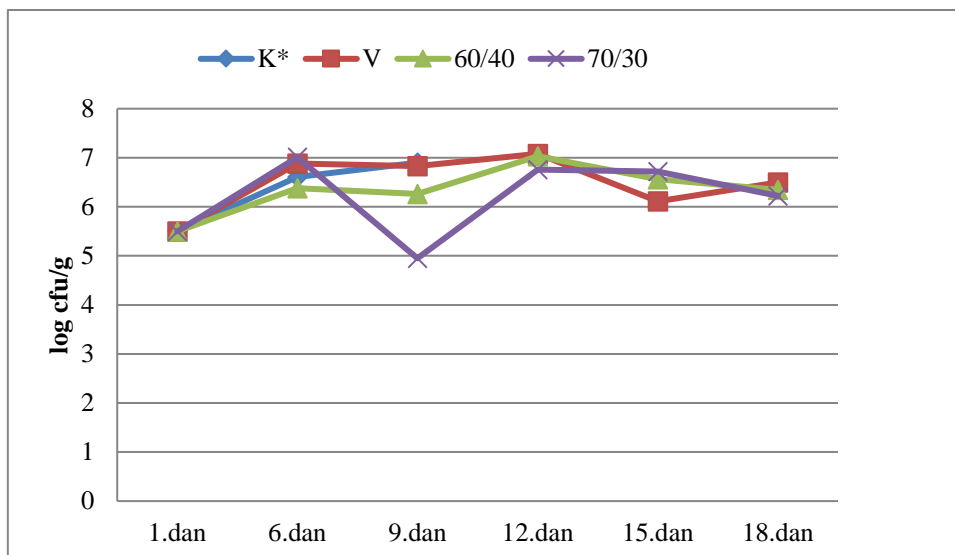


Slika 7. Prosječna titracijska kiselost svježeg sira tijekom 18 dana skladištenja

4.2. Mikrobiološka analiza svježeg sira kroz 18 dana skladištenja

4.2.1 Ukupan broj mikroorganizama

Na Slici 8. zaključuje se kako je rast ukupnog broja mikroorganizama u svim uzorcima relativno jednak. Najviše vrijednosti pokazuje kontrola, što je u skladu s istraživanjima u kojima se ta vrijednost kreće do 7 log cfu/g u prvih 10-ak dana (Dermiki i sur., 2008; Kizilirmak Esmer i sur. 2009), ali i uzorci pakirani u vakuum te modificiranu atmosferu koji, također, odgovaraju rezultatima istraživanja (Gonzalez-Fandos i sur., 2000; Dermiki i sur., 2008). Iz Slike 8. se može vidjeti da su vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama bile konstantne što je vjerojatno povezano s činjenicom da većinu prisutnih kolonija čine bakterije mliječne kiseline koje su fakultativni anaerobi pa se lako prilagode svim uvjetima u pakiranju te neometano rastu. Ipak, zabilježen je pad broja mikroorganizama, što je objašnjeno otežanom prilagodbom mikroorganizama na niske temperature skladištenja kroz duže vrijeme (Khoshgozaran i sur., 2012).



^d kontrolni uzorak je čuvan 9 dana što je bio eksperimentalno određeni rok trajanja obzirom na senzorska svojstva i ukupan broj prisutnih m.o. Nakon toga nisu ispitivani mikrobiološki parametri

Slika 8. Ukupan broj mikroorganizama naraslih tijekom 18 dana skladištenja.

4.2.2 Enterobacteriaceae

Tablica 6. Prosječan broj (log CFU/g) enterobakterija kroz 18 dana skladištenja

UZORAK	1.dan log cfu/g	6.dan log cfu/g	9.dan log cfu/g	12.dan log cfu/g	15.dan log cuf/g	18.dan log cfu/g
K^d	0,00	0,47±0,81	0,90	/	/	/
V	/	0,67±0,12	0	0	0,10	0,24
60/40	/	0,77	0	1,43	0	0,67
70/30	/	0	0	0	0	0,54

^d kontrolni uzorak je čuvan 9 dana što je bio eksperimentalno određeni rok trajanja obzirom na senzorska svojstva i ukupan broj prisutnih m.o.. Nakon toga nisu ispitivani mikrobiološki parametri.

U Tablici 6. prikazan je prosječan broj enterobakterija određen prilikom svake analize kroz 18 dana skladištenja te njihove standardne devijacije. Vidljivo je kako u većini uzoraka uopće nema naraslih kolonija enterobakterija, kolonije se pojavljuju na pojedinačnim uzorcima, ali unutar prihvatljivih granica propisanih *Zakonom o higijeni hrane* (Narodne novine, 81/13). Međutim, zadnji dan analize dolazi do porasta broja enterobakterija u sva tri uzorka što može ukazivati na istek roka trajanja. Istraživanja provedena na kozjem siru pokazala su da broj prisutnih enterobakterija u svim uzorcima ostaje konstantan kroz sve dane skladištenja, dok su u kontrolnim uzorcima zabilježene znatno više vrijednosti (oko 5,3 log cfu/g) za razliku od kolonija naraslih na uzorcima pakiranim u MAP i vakuum (ispod 2 log cfu/g) (Dermiki i sur., 2008). Za razliku od dosadašnjih istraživanja provedenih na sličnim vrstama sireva koji nisu dokazali korelaciju pakiranja sira u MAP i vakuum i suzbijanja rasta enterobakterija (Gonzalez-

Fandos i sur., 2000, Dermiki i sur., 2008) ova studija je pokazala kako pakiranje u vakuum i modificiranu atmosferu vjerojatno pogoduje redukciji broja enterobakterija u siru.

