# Mikrobiološka kakvoća sireva na hrvatskom tržištu

**Barun, Gabriela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:915079

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**
**VETERINARSKI FAKULTET**

**Gabriela Barun**

# MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SIREVA NA HRVATSKOM TRŽIŠTU

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2016.**

**VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**
**ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU**
**I SIGURNOST HRANE**

**Predstojnica:**
**Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić**

**Mentor:**
**Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec**

**Članovi povjerenstva:**

1. **Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić**
2. **dr. sc. Ivana Filipović**
3. **Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec**

## SADRŽAJ


1. UVOD 1

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 3

2.1. Općenito o siru 3

2.2. Tehnološki postupci u proizvodnji sira 4

2.2.1. Hlađenje mlijeka 5

2.2.2. Toplinska obrada mlijeka 5

2.2.3. Mehanička obrada mlijeka 6

2.2.4. Homogenizacija mlijeka 7

2.2.5. Dodavanje boja i aditiva 7

2.2.6. Dodavanje mljekarskih kultura i zrenje mlijeka 8

2.2.7. Dodavanje sirila i sirenje mlijeka 10

2.2.8. Gruš 11

2.2.9. Prešanje sira 11

2.2.10. Soljenje sira 12

2.2.11. Zrenje sira 12

2.2.12. Zaštita, pakiranje i skladištenje sira 14

2.3. Sastav sirarskih kultura 15

2.4. Mikrobiološki kriteriji za mliječne proizvode 18

2.5. Higijena u proizvodnji sira 20

2.5.1. Higijenska kvaliteta mlijeka za sirenje 20

2.5.2. Mikrobiološke opasnosti u sirarstvu 21

3. MATERIJAL I METODE 24

4. REZULTATI 26

**5. RASPRAVA** **29**

**6. ZAKLJUČAK** **32**

**7. LITERATURA** **33**

**8. SAŽETAK** **36**

**9. SUMMARY** **37**

**10. ŽIVOTOPIS** **38**

*Zahvala*

*Zahvaljujem se mentoru, doc. dr. sc. Neviju Zdolecu na ukazanom povjerenju tijekom pisanja rada, nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima. Veliko hvala svim djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane koji su na bilo koji način sudjelovali u realizaciji ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na potpori i strpljenju tijekom studiranja, te kolegama i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom studija.*

# 1. UVOD

Sir danas prihvaćamo kao uobičajenu hranu, no sirarstvo svoj početak ima još 8000 godina prije Krista na području današnjeg Iraka, a u Europi na području Engleske 4500 g.pr.Kr., gdje su pronađeni keramički predmeti za skladištenje i preradu. Nešto kasnije je sir opisan i kroz Homerova dijela, ali kao i biblijski motiv kao cijenjeno i vrijedno sve do renesansnoga doba gdje ga plemstvo smatra nezdravim i hranom običnog puka. Prema podacima FAOSTAT-a, svjetska proizvodnja sira 2013. godine bila je 21.3 milijuna tona, od toga u SAD-u 5.4 milijuna tona, a zatim slijede Njemačka, Francuska i Italija.

Takav opseg proizvodnje i potrošnje dovoljno govori o važnosti potencijalnih rizika za zdravlje potrošača, uključujući mikrobiološke rizike. Stoga je mikrobiološka kakvoća sirovine i sirarskih proizvoda regulirana odgovarajućim propisima koji se odnose na nalaz patogenih mikroorganizama i njihovih metabolita koji su štetni po zdravlje čovjeka (HADŽIOSMANOVIĆ, 1995.). Najčešći se razlozi mikrobiološke nesukladnosti različitih vrsta sireva navode bakterije *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* te kvasci i plijesni. Dobra mikrobiološka kakvoća sirovog mlijeka preduvjet je dobre mikrobiološke kakvoće mliječnih proizvoda (KOZAČINSKI i sur., 2003.). U tom smislu određivanje broja i vrsta mikroorganizama prisutnih u konzumnom mlijeku i mliječnim proizvodima daje najbolji uvid u kvalitetu proizvodnje određenog proizvođača.

Mikrobiološka kakvoća sira ocjenjuje se prema odredbama Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN br. 81/2013) koji zapravo prenosi odredbe europske Uredbe EZ 2073/2005 (naš bivši Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 156/08)). Proizvođači moraju osigurati sukladnost hrane s propisanim mikrobiološkim kriterijima što se ostvaruje provođenjem mjera u svakoj fazi proizvodnje, prerade i distribucije, uključujući maloprodaju. Poznato je da je odgovornost za zdravstvenu ispravnost hrane na subjektima u poslovanju s hranom, a mikrobiološka ispravnost je tu od primarnog značaja.

Na našem tržištu pojavljuju se brojne vrste sireva, od tradicijskih do industrijskih, proizvedenih od nepasteriziranog ili pasteriziranog mlijeka, sa ili bez starter kultura bakterija, kvasaca ili plijesni itd. Svaki tip proizvodnje u sirarstvu

donosi specifične izazove pa i određene mikrobiološke rizike. Cilj je ovog diplomskog rada bio odrediti mikrobiološku kvalitetu mekih, polutvrdih i tvrdih sireva u maloprodaji. Mikrobiološki parametri odabrani su prema kriteriju povezanosti s nastankom biogenih amina u sirevima, poput enterokoka, stafilokoka, enterobakterija ili kvasaca.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1 Općenito o siru

Sir je proizvod s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon zgrušnjavanja mlijeka (kravljeg, ovčjeg, bivoljeg ili njihovih mješavina), vrhnja ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sira dopuštena je uporaba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih enzima zgrušnjavanja i/ili dopuštenih kiselina. Definira se kao fermentiran ili ne fermetniran proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka, obranog mlijeka ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina te izdvajanjem sirutke (uz dodatak sirila ili nekog drugog zamjenskog enzima za zgrušavanje (KALIT, 2015.). U Tablici 1 prikazana je podjela sireva prema različitim mjerilima.

Tablica 1. Podjela sireva prema sadržaju vode, masti, načinu zrenja i grušanja

| | |
|---|---|
| SADRŽAJ VODE U BEZMASNOJ TVARI | EKSTRATVRDI- parmezan/paški sir |
| | TVRDI- emmentaler/ čedar |
| | POLUTVRDI- trapist/edamer/gouda |
| | MEKI- mozzarella |
| | SVJEŽI- svježi zrnati sir |

| | |
|---|---|
| PREMA SADRŽAJU MASTI U SUHOJ TVARI | EKSTRAMASNI- više od 60% |
| | PUNOMASNI- 45-60% |
| | MASNI-25-45% |
| | POLUMASNI- 10-25% |
| | POSNI-manje od 10% |

Nastavak Tablice 1.

| | |
|---|---|
| PREMA NAČINU ZRENJA | SIREVI KOJI NE ZRIJU |
| | SIREVI KOJI ZRIJU SA BAKTERIJAMA U UNUTRAŠNJOSTI |
| | SIREVI KOJI ZRIJU SA BAKTERIJAMA NA POVRŠINI |
| | SIREVI KOJI ZRIJU SA PLJESNIMA U UNUTRAŠNJOSTI |
| | SIREVI KOJI ZRIJU SA PLJESNIMA NA POVRŠINI |
| PREMA NAČINU GRUŠANJA MLIJEKA | KISELI (dodavanjem kiseline- mliječno kiselo vrenje) |
| | SLATKI (djelovanjem enzimskih pripravaka-sirila) |
| | MJEŠOVITI |

Tehnološki proces proizvodnje sira temelji se na dva ključna pitanja, kako proizvesti sir dobrih organoleptičkih svojstava (vanjski izgled, boja, kozistencija, izgled na presjeku, miris, okus) te drugo, kako napraviti tehnološko-proizvodni protokol koji će za cilj svakodnevno dati sir istih karakteristika.

## 2.2. Tehnološki postupci u proizvodnji sira

Tehnološki procesi i postupci u proizvodnji sira su zajednički za većinu sireva. Prvi i osnovni dio je standardnizacija mlijeka kao bi se poništile sezonske varijacije u kvaliteti mlijeka, odnosno kako bi se odnos od 0,7:1 kazeina i masti u mlijeku doveo u optimalan odnos. Standardizacija se može provesti na dva načina, obiranjem vrhnja iz punomasnog mlijeka ili dodavanjem mlijeka u prahu (KALIT, 2015.). Količina mliječne masti mora se prilagođavati vrsti sira koja se proizvodi (TRATNIK, 1998.).

Proizvodnja sira uključuje složene kemijske i fizikalne procese, koji uključuju:

- Hlađenje mlijeka
- Toplinsku obradu mlijeka
- Mehaničku obradu mlijeka
- Standardizaciju mlijeka
- Homogenizaciju mlijeka
- Dodavanje boja i aditiva
- Dodavanje mljekarskih kultura
- Zrenje mlijeka
- Dodavanje sirila i sirenje mlijeka
- Rezanje gruša i obradu sirnoga zrna
- Oblikovanje
- Prešanje
- Soljenje
- Zrenje sira
- Zaštitu, pakiranje i skladištenje
- Otpremu

### 2.2.1. Hlađenje mlijeka

Prije prerade mlijeko se hladi na 4 ºC i čuva 24 sata kako bi se završila baktericidna faza, a mlijeko bilo prikladno za sirenje. U manjim pogonima hladi se u laktofrizima (200-1000L), u velikim pogonima u tanku za sirovo mlijeko pri čemu se ono prethodno hladi u protočnom hladioniku. Aktivnost bakterija mliječne kiseline inhibiraju polimorfnonuklearni leukociti, makrofazi, lektoperoksidaza, tioijanat, imonoglobulini, vodikov peroksid, imunoglobulini.

