

Utjecaj dimljenja i dodataka biljnog podrijetla na zdravstvenu ispravnost kuhanoga sira

Čižmak, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:178:541542>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Anamarija Čižmak

**UTJECAJ DIMLJENJA I DODATAKA BILJNOG PODRIJETLA NA
ZDRAVSTVENU ISPRAVNOST KUHANOGA SIRA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

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

Predstojnik:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

- 1. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski**
- 2. prof. dr. sc. Vesna Dobranić**
- 3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec**
- 4. prof. dr. sc. Željka Cvrtila (zamjena)**

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu na nesebičnoj pomoći, ukazanom povjerenju i stručnim savjetima koje mi je pružio u izradi ovog diplomskog rada.

Djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane upućujem zahvale za svaku lijepu riječ i ohrabrenje te pružanja mogućnosti za realizaciju ovog diplomskog rada.

Najveća hvala mojoj mami koja mi je uz mnoga odricanja omogućila školovanje te mi je pružila mnogo ljubavi i pažnje te bila moja najbolja prijateljica. Hvala joj za svaku toplu riječ i majčinski zagrljaj bez kojih moje obrazovanje ne bi bilo moguće.

Neizmjerena zahvala ide mom Ivanu Branimiru koji je bio uz mene u svim trenucima mog studiranja i bio moja najveća podrška i motivacija za ostvarenje mojih snova. Hvala mu na pruženoj ljubavi i sreći tijekom mog studiranja i sazrijevanja.

Hvala mom bratu Nikoli na bratskoj ljubavi i podršci tokom cijelog studija.

Zahvaljujem svojim prijateljima koji su bili uz mene i zbog kojih će mi studiranje i mladost ostati u lijepom sjećanju.

Zahvaljujem i svima onima koji danas više nisu uz mene, ali bi bili ponosni na moje ostvarenje.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1.	Kuhani sir	2
2.1.1.	Vrtse kuhanog sira	2
2.2.	Tehnologija proizvodnje kuhanog sira	3
2.2.1.	Dimljenje sira	5
2.3.	Biljni dodaci u proizvodnji kuhanog sira	7
2.3.1.	Antioksidativna aktivnost začina	7
2.3.2.	Antimikrobna aktivnost začina	8
2.4.	Mikroflora kuhanih sireva	9
2.4.1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.4.2.	Stafilokokni enterotoksini	10
2.4.3.	<i>Escherichia coli</i>	10
2.4.4.	Koagulaza pozitivni stafilokoki	11
2.4.5.	Bakterije mliječne kiseline (BMK) i enterokoki	11
3.	MATERIJAL I METODE	12
3.1.	Uzorkovanje kuhanog sira na tržišnici	12
3.2.	Laboratorijske pretrage	13
3.3.	Statistička obrada	13
4.	REZULTATI	14
5.	RASPRAVA	17
6.	ZAKLJUČAK	20
7.	LITERATURA	21
8.	SAŽETAK	25
9.	SUMMARY	26
10.	ŽIVOTOPIS	27

1. UVOD

Sir je vrlo cijenjeni mliječni proizvod u mnogim zemljama svijeta. Prvi tragovi proizvodnje sira sežu u 7 tisućljeće prije Krista, dok se u našoj zemlji sirarstvo počelo razvijati u srednjem vijeku. Proizvodnja sira u Hrvatskoj u odnosu na svjetsku proizvodnju je relativnog malog obujma, ali iznimne kvalitete. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2018) u 2017. godini ukupna proizvodnja sira u Hrvatskoj je iznosila 34 496 tona.

Među najzastupljenije sireve kontinentalne Hrvatske spada kuhani sir koji se tradicionalno sprema na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima Podravine, Bilogore, Prigorja, ali i Like, Slavonije i dr. Zbog jednostavnog načina proizvodnje i najoptimalnijeg iskorištavanja mliječnih bjelančevina, ovaj sir se sve više proizvodi, a i razvijaju se brojne njegove varijante. Tako se koriste brojni biljni dodaci, začini i njihove kombinacije koje daju nove okuse i arome siru. Jedan od uobičajenijih začina je i mljevena crvena paprika koja se dodaje i u druge vrste sireva (KIRIN, 1980; KIRIN, 2004; VALKAJ i sur., 2013; VALKAJ i sur., 2014).