4.2.2. Kvasci i plijesni

Tablica 7. Prosječan broj (log cfu/g) kvasaca i plijesni naraslih tijekom 18 dana skladištenja

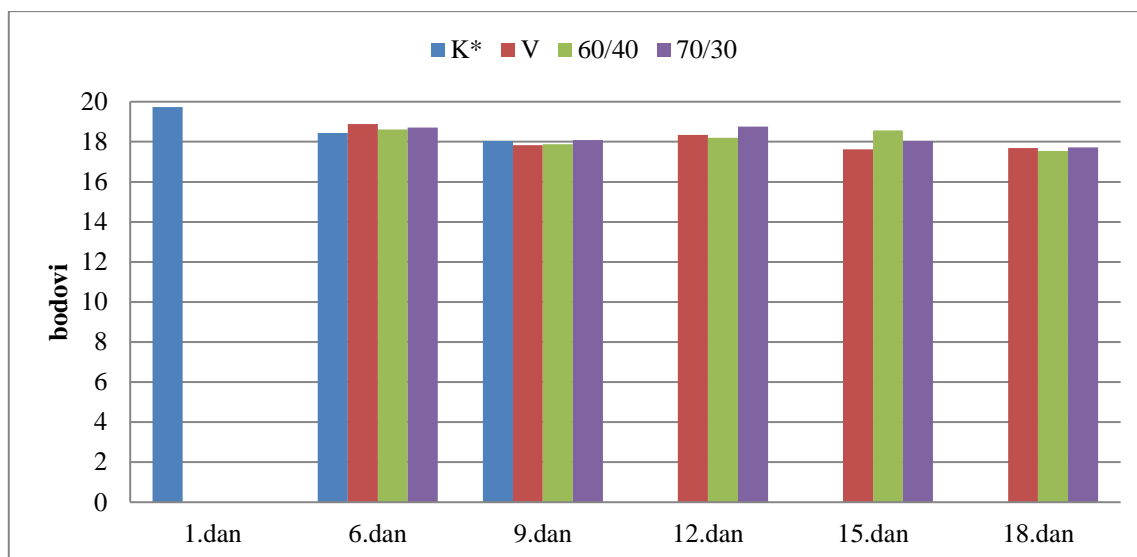
UZORAK	1.dan log cfu/g	6.dan log cfu/g	9.dan log cfu/g	12.dan log cfu/g	15.dan log cfu/g	18.dan log cfu/g
K^d	0	0,20	0,35	/	/	/
V	/	0,45	0	1,34	0	0
60/40	/	0,77	1,23	1,95	0,63	0
70/30	/	0	0	0	0,54	3,35

^d kontrolni uzorak je čuvan 9 dana što je bio eksperimentalno određeni rok trajanja obzirom na senzorska svojstva i ukupan broj prisutnih m.o.. Nakon toga nisu ispitivani mikrobiološki parametri.

Iz Tablice 7. vidljivo je kako 1. dan mjerenja uzorak svježeg sira nije sadržavao kvasce i plijesni, kao što je to slučaj i u istraživanju na svježem kozjem siru (Gonzalez- Fandos i sur., 2000), ali za razliku od navedenih rezultata, u tom istraživanju ne dolazi do rasta kvasaca i plijesni na siru pakiranom u vakuumu ili modificiranoj atmosferi. Ipak, u istraživanju Kizilirmak Esmer i sur. (2009) došlo je do pojave kolonija kvasaca i plijesni u svim uzorcima, ali samo je u kontrolnom uzorku došlo do naglog rasta, dok je u vakuum pakiranju i MAP-u zabilježeno povećanje manje od 1 log cfu/g. Inhibitorno djelovanje na rast kvasaca i plijesni pripisuje se djelovanju CO₂ pa su sukladno tome pakiranja s višim udjelom CO₂ imala niže vrijednosti broja naraslih kolonija kvasaca i plijesni. U rezultatima prikazanim u Tablici 6. rast je bio nešto viši od 1 log cfu/g, pogotovo u pakiranju s 40% CO₂, no takve promjene su vjerojatno povezane s prisutnim kisikom u pakiranju (vidi Slike 15. i 16.).

4.3 Senzorske analize uzoraka svježeg sira

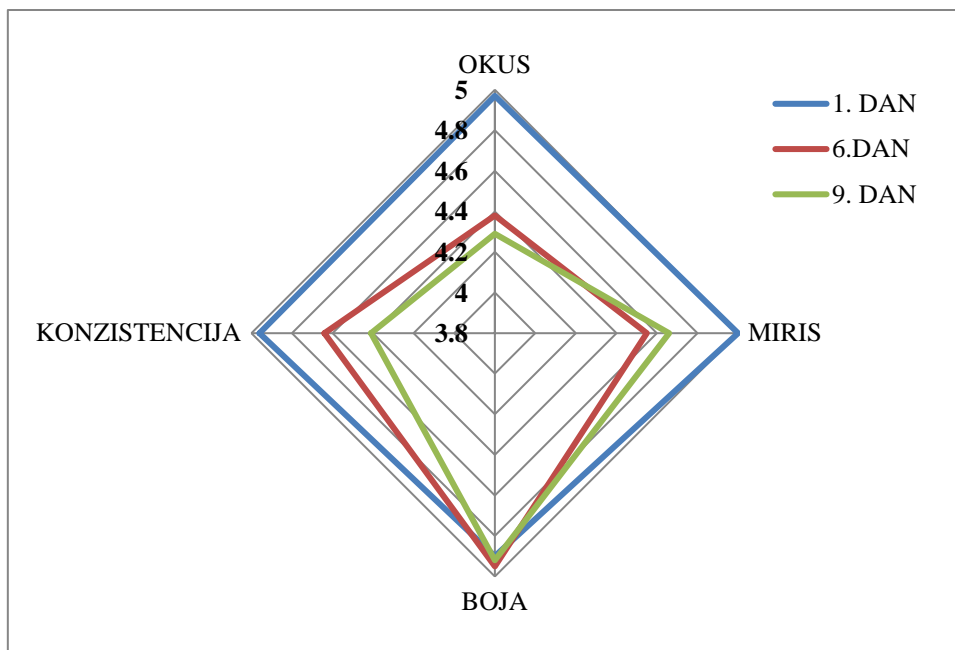
Svi ispitivani uzorci sira dobili su visok broj bodova prilikom senzorske ocjene te nije bilo značajnijih razlika među dobivenim rezultatima (Slika 9.).



*kontrolni uzorak je čuvan i analiziran samo 9. dana što je eksperimentalno određen rok s obzirom na senzorska svojstva i ukupan broj bakterija. Nakon tog dana nije ispitivana sensorika na kontrolnom uzorku.