### 2.2.2. Toplinska obrada mlijeka

U proizvodnji sira nije poželjna visoka toplinska obrada mlijeka koja oštećuje svojstvo sirenja, otpuštanje sirutke, miris i okus sira (TRATNIK, 1998.). Najčešće se koriste dvije toplinske obrade; termizacija i pasterizacija. Cilj toplinske obrade mlijeka

jest biološka standardizacija kvalitete mlijeka za sirenje. Termizacija se najčešće koristi u proizvodnji nekih tradicionalnih sireva kada se u mlijeku želi sačuvati što više prirodnih sastojaka (KALIT, 2015.). Tri su režima termizacije; 72º bez zadržavanja, 70º tijekom 15 sekundi (KALIT, 2015.), time se uništavaju bakterije: *Yersinia enterocolitica, E.coli, Salmonella* (TRATNIK, 1998.), 68 ºC tijekom 40 sekundi (KALIT, 2015.), koja uništava bakteriju *L. monocytogenes* (TRATNIK, 1998.). Termalizacija nije zamjena za pasterizaciju i ne uništavaju se enzimi (TRATNIK, 1998.). Pasterizacijom se, osim poboljšanja biološke kvalitete mlijeka, uništavaju svi patogeni mikroorganizmi i većina štetnih mikroorganizama. To znači da se pravilnim provođenjem pasterizacije osigurava mikrobiološka ispravnost sira. Međutim, pasterizacijom se uništavaju i korisne bakterije mliječne kiseline i prirodni enzimi kao što je lipaza. Važno je naglasiti da je u toplinski obrađeno mlijeko potrebno dodati BMK u obliku čiste mljekarske kulture ili startera. Najčešće se koriste dvije vrste pasterizacije;

a) niska pasterizacija na 63 ºC tijekom 30 minuta

b) srednja pasterizacija na 72 ºC tijekom 15 sekundi

Visoka pasterizacija (85 º C/ 1 minutu) rijetko se koristi u sirarstvu, narušava grušanje mlijeka (KALIT, 2015.), ali koristi se u proizvodnji svježeg mekog sira što dovodi do međudjelovanja kazeina i proteina sirutke, čime se povećava prinos svježeg sira, ali i količina vode u njemu (TRATNIK, 1998.).

### 2.2.3. Mehanička obrada mlijeka

Baktofugacija (centrifugalna separacija bakterije) proces je uklanjanja bakterija iz mlijeka, spora- hermetičkom centrifugom (baktofuga). Dolazi do separacije u dvije frakcije: mlijeko oslobođeno od većeg broja bakterija i spora i koncentrat bakterija i spora. 2-3% iznosi količina baktofugata od ukupnog volumena mlijeka. Temperatura pri kojoj se provodi baktofugacija je oko 60-63 ºC. Dobiveni baktofugat se može sterilizirati na 130 ºC nekoliko sekundi, ohladiti i pripojiti preostalom djelu baktofugiranoga mlijeka, što se prethodno pasterizira na 72 ºC 15 sekundi ili se posebno prerađuje u druge proizvode (TRATNIK, 1998.). Mikrofiltracija je proces uklanjanja bakterija preko membrana, upotrebljavaju se pore veličine od 0-8 do 0-17

mikrometara da se smanji gubitak proteina. Zadržani proteini tvore "dinamičku membranu" koja osigurava zadržavanje mikroorganizama. Obrano mlijeko se milkrofiltrira pri 50 ºC (TRATNIK, 1998.). Koncentrat filtrata što ostane može se sterilizirati na 120-130 ºC nekoliko sekundi, ohladiti i pripojiti mikrofiltriranome mlijeku koje se pasterizira pri 70-72 ºC 15 sekundi. Dvostrukom mikrofiltracijom, mogu se ukloniti i bakterije kao *Bacillus cereus* i *Clostridium tyrobutricium*. Prednosti mikrofiltracije su da nema dodavanja nitrata u mlijeko, lakše se kontrolira zrenje sira i kraće je trajanje zrenja sira, nema potrebe za termalizacijom svježeg mekog sira i produljena mu je trajnost (TRATNIK, 1998.).

### 2.2.4. Homogenizacija mlijeka

U sirarstvu se rijetko primjenjuje jer dovodi do promjena u mlijeku najviše kod strukture proteina jer tada dolazi do oblikovanja mekšeg gruša uz smanjenu sposobnost koncentracije i odvajanja sirutke, tada se gruš teže obrađuje, teže otpušta sirutku i veći su gubici proteina. Homogenizirano mlijeko se nešto brže gruša pa je veće zadržavanje masti u grušu i povećanje prinosa sira. Primjenom manjeg tlaka kod proizvodnje mekih sireva koristi se homogenizacija (TRATNIK, 1998.). Homogenizacija se primarno najviše koristi kod sireva sa plavim plijesnima gdje su potrebne lipoliza i proteoliza (KALIT, 2015.), veći udjel vode i tvorba slatkog gruša (TRATNIK, 1998.). Osim toga, veći udjel vode u siru i veća kiselost pospješuju rast plijesni, a homogenizirana mliječna mast ubrza lipolizu i nastaje oštar okus i miris karakterističan za takve sireve (TRATNIK, 1998.).

### 2.2.5. Dodavanje boja i aditiva

Dodaci u proizvodnji sira u pravilu dodaju se u već pripremljeno (pasterizirano i/ili temperirano mlijeko) za sirenje u otopljenom obliku (KALIT, 2015.). Ukoliko je sirovina loše kvalitete, otežano je odvajanje sirutke od gruša, a gubici kazeina i mliječne masti s odvojenom sirutkom veći, pa se dodaju različiti dodaci (TRATNIK, 1998.). Dodaju se prije mljekarskih kultura i sirila. Od dodataka u proizvodnji sira najčešće se koristi kalcijev klorid ($CaCl_2$; za grušanje mlijeka), enzim lizozim (za sprječavanje kasnog nadimanja sira), enzimi za ubrzanje zrenja sira (lipaze) (KALIT,

2015.). Kalcijev klorid je potreban da bi se stvorila dovoljna čvrstoća gruša pri sirenju mlijeka dodavanjem enzimatskih pripravaka. Prekomjerna količina $CaCl_2$ može utjecati na stvaranje prečvrstog gruša tako da se teško reže, a sirna se zrna onda loše sljepljuju i nastaje neujednačena tekstura tijesta i gorak okus sira (TRATNIK, 1998.). Kod proizvodnje tvrdih i polutvrdih sireva od boja se koriste beta karoten, ekstrakt šafrana, crvene paprike. Ekstrakti boja se moraju razrijediti višestruko u jednom udjelu mlijeka i ravnomjerno raspodjeliti u ostalom mlijeku, prije dodavanja sirila, nije poželjno da se boja miješa sa sirilom, da bi se ubrzao postupak, jer samo miješanje slabi jačinu sirila (TRATNIK,1998.). Često se u upotrebi može naći i lisozim, on se nalazi u tragovima i u bjelanjku jajeta (oko 0,5%) za uspješnu kontrolu bakterija roda *Clostridium* i maslačnog vrenja u nekim vrstama europskih sireva može se koristiti oko 1-3 g komercijalnog pripravka Lysozyma na 100L mlijeka, većina se enzima veže za gruš sira gdje inhibira klostridije i druge gram pozitivne bakterije (TRATNIK, 1998.). Enzimski pripravci mogu se dodavati izravno u mlijeko ili sirni gruš, najčešće su to lipaze, proteinaze. Metali u tragovima- kako se sirevi tipa Emmentaler i Gruyer tradicionalno proizvode u bakrenim kotlovima, ako se proizvodnja prebaci u kade od nehrđajućeg čelika ne postiže se svojstvena aroma pa se dodaje oko 15 ppm bakrovog sulfata što odgovara količini bakra koji se asporbira iz tradicionalnih kotlova. Bakar kontrolira aktivnost *Propionilbacterium* spp. koje su značajne za formiranje pravilnih sirnih očiju kod Emmetalera, a količina veća od 25 ppm mijenja boju sira (MATIJEVIĆ, 2015.).

### 2.2.6. Dodavanje mljekarskih kultura i zrenje mlijeka

Mljekarske kulture su bitna komponenta u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Sastoje se od aktivnim mikroorganizama koji nisu štetni i koji svojim rastom osiguravaju željeni okus i teksturu. Uloga mljekarskih kultura je mnogobrojna poput razgradnje mliječnog šećera i proizvodnje mliječne kiseline, stvaranja spojeva koji daju aromu, svojim enzimima razgrađuju proteine, masti i laktozu, ihibiraju rast nepoželjnih mikroorganizama te tako utječu na dužu trajnost, oblikovanje gruša (KALIT, 2015.). Mljekarske kulture se dijele s obzirom na optimalnu temperaturu za njihov rast i aktivnost na mezofilne i na termofilne. Mezofilne rastu na temperaturi između 25-30 $^oC$, zakisele sir razgradnjom laktoze, mogu sniziti pH sira ispod 5,0 pa

se dobije prekiseli sir, halofilne su, smanjena im je aktivnost na 40 ºC i više. Koriste se u proizvodnji mekih i polutvrdih sireva. U proizvodnji sireva kao što su paški ili istarski koriste se u kombinaciji sa termofilnim kulturama. Termofilne kulture rastu iznad 40 ºC, ako temperatura padne ispod 20ºC smanjuje se razgradnja laktoze i proizvodnja mliječne kiseline, nisu tolerantne na sol tako da sir mora dosegnuti konačnu kiselost prije salamurenja/soljenja. Koriste se u proizvodnji tvrdih sireva kod kojih se sirno zrno dodatno grije na temperaturu veću od 40 ºC (KALIT, 2015.)

- mikrobne kulture za polutvrde i meke sireve

2 vrste mikroorganizama *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis* i *Lactobacillius casei* u omjeru 1:1 ili 1:2 u inokulumu, uzgajaju se u obranom mlijeku na 30 ºC 20-24 sata. Mlijeku za sirenje dodaje se 0,5% mikrobne kulture (PERKO, 2015.). Postoje i posebne mikrobne kulture za polutvrde i meke sireve, kao što su:

*a) Brevibacterium linens*- živi u alkalnoj sredini i proteolit je i sudjeluje u sekundarnom zrenju sira, raste na površini sira, tvori crveni maz

*b) Bijela plijesan*- plijesan *Penicillium candida* najbolje raste na 15 ºC, uzgaja se na čvrstoj podlozi. Kultura je koja se ne priprema u mljekarama, koriste se spore plijesni koje se dodaju i mlijeko ili u sirni gruš prije oblikovanja mekih sireva kao što je Camembert.

*c) Plava plijesan*- koristi se u proizvodnji sira s pljesni koja se nalazi u sirnom tijestu (Roquefort, Gorgonzola). Mlijeku se dodaje suspenzija *Penicillium roqueforti* (zelene plijesni) ili *Penicillium gorgonzola* (plave plijesni). Količina plijesni koja se dodaje identična je onoj kod proizvodnje sireva s bijelom plijesni (PERKO, 2015.).

- mikrobne kulture za tvrde sireve

*a) mliječno-kisele mikrobne kulture*- uključuje *Streptococcus thermophilus* (za sinerezu) i *Lactobacillus helveticus* (formiranje okusa), u omjeru 1:1, koriste se kod Emmentalera.

*b) kisela sirutka*- uključuje *Lactobacillus helveticus* i kvasac *Candida crusei*, sadrži mliječno-kisele bakterije važne za formiranje tvrdih sireva i sireva za ribanje. Kvasac regulira nastajanje kiseline i služi drugim organizmima kao izvor proteina i vitamina (PERKO, 2015.).

