

Mogućnosti primjene netradicionalnih postupaka procesiranja u mljekarskoj industriji

Irena Jeličić*, Rajka Božanić, Ljubica Tratnik, Katarina Lisak

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb

Prispjelo - Received: 24.03.2010.
Prihvaćeno - Accepted: 24.05.2010.

Sažetak

U posljednja dva desetljeća istraživanja na području procesiranja hrane intenzivno su usmjerena na ispitivanje i optimiranje primjene novih, netermalnih postupaka obrade hrane. Ovaj rad opisuje nekoliko netradicionalnih postupaka poput visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka, mikrofiltracije i pulsirajućeg električnog polja, čija se primjena intenzivno istražuje i u mljekarskoj industriji. Za svaku je metodu dan poseban osvrt na princip inaktivacije mikroorganizama, dosad postignute rezultate vezane uz mikrobiološku redukciju te pozitivne, ali i negativne učinke koje imaju na sastojke i svojstva mlijeka. Među metode koje su se pokazale najviše obećavajućim za primjenu u mljekarskoj industriji, spadaju u prvom redu mikrofiltracija te kombinacija visokog hidrostatskog tlaka, odnosno pulsirajućeg električnog polja i umjerenih temperatura, obzirom da do sada nisu dokazani negativni učinci njihove primjene na senzorska svojstva mlijeka i mliječnih proizvoda. Primjena tih metoda također pozitivno utječe na homogenizaciju mliječne masti, brzinu i mehanizam sirenja mlijeka, trajanje fermentacije mlijeka i sl. Dosta dobri rezultati postignuti su i primjenom kombinacije ultrazvuka i umjerenih temperatura, ali zabilježeno je narušavanje senzorskih svojstava mlijeka zbog pojave neželjenih tvari arome nastalih uslijed oksidacije mliječne masti prouzročene ultrazvučnom kavitacijom. U radu je ukratko razmatrana i primjena prirodnih anitmikrobnih tvari poput bakteriocina, laktoperoksidaze i lizozima. Međutim, njihova uporaba je ograničena zbog visoke cijene, sklonosti interakcijama s drugim sastojcima namirnice, loše topljivosti, promjene senzorskih svojstava proizvoda, uskog spektra djelovanja, spontanog gubitka bakteričnosti, itd. Također, ukratko su opisani principi antimikrobnog djelovanja mikrovalova i ultraljubičastog zračenja, no njihova primjena nije značajnije zaživjela uglavnom iz tehničkih i komercijalnih razloga.

Ključne riječi: mlijeko, visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, mikrofiltracija

Uvod

S obzirom na svoju prirodu, mlijeko je namirnica koja sadržava gotovo sve makro- i mikronutrijente potrebne za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Stoga je u mljekarskoj industriji nužna toplinska obrada kako bi se inaktivirali prisutni enzimi i mikroorganizmi koji štetno utječu na sastav i svojstva mlijeka, a time i na kvalitetu mliječnih proizvoda nami-

jenjenih konzumaciji. Međutim, postupci toplinske obrade mlijeka mogu uzrokovati i neke nepoželjne promjene poput denaturacije termolabilnih proteina sirutke koji počinju denaturirati već pri temperaturama iznad 60 °C. Pri tome je bitno istaknuti kako nativni proteini sirutke imaju izrazito visoku nutritivnu vrijednost i biološku iskoristivost. Osim toga, primjena procesa toplinske obrade zahtijeva i velike utroške energenata (električne energije i vode).

*Corresponding author/Dopisni autor: Tel./Phone: +385 1 4605 024; E-mail: irjelicic@pbf.hr

Stoga se u posljednje vrijeme znanstvena istraživanja sve više bave proučavanjem novih postupaka obrade hrane koji bi djelomično ili potpuno zamijenili tradicionalne metode poput obrade visokom temperaturom, soljenja, sušenja, zakiseljavanja ili primjene kemijskih konzervansa. Cilj takvih postupaka je omogućiti proizvodnju minimalno procesirane hrane koja se odlikuje očuvanom visokom nutritivnom vrijednosti i dobrim organoleptičkim svojstvima budući da su ta dva kriterija sve bitniji potrošačima pri odabiru prehrambenih proizvoda koje će konzumirati. Osim toga, novi se postupci obrade hrane odlikuju manjom potrošnjom energenata te se njihovom primjenom obično skraćuje trajanje tehnološkog procesa, što je također značajna prednost u odnosu na tradicionalne metode koje se trenutno primjenjuju. Neke od novih tehnika procesiranja hrane čija se primjena istražuje i u mljekarskoj industriji su visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje te mikrofiltracija koja se još uvijek usavršava, iako se već odavno primjenjuje u kombinaciji s drugim membranskim procesima. Također je niz istraživanja posvećen primjeni prirodnih antimikrobnih tvari poput nizina i lizozima u svrhu konzerviranja. Međutim, rijetko kad se primjena samo jedne od spomenutih metoda pokazala jednako uspješnom ili uspješnijom od tradicionalnih metoda. Stoga su istraživanja u novije vrijeme usmjerena optimiranju primjene kombinacije jednog ili više novih postupaka procesiranja međusobno ili s već postojećim konvencionalnim metodama (kao sniženje pH vrijednosti, primjena umjerenom visokih temperatura i sl.) što se u mnogim slučajevima pokazalo obećavajućim načinom razvoja novih metoda konzerviranja.

Netradicionalni postupci

Visoki hidrostatski tlak (HHP)

Visoki hidrostatski tlak je trenutno jedna od najviše istraživanih alternativnih, novih metoda minimalnog procesiranja hrane. Ta metoda podrazumijeva obradu namirnice tlakovima između 50 i 1000 MPa u trajanju od nekoliko sekunda do nekoliko minuta (Ross i sur., 2003.). Svrha njegove primjene je djelomična ili potpuna zamjena toplinske obrade poput procesa pasterizacije i sterilizacije (Kessler, 2001.).

Industrijska oprema, koja se razvija u svrhu primjene visokog hidrostatskog tlaka u obradi

viskoznih, krutih i tekućih namirnica, u ovom trenutku ima kapacitet od 10 do 500 L, a primjenjuje se za diskontinuirane procese. Troškovi procesiranja tom metodom trenutno se kreću između 10 i 15 eurocenta po kg namirnice, uključujući troškove ulaganja u nabavu opreme i redizajn tehnološke operacije koju će visoki hidrostatski tlak zamijeniti (Devlieghere i sur., 2004.).

Primjena visokog hidrostatskog tlaka u mljekarskoj industriji je istraživana najviše u svrhu inaktivacije mikroorganizama i nativnih enzima, produljenja trajnosti kozjeg sira, smanjenja trajanja faze zrenja sireva na svega 3 dana, te kako bi se spriječilo prekomjerno zakiseljavanje jogurta produljenjem trajnosti na više od 2 tjedna tretiranjem istih tlakom od 250 MPa kroz 15 minuta pri 4 °C (Devlieghere i sur., 2004.; Fandino-Lopez, 2006.).

Inaktivacija mikroorganizama djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka ovisi o nizu faktora poput sastava, aktiviteta vode i pH vrijednosti namirnice, vrste mikroorganizama koji su prisutni u namirnici, trajanju postupka, temperaturi medija, itd. Visoki hidrostatski tlak uzrokuje smanjenje broja mikroorganizama mehanizmima poput oštećenja staničnih stijenki i membrana, inhibicije sinteze proteina, uništenja ribosoma, inaktiviranja staničnih enzima ili promjena na razini genetskih mehanizama (Huppertz i sur., 2006.).

Značajnija redukcija broja prisutnih mikroorganizama (iznad 4 log₁₀ jedinice) može se postići primjenom tlakova između 400 i 600 MPa pri sobnim temperaturama. Općenito se pokazalo da je za postizanje zadovoljavajuće redukcije (>6 log cfu/mL) ukupnog broja mikroorganizama prisutnih u svježem mlijeku potrebno primijeniti tlakove iznad 600 MPa.