Nadalje, specifičnost kuhanog sira je i da se može dimiti u pušnicama na domaćinstvu. Dimljenje, kao i začim određuje specifičnost arome, mirisa, boje i teksturu sira. Pojedini spojevi koji nastaju dimljenjem imaju bakteriostatska i antioksidativna svojstva, dok mnogi od njih imaju konzervirajući učinak. Dimljeni sirevi su cijenjeni među konzumentima zbog svojih senzorskih osobina.

Nastanak tradicijskih sireva vezan je uz običaje, navike, potrošnju, klimu, reljef i iskustva iz proizvodnje s generacije na generaciju, te je kuhani sir tradicionalni sir u sjeverozapadnoj Hrvatskoj i predstavlja zdravstveno siguran proizvod s obzirom na tehnološke procese proizvodnje. Međutim, dodatne obrade i utjecaj različitih dodataka može dodatno opteretiti ispravnost sira. Pretpostavka je da dimljenje i dodatak biljnih komponenti u sir utječe na mikrofloru sira dvojako; na način na inhibira prisutnu mikrobnu populaciju (dim, antimikrobni začim) ili dodatno onečišćuje proizvod (dodatci). Stoga je cilj ovog diplomskog rada utvrditi utječe li proces dimljenja kuhanoga sira u domaćinstvu na mikrobnu floru i na koju mikrobnu populaciju, te utječe li dodatak biljnog podrijetla (ljuta paprika) na povećanje (onečišćenje) ili smanjenje (antimikrobni učinak dodataka) mikroflora sira.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Kuhani sir

Kuhani sir je, uz domaći svježi sir, najzastupljeniji sir koji se proizvodi u seljačkim domaćinstvima u kontinentalnoj Hrvatskoj. Oblika je koluta, odnosno krnjeg stošca različitih dimenzija. Dvije su vrste kuhanog sira: dimljeni i nedimljeni. Kuhani sir se proizvodi najčešće od kravljeg mlijeka, dok se u posljednje vrijeme proizvodi i od kozjeg, odnosno mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka. Isto tako, postoje različite kombinacije kuhanih sireva uz razne dodatke biljnog podrijetla. Kuhani sir je na uzmaku iz razloga što ima relativno jednostavni način proizvodnje, te osigurava relativno dugu trajnost, prihvatljiva organoleptička svojstva, dobar prinos i brzu novčanu zaradu. Sa stručnog stajališta, kuhani sir predstavlja najjednostavniji oblik iskorištavanja i konzerviranja mliječnih bjelančevina (KIRIN, 2006.).



Slika 1. Kuhani sir (snimila: Anamarija Čižmak)

2.1.1. Vrste kuhanog sira

Kuhani sir je uglavnom predstavnik tradicionalnog sirarstva u zemljama u kojima se proizvodi. Sirutka se koristi izravno kao sirovina koja je dobivena nakon proizvodnje sira od kravljeg ili mješavine kravljeg i ostalih vrsta mlijeka. Također, kao sirovina u proizvodnji

kuhanog sira se može koristiti i svježi sir, odnosno kvark od kiselog mlijeka uz punomasno sirovo mlijeko (KIRIN, 2006.).

Kuhani sir se dijeli na:

1. Sirutkin ili albuminski sir
2. Kuhani sir od mlijeka
3. Kuhani sir od svježeg sira

2.2.Tehnologija proizvodnje kuhanog sira

Sirovo mlijeko se zagrijava na 90-95 °C i zakiseljava se kiselom sirutkom, mlaćenicom ili kiselinom. Dobiveni gruš može se miješati s dodacima, najčešće soli, u kalupima se oblikuje, preša, čime se dobiva konzistencija sira za rezanje. Takav sir se može konzumirati neposredno nakon proizvodnje, ali i nakon duljeg vremena čuvanja. Osim kazeina, ovim postupkom proizvodnje sira, koaguliraju se i sirutkine bjelancevine, što doprinosi većoj hranjivoj vrijednosti i prinosu sira. Također, kuhani sir je manje kiseo u odnosu na sir dobiven mliječno-kiselom fermentacijom (HILL, 1995.)