Na hrvatskom tržištu dolaze u smrznutom ili liofiliziranom obliku. Smrznuti oblik ima bržu aktivnost, ali skladištenje mora biti na -40 ºC. Liofilizirani oblik ima duže vrijeme prilagodbe, no skladištenje je na -18 ºC.




Slika 1. Liofilizirana mljekarska kultura. Izvor: http://artisangeek.com/danisco-yo-mix-lb340-specialty- thermophilic-and-yogurt-adjunct-culture/

Ako mlijeko za sirenje nije zrelo, aktivnost sirila može biti usporena ili zaustavljena. Zrenje može trajati od 5 minuta do 2 sata što ovisi o vrsti sira i obliku mljekarske kulture. Manifestira se zakiseljavanjem i padom pH vrijednosti. Optimalna ph vrijednost zrelog mlijeka prije dodavanja sirila je između 6,5-6,35.

### 2.2.7. Dodavanje sirila i sirenje mlijeka

Sirilo je ekstrakt enzima izoliranih iz želuca mladih sisavaca. Pojavljuje se u tekućem obliku u obliku praha (MATIJEVIĆ, 2015.) ili tableta, koji su obično 10 puta veće jakosti (TRATNIK,1998.). Sirilo karakterizira određena jakost koja pokazuje koliko jedan dio sirila može zgrušati dijelova mlijeka za 40 minuta na temperaturi od 35 ºC (MATIJEVIĆ, 2015.). U proizvodnji svježeg sira (pastoznog) provodi se sirenje obranog mlijeka pod utjecajem kiseline nastale djelovanjem mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline. Provodi se u zatvorenoj posudi, temperatura je između 25 i 28 ºC, a pH oko 4,5-7,5 i to obično traje 16 sati. U proizvodnji svježeg, zrnatog sira, uobičajena su tri postupka; kratki postupak- 5% kulture, 32 ºC, 5 sati, potom srednje dugi postupak - 3% kulture, 26 ºC oko 8 sati, te dugi postupak 0,5% kulture, 22 ºC

oko 14-16 sati. U proizvodnji zrnatog sira bitno je koristiti selekcionirane mezofilne bakerije mliječne kiseline koji će proizvesti što manje $CO_2$, a što više kiseline i arome. Ako ima previše $CO_2$, doći će do plutanja zrna (TRATNIK, 2012.). Sirenje mlijeka za ostale tipove sira; polutvrdi, tvrdi, sirevi s plemenitom plijesni provodi se djelovanjem enzima sirila te je bitno osigurati mlijeko visoke sirivosti. Zakiseljavanje je temeljni postupak u proizvodnji sira. Zakiseljavanje se događa tijekom svih faza u procesu proizvodnje sira, a za neke vrste tokom rane faze zrenja sira (TRATNIK, 2012.).

### 2.2.8. Gruš

Bitan dio proizvodnje je osigurati oblikovanje gruša (koaguluma) dovoljne čvrstoće koji će biti pogodan za rezanje te je bitno odrediti pravo vrijeme za rezanje gruša: empirijski, određivanjem pH gruša, određivanjem titracijske kiselosti sirutke, određivanjem dovoljene jakosti gruša (mjernim instrumentom). Kiseli gruš- nastaje nakon grušanja obranog mlijeka. Zbog demineralizacije kazeina kiseli gruš sadržava manje kalcija i manje čestica agregiranih proteina i nema rastezljivu strukturu. Slatki gruš- nastaje nakon sirenja mlijeka djelovanjem enzima pri povoljnoj kiselosti i temperaturi, elastičan je zbog više netopovih soli, a većom sposobnošću stezanja što pospješuje izdvajanje sirutke. S povećanjem kiselosti gruš se više steže i nastaje čvršći gruš,a veća količina masti smanji sinerezu.

### 2.2.9. Prešanje sira

Koristi se da se dodatno ukloni višak vode-sirutka i da bi se oblikovao sir (PERKO, 2015.), da bi se osiguralo bolje spajanje zrna i da se tijekom zrenja osigura nastanak kore sira (TRATNIK, 1998.). Kapilarna voda iz mladog sira se može ukloniti povećanjem kiselosti po načelima sinereze. Kiselost može rasti samo ako su bakterije mliječne kiseline fermentirali laktozu u mliječnu kiselinu. Za prešanje tvrdih sireva treba više vremena, kod mekih sireva preša se vlastitom težinom-samoprešanje. Potrebno je i okretati sireve kako bi se odvojila sirutka i ravnomjerno raspodjelila voda (PERKO, 2015.). Postoji i samoprešanje sireva (pod vlastitom masom) koje traje 18-24 sata sa okretajem svakih 5 sati, temperatura prostorije oko 25 ºC (za 10 viša nego kod ostalih sireva) i da je vlaga zraka prostorije oko 90-95%

da se ne stvori presuha površina ili kora sira koja sprječava rast plijesni (TRATNIK,1998.).

### 2.2.10. Soljenje sira

Provodi se zbog boljeg okusa, lakšeg i bržeg bubrenja proteina, poprimanja konačnog oblika kore, smanjenja vlage i produljenja trajnosti. Sol djeluje selektivno na rast mikroorganizama. Postoje tri načina soljenja: a) dodavanje u sirni gruš, b) suho soljenje, c) potapanjem u salamuru. Potapanje u salamuri je najčešće, kocentracija soli bi trebala biti između 16 i 22% (PERKO, 2015.), ili oko 23% (KALIT, 2015.), temperatura između 14 i 18 ºC (PERKO, 2015.). Preniska temperatura može dovesti do sporog prodiranja soli u tijesto sira, dok previsoka temperatura dovodi do prebrzoga (KALIT, 2015.). Salamura se radi zakuhavanjem određene količine vode (70-80 ºC) u koju se dodaje 2,5-2,7 kg soli na svakih 10L salamure, u ohlađenu salamuru potrebno je dodati kalcijev klorid pripremljen kao 30% otopina. Vremenski period salamurenja ovisi o vrsti sira, npr. Ementaler, 3-5 dana dok je Camambert siru dovoljno 2-4 sata (PERKO, 2015.).

### 2.2.11. Zrenje sira

Zrenje sira je sazrijevanje sirne mase u zreli sir (TRATNIK, 1998.). Sir se prenosi u zrionu nakon soljenja i sušenja u kojoj su bitni temperatura i relativna vlažnost zraka (PERKO, 2015.). Temperatura i relativna vlažnost zraka se prilagođavaju izabranoj mikrobnoj kulturi (TRATNIK, 1998.). Temperatura ovisi o tome koji mikroorganizmi sudjeluju pri zrenju i o vrsti sira. Kemijski, biokemijski i fizikalni procesi na sirnom tijestu postižu se odgovarajućom temperaturom. Na niskim temperaturama zriju meki sirevi, a na višima tvrdi. Za većinu je to između 14-18 ºC, a relativna vlažnost zraka između 85-95 % (PERKO, 2015.). Suha klima dovodi do naglog sušenja sira, stvori se kora koja spriječi pravilno zrenje i umanjuje kakvoću sira, vlažna klima uzrokuje rast neželjene plijesni i druge mane na kori te kvarenje sira (TRATNIK,1998.). Preko tvrdih ili polutvrdih sireva može doći parafin, plastični premaz ili plastična folija na početku zrenja ili tijekom zrenja. Time se smanjuje gubitak vode i zaštićen je od kontaminacije (TRATNIK, 1998.).

- primarno zrenje

  Ubrajamo postupke koji se zbivaju pri zrenju polutvrdih i tvrdih sireva (PERKO, 2015.). U tvrdim sirevima, procesi se događaju pod utjecajem izlučenih enzima i endogenih enzima bakterija mliječne kiseline, kod polutvrdih pod utjecajem mikrobnih enzima i enzima sirila. (TRATNIK, 1998.). Dvije najvažnije biokemijske i kemijske promjene koje se događaju su razgradnja laktoze i promjene na proteinima, pod utjecajem mliječne kiseline i soli u siru (NaCl) i proteolitičkih enzima, a paralelno sa razgradnjom proteina počinje i razgradnja masti. Mliječna kiselina uz soli u siru sudjeluje u pripravi kazeina za daljnje biokemijske reakcije. Promjene na proteinima omogućavaju aktivnost enzima za proteolizu što utječe na kozistenciju sira, jer sirno tijesto sira postaje plastično i gipko. Kod mladih sireva prije zrenja proteini su netopljivi, napredovanjem zrenja, napreduje hidroliza proteina u topljive komplekse. Zrelost se sira tako može određivati udjelom topljivog dušika u siru (TRATNIK, 1998.). Za vrijeme primarnog zrenja može doći do stvaranja sitnih rupica tvrdih sireva, posljedica su propionsko- kiselog vrenja pod vrenjem bakterija *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, koja nastale laktate i dio mliječne kiseline prevodi u propionsku kiselinu, octenu, $CO_2$ i vodu, nastali $CO_2$ je topiv u vodi, plin koji ostane difundira u dio sira na mjestu spajanja zrna jer je tamo otpor manji i tvori okrugle rupice. Proces se odvija u siru nakon 3-4 tjedna, a intezivnije u prostorijama pri 22-24 $^oC$, a pH je između 5-6. U slučaju prisustva koliformnih bakterija ili klostridija koje proizvode veću količiniu sira uzrokuju glavne mane sira; rano nadimanje sira (tijekom salamurenja) većinom u polutvrdih (koliformne bakterije) ili kasno nadimanje kod tvrdih sireva i u kasnoj fazi zrenja (*Clostridium*) (TRATNIK, 1998.).

- sekundarno zrenje

  Biokemijski procesi zbivaju se u sirevima koji imaju veći udjel vode i veću kiselost (meki i polumeki sirevi), a pod utjecajem su rasta i aktivnosti mikroflore proteolita i lipolita (kvasci i plijesni), djelovanje je esencijalno za nastanak maza na površini, te u sireva uz rast plijesni na površini kao kod kamambera ili u unutrašnjosti kao kod rokfora (TRATNIK, 1998.). Sekundarno zrenje ide s površine sira prema unutrašnjosti sira, za razliku od primarnog

koji istvoremeno ide u svim smjerovima (PERKO, 2015.). Intezitet okusa i mirisa sira ovisi o vrsti i količini produkta razgradnje aminokiselina i masnih kiselina, a stupanj razgradnje proteina utječe na kozistenciju i teksturu sira. Pri sekundarnom zrenju sirevi u salamuri sazrijevaju pod utjecajem anaerobnih bakterija. Kod sireva sa plemenitom plijesni, poželjan je veći stupanj proteoliza i lipolize kao naprimjer kod sira kamamber gdje su proteini razgrađeni čak do 90% i tada sir curi.