Međutim, ti tretmani ne rezultiraju uništavanjem bakterijskih spora, što se primjerice postiže sterilizacijom pri proizvodnji trajnog mlijeka. Tako spore nekih mikroorganizama mogu preživjeti i tlakove iznad 1000 MPa (Devlieghere i sur., 2004.). Osim toga, prisutnost dvovalentnih iona kalcija i magnezija vjerojatno povećava stabilnost staničnih membrana bakterija, zbog čega one postaju puno otpornije na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka (Huppertz i sur., 2006.). Stoga se visoki hidrostatski tlak nije pokazao kao dovoljno dobra zamjena za proces sterilizacije pa se u novije vrijeme sve više istražuje njegova primjena u kombinaciji s nekom drugom metodom

poput ultrazvuka, zakiseljavanja, umjerenih temperatura i ultrazvuka, bakteriocina, snižavanja pH, itd. (Ross i sur., 2003.). Tako je recimo primjenom temperature od 70 °C i tlaka od 500 MPa u trajanju 6 ciklusa po 5 minuta, postignuta vrlo dobra decimalna redukcija (6 log cfu/mL) spora bakterije *Bacillus stearothermophilus*. Slični rezultati dobiveni su i za redukciju spora bakterije *Bacillus cereus*, s tim da je tretman trajao kraće (10 ciklusa po 1 minutu), a dobivena redukcija je bila veća (8 log cfu/mL). Spore obje spomenute bakterije mogu se naći u mlijeku i mliječnim proizvodima. Pretpostavljeni mehanizam inaktivacije primjenom kombinacije umjerenih visokih temperatura i visokog hidrostatskog tlaka jest da pod utjecajem topline dođe do germinacije spora što ih čini osjetljivijima na djelovanje tlaka. Stoga je preporučljivije provoditi predzagrijavanje na određenu temperaturu i potom provoditi tretman visokim hidrostatskim tlakom, nego istovremeno grijati uzorak i djelovati tlakom. Međutim, spore nekih sojeva bakterijskih vrsta *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* pokazale su se izuzetno otpornim na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka, što predstavlja jednu od većih prepreka u istraživanju primjene te metode (Devlieghere i sur., 2004.). Nadalje, kombinacija relativno niskih tlakova (200-300 MPa) i temperatura (30 °C/40 °C) u nekim se istraživanjima pokazala jednako uspješnom kao i pasterizacija u redukciji mikroorganizama prisutnih u svježem mlijeku (psihrotrofne bakterije, laktokoki, koliformne bakterije, enterokoki, bakterije roda *Pseudomonas*), dok je tijekom 28 dana čuvanja u mlijeku tretiranom visokim tlakom zabilježen znatno manji porast tih bakterija u odnosu na pasterizirano mlijeko (Pereda i sur., 2007.).

Iako je mlijeko bila prva namirnica na kojoj se počela istraživati primjena visokog hidrostatskog tlaka, na tržištu još uvijek ne postoje mliječni proizvodi u čijoj je proizvodnji ta metoda primijenjena. Jedan od glavnih razloga za to jest utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu sastojaka i svojstava mlijeka. Jedna od glavnih promjena koje izaziva primjena visokog hidrostatskog tlaka jesu promjene na micelama kazeina jer može doći do smanjenja, odnosno do povećanja micela kazeina (Kessler, 2002.). Primjenom tlakova od 250-310 MPa u trajanju iznad 15 minuta dolazi do povećanja micela kazeina, što je najvjerojatnije posljedica udruživanja pojedinih submicela i frakcija kazeina nakon što je prethodno došlo

do razbijanja micela na manje dijelove (Huppertz i sur., 2006.; Harte i sur., 2007.) Do razbijanja kazeinske micela vjerojatno dolazi uslijed otapanja micelnog kalcijevog fosfata te zbog pucanja hidrofobnih veza i narušavanja elektrostatičnih interakcija među submicelama (Kessler, 2002.). Primjenom tlakova iznad 310 MPa ne dolazi do razbijanja kazeinskih micela (Harte i sur., 2007.). S obzirom na taj pretpostavljeni mehanizam, dolazi i do povećanja razine nemicelnog kazeina u mlijeku. Ta promjena je pri temperaturama skladištenja mlijeka (0-5 °C) ireverzibilna, dok je duljim čuvanjem pri 20 °C reverzibilna. Kao posljedica promjene u strukturi micela kazeina, dolazi i do promjene u mineralnom sastavu mlijeka. Uslijed razbijanja micela oslobađa se i otapa kalcijev fosfat zbog čega se povećava razina iona kalcija i fosfata u mliječnom serumu što za posljedicu ima povećanje pH vrijednosti mlijeka. Ova pojava također je ireverzibilna pri temperaturama do 5 °C, dok je duljim čuvanjem pri 20 °C reverzibilna (Huppertz i sur., 2006.). Nadalje, tretman visokim hidrostatskim tlakom uzrokuje i denaturaciju nekih frakcija proteina sirutke pa tako primjerice oko 90 % β -laktoglobulina prisutnog u mlijeku denaturira djelovanjem tlaka jakosti 400 MPa. β -laktoglobulin u denaturiranom obliku se zatim preko slobodnih sulfhidrilnih skupina veže na micela kazeina. S druge strane, α -laktalbumin pokazao se puno otpornijim na djelovanje tlaka, te je njegova denaturacija zabilježena tek primjenom tlakova od oko 600 MPa (Anema, 2010.). Dio tako denaturiranih proteina sirutke veže se i na membrane globula mliječne masti. Međutim, pokazalo se kako promjene na strukturi proteina sirutke, izazvane djelovanjem visokog tlaka, mogu biti gotovo u potpunosti izbjegnute dodavanjem sredstva za blokiranje sulfhidrilnih skupina u mlijeko (Fandino-Lopez, 2006.; Bouaouina i sur., 2006.). Sve navedene promjene za posljedicu imaju modifikaciju mehanizama koji se odvijaju pri grušanju mlijeka u proizvodnji sira i fermentiranih mliječnih napitaka, poglavito jogurta. Tako u proizvodnji sira može doći do ubrzanog ili usporenog nastanka gruš, ovisno o intenzitetu pojedinih promjena na proteinima, dok u proizvodnji jogurta, gdje mlijeko koagulira pri višim pH vrijednostima, nastaje gel veće čvrstoće te se sinereza javlja u manjoj mjeri (Fandino-Lopez, 2006.; Huppertz i sur., 2006., Anema, 2010.).

Nadalje, u raznim istraživanjima pokazalo se kako primjena visokog hidrostatskog tlaka ne izaziva

značajne promjene u veličini globula mliječne masti. Međutim, primjenom tlakova od 100-250 MPa mliječna mast postaje kremastija u odnosu na netretirano mlijeko ili mlijeko tretirano tlakovima od 400-600 MPa. Ta se pojava povezuje s promjenama nastalim na imunoglobulinu M (IgM) i lipoproteinima koji sudjeluju u mehanizmima udruživanja mliječnih globula u veće nakupine (Huppertz i sur., 2006.; Garcia-Amezquita i sur., 2009.).

Isto tako, pokazalo se da su enzimi mlijeka većinom otporni na djelovanje tlaka umjerenih jakosti (do 400 MPa) pa i tu činjenicu treba istaknuti (Huppertz i sur., 2006). Međutim, Moatsous i suradnici (2008.) postigli su vrlo dobru inaktivaciju proteolitičkih enzima plazmina i katepsina D primjenom tlakova 200, 450 i 600 MPa u kombinaciji s temperaturama od 20, 40 i 55 °C. Pri tom se najotpornijim na djelovanje tlaka pokazao katepsin D i njegova inaktivacija je postignuta tek primjenom viših vrijednosti tlakova (450 i 600 MPa) pri 55 °C. S druge strane, plazmin je bio značajno inaktiviran već pri sobnim temperaturama. Prema zaključcima autora (Moatsous i sur., 2008.) postignuta inaktivacija te prijelaz plazminogenih aktivatora iz kazeina u mliječni serum vjerojatno će pozitivno utjecati na prinos sira, poželjne proteolitičke procese tijekom zrenja sira i očuvanje kvalitete UHT-steriliziranog mlijeka.