Slika 9. Ukupan broj bodova (max. 20) senzorskog ocjenjivanja ispitivanih uzoraka sireva 18 dana skladištenja

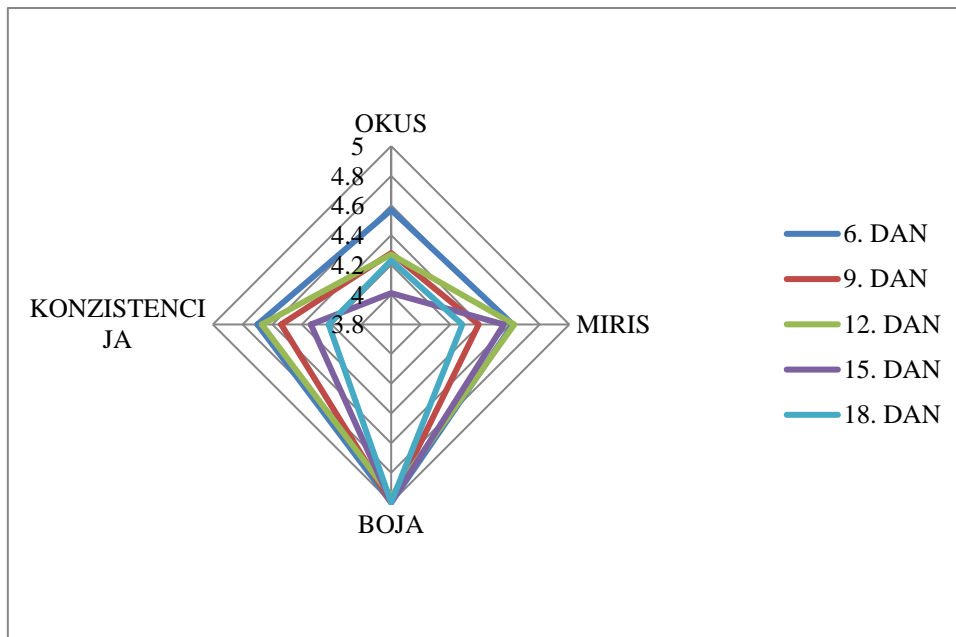
Svježi sir iz kontrolnog pakiranja postigao je visoke senzorske ocjene tijekom skladištenja s prosječnim ukupnim brojem bodova od 18,04 do 19,73. Takvi rezultati su znatno viši u usporedbi s istraživanjem provedenim na određivanju trajnosti svježeg sira gdje je prosječan broj bodova iznosio od 12,8 do 18,2, a rok trajanja je bio tek 3 dana i to u pojedinim slučajevima (Sabljak i sur., 2013). Međutim, kako je prikazano u Slici 10. ocjene za okus i miris kontrolnog uzorka su tijekom skladištenja znatno opadale što je ukazalo na zaključak da svježi sir pakiran u atmosferi zraka nije prihvatljiv za konzumaciju nakon 9 dana. U ostalim uzorcima sve ukupne ocjene su približno jednake pa je teško istaknuti pakiranje s najboljom sensorikom, ali ipak 18. dan uzorkovanja najvišu ukupnu ocjenu (17,72) dobio je svježi sir pakiran u modificiranu atmosferu s 70% N₂ : 30% CO₂.



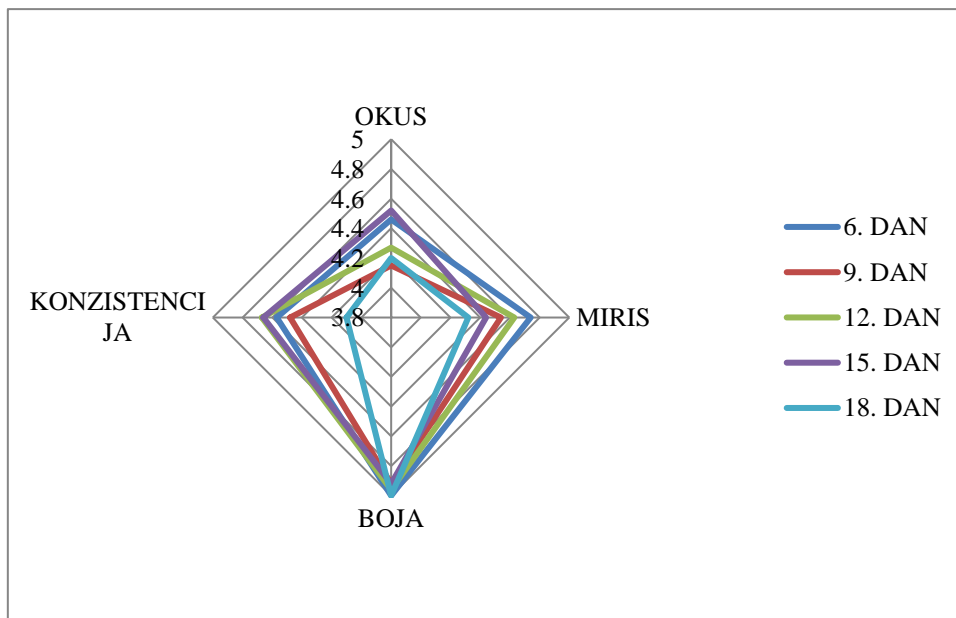
Slika 10. Prosječne ocjene za pojedinačna senzorska svojstva u kontrolnom uzorku sira tijekom 9 dana skladištenja

Senzorske ocjene za uzorke pakirane u vakuumu i MAP-u imaju slične ocjene te su i nakon 18 dana skladištenja visoke što sir čini pogodnim za daljnju konzumaciju. Time se dokazalo da pakiranje u vakuumu i MAP-u produljuje rok trajanja na način da pozitivno utječe na sensoriku što je dokazala većina autora (Khoshgozaran i sur., 2012). Međutim, manje razlike su ipak uočene i najbolje su se manifestirale na okusu. Ocjene za okus uzoraka pakiranih u vakuumu proporcionalno padaju tijekom skladištenja, dok kod uzoraka pakiranih u MAP s omjerom plinova 60% N₂ : 40% CO₂ i 70% N₂ : 30% CO₂ to nije uočeno (Slika 11.). Pri tom valja istaknuti kako ocjene za okus i miris u oba uzorka pakirana u MAP nisu bile ispod 4,2, čime su više u usporedbi s ostalim pakiranjima ispitivanim načinima pakiranja, te su više i od ocjena postignutih za isti način pakiranja u istraživanju Kizilirmak Esmer i sur. (2009), gdje padaju ispod 3,2. Tako visoke ocjene za MAP mogu se objasniti prisutnošću CO₂ koji vjerojatno inhibira rast aerobnih i psihrotrofnih bakterija - uzročnika negativnih promjena na senzorskim svojstvima (Dermiki i sur., 2000).