### 2.2.12. Zaštita, pakiranje i skladištenje sira

Zaštita sira ovisi o vrsti sira, kod polutvrdih/tvrdih sireva- premažu se parafinom ili sintetičkim premazima ili se zamotaju u polivinil ili polistiren folije, a premazi sadržavaju tvari s antibakterijskim djelovanjem. Površinska obrada polutvrdih i tvrdih sireva sorbinskom kiselinom ili solima sorbinske kiseline može biti djelotvorna zaštita protiv rasta plijesni i kvasca tijekom zrenja ili skladištenja sira. Za zaštitu sireva može se primjeniti i antibiotik natamicin koji zaostaje na površini sira dulje vrijeme, prodire ispod kore 2mm za razliku od sorbinske kiseline koja penetrira u cijeli sir. Natamicin je djelotvoran u zaštiti od aflatoksina, a posebno je na njega osjetljiva plijesan *Aspergillus flavus* koja ga sintetizira, nema fiziološko djelovanje, nije toksičan, a sir može zaštititi do 8 tjedana. U trenutku prodaje ne smije sadržavati više od 2mg natamicina na $dm^2$. Jako tvrdi sirevi (paški, ementaler) nakon duljeg zrenja, premazuju se uljem da se spriječi isušivanje sira. Meki sirevi se zamotaju u pergamentni papir, celofan ili aluminijske folije, a kod transporta u kartonsku ili drvenu ambalažu (TRATNIK, 1998.). Parafiranje se sve manje primjenjuje osim kod tradicionalnih sireva gdje obojeni parafin karakterizira vrstu sira (gouda-žuti parafin). U novije vrijeme se provodi zamatanje sireva u obojene ili neobojene plastične folije. Sirevi u salamuri pakiraju se u plastične, metalne ili drvene posude. Pakiranje sira sira u plastični materijal je pod vakumom da se spriječi pristup kisika ili onečošćenje sira. Sirevi koji se konzumiraju svježi, prije otpreme na tržište moraju se skladištiti na temperaturi (4-8 ºC) (PERKO, 2015.). Tvrdi i polutvrdi sirevi su trajniji pa se mogu duže skladištiti pri nižim temperaturama, vlaga mora biti prilagođena vrsti sira da ne bi došlo do prevelikog isušivanja sira ili tvorbe nepoželjne plijesni. Ako se sirevi zamrzavaju, onda moraju biti u zaštitnoj ambalaži na temperaturi između -15º C do –40 ºC, a odmrzavati se postupno u hladnijim prostorijama (TRATNIK, 1998.).

## 2.3. Sastav sirarskih kultura

Osnovna i najznačajnija uloga mikrobne kulture u sirarstvu je kontrolirana acidifikacija (fermentacija laktoze do mliječne kiseline) (ROGELJ, 2015.). Fermentacija laktoze ima za posljedicu snižavanje pH vrijednosti koja je značajna dalje za tehnološki proces proizvodnje sira, za sastav i kakvoću sira.

Primarne mikrobne kulture se dodaju u mlijeko za sir, na početku acidifikacije pospješuju aktivnost sirila i utječu na proteolitički aktivnost prirodnih proteinaza mlijeka. Kombinirana proteolitička aktivnoost sirila, prirodnih enzima mlijeka i enzima mikrobne kulture utječe na nastanak arome/okusa sira. Bakterije mliječne kiseline tvore aromu sira direktno, stvaranjem aromatičnin spojeva kao produkte fermenacije laktoze i citrata (ROGELJ, 2015.).

Sekundarne mikrobne kulture koriste se u sirarstvu sa ciljem formiranja specifičnih i jače izraženih senzornih svojstava. One nisu dio acidikikacije jer su aerobni mikroorganimzmi i nemaju enzim beta galaktoizidazu koja razgrađuje laktozu do jednostavnih šećera. Sekundarne mikrobne kulture čine različiti mikroorganizmi, bakterije, plijesni i kvasci.

U tablicama 2 i 3 prikazani su najvažniji mikroorganizmi u sastavu primarnih i sekundarnih mikrobnih kultura u sirarstvu.

Tablica 2. Glavni predstavnici BMK primarnih mikrobnih kultura (FARKYE i VEDAMUTH, 2002.; COGAN i BERESFORD, 2002.)

| ROD/VRSTA BAKTERIJE | FUNKCIJA | VRSTA SIRA |
|---|---|---|
| ***Lactococcus lactis*** | Proizvodnja kiseline, tijekom zrenja proizvodi aromu | Gauda,Edam |
| ***Leuconostoc spp.*** | Metabolizira citrat, proizvodi aromu | Svježi sirevi |
| ***Lactobacillus helveticus*** | Porizvodnja kiseline, tijekom zrenja proizvodi aromu | Tvrdi i polutvrdi sa visokom temepraturom dogrijavnja |
| ***Streptococcus thermophilus*** | Proizvodnja kiseline, tijekom zrenja proizvodi aromu | Emmentaler, Parmezan |
| ***Enterococcus* spp.** | Proizvodnja arome tokom zrenja, moguće patogen | Tradicionalni sirevi iz sirovog mlijeka |

Tablica 3. Glavni predstavnici sekundarnih mikrobnih kultura (RATTRAY i EPPERT, 2011.) i njihov značaj (FARKYE i VEDAMUTH, 2002.; COGAN i BERESFORD, 2002.)

| ROD/VRSTA BAKTERIJE | FUNKCIJA | VRSTA SIRA |
|---|---|---|
| ***Penicillium camemberti*** | Bijela plijesan, proteoliza-oblikovanje arome i tekstura tijekom zrenja (sirevi s plijesni na površini) | Camembert |
| ***Penicillium roqueforti*** | Plava plijesan, lipoliza-oblikovanje arome sira (sirevi s plijesni u sirnom tijestu) | Roquefort, Gorgonzola |
| ***Propionibacterium freudenrechi*** | Hidroliza mlijčne kiseline, stvaranje očiju kod švicarskog tipa sireva | Emmentaler |
| ***Corynebacterium* spp.** | Proteoliza pigmenta, oblikovanje teksture tijekom zrenja | Limburger, Munster |
| **KVASCI**<br>***Geotrichum candidum***<br>***Candida sake***<br>***Torulopsis candida*** | Lipoliza, djelomična proteoliza, oblikovanje arome, neutralizacija pH | Tilsit<br>St. Nectaire |
| ***Micrococcus* spp.** | Proteoliza, djelomična lipoliza, oblikovanje arome, proizvodi žuto-crvene pigmente na površini sira | |

## 2.4. Mikrobiološki kriteriji za mliječne proizvode

U Europskoj uniji mikrobiološki standardi za hranu propisani su Uredbom EZ 2073/2005 koja se u Republici Hrvatskoj prenosi Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/2013). Povijesno gledano, u Republici Hrvatskoj započela je primjena Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/2008, 156/2008) preuzetih iz iste Uredbe EZ 2073/2005 još 1. srpnja 2009. godine. U tim odredbama propisani su kriteriji za sigurnost hrane, higijenu u procesu proizvodnje, pravila za uzimanje i pripremu uzoraka te način interpretacije rezultata analize. Značajnije izmjene u odnosu na prijašnju praksu odnose se na plan uzimanja uzoraka, normirane metode te određivanje faze u kojoj se kriteriji primjenjuju (za vrijeme i na kraju proizvodnog procesa, prije otpreme proizvoda na tržište, na tržištu tijekom roka trajanja proizvoda). U okvirima odredbi za sigurnost mliječnih proizvoda uvodi se određivanje stafilokoknih enterotoksina u sirevima, mlijeku u prahu i sirutki u prahu tijekom predviđenog roka trajanja na tržištu. U tim se mliječnim proizvodima prisutnost stafilokoknih enterotoksina određuje i u slučajevima kada se utvrdi veći broj koagulaza pozitivnih stafilokoka od propisanog.

Preuzimanjem odgovornosti za sigurnost hrane, subjekti u poslovanju s hranom moraju dokazati da je njihova hrana sigurna, odnosno da se proces proizvodnje provodi u higijenskim uvjetima. Veterinarski inspektori/ovlašteni veterinari tijekom službenih kontrola između ostalog provjeravaju sukladnost s mikrobiološkim kriterijima sigurnosti hrane i higijene procesa. To znači da subjekti u poslovanju s hranom kroz svoje planove mikrobioloških kontrola moraju uzorkovati i slati na mikrobiološke pretrage uzorke hrane, obrisaka i dr. kako bi dokazali da su kritične točke proizvodnje pod kontrolom i proizvod zdravstveno ispravan.

U prijašnjim nacionalnim propisima bili su određeni mikrobiološki standardi za pojedine namirnice na tržištu, odnosno kriteriji su se odnosili na proizvod na kraju proizvodnog procesa (Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice; NN 46/1994, 20/2001, 40/2001, 125/2003, 32/2004). Od mliječnih proizvoda tu su bili obuhvaćeni: pasterizirano mlijeko i pasterizirani mliječni napitci, sterilizirano mlijeko i sterilizirani mliječni napitci, mlijeko u prahu i drugi praškasti proizvodi od mlijeka, zgusnuto zaslađeno i nezaslađeno mlijeko, puding, toplinski obrađeni mliječni deserti i slični proizvodi, kiselo mliječni fermentirani proizvodi, kiselo vrhnje, vrhnje od sirovog mlijeka, slatko vrhnje, maslac, sterilizirano slatko vrhnje i sterilizirane zamjene za slatko vrhnje, meki (svježi) sirevi od sirovog mlijeka, meki (svježi) sirevi od pasteriziranog mlijeka, sirevi s plijesnima, polutvrdi sirevi, tvrdi sirevi, topljeni sirevi, mliječni i sirni namazi (toplinski obrađeni), sladoledi, smrznuti deserti i slični proizvodi, slastičarski sladoledi, smjese za sladolede, tekuće i u

prahu. Ovisno o vrsti mliječnog proizvoda, standardi su bili propisani za slijedeće mikroorganizme: aerobne mezofilne bakterije, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, enterobakterije, *Staphylococcus aureus*, sulfitreducirajuće klostridije, *Listeria monocytogenes* te kvasce i plijesni.

Danas subjekti u poslovanju hranom moraju osigurati sukladnost hrane s propisanim mikrobiološkim kriterijima što se ostvaruje provođenjem mjera u svakoj fazi proizvodnje, prerade i distribucije, uključujući maloprodaju u okvirima dobre higijenske prakse i načela HACCP-a. Poznato je da je odgovornost za zdravstvenu ispravnost hrane na subjektima u poslovanju s hranom, a mikrobiološka ispravnost je tu od primarnog značaja.