Dakle, visoki hidrostatski tlak se pokazao ne samo obećavajućom metodom što se tiče učinka konzerviranja, već i u smislu poboljšanja pojedinih procesa u mljekarskoj industriji. Međutim, potrebno je još dalje istraživati njegov utjecaj na neke sastojke poput laktoze, o čemu trenutno ne postoji puno podataka.

Ultrazvuk (UZV)

Ultrazvuk se definira kao zvučni val s frekvencijama od 20 kHz ili više, a karakteriziraju ga amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (λ) i koeficijent atenuacije (α) (Butz i Tauscher, 2002.; Brondum i sur., 1998.). Najvažniji kriterij koji se koristi za podjelu ultrazvučnih valova je količina energije koju generira zvučno polje pri čemu se razlikuje ultrazvuk niskog i visokog intenziteta (Fellows, 2000.; McClements, 1995.).

Ultrazvuk niskog intenziteta odnosi se na intenzitete manje od 1 W/cm^2 i frekvencije više od 100 kHz. Uslijed malih razina snage ultrazvučni valo-

vi niskog intenziteta ne uzrokuju fizičke i kemijske promjene u svojstvima materijala kroz koji val prolazi. Stoga se ultrazvuk niskog intenziteta koristi kao analitička metoda primjerice za mjerenja teksture, određivanje sastava namirnice, viskoznosti i brzine protjecanja, te za kontrolu pakiranja (Knorr i sur., 2004.).

Ultrazvuk visokog intenziteta odnosi se na intenzitete više od 1 W/cm^2 (obično u rasponu od $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) i frekvencije između 18 i 100 kHz. Obzirom da tada nastaju valovi velike snage i niske frekvencije (20-100 kHz), njihova uporaba se preporuča u svrhu inaktivacije i redukcije broja mikroorganizama (Knorr i sur., 2004.).

Djelovanjem ultrazvučnih valova visokog intenziteta u tekućem mediju stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995.). Naizmjenično izmjenjivanje tlaka izaziva kavitaciju pri čemu nastaju mjehurići plina u materijalu (Patist i Bates, 2008.). Veličina mjehurića raste tijekom svakog ciklusa sve dok ne postignu kritičnu veličinu unutar koje energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinovita faza u mjehuriću te mjehurići implodiraju. Svaka implozija mjehurića se ponaša kao lokalizirana "vruća točka" pri čemu se razvijaju vrlo visoke temperature (iznad 5000 °C) i tlakovi (oko 50 MPa) (Knorr i sur., 2004.). Ovaj fenomen poznat je kao prijelazna kavitacija i dugo se smatralo kako je upravo on glavni letalni mehanizam ultrazvuka (Sala i sur., 1995.). Međutim, Butz i Tauscher (2002.) te Fellows (2000.) iznijeli su teoriju prema kojoj se baktericidno djelovanje ultrazvuka zasniva na stanjivanju staničnih membrana, lokaliziranom razvoju visokih temperatura i tlakova te stvaranju slobodnih radikala. Vruće zone koje nastaju uslijed implodije mjehurića kavitacije mogu djelovati baktericidno, međutim one su vrlo ograničene i ne utječu na dovoljno veliku površinu. Osim toga, iznimno visoke temperature i tlakovi nastali implozijom mjehurića mogu izazvati disocijaciju vodene pare na OH^- radikale i H^+ ione (Suslick, 1989.) koji su vrlo vjerojatno odgovorni za inaktivaciju bakterijskih stanica oksidacijom (Shin i sur., 1994.).

U mljekarskoj industriji dosad je istraživana primjena ultrazvuka visokog intenziteta u svrhu inaktivacije nepoželjnih mikroorganizama i enzima, za homogenizaciju mlijeka te za poboljšanje fermentacije (Brnčić i sur., 2009.).

Neke od prednosti primjene ultrazvuka u usporedbi s pasterizacijom odnose se na gubitak tvari okusa, veću homogenost i značajnu uštedu energije. Međutim, brojna su istraživanja pokazala kako samo primjena ultrazvuka nije dovoljno učinkovita za inaktivaciju bakterija, no primjena ultrazvuka u kombinaciji sa tlakom i/ili toplinom je polučila puno bolje rezultate. Tako su ispitivanja kombinacije djelovanja topline, ultrazvuka i tlaka pokazala kako je letalni učinak na bakterijske stanice, spore i kvasce 6 do 30 puta veći nego kod toplinskog tretiranja koji se provodi na istoj temperaturi (Ross i sur., 2003.). Termosonifikacija (kombinacija topline i ultrazvuka), manosonifikacija (kombinacija tlaka i ultrazvuka) i manotermosonifikacija (kombinacija tlaka, topline i ultrazvuka) pokazali su se vrlo učinkovitim tretmanima za inaktivaciju većine patogenih mikroorganizama koji se među ostalim mogu pojaviti u svježem mlijeku, ali i u mliječnim proizvodima te također za inaktivaciju enzima otpornih na djelovanje ultrazvuka (Knorr i sur., 2004.; Režek-Jambrak i sur., 2009.). Pri tom je, međutim, vrlo bitan odabir vrijednosti temperature i tlaka koji će se kombinirati sa ultrazvukom, jer se u istraživanjima pokazalo kako njihov učinak nije nužno sinergijski i pozitivan kad se radi o pojačavanju učinka ultrazvučne kavitacije. Raso i suradnici (1998.) ustanovili su kako temperature ispod 50 °C nemaju nikakav letalni učinak i ne pojačavaju baktericidno djelovanje ultrazvuka, dok ga temperature između 50 °C i 58 °C značajno poboljšavaju. Ukoliko je, pak, temperatura uzorka pri tretmanu termosonifikacijom, odnosno manotermosonifikacijom iznad 60 °C, postignuti baktericidni učinci pripisuju se isključivo učinku topline, dok je djelovanje ultrazvuka zanemarivo. Tlakovi koji se kombiniraju pri ovim tretmanima obično iznose između 100 i 400 kPa.

Tako je primjerice vrijeme decimalne redukcije za *Listeriu monocytogenes* smanjeno na 1,5 minutu primjenom kombinacije ultrazvuka i tlaka jačine 200 kPa odnosno na 1 minutu primjenom ultrazvuka i tlaka jačine 400 kPa. Vrijeme decimalne redukcije primjenom samog ultrazvuka za ovu bakteriju iznosi oko 4,3 minute (Piyasena i sur., 2003.). Slični rezultati dobiveni su i za inaktivaciju nekih sojeva *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* i *Bacillus subtilis* (Piyasena i sur., 2003.). Međutim, Villamiel i De Jong (2000.) ispitivali su utjecaj kombinacije ultrazvuka i topline na redukciju ukupnog broja mikroor-

ganizama u svježem mlijeku te na inaktivaciju enzima alkalne fosfataze koji se smatra mjerilom uspješno provedene standardne pasterizacije. Pri tom se pokazalo kako se baktericidni učinak i inaktivacija alkalne fosfataze, jednaki onima postignutim pasterizacijom, mogu postići primjenom kombinacije protočnog ultrazvuka jakosti 150 W i temperature od 23,5 °C u trajanju 102 sekunde.