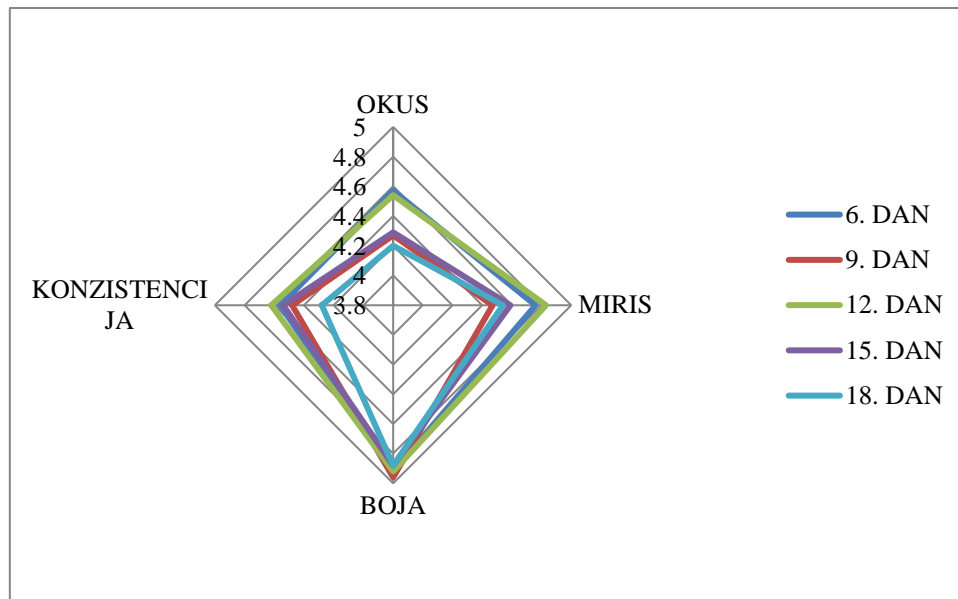
a)



b)

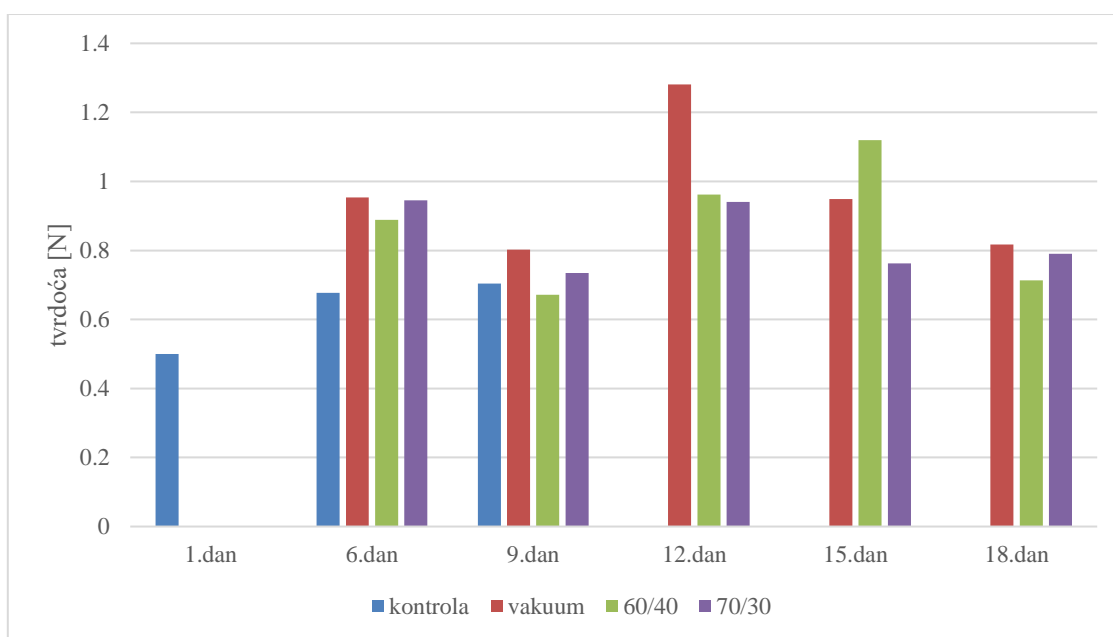


c)