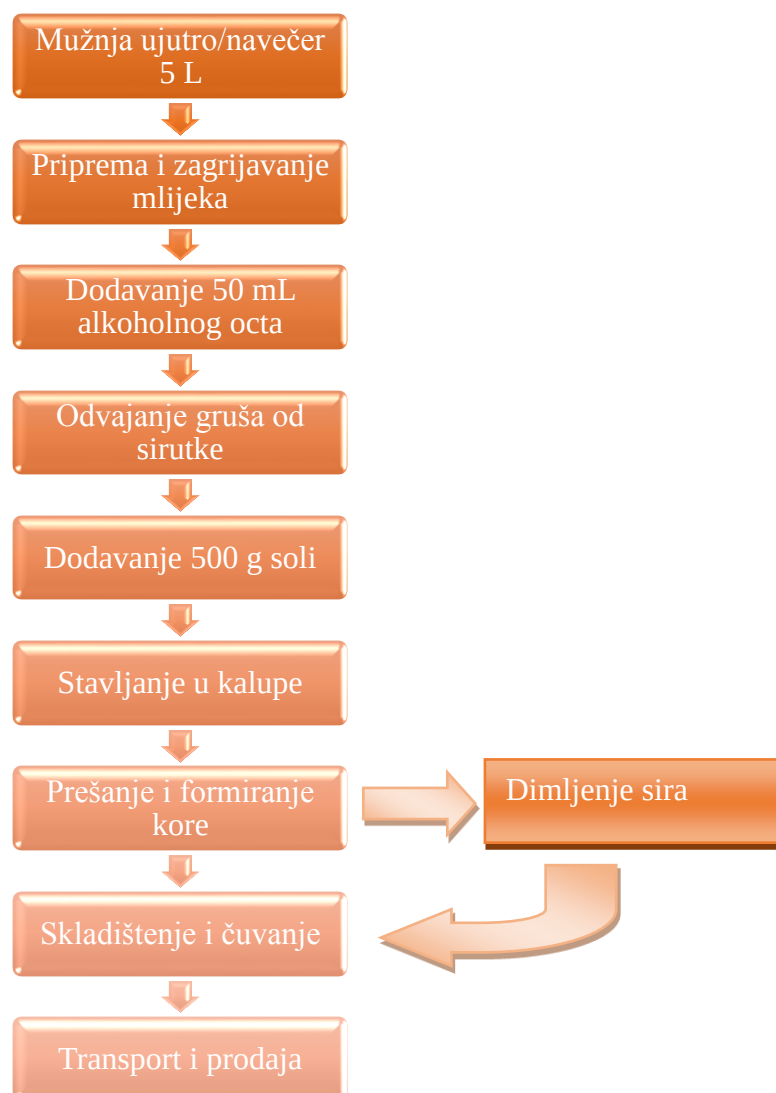
Kuhani sir od mlijeka proizvodi se u mnogim zemljama svijeta, pa tako i na seoskim domaćinstvima u kontinentalnoj Hrvatskoj gdje se proizvodnja kuhanoga sira zasniva na nekoliko grla u staji koja su u laktaciji te na jutarnjoj i večernjoj mužnji. Prije kuhanja mlijeka, ono se prvo mora procijediti kroz odgovarajuće cjedilo kako bi se otklonila mehanička nečistoća u mlijeku. Mlijeko se zagrijava do vrenja, odnosno 92-96°C uz povremeno miješanje. U mlijeko se zatim dodaje 50 ml 9%-tne octene kiseline na 10 L mlijeka za sirenje. Miješanje zaustavljamo, na površini se počinje oblikovati gruš, dok zagrijavanje mlijeka nastavljamo slijedeće dvije do tri minute sve do pojave zelenkaste bistre sirutke uz rub posude. Sirutka se može ispustiti kroz ventil na dnu posude ili izliti iz posude tako da se u potpunosti izdvoji iz gruša. U dobiveni gruš se dodaje do 50 g soli na 10 L mlijeka. U ovoj fazi proizvodnje ako se proizvode kuhani sirevi sa biljnim dodacima, dodaju i biljni dodaci. Dobiveni sadržaj lagano i temeljito izmiješamo kako bi se sol ravnomjerno otopila te biljni dodatak ravnomjerno rasporedio. Gruš se prenosi u oblikovane kalupe, najčešće okrugle, u koje je prethodno stavljena vlažna sirarska marama. Kalupi napunjeni grušom, zatvaraju se poklopcem, opterete i prešaju. Tijekom prešanja se trebaju nekoliko puta okrenuti. Posljednje prešanje se obavlja bez gaze. Prešanje obično traje 3 do 4 sata, ili po iskustvu proizvođača, a nakon toga se vadi iz kalupa i stavlja u prostoriju s odgovarajućom mikroklimom (6-8°C i 70-80% relativne vlažnosti zraka)