Iako se u novije vrijeme uporabom ultrazvuka u kombinaciji s toplinom postižu vrlo dobri rezultati vezani uz redukciju broja mikroorganizama prisutnih u mlijeku i mliječnim proizvodima, ne treba zanemariti činjenicu kako se pri tim tretmanima znatno djeluje i na strukturu ostalih sastojaka (prvenstveno mliječne masti i proteina), ali i na senzorska svojstva. U mlijeku obrađenom ultrazvukom primijećeno je povećanje udjela masti u što je vjerojatno posljedica pucanja membrana globula mliječne masti (Herceg i sur., 2009.) pa je jedan od pozitivnijih učinaka ultrazvuka efekt homogenizacije (Knorr i sur., 2004.; Patist i Bates, 2008.), što bi pri optimiranju procesa u mljekarskoj industriji bilo od velike koristi, budući da se jednom tehnološkom operacijom mogu zamijeniti dosadašnje dvije - homogenizacija i toplinska obrada, tj. znatno se smanjuje trajanje procesa pasterizacije, homogenizacije, emulgiranja i radnih temperatura, a da se pri tom postiže isti učinak kao i primjenom tradicionalnih metoda (Mason i sur., 1996.; Režek Jambrak i sur., 2009.). U svrhu homogenizacije mlijeka primjenjuje se ultrazvuk visokog intenziteta (oko 100 W) jer se na taj način postiže zadovoljavajuće smanjenje masnih globula (promjer do 1 μ m) (Režek Jambrak i sur., 2009.). Nadalje, mnogi su znanstvenici istraživali utjecaj primjene ultrazvuka na proces fermentacije u mljekarskoj industriji, a postignuti rezultati su vrlo obećavajući. Wang i sur. (1996.) postigli su puno bolji stupanj hidrolize laktoze pomoću *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ukoliko su na mlijeko neposredno nakon inokulacije djelovali ultrazvukom u odnosu na netretirano mlijeko. Nguyen i sur. (2009.) su primjenom ultrazvuka snage 100 W u trajanju 7, 15 i 30 minuta uspjeli znatno smanjiti vrijeme potrebno za postizanje pH vrijednosti 4,7 pri fermentaciji mlijeka kulturama *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 i *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12. Pretpostavljeni je mehanizam da ultrazvuk uzrokuje bolje otpuštanje intracelularne β -galaktozidaze iz stanica bakterijske kulture, koja

pokazuje veću sposobnost razgradnje laktoze van stanica nego unutar njih. Međutim, u nekoliko istraživanja pokazalo se kako primjena ultrazvuka može imati negativan učinak na senzorska svojstva mlijeka, a to se odnosi prvenstveno na promjenu okusa i mirisa. Riener i suradnici (2009.) pomoću plinske kromatografije i masene spektrometrije uspjeli su identificirati nekoliko hlapljivih spojeva, prvenstveno aldehida i aromatskih ugljikovodika, nastalih u mlijeku prilikom ultrazvučnog tretmana. Pretpostavlja se da ti aldehidi nastaju kao posljedica ultrazvukom proizročene oksidacije lipida prisutnih u mlijeku, dok aromatski ugljikovodici vjerojatno nastaju cijepanjem bočnih lanaca aminokiselina poput fenilalanina. Tvari arome koje potječu od tih spojeva su miris i okus na gumu te metalni miris, čiji se intenzitet znatno smanjuje ukoliko se ultrazvučni tretmani provode pri 100 W. Međutim, vrlo su rijetko pri tim ultrazvučnim snagama postignuti zadovoljavajući mikrobiološki rezultati, tako da istraživanja primjene ultrazvuka kao nove metode konzerviranja u budućnosti treba više usmjeriti optimiranju postupaka koji izazivaju minimalne strukturalne i senzorske promjene mlijeka i mliječnih proizvoda.

Pulsirajuće električno polje (PEP)

Procesiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (PEP) sastoji se od propuštanja vrlo kratkih i brzih električnih impulsa (obično 1-100 μ S) u električnom polju visokog intenziteta (10-80 kV/cm) kroz tekuću namirnicu koja se nalazi u komori između dvije elektrode, obično pri sobnoj temperaturi (Devlieghere i sur., 2004.; Bendicho i sur., 2002.; Lelas, 2006.). Mehanizam kojim PEP metoda inaktivira mikroorganizme nije potpuno razjašnjen, no pretpostavlja se kako električno polje visokog intenziteta uzrokuje promjenu propusnosti staničnih membrana. Nakon što se u dovoljno dugom vremenskom intervalu djeluje električnim poljem čija jakost premašuje kritični transmembranski napon, dolazi do ireverzibilnog formiranja velike pukotine na membrani što rezultira staničnom smrću (Shamsi i sur., 2008.). Učinkovitost PEP metode ovisi o brojnim čimbenicima među kojima su najznačajniji intenzitet električnog polja, trajanje tretmana, temperatura namirnice te vrsta mikroorganizama odnosno enzima na koji se u njoj nalaze (Bendicho i sur., 2002.). Vrlo često se pulsirajuće električno polje primjenjuje u kombinaciji s nekim drugim

antimikrobnim faktorima kao što su umjereno visoke temperature koje u većini slučajeva ne prelaze 55 °C, snižena pH vrijednost medija i bakteriocini, s obzirom da svi ti čimbenici sinergijski pojačavaju učinak PEP metode (Devlieghere i sur., 2004.).

Budući da se ovom metodom mogu procesirati samo tekuće namirnice, odnosno namirnice koje bez problema mogu prolaziti kroz pumpu, mlijeko i tekući mliječni proizvodi spadaju u medije na kojima se najviše istraživala primjena pulsirajućeg električnog polja (Devlieghere i sur., 2004.; Bendicho i sur., 2002.). Industrijska oprema koja služi za procesiranje pulsirajućim električnim poljem u ovom je trenutku vrlo rijetka, dosta skupa i ima ograničene kapacitete čiji maksimum iznosi svega 1800 L/h (Devlieghere i sur., 2004.).

Primjena PEP metode u mljekarskoj industriji istražuje se kako bi se zamijenila prvenstveno obrada visokim temperaturama sterilizacije koja rezultira nekim nepoželjnim pojavama poput promjene boje, pojave okusa po kuhanom, karameliziranom mlijeku, te gubitka nutritivne vrijednosti zbog denaturacije proteina, inaktivacije nekih endogenih enzima i sl. (Craven i sur., 2008.). Upravo zbog tih promjena potrošači preferiraju konzumaciju pasteriziranog mlijeka, međutim ono je puno kraće trajnosti i može sadržavati termorezistentne spore nekih patogenih mikroorganizama kao što je primjerice *Bacillus cereus*. Jedan od vrlo čestih uzročnika kvarenja pasteriziranog mlijeka jesu gram negativne bakterije roda *Pseudomonas*. Njihovi vegetativni oblici se uništavaju tijekom samog procesa pasterizacije, no ukoliko se ne poduzimaju vrlo stroge higijenske mjere i kontrole istih u procesu prerade, njihova pojava je neizbježna nakon provođenja toplinske obrade. Ove bakterije vrlo dobro preživljavaju niske temperature i kad njihova razina dosegne 10⁷ cfu/mL, započinje faza kvarenja mlijeka budući da tad ulaze u stacionarnu fazu rasta i proizvode znatne količine lipaza i proteaza (Craven i sur., 2008.). Craven i suradnici (2008.) postigli su vrlo dobre rezultate vezano uz redukciju bakterija roda *Pseudomonas* u mlijeku. Primjenom kombinacije temperatura 50 i 55 °C i električnog polja intenziteta 31 kV/cm, postignuta je značajna redukcija u iznosu višem od 5 log, a praćen je rast i razmnožavanje istih bakterija tijekom uobičajenog roka trajanja pasteriziranog mlijeka. Takvim tretmanom postignuto je produženje roka trajanja za 8 dana prilikom skladištenja na 4 °C u odnosu na mlijeko koje je bilo pasterizirano.