Mikrobiološki kriterij Uredba EZ 2073/2005 definira kao kriterij koji utvrđuje prihvatljivost jednog proizvoda, serije proizvoda ili procesa, na temelju odsutnosti, prisutnosti ili broja mikroorganizama i/ili količine njihovih toksina/metabolita po jedinici mase, volumena, površine ili serije. Pod *kriterijem sigurnosti hrane* podrazumijevamo kriterij kojim se utvrđuje prihvatljivost jednog proizvoda ili serije proizvoda i primjenjuje se na proizvode stavljene na tržište, a *kriterij higijene procesa* jest kriterij koji označava prihvatljivo funkcioniranje proizvodnog procesa.

Danas se mikrobiološki *kriteriji sigurnosti mliječnih proizvoda* propisuju za sireve, maslac i vrhnje od sirovog mlijeka ili mlijeka koje je obrađeno temperaturom nižom od temperature pasterizacije, mlijeko u prahu i sirutku u prahu, sladoled i hranu za dojenčad. Kriteriji higijene u procesu proizvodnje odnose se na: pasterizirano mlijeko i druge pasterizirane tekuće mliječne proizvode, sireve od toplinski obrađenog mlijeka ili sirutke, sireve od sirovog mlijeka, sireve od mlijeka koje je toplinski obrađeno na temperaturi nižoj od temperature pasterizacije, zrele sireve od mlijeka ili sirutke koji su pasterizirani ili još jače toplinski obrađeni, nedozrele meke sireve (svježi sirevi) od mlijeka ili sirutke koji su pasterizirani ili još jače toplinski obrađeni, maslac i vrhnje od sirovog mlijeka ili mlijeka koje je toplinski obrađeno na temperaturi nižoj od temperature pasterizacije, mlijeko u prahu i sirutku u prahu, sladoled i smrznute mliječni deserte te dehidriranu hranu za dojenčad. U usporedbi s prije važećim propisima, uočava se da se Uredbom EZ 2073/2005 smanjuje broj mikrobioloških parametara koji se određuju u pojedinim vrstama hrane, što se osniva na znanstvenim mišljenjima vodećih mikrobioloških organizacija odnosno procjeni rizika. Tako se u mliječnim proizvodima i proizvodima koji sadrže mlijeko rizičnima smatraju bakterije (kriteriji sigurnosti hrane) *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* (danas mu je naziv *Cronobacter sakazakii*) te enterotoksini stafilokoka. Što se tiče kriterija higijene u procesu proizvodnje mliječnih proizvoda, prati se prisutnost i broj enterobakterija,

*Escherichia coli*, koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Bacillus cereus* tijekom proizvodnog procesa ili na kraju proizvodnje.

Pored navedenih propisa, zemlje članice mogu predlagati i provoditi nacionalne vodiče u području higijene hrane, pa je tako u lipnju 2009. godine izdan Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu kojeg je izradilo stručno Povjerenstvo imenovano od Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (danas Ministarstvo poljoprivrede, MP). Taj Vodič daje smjernice i preporuke o mikrobiološkim kriterijima na osnovi kojih se razlučuje da li je sustav samokontrole učinkovit, a namijenjen je subjektima u poslovanju s hranom i inspekciji. Primjena Vodiča dobrovoljna je, odnosno on nikog ne obvezuje. Međutim, ako subjekt postavlja svoje drugačije kriterije, mora dokazati da oni predstavljaju mjerila sigurne hrane. Novi propisi i novi pristup u analitici donosi i promjene za analitičke laboratorije, posebno u smislu mikrobioloških parametara koji se određuju u hrani ili na površinama te kako tumačiti rezultate. Načelno je dogovoreno da se pri određivanju zdravstvene ispravnosti neke hrane primjenjuju preporučeni kriteriji iz Vodiča, a ako se traži samo pretraga prema Uredbi EZ 2073/2005 tada se uzimaju u obzir samo njime propisani kriteriji. Pri davanju mišljenja o ispravnosti hrane laboratorij će se pozvati na odredbe članka Zakona o hrani (NN 81/2013, 14/2014, 30/2015) koji određuje zahtjeve vezane uz zdravstvenu ispravnost hrane.

## 2.5. Higijena u proizvodnji sira

Zdravlje muznih životinja koje su držane u optimalnim zoohigijenskim uvjetima preduvjet je proizvodnje ispravnog mlijeka optimalnog kemijskog sastava za preradu u sir. Higijenska kvaliteta mlijeka presudan je čimbenik kakvoće i zdravstvene ispravnosti svih mliječnih proizvoda uopće.

### 2.5.1. Higijenska kvaliteta mlijeka za sirenje

Mlijeko predstavlja idealnu sredinu za razmnožavanje mikroorganizama. Od trenutka proizvodnje pa sve do potrošnje u mlijeku i mliječnim proizvodima aktivno djeluju mikroorganizmi koji razgrađuju sastojke mlijeka. Kao posljedica te razgradnje nastaju manje ili više izražene nepoželjne promjene u kakvoći mlijeka. U zavisnosti od intenziteta promjena smanjuje se hranjiva vrijednost mlijeka ili ono postaje potpuno neupotrebljivo za prehranu ljudi. Isti mikrobiološki procesi mogu se nastaviti i u siru s istim negativnim posljedicama za kakvoću sira.

Kakvoća proizvedenog sira značajno ovisi o higijenskoj kakvoći mlijeka za sirenje. Sirovo mlijeko za proizvodnju sira mora udovoljavati EU propisima, odnosno Uredbi 853/2004, a ti standardi se pojavljuju i u nekim našim nacionalnim pravilnicima. Higijensko postupanje prije, tijekom i nakon mužnje znatno utječe na kakvoću mlijeka. Svrha provođenja higijenskih postupaka tijekom mužnje i nakon nje ima ulogu smanjiti mogućnost infekcije vimena mikroorganizmima preko muznih uređaja i drugih izvora te smanjiti stupanj onečišćenja mlijeka nakon prikupljanja. Mlijeko krava s mastitisom nije prikladno za preradu u sir, a najčešći problemi su poteškoće u separaciji masti, otežano zgrušavanje, smanjenje čvrstoće koaguluma, gubitak sastojaka sirutke i smanjenje kakvoće i prinosa sira.

Najznačajniji pokazatelj higijenske kakvoće mlijeka je broj mikroorganizama na kojeg utječu najviše higijenski postupak mužnje, higijenski postupak čuvanja mlijeka do otpreme i zdravstveno stanje vimena. Važno je napomenuti da mikrobiološka kakvoća sirovog mlijeka preduvjet dobre mikrobiološke kakvoće konzumnog mlijeka i mliječnih proizvoda. Broj mikroorganizama u sirovom mlijeku može znatno varirati ovisno o godini i sezoni proizvodnje. Pri tome je bitno utvrditi povezanost promjene broja mikroorganizama i broja somatskih stanica (korelacija). Ukoliko nema te povezanosti, higijenska kakvoća mlijeka nazaduje zbog određenih propusta u higijeni mužnje i čuvanju mlijeka do otpreme. Drugi uzrok može biti i u mlijeku određenih krava koje imaju značajnije povećan broj mikroorganizama i/ili somatskih stanica, a miješa se s mlijekom ostalih krava, mlijekom bolje kakvoće.

### 2.5.2. Mikrobiološke opasnosti u sirarstvu

Sirovo mlijeko koje se koristi u proizvodnji sira može biti kontaminirano bakterijama iz vimena, vodom, opremom koja se koristi za mužnju i pohranu mlijeka, a najčešće bakterijama roda *Micrococcus*, *Strepotococccus* i *Corynebacterium*. Sirovo mlijeko bi trebalo sadržavati $<10^3$ mikroorganizama/mL. U slučaju mastitisa najčešće se pojavljuju *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, koliformne bakterije, *Pseudomonas* spp. Za vrijeme hlađenja mlijeka, prije pasterizacije mogu narasti samo psihrotrofne bakterije npr. *Pseudomonas, Flavobacterium*, koliformne bakterije i *Bacillus* spp. Neke od njih mogu proizvesti termostabilne enzime (proteinaze i lipaze) koji nepovoljno djeluju na kvalitetu proizvoda. Psihotropne patogene bakterije su i patogene *L. monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* i mogu se također umnožiti u ohlađenom sirovom mlijeku tijekom skladištenja. Poznata je još i post pasterizacijska kontaminacija (prije pakiranja proizvoda) ili u obliku zaostalih bakterija

koje su rezistentne na pasterizaciju: mikrokoki, enterokoki, streptokoki, bacili, kostridije te *Pseudomonas* spp. i *Alcaligenes* spp (RAY i BHUNIA, 2014.). Mlijeko kao sirovinu mogu kvariti i bakterije mliječne kiseline u slučaju grešaka hlađenja odnosno viših temperatura od 4°C. *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* i *Enterococcus* spp. su najčešći uzročnici kvarenja neohlađenog mlijeka a očituje se promjenom okusa i izgleda mlijeka (MOATSOU i MOSCHOPOULOU, 2014.).

U proizvodnji sira pojavljuju se određene greške odnosno mane sira od kojih su neke uzrokovane mikroorganizmima. Tako je rano nadimanje sira posljedica djelovanja koliformnih bakterija i kvasaca, a kasno nadimanje posljedica djelovanja bakterija iz roda *Clostridium*. *Penicillium brevicaule* uzročnik je sirnog raka. Tip mikrobnog kvarenja ovisi o aktivitetu vode i pH sira. Tako u nezrelim sirevima s visokim udjelom vlage i niskom kiselošću kvarenje nastaje zbog gram negativnih bakterija, kvasaca i plijesni. Najčešće su uključene bakterije roda *Alcaligenes* i *Pseudomonas* uzrokujući kašastu strukturu i putridan okus. Kod vakumiranih sireva kojima u prodavaonicama istekne rok trajanja za više od 30 dana, najčešće znakove kvarenja uzrokuju heterofermentativni *Leuconostoc* spp. karakteriziranih stvaranjem $CO_2$, a u vakumiranoj vrećici nalazi se tekućina. Plinovitost u nekim sirevima sa visokim pH, malo soli i relativno visokim aktivitetom vode (Gauda, Emmentaler) može se pojaviti zbog rasta klostridija. Njihove spore preživljavaju pasterizaciju mlijeka, germinaciju i rastu u anaerobnom okolišu, proizvode $CO_2$, $H_2$ i butirat iz laktata.

Sir može biti rizičan po zdravlje potrošača ako je onečišćen patogenom bakterijom *Listeria monocytogenes* te pohranjen na temperaturi hladnjaka. *L. monocytogenes* je najvažniji patogen koji se prenosi hranom, osobito nakon naknadne obrade. Europska regulativa (EC 2073/2005) kategorizira hranu u dvije grupe, onu koja pogoduje rastu i koja ne pogoduje rastu *L. monocytogenes.* Hrana s pH < 4,4, i aktivitetom vode <0,92 te hrana s rokom trajanja manjim od pet dana smatra se sigurnom (RAY i BHUNIA, 2014.).