kako bi se kora sira osušila i poprimila žutu boju za što je potrebno otprilike 3 tjedna. Fizikalno-kemijska svojstva prikazana su tablicom 1.

Tablica 1. Fizikalno – kemijska svojstva kuhanog sira od kravljeg mlijeka (NOVAK, 2011.)

pH
• 5,8
°SH
• 43
Proteini
• 13%
Mliječna mast
• 19,8 %
Suha tvar
• 49,6%
Pepeo
• 2,9%

Kuhani sir nakon oblikovanja kore se stavlja u proces dimljenja koji traje tri do četiri sata ili također prema iskustvu proizvođača (KIRIN, 2006.). Neposredno nakon proizvodnje sir se može konzumirati, odnosno može se čuvati. U industrijskoj proizvodnji sira, na temperaturi 6-8°C, sir se može čuvati dva do tri mjeseca, a uz odgovarajuću njegu i na temperaturi od 6°C deset mjeseci do godinu dana (ŠTEFEKOV, 1990.). Tehnološki proces proizvodnje kuhanog sira u domaćinstvu prikazan je grafom 1.



Graf 1. Tehnološki proces proizvodnje kuhanog sira u domaćinstvu iz ovog istraživanja

2.2.1. Dimljenje sira

Dimljenje sira je tehnološki proces u proizvodnji kuhanoga dimljenoga sira. Najstariji je način kemijskog konzerviranja koji se primjenjuje samo za neke vrste sira. Tradicionalno dimljenje uglavnom uzrokuje izlučivanje masti na površinu sira, isparavanje vlage i prodiranje dimnih para koje sadržavaju fenolne tvari i utječu na organoleptička svojstva te imaju zaštitno djelovanje. Mast koja je izlučena štiti sir od rasta plijesni, ako se on skladišti na suhom (TRATNIK, 1998.). Konzervirajuće djelovanje dimljenja zasniva se na antioksidativnom, baktericidnom i fungicidnom djelovanju dima te sušenju na osnovi temperature i brzine strujanja zraka i dima (ŽIVKOVIĆ, 1986.; VUKOVIĆ, 2012.). Postupak dimljenja sam po sebi

nema dovoljan konzervirajući učinak te se kombinira s drugim metodama, najčešće soljenjem i sušenjem (VUKOVIĆ, 2012.). Najvažnija uloga dimljenja je dobivanje specifičnog, ugodnog mirisa i okusa sira po dimu te dobivanje zlatnosmeđe boje (KOVAČEVIĆ i sur., 2014.). Specifična svojstva i konzervirajući učinak posljedica su taloženja dima na površinu i prodiranje u dubinu proizvoda koje se nastavlja i nakon dimljenja.

Kuhani sir se nakon oblikovanja suhe kore stavlja u hermetički zatvorene posude te se doprema do pušnice, odnosno tradicionalne postojeće pušnice na gospodarstvu gdje se slabijim ili jačim intenzitetom dimi hladnim dimom koji nastaje izgaranjem bjelogoričnog drva kao što su bukva, grab, hrast i jasen. Drvo za dimljenje ne smije biti obrađivano, bojano, lakirano, impregnirano i sl. Dim se proizvodi tijekom sagorijevanja drveta koje se sastoji najviše od celuloze, te u manjoj količini od hemiceluloze i lignina. Na domaćinstvima se koristi postupak nepotpunog sagorijevanja, tzv. tinjanja pri čemu ne nastaje pepeo već drveni ugljen, CO₂, H₂O te dim koji sadrži aktivne komponente (KRVAVICA i sur., 2013.). Dimljenje može trajati nekoliko sati pa do 24 sata, no najčešće prema iskustvu proizvođača (KIRIN, 2006.).