Shamsi i suradnici (2008.) uspoređivali su utjecaj pulsirajućeg električnog polja u kombinaciji s temperaturama od 15 °C odnosno 60 °C i dvaju režima pasterizacije (63 °C/30 min. i 72 °C/15 sek.) na inaktivaciju alkalne fosfataze te na redukciju ukupnog broja mikroorganizama, broja bakterija roda *Pseudomonas* i bakterija roda *Enterobacteriaceae* u svježem obranom mlijeku.

Primjena električnog polja intenziteta 35 kV/cm, u kombinaciji s temperaturom od 60 °C, rezultirala je jednako dobrom inaktivacijom alkalne fosfataze te redukcijom svih vrsta ispitivanih mikroorganizama u usporedbi s oba režima pasterizacije.

Također, vrlo dobri rezultati postignuti su u redukciji bakterije *Escherichia coli* te je primjenom 64 impulsa električnog polja intenziteta 36 kV/cm pri 20 °C postignuta redukcija u obranom mlijeku iznosila 5 log. Nadalje, redukcija bakterije *Listeria monocytogenes* u iznosu 4 log postignuta je primjenom 400 impulsa električnog polja intenziteta 30 kV/cm pri 50 °C (Bendicho i sur., 2002.). Vrlo slične rezultate dobili su Sepulveda i suradnici (2009.), koji su primjenom pet impulsa, duljine 2,4 μ s svaki, električnog polja intenziteta 35 kV/cm u kombinaciji s temperaturom od 65 °C uspjeli produljiti trajnost punomasnog mlijeka za čak 24 dana. Neki autori su istraživali utjecaj PEP metode na senzorska svojstva i mikronutrijente mlijeka, pri čemu nisu primijećene nikakve nepoželjne promjene senzorskih svojstava niti smanjenje udjela većine vitamina prisutnih u mlijeku. Pri tome je jedino zabilježen veći pad udjela askorbinske kiseline primjenom električnog polja jakosti 22,6 kV/cm u trajanju 400 μ s u odnosu na LTLT ili HTST pasterizaciju (Bendicho i sur., 2002.). Nadalje, Yu i sur. (2009.) primjenom električnih polja intenziteta oko 30 kV/cm u kombinaciji s temperaturama ispod 50 °C uspjeli su znatno poboljšati proces sirenja mlijeka, tj. skratiti vrijeme potrebno za nastanak sirnog grušaa kao i dobivanje grušaa bolje čvrstoće u odnosu na pasterizirano mlijeko. Neki od glavnih problema, koji trenutno ograničavaju primjenu PEP metode u svrhu konzerviranja mlijeka, su otpornost većine bakterijskih spora te cijena opreme (Devlieghere i sur., 2004.). Osim toga, trenutno postoji puno manje izvješća o negativnom učinku PEP metode na sastojke i svojstva mlijeka nego u slučaju prethodne dvije metode, što s jedne strane čini ovu metodu najviše obećavajućom

kad se radi o zamjeni toplinske obrade. S druge strane, pak, svakako je potrebno posvetiti više pozornosti istraživanju utjecaja pulsirajućeg električnog polja na pojedine sastojke mlijeka, svojstva poput sposobnosti grušanja te senzorske karakteristike.

Mikrofiltracija

Mikrofiltracija pripada skupini membranskih procesa i po principu uklanjanja mikroorganizama potpuno se razlikuje od prethodno opisanih metoda. Membranske procese može se definirati kao tlačne procese filtracije u kojima tekućina pod utjecajem tlaka prolazi kroz polupropusne membrane. Koji će sastojci proći kroz membranu u permeat (filtrat), odnosno koji će se zadržati u retentatu (koncentratu) ovisi prvenstveno o propusnosti upotrijebljenih membrana, tj. o promjeru njezinih pora, ali i o drugim procesnim parametrima poput primijenjenog tlaka, pH vrijednosti tekućine, temperaturi provođenja procesa, brzini protjecanja i načinu kretanja tekućine itd. (Tratnik, 1998.; Pouliot, 2008.)

Promjer pora membrana za mikrofiltraciju kreće se u rasponu od 0,1 μ m do 10 μ m, pa se tako u slučaju mikrofiltracije mlijeka, a ovisno o propusnosti upotrijebljene membrane, u retentatu zadržavaju somatske stanice (veličina 6-15 μ m), mikroorganizmi (veličine 0,2-6 μ m), globule mliječne masti (promjera 0,2-15 μ m) te kazeinske micelle (veličine 0,03-0,3 μ m). Mikrofiltracija se još naziva i "hladna sterilizacija" jer omogućava uklanjanje termorezistentnih spora bez primjene visokih temperatura (Tratnik, 1998.; Saboya i Maubois, 2000.). Stoga, za razliku od ostalih membranskih procesa kod mikrofiltracije za daljnju preradu koristi se permeat, dok se zbog što manjih gubitaka mliječne masti i kazeina retentat može sterilizirati te naknadno dodati permeatu (Nielsen, 2000.).

Uz pravilan odabir membrana i optimiranjem procesnih uvjeta, mikrofiltracija omogućava pročišćavanje sirutke i salamure, separaciju somatskih stanica i mikroorganizama iz sirovog mlijeka, odvajanje većih globula masti, frakcioniranje proteina mlijeka ili proteina sirutke i obogaćivanje mlijeka micelama kazeina u proizvodnji sira (Kulozik i Kersten, 2002.; Tolkach i Kulozik, 2006.). Jedna od novijih primjena mikrofiltracije je u procesu proizvodnje kazeina u prahu (Drgalić i Tratnik, 2004.) te u procesu proizvodnje tzv. ESL (extended shelf life) mlijeka.

Tablica 1. Pregled nekih režima obrade sa značajnom mikrobiološkom redukcijom u obradi mlijeka
 Table 1. Overview of some novel methods with significant microbiological reduction in milk processing

Način obrade Processing method	Ciljani mikroorganizmi Target microorganisms	Procesni uvjeti Processing conditions	Postignuta redukcija Obtained reduction	Referenca Reference
HHP	ukupan broj mikroorganizama/mL viable cell count/mL	600 MPa	>6 log cfu/mL	Huppertz i sur., 2006. Huppertz et al., 2006
HHP + toplina HHP + heat	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	500 MPa, 6 ciklusa po 5 min., 70 °C 500 MPa, 6 cycles - 5 min each, 70 °C	6 log cfu/mL	
HHP	<i>Escherichia coli</i> MG1655	700-900 MPa, 70 °C, 5 min.	5 log cfu/mL	Devlighiere i sur., 2004. Devlighiere et al., 2004
HHP + nizin + lizozim HHP + nisine + lysozime	<i>Escherichia coli</i> MG1655	550 MPa, lizozim: 400 µg/mL nizin: 400 IU/mL 550 MPa, lysozime: 400 µg/mL nisin: 400 IU/mL	3 log cfu/mL	
HHP + lakticin 3147 HHP + lactacin 3147	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 MPa konc. lakticina: 10000 IU/mL 250 MPa lactacin konc.: 10000 IU/mL	6 log cfu/mL	Ross i sur., 2003. Ross et al., 2003
UZV + tlak Ultrasound + pressure	<i>Listeria monocytogenes</i>	UZV: frekvencija 20 kHz, amplituda 117 µm, tlak: 200 kPa 20 kHz, amplitude 117 µm, pressure 200 kPa UZV: frekvencija 20 kHz, amplituda 117 µm, tlak 400 kPa 20 kHz, amplitude 117 µm, pressure 200 kPa	Skraćivanje vremena decimalne redukcije sa 4,3 na 1,5 min. Reduction of decimal reduction time from 4.3 to 1.5 min Skraćivanje vremena decimalne redukcije sa 4,3 na 1 min. Reduction of decimal reduction time from 4.3 to 1.5 min	Piyasena i sur., 2003. Piyasena et al., 2003