Nadalje, *Staphylococcus aureus* je kontaminant sirovine, može preživjeti toplinsku obradu te rasti za vrijeme sirenja i stvarati enterotoksine koji su vrlo stabilni. Pored navedenog, zdravstveni rizik predstavljaju i biogeni amini koji nastaju dekarboksilacijom aminokiselina, osobito kod sireva koji dugo zriju (RAY i BHUNIA, 2014.). Biogeni amini nastaju tijekom zrenja i skadištenja, a čimbenici koji utječu na

njihovo stvaranje su pH, koncentracija soli, bakterijska aktivnost, vlaga, temperatura skladištenja i vrijeme zrenja. Najčešće se pojavljuju kavaderin, putrescin, histamin, spermidin, spermin, tiramin i triptamin. Prvi poznati slučaj trovanja biogenim aminima iz sira, i to prvenstveno histaminom bio je 1967. Nizozemskoj kao posljedica konzumacije sira Gauda gdje je koncentracija prelazila 1g/kg (MORET i sur., 1996.). Bakterije kao *Enterococcus* i *Lactobacillus* većinom su odgovorne za nastanak biogenih amina u sirevima koji su proizvedeni od neprerađenog mlijeka. (BURDYCHOVA i KOMPRDA, 2007.; LADERO i sur., 2012.). Kocentracija histamina u hrani do 50mg/kg ne izaziva otrovanje, 50-100 mg/kg izaziva lakše ontrovanje samo osjetljivih ljudi, a kocentracija od 100 do 1000 mg/kg izaziva teška otrovanja (BOYER i sur., 1956.). Ako se prekorači dozvoljena granica histamin pokazuje patološko djelovanje te dolazi do pada krvnog tlaka, ubrzava se rad srca, edem pluća, grč glatke muskulature, anafilaktički šok (MARIJAN, 2013.).

## 3. MATERIJAL I METODE

Za potrebe istraživanja uzorci sireva (n=36) uzorkovani su na tržištu u maloprodaji u originalnim pakiranjima. Prikupljeno je 7 mekih, 9 polutvrdih i 20 tvrdih sireva (Tablica 4). Uzorci su dostavljeni u prijenosnim hladnjacima do mikrobiološkog laboratorija Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Analize su provedene u okviru istraživanja „Rizici antimikrobne rezistencije i biogenih amina iz hrane životinjskog podrijetla“ u potpori Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 4. Vrste sireva korištenih u istraživanju

| **Tip sira** | **Naziv** | **Podrijetlo** |
|---|---|---|
| Meki (bijela/ plava plijesan) | camembert, brie, gorgonzola, edel, bovizola, mont salvat | Francuska, Italija, Njemačka, Hrvatska |
| Polutvrdi | trapist, cincar, gouda, paladin blue | Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Njemačka, Novi Zeland |
| Tvrdi | ribanac, livanjski, livanjac, tvrdi sir od ovčjeg, kravljeg ili kozjeg mlijeka, sir u teranu, sir s brusnicom, sir s marelicom | Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Velika Britanija |

Za mikrobiološku pretragu je uzimano 25 grama sira nakon sterilnog odvajanja površinskih slojeva proizvoda. Potom je uzorak usitnjen te razrijeđen otapanjem u 225 ml slane peptonske vode i homogeniziran 2 minute na 200 o/min. Potom su načinjena serijska decimalna razrjeđenja radi određivanja broja *Escherichia coli,* enterobakterija, aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline, kvasaca i plijesni te enterokoka. Broj *E. coli* određivan je površinskim nasađivanjem 0,1 ml određenih razrjeđenja uzorka na kromogenu podlogu Rapid Ecoli (BIOKAR,

Francuska) te inkubiranjem na 37 ºC 24 sata. Enterobakterije su određivane na ljubičasto-crvenom žučnom agaru s glukozom (VRBG, Merck, Njemačka) inkubiranjem na 37 ºC 24 sata. Broj aerobnih mezofilnih bakterija određivan je na Plate Count agaru (PCA, bioMerieux, Francuska) inkubiranjem na 30 ºC 72 h. Broj bakterija mliječne kiseline određivan je površinskim nasađivanjem na de Man, Ragosa, Sharpe agar (MRS, Merck, Njemačka) i inkubiranjem na 30 ºC 24-48 h, a enterokoki na kromogenu podlogu Compass Enterococcus agar (BIOKAR, Francuska) inkubiranjem na 37 ºC 24 h. Broj kvasaca i plijesni određivan je površinskim nasađivanjem na OGY agar (Oxytetracycline glucose yeast agar) inkubiranjem na 25 ºC 48-72 h. Broj *Listeria monocytogenes* određivan je prema metodi HRN ISO 11290:2.

Nakon inkubiranja provedeni su dodatni biokemijski testovi prema zahtjevima standardnih metoda, i potom određen broj pojedinih mikroorganizama. Rezultati su prikazivani kao logaritamske vrijednosti broja kolonija po gramu sira ($\log_{10}$ CFU/g).

## 4. REZULTATI

Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 5-7 i grupirani su prema vrsti sireva (polutvrdi, tvrdi i meki).

Tablica 5. Rezultati mikrobioloških pretraga polutvrdih sireva (log CFU/g)

| | **6** | **7** | **10** | **11** | **15** | **21** | **25** | **66** | **79** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Aerobne mezofilne bakterije*** | 7,07 | 7,64 | 7,77 | 7,95 | 7,3 | 7,07 | 7,17 | 6,25 | 7,2 |
| ***Enterokoki*** | 2 | 4,17 | 4,3 | 4,3 | 5 | 8 | 8 | 2 | 3,07 |
| ***E. coli*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |
| ***Enterobakterije*** | <1 | 2 | <1 | 3,3 | 3,47 | <1 | <1 | 2,69 | <1 |
| ***Stafilokoki*** | <3 | <2 | <2 | 2,84 | 3,47 | 4,44 | 3,47 | 3,3 | 2,69 |
| ***Bakterije mliječne kiseline*** | 7,3 | 8 | 7,87 | 8,07 | 8,39 | 7,54 | 7,38 | 5 | 7,6 |
| ***Kvasci i plijesni*** | 4,2 | 2,84 | <2 | 2,69 | 2,6 | 2 | 2,6 | 5,34 | 7,97 |
| ***Listeria monocytogenes*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |

Tablica 6a. Rezultati mikrobioloških pretraga tvrdih sireva (log CFU/g)

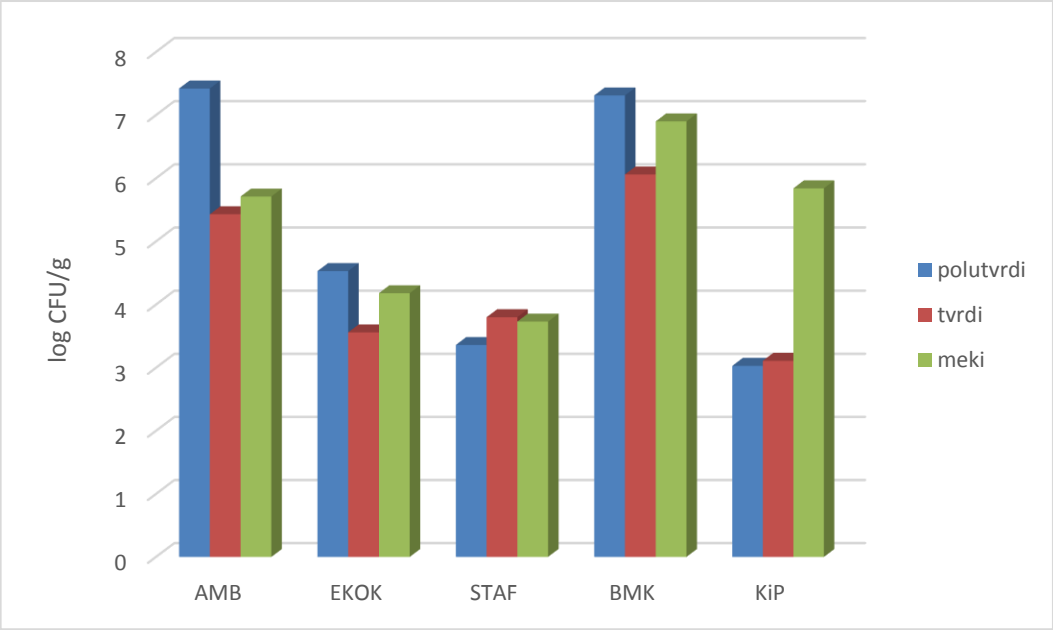
| | **1** | **5** | **16** | **19** | **20** | **28** | **32** | **48** | **59** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Aerobne mezofilne bakterije*** | 2 | 2 | 7,14 | 6,77 | 6,07 | 7,2 | 7,5 | 6,65 | 3 |
| ***Enterokoki*** | <1 | <1 | 5,3 | 4,8 | 4,69 | 6,07 | 5,69 | 6,2 | 2,3 |
| ***E. coli*** | <1 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | 4,07 | <2 | <2 |
| ***Enterobakterije*** | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 | 3,77 | 2,3 | <1 |
| ***Stafilokoki*** | <1 | <2 | 3,47 | 3,95 | 4,38 | 4 | 3,69 | <2 | <2 |
| ***Bakterije mliječne kiseline*** | 5 | 4,69 | 6,54 | 6,69 | 6,65 | 7,3 | 7,84 | 6,84 | 3 |
| ***Kvasci i plijesni*** | <2 | <2 | 2 | <2 | 2 | 2,84 | 2 | <2 | 2,47 |
| ***Listeria monocytogenes*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |

Tablica 6b. Rezultati mikrobioloških pretraga tvrdih sireva (log CFU/g)

| | 53 | 54 | 58 | 46 | 47 | 64 | 65 | 69 | 73 | 71 | 74 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Aerobne mezofilne bakterije*** | 7,14 | 7 | 6,3 | 4,81 | 4 | 6,6 | 3 | 4 | 6,69 | 6,14 | 4,69 |
| ***Enterokoki*** | 6 | 6,3 | 6 | 4,65 | <2 | <2 | 2,69 | <2 | 5,3 | 3 | <2 |
| ***E. coli*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |
| ***Enterobakterije*** | 1,47 | 2 | 2 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 | <1 | 1,69 | <2 |
| ***Stafilokoki*** | <2 | 2,3 | 3,84 | 3,9 | 3,77 | 6,3 | <2 | 3,17 | 4,07 | 3,6 | 2,84 |
| ***Bakterije mliječne kiseline*** | 7,3 | 7,04 | 6,69 | 4,95 | 6,39 | 7,5 | 4,69 | 6,6 | 7,3 | 6,3 | 2 |
| ***Kvasci i plijesni*** | <2 | 2,47 | 2,47 | 4,14 | 4 | 5 | 5 | 6 | 5 | 4,55 | 3 |
| ***Listeria monocytogenes*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |

Tablica 7. Rezultati mikrobioloških pretraga mekih sireva s plijesni (log CFU/g)

| | 67 | 68 | 70 | 72 | 76 | 77 | 78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Aerobne mezofilne bakterije*** | 3,04 | 5,5 | 6,95 | 5,25 | 7,77 | 6,44 | 5,04 |
| ***Enterokoki*** | 3,47 | 5,38 | 2,69 | 3,77 | <2 | 5,9 | 3,89 |
| ***E. coli*** | <2 | 2 | <2 | <2 | <2 | 3,11 | <2 |
| ***Enterobakterije*** | <1 | 2,2 | <1 | 3 | 2,3 | 1,69 | 2,69 |
| ***Stafilokoki*** | 4 | 4,2 | 4,07 | 3,69 | 4,47 | 3 | 2,69 |
| ***Bakterije mliječne kiseline*** | 7,62 | 7,90 | 5 | 7,59 | 7,81 | 6,84 | 5,6 |
| ***Kvasci i plijesni*** | 7,65 | 5,04 | 4 | 7,56 | 7,69 | 4 | 5 |
| ***Listeria monocytogenes*** | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 |




Slika 2. Prosječni broj aerobnih mezofilnih bakterija, enterokoka, stafilokoka, bakterija mliječne kiseline te kvasaca i plijesni prema skupinama sireva

Na slici 2 vidljivo je da su bakterije mliječne kiseline dominantna mikroflora u svim vrstama sireva pri čemu je zabilježen prosječni broj od 6 – 7 log CFU/g. Uočava se također stabilna populacija enterokoka (pripadnici skupine bakterija mliječne kiseline) u broju od 3,5 – 4,5 log CFU/g te podjednak broj koagulaza-negativnih stafilokoka (3,5 log CFU/g). Broj kvasaca i plijesni podjednak je u polutvrdim i tvrdim sirevima (3 log CFU/g), dok je u mekim sirevima taj broj veći za 3 log kao posljedica tehnološkog procesa (sir s plijesnima).

## 5. RASPRAVA

U radu je istražena mikrobiološka kvaliteta mekih, polutvrdih i tvrdih sireva na našem tržištu, a podrijetlom iz uvoza i domaće proizvodnje. Mikrobiološki parametri odabrani su temeljem njihove specifične uloge u nastajanju biogenih amina u sirevima, izuzev *L. monocytogenes*.

Sirevi općenito pripadaju skupini gotove hrane, hrane koja se prije konzumiranje ne obrađuje nikakvim postupcima, odnosno konzumira se u stanju u kakvom je proizvedena. U tom smislu vrlo je značajna higijena proizvodnje te kvaliteta sirovine budući da pojedini patogeni mikroorganizmi mogu preživjeti tehnološke operacije ili naknadno onečistiti proizvod, npr. *L. monocytogenes* (VRDOLJAK i sur., 2016.). Mikrobiološke promjene u/na sirevima tijekom proizvodnje odnosno pohrane ovise o više čimbenika poput tehnologije proizvodnje i vrsti sira (pasterizacija mlijeka ili nepasterizirano mlijeko, primjena mljekarskih kultura, kiselost, zrenje itd.), fizikalno-kemijskim svojstvima sira, uvjetima pohrane i dr. U pogledu patogenih bakterija, pretraživani sirevi bili su sukladni propisanim kriterijima za *L. monocytogenes,* što je također utvrđeno u nedavnim istraživanjima škripavca, skute, livanjskog sira, trapista i tvrdog sira u maslinovu ulju (VRDOLJAK i sur., 2016.). *Listeria monocytogenes* je najvažniji patogen u sirarstvu, posebno u fazi nakon proizvodnje tj. tijekom pohrane i distribucije kada je moguće onečišćenje npr. tijekom narezivanja, pakiranja. Izvješće EFSA-e (2013.) pokazuje da na europskom tržištu tek 0,06% mekih i polutvrdih sireva (pretraženih 3452 uzoraka sira) ne udovoljava kriteriju od 100 CFU/g na kraju roka trajanja, dok je patogen prisutan (u 25g uzorka) u 0,47% sireva. U našoj zemlji su provedena istraživanja uglavnom na tradicionalnim sirevima od nepasteriziranog mlijeka, a nalaz *L. monocytogenes* bio je uobičajen (KOZAČINSKI i HADŽIOSMANOVIĆ, 2001.; MARKOV i sur., 2009.).

U pogledu mikroorganizama indikatora onečišćenja, u našem istraživanju zabilježena su dva uzorka (1 meki i 1 tvrdi sir) s povećanim brojem *E. coli* (5,5 %) te se mogu smatrati mikrobiološki neispravnima sukladno preporučenim kriterijima nacionalnog Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (MP, 2011.). Nadalje, kriteriji za enterobakterije u sirevima nisu propisani, no u našem su istraživanju enterobakterije bile prisutne u tri polutvrda sira (33,3 %), 5 tvrdih sireva (25 %) te 5 mekih sireva s plijesni (71,4 %) što može ukazivati na lošu kvalitetu korištene sirovine

i propuste u pasterizaciji mlijeka za sirenje. Nadalje, ne treba zanemariti i mogućnost post-procesnog onečišćenja sira, kako je prije spomenuto. MARIJAN (2013.) je u mikrobiološkoj analizi livanjskog sira određivala broj mikroorganizama tijekom zrenja: aerobnih mezofilnih bakterija, koagulaza pozitivnih streptokoka, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* i kvasaca. Tijekom zrenja sira utvrđena je statistički značajna razlika ($P<0,05$) u broju kvasaca 105. dana i u broju gljivica 50. i 60. dana s obzirom na sredinu ili koru sira. Koagulaza pozitivni stafilokoki i bakterija *P. aerugionosa* nisu utvrđeni niti u jednom ispitanom uzorku sira. Nalaz enterokoka i u navedenom istraživanju vjerojatno je povezan sa sirovinom križnom kontaminacijom. Izvori kontaminacije mogu biti podovi, zidovi, police, sirarski pribor i oprema (ZEBEC, 2016.).

Koagulaza negativni stafilokoki bili su utvrđeni u podjednakom broju u svim vrstama sireva (3 log CFU/g). Oni su „fiziološki“ prisutni u različitim vrstama hrane, uključujući sireve sa zrenjem gdje doprinose razvoju senzorskih svojstava svojom lipolitičkom i proteolitičkom aktivnošću. Poznati su kao uzročnici mastitisa, te se mogu izolirati i iz mliječnih proizvoda od pasteriziranog mlijeka (ZDOLEC i sur., 2013.). Koagulaza-negativni stafilokoki (KNS) su uz bakterije mliječne kiseline (BMK) tehnološki/zdravstveno važni mikroorganizmi u proizvodnji hrane animalnog podrijetla (TRMČIĆ i sur., 2011.) no zdravstveni rizici mogu se očekivati pri nalazu sojeva koji produciraju biogene amine, enterotoksine ili prenose antimikrobnu rezistenciju (DOBRANIĆ i sur., 2013.; ZDOLEC, 2015.).

Bakterije mliječne kiseline tehnološki su najvažniji mikroorganizmi u sirarstvu, a njihov broj u pretraženim sirevima sukladan je vrsti proizvoda odnosno uvjetovan primjenom mljekarskih kultura. Daljnje kretanje broja bakterija mliječne kiseline u siru tijekom pohrane ovisi o tipu sira, pa općenito se smanjuje u polutvrdim i tvrdim sirevima, a povećava u mekima (VRDOLJAK i sur., 2016.; Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati mikrobioloških i fizikalno-kemijskih analiza sireva na tržištu tijekom pohrane (VRDOLJAK i sur., 2016.)

| Tip sira | Naziv sira | Mikrobiološki parametar i dan uzorkovanja | Broj m.o. ($log_{10}$ CFU/g) | Rezultati fizikalno-kemijskih pretraga | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | pH | $a_w$ | NaCl (%) |
| Meki sir | Skuta | Bakterije mliječne kiseline | | | | |
| | | Dan 5 | 4.20±0.07 | 6.21±0.02 | 0.945±0.01 | 0.12±0.02 |
| | | Dan 7 | 4.60±0.05 | 6.53±0.01 | 0.960±0.01 | 0.23±0.03 |
| | | Dan 8 | 6.80±0.02 | 5.80±0.02 | 0.990±0.01 | 0.29±0.04 |
| | | Kvasci | | | | |
| | | Dan 5 | 2.47±0.01 | | | |
| | | Dan 7 | 2.77±0.11 | | | |
| | | Dan 8 | 2.95±0.12 | | | |
| | Škripavac | Bakterije mliječne kiseline | | | | |
| | | Dan 6 | 6.62±0.15 | 6.28±0.02 | 0.950±0.02 | 1.10±0.02 |
| | | Dan 9 | 6.50±0.07 | 6.40±0.03 | 0.960±0.01 | 1.10±0.02 |
| | | Dan 12 | 7.25±0.12 | 6.55±0.03 | 0.978±0.02 | 1.20±0.01 |
| | | Dan 15 | 7.82±0.14 | 6.20±0.01 | 0.990±0.02 | 1.22±0.02 |
| | | Kvasci | | | | |
| | | Dan 6 | 2.30±0.11 | | | |
| | | Dan 9 | 2.54±0.06 | | | |
| | | Dan 12 | 2.58±0.07 | | | |
| | | Dan 15 | 2.77±0.10 | | | |
| Polutvrdi sir | Trapist | Bakterije mliječne kiseline | | | | |
| | | Dan 90 | 6.20±0.12 | 5.4±0.04 | 0.910±0.01 | 1.51±0.02 |
| | | Dan 120 | 5.04±0.10 | 5.48±0.02 | 0.900±0.04 | 1.68±0.03 |
| | | Dan 180 | 4.80±0.08 | 5.80±0.04 | 0.866±0.03 | 2.12±0.06 |
| | | Dan 270 | 4.62±0.10 | 5.96±0.02 | 0.806±0.02 | 2.85±0.03 |
| Tvrdi sir | Livanjski | Bakterije mliječne kiseline | | | | |
| | | Dan 90 | 7.20±0.15 | 5.52±0.03 | 0.900±0.02 | 1.85±0.02 |
| | | Dan 120 | 5.83±0.10 | 5.60±0.02 | 0.907±0.05 | 2.20±0.02 |
| | | Dan 180 | 4.60±0.12 | 5.72±0.05 | 0.880±0.03 | 2.28±0.04 |
| | | Dan 330 | 3.40±0.12 | 5.80±0.02 | 0.795±0.03 | 3.30±0.01 |
| | | Dan 360 | 2.20±0.05 | 5.92±0.02 | 0.791±0.06 | 3.35±0.02 |
| | | Dan 450 | 2.00±0.02 | 5.97±0.02 | 0.650±0.04 | 3.62±0.03 |
| | Tvrdi sir u maslinovu ulju | Bakterije mliječne kiseline | | | | |
| | | Dan 90 | 6.80±0.11 | 5.72±0.02 | 0.890±0.02 | 1.74±0.02 |
| | | Dan 150 | 6.78±0.14 | 5.80±0.04 | 0.870±0.03 | 1.75±0.02 |
| | | Dan 240 | 6.75±0.05 | 5.84±0.03 | 0.842±0.04 | 1.80±0.04 |
| | | Dan 270 | 6.42±0.04 | 5.90±0.03 | 0.760±0.04 | 1.92±0.03 |

## 6. ZAKLJUČAK

Učestalost i broj bakterija indikatora onečišćenja smanjuje se kako se konzistencija sira povećava, odnosno najbrojnije su u mekim sirevima.