Dim nastaje u nekoliko faza. Prva faza se odvija na temperaturi od 100-110°C i nema značajnih promjena, već se voda oslobađa iz drva. U drugoj fazi koja se odvija na 110-150°C drvo počinje žutiti, a kemijske reakcije se ubrzavaju. Treća faza je kada drvo dobije tamniju nijansu pri temperaturi od 150-250°C te nešto kasnije prelazi u ugljen kada je temperatura 300°C. Hlapljivi sastojci dima kao što su fenoli, organske kiseline i karbonilni spojevi su najvažniji za miris i okus dimljenih proizvoda, a nastaju najviše pri temperaturama od 200-350°C.

Primjenom topline, poput vrućeg dima, dolazi do porasta temperature te na taj način dolazi do uništavanja mikroorganizama. Uništavanje mikroorganizma je veće ako je temperatura viša. Vegetativni oblici bakterija, kvasci i plijesni koji su izloženi temperaturi od 100 °C brzo se uništavaju i ne predstavljaju problem prilikom konzerviranja namirnica. Niže temperature od 60-65 °C u trajanju od 10-15 minuta uništavaju većinu mezofilnih vegetativnih bakterija, kvasaca i plijesni. *Streptococcus* i *Lactobacillus* su termorezistentnije bakterije (VEREŠ, 2004.). Međutim, isti mikroorganizmi u jednakim uvjetima nisu jednako otporni na povišenu temperaturu. U slučaju velikog broja mikroorganizama, različitog genetskog potencijala i nejednakih faza razmnožavanja, postoji mogućnost da će pojedini mikroorganizmi preživjeti letalnu temperaturu.

2.3. Biljni dodaci u proizvodnji kuhanog sira

Na specifičnost kuhanog sira sa dodatkom biljnog podrijetla, utječu osim mlijeka kao sirovine zbog djelovanja bakterija mliječne kiseline i začini. Začini u proizvodnji sira poboljšavaju senzorička svojstva, rok trajanja i daju nova svojstva, tzv. funkcionalnu namirnicu. Najčešći začini koji se dodaju u sir su crvena paprika, papar, peršin, bosiljak, luk, češnjak, rajčica, hren, klinčić, kumin, kim, muškatni oraščić i estragon (KIRIN, 2004.; HAN i sur., 2011.; SHAN i sur., 2011., OLMEDO i sur., 2013.). Pojedini začini imaju jako biološko djelovanje na organizam, tako da je neophodno poznavanje odgovarajuće doze i učestalost primjene začina, zbog ljekovitog ali i mogućeg toksičnog djelovanja.

Svi dijelovi začinskih biljaka, korijen, kora, list, cvjetni pupoljak, cvijet, tučak, plod ili sjeme mogu se koristiti kao začini, odnosno biljni dodaci u siru. Korištenje začina može biti u prirodnom obliku, ili se mogu pripremiti sušenjem, usitnjavanjem, pretvaranjem u prah ili ekstrakcijom aromatičnih sastojaka. Najčešće se u proizvodnji sira koriste mljeveni začini. Kemijski sastav začina je vrlo kompleksan i svaki začina ima specifičan i dominantan sastojak te posljedično tome antimikrobno i antioksidativno djelovanje začina je različito i ovisi o koncentraciji i vrsti aktivnih komponenti (FILIPOVIĆ i sur., 2016.; TAJKARIMI i sur., 2010; CHARLES, 2013).

Antioksidativna aktivnost začina proizlazi iz aktivnih komponenti, koje čine fenolne kiseline, flavonidi, prirodni pigmenti i terpeni, dok antimikrobnu aktivnost začina većinom čine terpeni kao što su karvakrol, α -pinen, p-cimen, timol, kamfor, linalol i mnogi drugi. Terpeni su spojevi male molekularne mase, jakih lipofilnih svojstava i lako prelaze stanične membrane te izazivaju biološke reakcije (PROESTOS i sur., 2005; SHAN i sur., 2005; SUHAJ, 2006; SHAN i sur., 2007).