Način obrade Processing method	Ciljani mikroorganizmi Target microorganisms	Procesni uvjeti Processing conditions	Postignuta redukcija Obtained reduction	Referenca Reference
PEP PEF	<i>Escherichia coli</i>	električno polje jakosti 36 kV/cm - 64 impulsa, temperatura 20 °C intensity of electric field 36kV/cm - 64 pulses, temperature 20 °C	5 log cfu/mL	Bendicho i sur., 2002. Bendicho et al., 2002
PEP + toplina PEF + heat	<i>Listeria monocytogenes</i>	električno polje jakosti 30 kV/cm temperatura 50 °C intensity of electric field 30 kV/cm temperature 50 °C	4 log cfu/mL	
PEP + toplina PEF + heat	rod <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	električno polje jakosti 31 kV/cm, temperatura 50-55 °C intensity of electric field 31 kV/cm, temperature 50-55 °C	5 log cfu/mL	Craven i sur., 2008. Craven et al., 2008
PEP + toplina PEF + heat	rod <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	električno polje jakosti 35 kV/cm, temperatura 65 °C intensity of electric field 35 kV/cm, temperature 65 °C	>5,9 log cfu/mL	Shamsi i sur., 2008. Shamsi et al., 2008

HHP - visoki hidrostatski tlak/high hydrostatic pressure; UZV - ultrazvuk/ultrasound; PEP/PEF - pulsirajuće električno polje/pulsed electric field

Za sve navedene procese danas se najčešće koriste keramičke membrane jer se odlikuju dugotrajnošću, dobrim mogućnostima čišćenja i održavanja te dobrom otpornošću na široki raspon pH vrijednosti i temperature, ali nedostatak im je visoka cijena (Tratnik, 1998.; Nielsen, 2000.).

Najvažniji aspekt za mljekarsku industriju svakako je uklanjanje bakterija i spora iz sirovog mlijeka ili sirutke mikrofiltracijom na niskim temperaturama (najčešće 50 °C) čime se izbjegava visoka toplinska obradba te promjene koje ona izaziva kao što je primjerice pojava suokusa na kuhano koji je posljedica denaturacije proteina sirutke. Nadalje, mikrofiltrira-

no mlijeko, u odnosu na pasteurizirano, ima produljenu trajnost (do 21 dan na 8 °C), ne sadrži spore bakterije *Bacillus cereus* te su iz njega uklonjene gotovo sve žive i mrtve stanice mikroorganizama, pa ne postoji mogućnost dvojbe oko aktivnosti enzima ili drugih intracelularnih komponenata iz mrtvih bakterijskih stanica (Tratnik, 1998.; Drgalić i Tratnik, 2004.).

Saboya i Maubois (2000.) iznijeli su vrlo dobre rezultate pri mikrofiltraciji mlijeka keramičkim membranama veličine pora oko 1,4 μm. Tako je prosječna vrijednost decimalne redukcije iznad 3,5, odnosno broj bakterija u mlijeku se smanjuje sa 20.000 cfu/mL na svega 10 cfu/mL. Nadalje, razna istraživanja mikrofiltracije mlijeka rezultirala su prosječnom decimalnom redukcijom za bakterije *Listeria monocytogenes* 3,4; *Brucella abortus* 4,0; *Salmonella typhimurium* 3,5 odnosno *Mycobacterium tuberculosis* 3,7 (Drgalić i Tratnik, 2004.).

S obzirom na velike uspjehe, u novije vrijeme se proces mikrofiltracije sve više primjenjuje u optimiranju proizvodnje ESL mlijeka. Pod ESL mlijekom podrazumijeva se mlijeko produljene trajnosti koje nije proizvedeno uporabom režima sterilizacije. Potreba za razvojem ovakvog načina proizvodnje mlijeka proizašla je iz zahtjeva potrošača za mlijekom produljene trajnosti koje nije podvrgnuto UHT postupku. Naime kod UHT mlijeka se javlja suokus na kuhano te dolazi do određenog gubitka nutritivne vrijednosti, što ga čini dosta neprihvatljivim od strane potrošača koji su sve bolje educirani o pravilnoj prehrani te imaju sve veće zahtjeve pri odabiru namirnica (Rysstad i Kolstad, 2006.).

Princip proizvodnje ESL mlijeka svodi se na uklanjanje živih stanica i spora bakterija iz sirovog mlijeka, kao i primjenom procesa mikrofiltracije. Međutim, veličina somatskih stanica i spora je slična veličini globula mliječne masti pa je poželjno da se mlijeko prije mikrofiltracije potpuno obere primjenom centrifugalnih separatora, kako bi se izbjegli gubici mliječne masti. Nadalje, obzirom na veličinu kazeinskih micela i poznate mehanizme začepljavanja membrana, u svrhu mikrofiltracije koriste se keramičke membrane promjera 0,8-1,4 μm (Kessler, 2002.).

Međutim, pore tih promjera omogućavaju prolazak određenog broja bakterija kroz membranu te je stoga nakon provedbe mikrofiltracije nužna pasteri-

zacija mlijeka HTST režimom kako bi se u potpunosti osiguralo uklanjanje vegetativnih oblika patogenih mikroorganizama. Osim toga, obrano vrhnje podvrgava se procesu sterilizacije te se naknadno dodaje mlijeku u svrhu standardizacije udjela mliječne masti (Rysstad i Kolstad, 2006.).

Hoffmann i suradnici (2006.) uporabom keramičke membrane promjera pora 1,4 μm uspjeli su proizvesti ESL mlijeko znatno veće trajnosti u odnosu na pasteurizirano mlijeko. Postupak proizvodnje je jednak onomu koji je prethodno opisan. Sastav ovako proizvedenog ESL mlijeka gotovo se uopće nije razlikovao od sastava sirovog mlijeka, osim što je došlo do laganog pada udjela proteina u iznosu od 0,2-0,3 %, što se pripisuje gubicima zbog začepljenja membrane. Senzorska svojstva ESL mlijeka su također izvrsno ocijenjena, odnosno nije došlo do pojave stranih mirisa i okusa, promjene boje i sl. Primjena mikrofiltracije u mljekarskoj industriji pokazala se jednom od najboljih alternativnih metoda u svrhu zamjene postupaka toplinske obrade. Najveća prepreka u njezinoj implementaciji dugo vremena bilo je začepljavanje membrana tijekom samog procesa, što mu je produljivalo trajanje i time znatno smanjivalo kapacitet. Međutim, u današnje vrijeme osmišljeni su novi koncepti koji su omogućili rješavanje tih problema. Stoga je danas jedina preostala prepreka ekonomske prirode, odnosno visoki troškovi nabave i pokretanja postrojenja, što je vjerojatno i razlog nepostojanja ove tehnologije u mljekarama Hrvatske.

Ostale metode

Još jedna od novijih metoda konzerviranja jest uporaba antimikrobnih tvari koje se prirodno nalaze u biljkama, životinjama i mikroorganizmima i najčešće čine dio njihovog imunološkog sustava. Svrha uporabe ovih tvari jest djelomična ili potpuna zamjena kemijskih dodataka čija primjena u proizvodnji konzumnog mlijeka nije dozvoljena. Međutim, u proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka te u proizvodnji sireva mogu se upotrebljavati aditivi poput nekih kiselina i njihovih soli.

Među tipične prirodne antimikrobne tvari koje su dosad istraživane, spadaju enzim laktoperoksidaza koji se prirodno nalazi u mlijeku, lizozim iz bjelanjka jajeta i smokve te bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline. Sve tri vrste tvari već se nalaze i/ili upotrebljavaju u mljekarstvu.