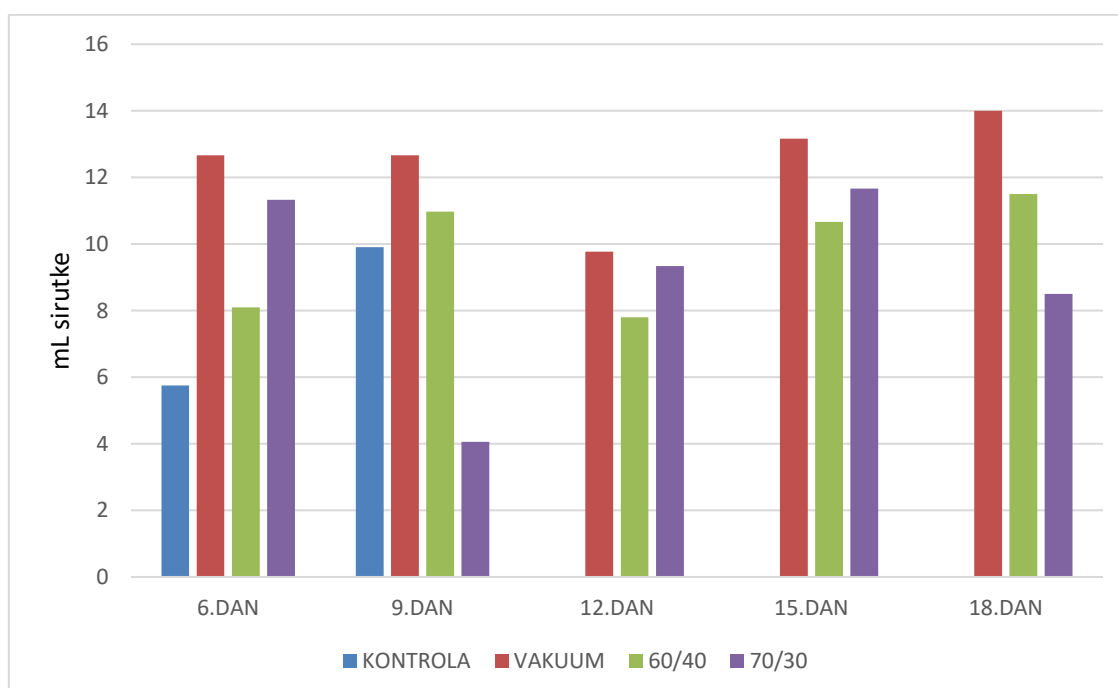


Slika 11. Prosječne ocjene za pojedinačna senzorska svojstva za uzorke pakirane u vakuum (a), u MAP 60/40 (b) odnosno 70/30 (c) tijekom 18 dana skladištenja

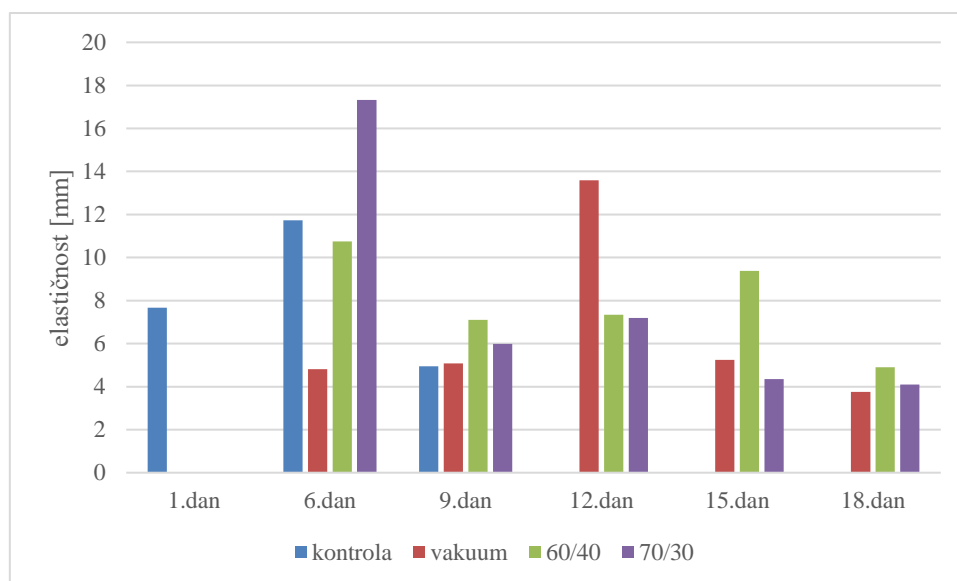
4.4 Tekstura svježeg sira



Slika 12. Svojstvo tvrdoće svježeg sira izraženo kao srednje vrijednosti mjerene kroz 18 dana skladištenja



Slika 13. Količina izdvojene sirutke iz ispitivanih uzoraka izražene kao srednje vrijednosti mjerene kroz 18 dana skladištenja



Slika 14. Svojstvo elastičnosti svježeg sira izraženo kao srednje vrijednosti mjerene kroz 18 dana skladištenja

Iz prikazanih rezultata za tvrdoću svježeg sira (Slika 12.) vidljivo je da dobivene brojke variraju te se nije dokazala povezanost između načina pakiranja i promjena u teksturi. Do sad se u istraživanjima pokazalo kako se tekstura sira smanjuje tijekom skladištenja u svim vrstama pakiranja pa sir omekšava, ponajviše zbog proteolize (Kizilirmak Esmer i sur., 2009). Na Slici 12. jasno se vidi kako tekstura sireva u svim vrstama pakiranja je jednaka tijekom svih 18 dana skladištenja, ali zato elastičnost sira (Slika 14.) u svim pakiranjima opada tijekom skladištenja u svim vrstama pakiranja. Ipak, zaključuje se kako je najtvrdi sir pakiran u vakuumu kod kojeg je tijekom svih dana skladištenja izdvojeno najviše sirutke (Slika 13.), dok sirevi pakirani u MAP imaju slične rezultate tvrdoće (Slika 12.) za oba pakiranja (70% N₂ : 30% CO₂ i 60% N₂ : 40% CO₂) kao i rezultate izdvojene sirutke (Slika 13.).

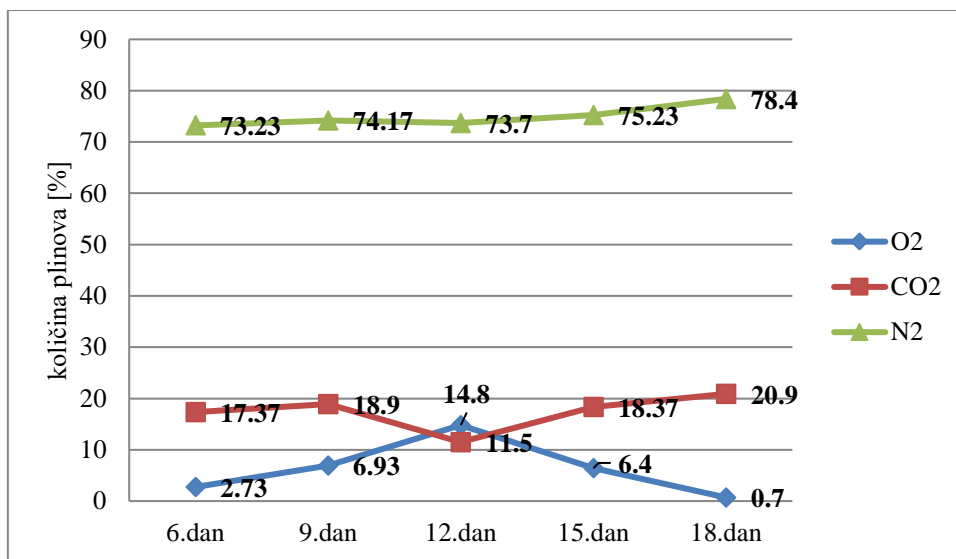
4.5 Boja svježeg sira

Tablica 8. Boja svježeg sira izražena kroz srednje vrijednosti svojstava L (svjetlina) a (zeleno) b (žuto) mjerene kroz 18 dana skladištenja