Sirevi u maloprodaji bili su sukladni kriteriju za *L. monocytogenes* tijekom roka trajanja što ide u prilog sigurnosti proizvoda.

Mikrobna populacija koju nalazimo u mekim, polutvrdim i tvrdim sirevima mogu sudjelovati u stvaranju biogenih amina u siru, što je potrebno potvrditi dodatnim istraživanjima dekarboksilacijske aktivnosti izolirane mikroflore.

## 7. LITERATURA


1. ANONIMNO (2005): Commision regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foods. Official Journal of the European Union L338/1-338/26.
2. ANONIMNO (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. MPRR
3. ANONIMNO (2008): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 81/2013
4. BOYER, J., F. DESPIETE, M. TISSIER, J. JAKOB (1956): Microbiological safety of food. Academic Press, London –New York.
5. BURDYCHOVA, R., T. KOMPRDA (2007): Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. FEMS Microbiol. Lett. 276, 149-155.
6. COGAN, T.M., T.P. BERESFORD (2002): Microbiology of Hard Cheese. Dairy Microbiology Handbook. The Microbiology of Milk and Milk Products, 3rd edition.Robinson, R.K (ur.), New York, John Wiley & Sons, Inc., 519-560.
7. DOBRANIĆ, V., ZDOLEC, N., RAČIĆ, I., VUJNOVIĆ, A., ZDELAR-TUK, M., FILIPOVIĆ, I., ŠPIČIĆ, S. (2013): Determination of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci from autochthonous Croatian fermented sausages. *Veterinarski arhiv, 83, 2, 145-152.*
8. EFSA (2013): Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA Jounal 11, 3241.
9. KALIT, S. (2015): Opće sirarstvo. B. Matijević (ur.) *Sirarstvo u teoriji i praksi* (str.29-45). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu.
10. FARKYE, N.Y., E.R. Vedamuthu (2002): Microbiology of Soft Cheeses. Dairy Microbiology Handbook. The Microbiology of Milk and Milk Products. 3rd edition. Robinson, R.K (ur.). New York, John Wiley & Sons, Inc., 479.
11. HADŽIOSMANOVIĆ, M. (1995.): Uvjeti za kakvoću mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 45, 263-268.
12. KOZAČINSKI, L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ, B. KUKURUZOVIĆ (2003.): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 53, 17-22.
13. KOZAČINSKI, L., M. HADŽIOSMANOVIĆ (2001): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in home-made dairy products. Tierartz. Umsch. 56, 590-594.

14. LADERO, V., M. FERNANDEZ, M.CALLES-ENRIQUEZ, E.SANCHEZ-LLANA, E. CANEDO, M.C. MARTINI, M.A. ALVAREZ (2012): Is the production of biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? Food Microbiol. 30,132-128
15. MARIJAN, A. (2013): Utjecaj procesa zrenja na količinu pojedinih biogenih amina u Livanjskom siru. Diplomski rad. Zagreb : Veterinarski fakultet
16. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK, F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* and other contaminants in fresh cheese and cream from Zagreb city area domestic production. Mljekarstvo 59, 225-231.
17. MATIJEVIĆ, B. (2015): Dodaci u proizvodnji sira i njihov značaj. B. Matijević (ur.) *Sirarstvo u teoriji i praksi* (str. 103-110). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu
18. Moatsou, G., E. Moschopoulou (2014): Microbiology of Raw Milk. U: Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. Barbaros H. Ö., Akdemir-Evrendilek G. (ur.). CRC Press Taylor & Francis Group, London, 1-39.
19. MORET, S., L.S. CONTE, E. SPOTO (1996): Biogenic amines in cheese-Parameters affecting therir analytic determination. Industrie Alimentari 35, 788-792.
20. PAVIŠIĆ, M. (2013): Mikrobiološka održivost i kakvoća svježeg kravljeg sira. Diplomski rad. Zagreb: Veterinarski fakultet.
21. PERKO, B. (2015): Najnovija dostignuća u proizvodnji sira i njihov značaj. B. Matijević (ur.) *Sirarstvo u teoriji i praksi* (str. 136-145). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu.
22. RATTRAY, F.P, I. Eppert (2011): Secondary Cultures, Encyclopedia of Dairy Sciences, vol.1, J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeny (ur.). Amsterdam: Elsevier Academic Press, 567-573.
23. RAY, B., A. BHUNIA (2014): Fundamental food microbiology, str. 35-267., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
24. ROGELJ, I. (2015): Mikrobne kulture u proizvodnji sira i njihov značaj. B. Matijević (ur.) *Sirarstvo u teoriji i praksi* (str. 113-123). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu.
25. TRATNIK, LJ. (1998): Sirarstvo. *Mlijeko-tehnologija,biokemija i mikrobiologija* (str.187-300). Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga.
26. TRATNIK, LJ. (2012): Sirarstvo. U: Mlijeko i mliječni proizvodi, Tratnik, Lj., Božanić, R., Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 205-348.

27. TRMČIĆ, A., OBERMAJER, T., ČANŽEK MAJHENIČ, A., BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, B., ROGELJ, I. (2011): Competitive andvantage of bacteriocinogenic strains within lactic acid bacteria consortium of raw milk cheese. Mljekarstvo 61, 26-32.
28. VRDOLJAK J, DOBRANIĆ V., FILIPOVIĆ I., ZDOLEC N. (2016): Microbiological quality of soft, semi-hard and hard cheeses during the shelf-life. Macedonian veterinary review 39 (1), 59-64.
29. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, G. ZDOLEC, D. ĐURIČIĆ (2013): Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria from industrially produced dairy products. Mljekarstvo 63, 30-35.
30. ZDOLEC, N. (2015): Antimicrobial resistance of fermented food bacteria. U: Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology. Montet, D., R. C. Ray, Eds. CRC Press, Boca Raton, 263-281.
31. ZEBEC, V. (2016): Mikrobiološka kvaliteta mlijeka u proizvodnji sira od sirovog mlijeka. Diplomski rad. Zagreb: Agronomski fakultet.

## 8. SAŽETAK

U radu je istražena mikrobiološka kvaliteta mekih (n=7), polutvrdih (n=9) i tvrdih sireva (n=20) na hrvatskom tržištu, a podrijetlom iz uvoza i domaće proizvodnje. Određivan je broj enterokoka, stafilokoka, bakterija mliječne kiseline, kvasaca i plijesni, aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija, *Escherichia coli* te *Listeria monocytogenes.* Broj bakterija mliječne kiseline kretao se od 6–7 log CFU/g, enterokoka 3,5–4,5 log CFU/g i koagulaza-negativnih stafilokoka 3,5 log CFU/g. Broj kvasaca i plijesni podjednak je u polutvrdim i tvrdim sirevima (3 log CFU/g), dok je u mekim sirevima taj broj veći za 3 log. Dva uzorka (1 meki i 1 tvrdi sir) pokazala su povećan broj *E. coli* (5,5 %). Enterobakterije su bile prisutne u tri polutvrda sira (33,3 %), 5 tvrdih sireva (25 %) te 5 mekih sireva s plijesni (71,4 %) što može ukazivati na lošu kvalitetu korištene sirovine, propuste u pasterizaciji mlijeka za sirenje ili na sekundarnu kontaminaciju. Broj *L. monocytogenes* bio je ispod 100 CFU/g u svim uzorcima sira uzorkovanih na tržištu. Rezultati pokazuju dobru mikrobiološku kvalitetu sireva na tržištu s obzirom na patogenu mikrofloru, no nalaz bakterija indikatora onečišćenja ukazuje na propuste u higijenskoj praksi proizvodnje ili distribucije.

Ključne riječi: sir, mikrobiologija, tržište

## 8. SUMMARY

*MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CHEESES ON CROATIAN MARKET*

Microbiological quality of soft (n=7), semi-hard (n=9) and hard cheeses (n=20) from retail were studied. The number of enterococci, staphylococci, lactic acid bacteria, yeast and moulds, aerobic mesophylic bacteria, enterobacteria, *E. coli* and *L. monocytogenes* were determined. LAB count ranged 6–7 log CFU/g, enterococci 3.5–4.5 log CFU/g and coagulase-negative staphylococci 3.5 log CFU/g. Yeast and mould count was equal in both semi-hard and hard cheeses (3 log CFU/g), and 3 log higher in soft cheeses. *Escherichia coli* exceeded recommended microbiological criteria in one soft and one hard cheese (5.5%). Enterobacteria were recovered from 3 semi-hard cheeses (33.3 %), 5 hard cheeses (25 %) and 5 soft cheeses (71.4 %), indicating a poor raw milk quality, low pasterization effect or re-contamination of final products. *L. monocytogenes* counts were below 100 CFU/g in all samples. Results obtained shows appropriate level of microbiological safety, however presence of contaminating bacteria indicates a poor hygienic practice in cheese production or distribution.

Key words: cheese, microbiology, retail

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. siječnja 1992. godine u Zagrebu. 2006. god završila sam osnovnu školu u Dugom Selu, a 2010. maturirala u SŠ Dugo Selo- opća gimnazija. Iste godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studiji veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2014. godine sam sudjelovala sam na European Youth Eventu u Europskom parlamentu na programu o budućnosti ribarstva EU, Strasbourg Francuska. 2015. godine bila sam demonstrator knjižice Veterinarskog fakulteta. Tijekom srpnja-kolovoza 2016. pohađala sam ljetu školu javnog zdravstva "Food safety" na Veterinarskom fakultetu u Brnu, Republika Češka. Aktivno se koristim engleskim i njemačkim jezikom koji pohađam u školi stranih jezika, Vodnikova 7, Zagreb. Tijekom studija obavljala sam poslove preko studentskog servisa.