Bakteriocini se definiraju kao ribosomalno sintetizirani peptidi ili proteini koji pokazuju antimikrobno djelovanje, a proizvode ih različite skupine bakterija u koje prije svega spadaju bakterije mliječne kiseline (Galvez i sur., 2007.). U proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka već se odavno koriste probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactococcus lactis* za koje je dokazano da proizvode nizin - bakteriocin s potvrđenim antimikrobnim učinkom protiv bakterije *Bacillus cereus* (Galvez i sur., 2007.; Devlieghere i sur., 2004.). Kombinacija primjene nizina i octene kiseline u proizvodnji sira tipa Ricotta pokazala se vrlo dobrim načinom prevencije kontaminacije bakterijom *Listeria monocytogenes* u vremenskom intervalu od čak 70 dana pri čuvanju na temperaturama hladnjaka (6-8 °C) (Davies i sur., 1997.). Nadalje, kombinacija nizina i laktoperoksidaze pokazala je veoma jako antimikrobno djelovanje protiv sojeva *Listeria monocytogenes* Ohio i *Listeria monocytogenes* Scott A u obranom mlijeku nakon 24 sata inkubacije na 30 °C (Zapico i sur., 1998.), odnosno protiv soja *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 u obranom mlijeku čuvanjem pri 25 °C u vremenskom intervalu od 15 dana (Boussouel i sur., 2000.). Neki autori ističu vrlo dobar inhibički učinak kombinacije bakteriocina pediocin bakterijskog soja *Pediococcus acidilactici* i sakeicina bakterijskog soja *Lactobacillus sakei* na rast i razvoj plijesni na površini sireva (Devlieghere i sur., 2004.).

Nadalje, u sirarskoj je praksi dozvoljena uporaba lisozima kao prirodne antimikrobne tvari koja ciljno djeluje protiv bakterija roda *Clostridium*. Pri tom je dozvoljen dodatak 1-3 g ovog enzima na 100 L mlijeka, a sveukupna količina veže se na sirni gruš i uzrokuje razlaganje stanične stijenke eventualno prisutnih bakterija roda *Clostridium* te drugih gram-pozitivnih bakterija (Tratnik, 1998.).

Međutim, primjena prirodnih antimikrobnih tvari pokazuje i negativne aspekte poput visoke cijene, sklonosti interakcijama s drugim sastojcima namirnice, loše topljivosti i promjene senzorskih svojstava proizvoda. Problemi koji se javljaju kod primjene bakteriocina su primjerice uzak spektar djelovanja, spontani gubitak baktericidnog učinka, podložnost inaktivaciji putem proteolitičkih enzima te prisutnost bakterija otpornih na djelovanje bakteriocina (Devlieghere i sur., 2004.; Galvez i sur., 2007.).

Kao alternativa pasterizaciji mlijeka dosta se istraživala i primjena mikrovalova. Mikrovalovi se definiraju kao dio elektromagnetskog zračenja u rasponu frekvencija od 300 MHz do 300 GHz. Obzirom da se mikrovalovi također koriste u komunikacijske svrhe, u prehrambenoj industriji dozvoljena je isključivo uporaba slijedećih frekvencija: 2450 MHz u većini zapadnoeuropskih zemalja, 896 MHz u Velikoj Britaniji i 915 MHz u Sjevernoj i Južnoj Americi (Kessler, 2002.).

Princip djelovanja mikrovalova sastoji se od prijenosa energije nastale uslijed visokih frekvencija izravno na medij koji se zagrijava. Mikrovalovi prodiru duboko u namirnicu pri čemu se kinetička energija pretvara u toplinu putem mehanizama vezanih uz promjenu polarnosti iona prisutnih u namirnici. Polarne molekule, od kojih je u mlijeku i mliječnim proizvodima najbrojnija voda, ali i ioni mineralnih tvari, mijenjaju svoj polaritet kad se nađu pod utjecajem električnog polja i teže da njihov polaritet bude jednak onom električnog polja. Kako se polaritet polja mijenja nekoliko milijuna puta u sekundi, što je primjerice slučaj pri primjeni zračenja frekvencije 2450 MHz, molekule vode nailaze na otpor i ne uspijevaju se orijentirati tom brzinom. Energija mikrovalova nastoji prevladati taj otpor i pretvara se u toplinu (Herceg, 2009.; Gould, 1999.). Inaktivacija mikroorganizama mikrovalovima vjerojatno se događa putem sljedeća dva predložena mehanizma i to djelovanjem topline te putem netermičkih mehanizama poput elektropolacije, razaranja staničnih membrana transmembranskim potencijalom te uništavanjem stanica djelovanjem magnetskog polja na značajne molekule unutar stanice (Herceg, 2009.).

Primjena mikrovalova kao alternativne metode konzerviranja dosta se istraživala kao alternativa sterilizaciji i pasterizaciji u mljekarskoj industriji, no nije u potpunosti zaživjela uglavnom iz tehničkih i komercijalnih razloga.

Dosta se istraživanja radi i na području primjene ultraljubičastog zračenja u svrhu konzerviranja namirnica. Ultraljubičasto zračenje obuhvaća dio elektromagnetskog spektra valnih duljina u rasponu od 10 do 400 nm, a dijeli se na četiri spektralna područja: UV-zračenje (100-200 nm), UV-C zračenje (200-280 nm), UV-B zračenje (280-315 nm) i UV-A zračenje (315-400 nm). Za mikroorganizme je najpogubnije zračenje valnih duljina od 228 nm do 290 nm, s izrazitim maksimumom pri valnoj duljini od

265 nm, budući da zrake te valne duljine apsorbiraju nukleinske kiseline pri čemu dolazi do formiranja kovalentnih veza između pirimidinskih baza, što ima za posljedicu sprječavanje razmnožavanja mikroorganizama. Stoga se u svrhu inaktivacije mikroorganizama primjenjuju valne duljine UV-B i UV-C spektralnog područja (Herceg, 2009.).

Učinkovitost UV zračenja ovisi o broju i vrsti mikroorganizama te o intenzitetu zračenja. Najmanju otpornost na djelovanje UV zračenje pokazuju gram-negativne bakterije, zatim gram-pozitivne bakterije, kvasci, bakterijske spore, plijesni i virusi koji su najotporniji (Herceg, 2009.).

Da bi se postigla inaktivacija mikroorganizama u rangu redukcije oko 4 log, UV doza zračenja mora biti minimalno 400 J/m² pri valnoj duljini 254 nm u svim dijelovima proizvoda. Koeficijent apsorpcije UV zračenja za mlijeko iznosi 300 cm⁻¹, a ovom se metodom dosta dobro mogu uništiti spore *Bacillus cereus*, vegetativni oblici *Mycobacterium tuberculosis* te *Pseudomonas aeruginosa*, koji se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Herceg, 2009.).

Umjesto zaključka

Borba protiv uzročnika kvarenja hrane i patogenih mikroorganizama uzima sve veći zamah. Istražuju se brojne nove metode i njihova primjena u svrhu uništavanja tih patogenih mikroorganizama pri čemu se dobivaju sve bolji rezultati. Međutim, velik broj istraživanja proveden je na model otopinama i *in vitro*, dok je hrana vrlo složen medij, što znatno otežava primjenu dobivenih rezultata na konkretan medij kao što su primjerice mlijeko i mliječni proizvodi. Stoga je u novije vrijeme sve više istraživanja koja se bave primjenom novih postupaka konzerviranja na pojedine namirnice kao medij. U slučaju mlijeka i mliječnih proizvoda dobiveno je dosta obećavajućih rezultata vezanih uz mikrobiološku redukciju, međutim sve je veći broj studija koje izvještavaju o negativnim učincima pojedinih postupaka na njihove sastojke i svojstva. Stoga je u budućnosti potrebno posvetiti još više pozornosti optimiranju primjene novih metoda u svrhu postizanja što manjih strukturalnih promjena te što bolje redukcije mikroorganizama. Pri tom se svakako trebaju uzeti u obzir i faktori koji utječu na sigurnost hrane, s obzirom da je to danas jedan od najznačajnijih pojmova koji se veže uz hranu.