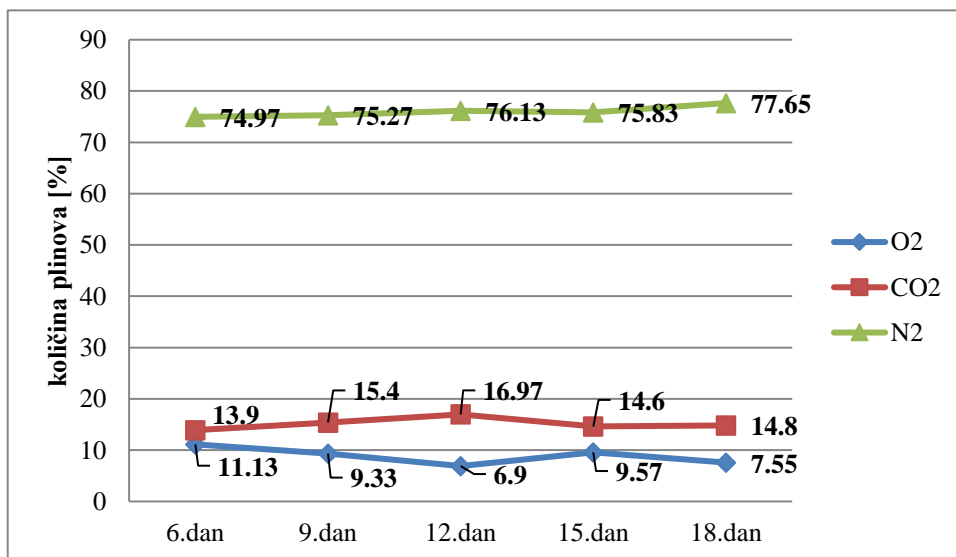
Svojstvo boje	Dan skladištenja	Kontrola	Vakuum	60/40	70/30
L vrijednost	1.dan	9,68	NA*	NA	NA
	6.dan	9,71	92,90	94,75	94,69
	9.dan	95,05	94,79	93,97	93,20
	12.dan	NA	94,33	94,77	94,52
	15.dan	NA	95,31	95,18	95,40
	18.dan	NA	94,93	92,50	92,63
a vrijednost	1.dan	-1,78	NA	NA	NA
	6.dan	-1,86	-1,60	-1,60	-1,67
	9.dan	-1,62	-1,68	-1,82	-1,84
	12.dan	NA	-1,75	-1,84	-1,69
	15.dan	NA	-1,78	-1,51	-1,64
	18.dan	NA	-1,61	-1,98	-1,89
b vrijednost	1.dan	9,64	NA	NA	NA
	6.dan	9,74	9,3	8,98	8,95
	9.dan	9,37	9,74	9,22	9,17
	12.dan	NA	9,63	9,55	8,17
	15.dan	NA	8,99	8,95	9,27
	18.dan	NA	8,58	9,60	10,27

Vrijednosti za sva tri svojstva boje (L, a i b) padaju tijekom skladištenja, te su kao i u većini dosadašnjih istraživanja vidljive razlike između MAP i obične atmosfere u pakiranju. Navedene razlike vjerojatno su povezane s prisutnošću kisika koji dovodi do oksidacije vidljive na promjeni boje (Del Nobile i sur., 2009) te su male razlike između vrijednosti pojedinih svojstava za različite omjere MA (Temiz i sur., 2009). Sve vrijednosti za sva tri određivana parametra opadaju tijekom 18 dana skladištenja, ali ipak je vidljivo kako vakuum te modificirana atmosfera stabiliziraju boju do 15.dana skladištenja. U pojedinim uzorcima različitih pakiranja (Tablica 8.) dolazi do porasta vrijednosti pojedinih svojstava, što se objašnjava manjim udjelom kisika nego u ostalim pakiranjima, dok se niže vrijednosti za L svojstvo mogu objasniti degradacijom prisutnih karotenoida i riboflavina uslijed predugog izlaganja svjetlosti. Vakuum se pokazao kao najbolja zaštita u degradaciji boje što je logičan slijed s obzirom da ne dolazi do oksidacije zbog odsutnosti kisika te ne dolazi do isušivanja uzrokovano prisutnošću CO₂ (Khoshgazaran i sur., 2012).

4.6 Sastav modificirane atmosfere u pakovini svježeg sira



Slika 15. Sastav modificirane atmosfere čiji je traženi omjer 60% N₂ : 40% CO₂ mjereno kroz 18 dana skladištenja



Slika 16. Sastav modificirane atmosfere čiji je traženi omjer 70% N₂ : 30% CO₂ mjereno kroz 18 dana skladištenja

U pakiranju svježeg sira s omjerom plinova 60% N₂ : 40% CO₂ odmah se može primijetiti kako udio tih plinova nije postignut niti u jednom pakiranju, odnosno već 6.-og dana nakon pakiranja nije održan željeni omjer plinova. Na Slici 15. je vidljivo kako do 12. dana dolazi do

pada udjela CO₂ u pakiranju, te rasta O₂ čemu je uzrok oslobađanje određene količine kisika zarobljene u uzorcima sira, što posljedično (zbog prisutnosti O₂) uzrokuje rast aerobnih te anaerobnih koje konzumiraju CO₂ te smanjuju njegov udjel (Khoshgozaran i sur., 2012). Ipak tako visok udio kisika u pakovini pretpostavlja se da je dijelom i greška mjerenja. Jedan od čestih razloga snižavanja udjela CO₂ u pakiranju je otapanje CO₂ u masi sira (Dermiki i sur., 2008). Nakon 12. dana udjel CO₂ raste, a O₂ pada što je očekivano jer dolazi do povećanog rasta aerobnih i anaerobnih bakterija i kvasaca koje produciraju CO₂, a istovremeno ti mikroorganizmi konzumiraju raspoloživi O₂. Također, dolazi do oksidacijskih i enzimskih reakcija koje koriste kisik tijekom 18 dana skladištenja (Juric i sur., 2003). U pakiranju svježeg sira s omjerima plinova 70% N₂ : 30% CO₂ (Slika 16.) omjer plinova je relativno konstantan jer je respiracija mikroorganizama (konzumacija O₂, otpuštanje CO₂) izjednačena s otapanjem CO₂ u masi sira i permeabilnosti kroz ambalažni materijal vrećice u pakovini kao i oslobađanjem zarobljenog kisika u masi sira (Khoshgozaran i sur., 2012).

4.7 Mliječna mast, suha tvar i pepeo svježeg sira

Tablica 9. Mliječna mast, suha tvar te pepeo izraženi kao srednje vrijednost mjerene kroz 18 dana skladištenja (n=3)

ISPITIVANO SVOJSVO	DAN	KONTROLA	VAKUUM	60/40	70/30	
MLIJEČNA MAST (%, w/w)	1. dan	1,67				
	9. dan	1,46				
	15. dan			1,70	1,80	1,70
	18. dan			1,23	0,99	0,98
SUHA TVAR (%, w/w)	1. dan	18,17				
	9. dan	17,55				
	15. dan			18,92	18,74	19,05
	18. dan			19,66	18,74	19,395
PEPEO (%, w/w)	1. dan	1,16				
	9. dan	1,12				
	15. dan			1,05	1,08	1,07
	18. dan			0,98	1,07	1,01

Mliječna mast opada već devetog dana u kontrolnom uzorku (Tablica 9.) što može upućivati na lipolizu koja se mogla osjetiti i na senzoricu. U uzorcima sira pakiranog u vakuumu i MA mliječna mast ostaje konstantna do 18. dana kada kreće degradacija jer CO₂ inhibira lipolizu (Pintado i sur., 2000).

Suha tvar raste dok pepeo pada što je u skladu s prijašnjim rezultatima istraživanja (Kizilirmak Esmer i sur., 2009) gdje je, također, najveći pad u suhoj tvari zabilježen u kontrolnom uzorku.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja te dobivenih rezultata fizikalno-kemijskih, mikrobioloških i senzorskih analiza svježeg sira pakiranog u atmosferu zraka, vakuum te modificiranu atmosferu s dva različita omjera plinova (60% N₂ : 40% CO₂ i 70% N₂ : 30% CO₂) mogu se izvesti se slijedeći zaključci:

- 1) Tijekom 18 dana skladištenja uzoraka svježeg sira dolazi do pada pH vrijednosti koju proporcionalno prati porast °SH vrijednosti. Najniža zabilježena pH vrijednost nije bila ispod 4,50 kroz 18 dana skladištenja, što upućuje da vakuum i modificirana atmosfera usporavaju degradacijske promjene u svježem siru.
- 2) Mikrobiološkom analizom pokazalo se kako su uzorci sira pakiranu u vakuum i modificiranu atmosferu i nakon 18 dana bili prihvatljivi za konzumaciju što potvrđuje hipotezu kako VA i MAP produljuju rok trajnosti svježeg sira.
- 3) Bodovi postignuti pri senzorskoj analizi bili su izuzetno visoki (17,63 – 19,73) s tim da su najbolje ocjenjeni uzorci sira pakiranog u MA s omjerom plinova 70% N₂ : 30% CO₂ (prosječan broj bodova 18,26). Kontrolni uzorci su nakon 9 dana ocijenjeni kao neprihvatljivi, ponajviše zbog okusa i mirisa, dok uzorci pakirani u vakuum i modificiranu atmosferu nisu pokazali pad u ocjenama pojedinačnih senzorskih svojstava tijekom 18 dana skladištenja.
- 4) Nije dokazana povezanost između načina pakiranja i promjena u teksturi. Tekstura tijekom cjelokupnog razdoblja skladištenja ostaje ista, dok se elastičnost opada u svim uzorcima. Najtvrdim sirom se pokazao onaj pakiran u vakuumu koji je također imao i najviše izdvojene sirutke.
- 5) Sva tri parametra boje (L, a i b) opadaju tijekom skladištenja, s tim da MAP i vakuum stabiliziraju boju sve do 15. dana skladištenja dok kod kontrolnog pakiranja degradacija počinje već 9.-og dana skladištenja.
- 6) Zadani omjer plinova 60% N₂/40% CO₂ bio je podložan promjenama u omjerima plinova zbog mikrobiološke aktivnosti, oslobađanja kisika te otopljenog CO₂ u masi sira. Omjer plinova u pakiranju 70% N₂/30% CO₂ je konstantan što se objašnjava ravnotežom između respiracije mikroorganizama i oslobađanja kisika iz mase sira, kao i otopljenog CO₂ u masi sira.
- 7) Udio mliječne masti, suhe tvari i pepela opadaju tijekom skladištenja što je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja.

6. POPIS LITERATURE

- Alam, T., Goyal, G., K. (2007) Influence of modified atmosphere packaging and storage at deep freeze conditions on the sensory characteristics of Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft* **62** (3), str. 311-314
- Bajt, N., Golc-Teger, S., Pirkmajer, E. (1998) Mleko in mlečni izdelki, Zavod Republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana
- Božanić, R. (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi* (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 54
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb
- Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D. (2000) Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad
- Cindrić, M. (1997) Proizvodnja svježeg sira Schulenburgovim postupkom. *Mljekarstvo* **47**, str 195-199
- Del Nobile, M., A., Conte, A., Incoronato, A., L., Panza, O. (2009) Modified atmosphere packaging to improve the microbial stability of Ricotta. *African J. Microbiol. Res.* **3** (4) str. 137-142
- Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I., N., Kontominas, M., G. (2008) Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese „Myzithra Kalathaki“ using modified atmosphere packaging. *Elsevier LWT* **41**, str. 284-294
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M-A., Daubert, C., R. (2003): Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *Int. Dairy J.* **13**, str. 585-591
- Gonzalez Fandos, E., Sanz, S., Olarte, C. (2000) Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmosphere. *Food Microbiology* **17**, str 407-414.
- Havranek, J., Kalit, S., Antunac N., Samaržija, D. (2014) Sirarstvo, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str 173-175

Hrvatska agencija za hranu (2016) Znanstveno mišljenje o mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrđim sirevima na tržnicama RH i njihovim kemijskim parametrima (Zahtjev HAH-Z-2016-1) Zagreb