Possibilities of implementing nonthermal processing methods in the dairy industry

Summary

In the past two decades a lot of research in the field of food science has focused on new, non-thermal processing methods. This article describes the most intensively investigated new processing methods for implementation in the dairy industry, like microfiltration, high hydrostatic pressure, ultrasound and pulsed electric fields. For each method an overview is given for the principle of microbial inactivation, the obtained results regarding reduction of microorganisms as well as the positive and undesirable effects on milk composition and characteristics. Most promising methods for further implementation in the dairy industry appeared to be combination of moderate temperatures with high hydrostatic pressure, respectively, pulsed electric fields and microfiltration, since those treatments did not result in any undesirable changes in sensory properties of milk. Additionally, milk treatment with these methods resulted in a better milk fat homogenization, faster rennet coagulation, shorter duration of milk fermentations, etc. Very good results regarding microbial inactivation were obtained by treating milk with combination of moderate temperatures and high intensity ultrasound which is also called a process of thermosonification. However, thermosonification treatments often result in undesirable changes in milk sensory properties, which is most probably due to ultrasonic induced milk fat oxidation. This article also shortly describes the use of natural compounds with antimicrobial effects such as bacteriocins, lactoperoxidase system and lysozyme. However their implementation is limited for reasons like high costs, interaction with other food ingredients, poor solubility, narrow activity spectrum, spontaneous loss of bacteriocinogenicity, etc. In addition, principles of antimicrobial effect of microwaves and ultraviolet irradiation are described. However their implementation in the dairy industry failed mostly due to technical and commercial reasons.

Key words: milk, high hydrostatic pressure, ultrasound, pulsed electric fields, microfiltration

Literatura

1. Anema, S.G. (2010): Effect of pH at pressure treatment on the acid gelation of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 265-273.
2. Bendicho, S., Barbosa-Canovas, G.V., Martiny, O. (2002): Milk processing by high intensity pulsed electric fields, *Trends in Food Science and Technology* 13, 195-204.
3. Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J. (2006): Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal* 16, 275-284.
4. Bousouel, N., Mathieu, F., Revol-Junelles, A.M., Millière, J.B. (2000): Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 61, 169-175.
5. Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009): Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehranbenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (1-2), 32-37.
6. Brondum, J., Egebo, M., Agerskov, C., Busk, H., (1998): Online park carcass grading with the autoform ultrasound system. *Journal of Animal Science* 76, 1859-1868.
7. Butz, P., Tauscher, B. (2002): Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35 (2/3), 279-284.
8. Craven, H.M., Swiergon, P., Midgely, S., Ng, J., Versteeg, C., Coventry, M.J., Wan, J. (2008): Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 211-216.
9. Davies, E.A., Bevis, H.E., Delves-Broughton, J. (1997): The use of the bacteriocin nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*, *Letters in Applied Microbiology* 24, 343-346.
10. Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004): New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273-285.
11. Drgalić, I., Tratnik, L.J. (2004): Primjena i značaj mikrofiltracije u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 54 (3), 225-245.
12. Fandino-Lopez, R. (2006): High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal* 16, 1119-1131.
13. Fellows, P.J. (2000): Food processing technology: principles and practice. Woodhead Publishing.
14. Garcia-Amezquita, L.E., Primo-Mora, A.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Sepulveda, D.R. (2009): Effect of non-thermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 491-494.
15. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N.B. (2007): Bacteriocin-based strategies for food biopreservation- *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.
16. Gould, G.W. (1999): *New Methods of Food Preservation*. Aspen Publishers, Gaithersberg, Maryland, USA.
17. Harte, F.M., Gurram, S.R., Luedecke, L.O., Swanson, B.G., Barbosa-Canovas, G.V. (2007): Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. *Journal of Dairy Research* 74, 452-458.
18. Herceg, Z. (2009): *Procesi konzerviranja hrane - Novi postupci*. Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
19. Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009): Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59 (1), 65-69.
20. Hoffmann, W., Kiesner, K., Clawindraecker, I., Martin, D., Einhoff, K., Lorenzen, C.P., Meisel, H., Hammer, P., Suhren, G., Teufel, P. (2006): Processing of extended shelf life milk using microfiltration. *International Journal of Dairy Technology* 59 (4), 229-236.
21. Huppertz, T., Smiddy, M.A., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L. (2006): High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology* 59 (2), 58-66.
22. Kessler, H.G. (2002): *Food and Bio Process Engineering - Dairy Technology*. Verlag A. Kessler, Munich, Germany.
23. Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D-U. (2004): Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 15, 261-266.
24. Kulozik, U., Kersten, M. (2002): Membrane Fractionation of Dairy Proteins by Means of Microfiltration. *English Life Sciences* 2 (9), 275-278.
25. Lelas, V. (2006): Nove tehnike procesiranja hrane, *Mljekarstvo* 56 (4), 311-330.
26. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996): The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253.
27. McClements, D.J. (1995): Advances in applications of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6, 293-299.
28. Moatsou, G., Bakopanos, C., Katharios, D., Katsaros, G., Kandarakis, I., Taoukis, P., Politis, I. (2008): Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 75, 262-269.
29. Nguyen, T.M.P., Lee, Y. K., Zhou, W. (2009): Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal* 19, 410-416.
30. Nielsen, W.K. (2000): *Membrane filtration and related molecular separation technologies*. APV Systems, Silkeborg, Denmark.

31. Patist, A., Bates, D. (2008): Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.
32. Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2007): Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *Journal of Dairy Science* 90 (3), 1081-1093.
33. Piyasena, P., Mohareb, E., Mckellar, R.C. (2003): Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* 87, 207-216.
34. Pouliot, Y. (2008): Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal* 18, 735-740.
35. Raso, J., Pagan, R., Condon, S., Sala, F.J. (1998): Influence of Temperature and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 465-471.
36. Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J. G. (2009): Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal* 19, 269-272.
37. Režek-Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža M. (2009): Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59 (4), 267-281.
38. Ross, A.I.V., Griffiths, M.W, Mittal, G.S., Deeth, H.C. (2003): Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 89, 125-138.
39. Rysstad, G., Kolstad, J. (2006): Extended shelf life milk - advances in technology. *International Journal of Dairy Technology* 59, 85-97.
40. Saboya, L. V., Maubois, J.L. (2000): Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait* 80, 541-553.
41. Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995): Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: Gould, G W. (ur.) *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic & Professional, London.
42. Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F., Wan, J. (2008): Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9,217-223.
43. Shin, S.Y., Calvisi, E.G., Beaman, T.C., Pankratz, H.S., Gerhardt, P., Marquis, R.E. (1994): Microscopic and thermal characterisation of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators and antioxidants. *Applied Environmental Microbiology* 60, 3192-3197.
44. Sepulveda, D.R., Gongora-Nieto, M.M., Guerrero, J.A., Barbosa-Canovas, G.V. (2009): Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *LWT - Food Science and Technology* 42,735-739.
45. Suslick, K.S. (1989): The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* 60, 62-68.
46. Tratnik, LJ. (1998): *Mlijeko-Tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
47. Tolkach, A., Kulozik, U. (2006): Transport of whey proteins through 0.1 mm ceramic membrane: phenomena, modelling and consequences for concentration or diafiltration processes. *Desalination* 199, 340-341.
48. Villamiel, M., de Jong, P. (2000): Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Tryptocase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering* 45, 171-179.
49. Wang, D., Sakakibara, M., Kondoh, N., Suzuki, K. (1996): Ultrasound-Enhanced Lactose Hydrolysis in Milk Fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 65, 86-92.
50. Yu, L.J., Ngadi, M., Raghavan, G.S.V. (2009): Effect of temperature and pulsed electric field treatment on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Food Engineering* 95, 115-118.
51. Zapico, P., Medina, M., Gaya, P., Nunez, M. (1998): Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 40, 35-42.