Jalilzadeh, A., Tuncturk, Y., Hesari, J. (2015) Extension Shelf Life of Cheese: A Review. *Int. J. Dairy Technol.* **10** (2) str. 44-60

Juric, M., Bertlsen, G., Mortensen, G., Petersen, M., A. (2003) Light- induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi- hard cheese. *Int. Dairy J.* **13** (2-3), str. 239-249

Kalit, S. (2016) Svježi sir. U: *The Oxford Companion to Cheese* (Donnelly, C., ured.) Oxford University Press, New York, SAD, str. 687-688

Khoshgozaran, S., Azizi, M., H., Bagheripoor-Fallah N. (2012) Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. *Dairy Sci. and Technol.* **92**, str. 1-24

Kirin, S. (2009) Bjelovarski domaći svježi sir. *Mljekarstvo* **59**, str. 148-154

Kirin, S. (2016) Sirarski priručnik, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Kizilirmak Esmer, O., Balkir P., Seckin K., A., Irkin, R. (2009) The Effect of Modified Atmosphere and Vacuum Packaging on the Ohysichemical, Microbiological, Sensory and Textural Properties of Crottin de Chavignol Cheese. *Food Sci. Technol. Res.* **15** (4) str. 367-376

Lisak Jakopović, K. (2015) Pakiranje i deklaracija sira U: *Sirarstvo u teoriji i praksi* (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 179-180

Maniar, A., B., Marcy, J., E., Bishop, J., R., Duncan, S., R. (1994) Modified atmosphere packaging to maintain direct set Cottage cheese quality. *J. Food Sci.* **59** (6), str 1305-1308

Mannheim, C., H., Soffer, T. (1996) Shelf-life Extension of Cottage Cheese by Modified Atmosphere Packaging. *Lebensm.- Wiss. u.- Technol.*, **29**, str. 767-771

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja Zagreba. *Mljekarstvo* **59** (3), str 225-231

Matijević, B. (2015) Sir kroz povijest. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi* (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 11-12

Mortensen, G., Sorensen, J., Stapelfeldt, H. (2003) Effect of modified atmosphere packaging and storage condition on photooxidation of sliced Havrati cheese. *Eur. Food Res. Technol.* **216** (1), str.57-61

Murcia, M., A., Martinez- Tome, M., Nicolas, M., C., Vera, A., M. (2003) Extending the shelf-life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging. *Food Microbiology* **20**, str 671-679

Pintado, M., E., Malacata, F., X. (2000) Optimization of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijao. *Food Research International* **33**, str 821-832

Popović- Vranješ, A. (2015) Specijalno sirarstvo, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, str. 68-70

Pravilnik o metodama analiza toplinski obrađenog mlijeka za prehranu mlijeka za prehranu ljudi (2007) Narodne novine **133**, Zagreb

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009) Narodne novine **20**, Zagreb

Pravilnik za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004) Zavod za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Rodriguez- Aguilera, R. i Oliveira, J., C. (2009a) Review of Design Engineering Methods and Application of Active and Modified Atmosphere Packaging System. *Food Eng.* **1**, str. 66-83

Rodriguez- Aguilera, R., Oliveira, J., C., Montanez, J., C., Mahajan, P., V. (2009b) Gas exchange dynamics in modified atmosphere packaging of soft cheese. *Journal of Food Engineering* **95**, str 438-445

Rodriguez- Aguilera, R., Oliveira, J., C., Montanez, J., C., Mahajan, P., V. (2009c) Mathematical modelling of the effect of gas composition and storage temperature on the gas exchange rate of soft cheese. *Journal of Food Engineering* **95**, str 82-89

Romani, S., Sacchetti, G., Vanniani, L., Pinnavaia, G., G., Dalla Rosa, M., Corradini, C. (1999) Storage stability of portioned packed Parmigiano Reggiano cheese [Emilia-Romagna],

Stabilita´in conservazione del Parmigiano Reggiano confezionato in porzioni [Emilia-Romagna]. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* **50**, str 273-290

Rosenthal, I., Rosen, B., Bernstein, S., Popel, G. (1991) Preservation of fresh cheese in a CO₂-enriched atmosphere. *Milchwissenschaft* **46**, str. 706-708

Sabadoš, D. (1998) Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Sabljak, V., Lisak-Jakopović, K., Barukčić, I., Pejaković, A., Božanić, R. (2013) Određivanje trajnosti tradicionalnog svježeg sira. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**, str. 115-122

Sobota Šalamon, B., Božanić, R., Dobša, J. (2010) Analiza varijabli koje utječu na mikrobiološku kvalitetu u proizvodnji svježeg sira. *Mljekarstvo* **50** (4) str. 252-259

Taniwaki, M., H., Hocking, A., D., Pitt, J., I., Fleet, G., H. (2001) Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* **68**, str 125-133

Temiz, H., Aykut, U., Hursit, A., K. (2009) Shelf life of Turkish whey cheese (Lor) under modified atmosphere packaging. *Int. J. Dairy Sci.* **62** (3) str.378-386

Trajković, J., Mirić, M., Baras, J., Šiler, S. (1983) Analize životnih namirnica, Tehnološko-metarulški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Tratnik, Lj. (2012) Sirarstvo. U: *Mlijeko i mliječni proizvodi* (Z. Bašić ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 214-215

Tsantilis, C., N., Kosikowski, F., V. (1960) The keeping quality of Cottage cheese packaged under high vacuum, nitrogen and carbon dioxide. *J. Dairy Sci.* **43**, str 846

Tunick, M. (2016) Texture. U: *The Oxford Companion to Cheese* (Donnelly, C., ured.) Oxford University Press, New York, SAD, str. 708-709

Uredba Komisije (EZ) br 2073/2005 (15. studenog 2005) Omikrobiološkim kriterijima za hranu, *Službeno glasilo Europske unije* L 338/1,

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb

Vujković, I., Galić, K., Vereš, M. (2007) Ambalaža za pakiranje namirnica, Tectus, Zagreb

Zakon o hrani (2013) Narodne novine **81**, Zagreb

Zimmerman, M., K., Kester, L., T. (1960) A study od the surface spoilage defect of Cottage cheese. *J. Dairy Sci.* **43**, str 845