2.3.1. Antioksidativna aktivnost začina

Antioksidansi sudjeluju u biokemijskim procesima koji se odvijaju tijekom razvoja bilja, odnosno uključeni su u nastanak bolje, okusa i arome koji su svojstveni svakoj pojedinoj biljnoj vrsti. Antioksidativni kapacitet ovisi o koncentraciji i vrsti fenolnih spojeva i o broju i položaju –OH skupine u fenolnoj kiselini tako da biljne vrste iz porodice Lamiaceae predstavljaju značajan izvor prirodnih antioksidanata (SHAN i sur., 2005.). Ružmarin je jedini

začin koji je komercijalno dopušten kao antioksidans, ali i druge biljne vrste spadaju u ovu porodicu, kao što je bosiljak, kadulja, metvica, origano, majčina dušica, timijan i mažuran.

2.3.2. Antimikrobna aktivnost začina

Antimikrobna aktivnost začina najčešće se prepisuje eteričnim uljima i nekim fenolnim spojevima. U eteričnim uljima prisutan je veliki broj reaktivnih skupina, pa se antimikrobna aktivnost ne prepisuje samo jednom, specifičnom mehanizmu, već je uključeno nekoliko ciljnih mjesta na stanici mikroorganizma (SKANDAMIS i sur., 2006.). U vegetativnim bakterijskim stanicama antimikrobne tvari djeluju na staničnu stijenku, citoplazmu ili citoplazmatsku membranu (DENYER i STEWART, 1998.).

Antimikrobna djelovanja i njihovi spojevi su naročito izraženi kod začinskog povrća: alicin u bijelom luku, kapsaicin u ljutim paprikama, piperin u papru, cimet aldehid u cimetu, eugenol u karanfilićima, karvakol u origanu, timol u majčinoj dušici, alil izotiocijanat u gorušici, oleuropen u maslinovom ulju i mnogi drugi.



Slika 2. Ljuta paprika (snimila: Anamarija Čizmak)

Mnogi začini mogu inhibirati mikrobn rast uključujući patogene mikroorganizme važne u sigurnosti hrane, kao i mikroorganizme kvarenja poput kvasaca i plijesni (SOUZA i sur.,

2007.). *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella Typhimurium* su najčešći kontaminanti hrane, pa su najviše i istraživani. Slično antioksidacijskom kapacitetu, biljke porodice *Lamiaceae* također imaju najjače antimikrobno djelovanje, poput origana, ružmarina, žalfije i timijana (WITKOVSKA i sur., 2013.). Izvan ove porodice značajan antimikrobni potencijal pokazuju klinčić i češnjak, dok peršin, paprika ili gorušica imaju manju antimikrobnu aktivnost. Općenito, gram-pozitivne bakterije su osjetljivije na biljne ekstrakte od gram-negativnih (FILIPOVIĆ i sur., 2016.).

2.4. Mikroflora kuhanih sireva

S obzirom na veliku proizvodnju i potrošnju sira, mikrobiološka kakvoća sirovine i sirarskih proizvoda regulirana je odgovarajućim propisanim kriterijima sigurnosti i higijene hrane koji se odnose na nalaz patogenih mikroorganizama i njihovih metabolita koji su štetni za zdravlje čovjeka. Ti kriteriji kao potencijalni rizik u svježim sirevima prepoznaju samo koagulaza-pozitivne vrste stafilokoka i stafilokokne enterotoksine.

U proizvod patogeni mikroorganizmi mogu doći iz mlijeka kada je zaražena životinja u laktaciji, zatim od osoba koje su u doticaju sa patogenim mikroorganizmom, a rade u proizvodnom pogonu. Najčešći se razlozi mikrobiološke nesukladnosti različitih vrsta sireva navode bakterije *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* te kvasci i plijesni. Posljednjih godina sve je veći fokus na gotovoj hrani i potencijalnim mikrobiološkim opasnostima, a u tom kontekstu je u sirarstvu najvažnija bakterija *Listeria monocytogenes* (VRDOLJAK i sur., 2016.). Dobra mikrobiološka kakvoća sirovog mlijeka preduvjet je dobre mikrobiološke kakvoće mliječnih proizvoda. U tom smislu određivanje broja i vrsta mikroorganizama prisutnih u konzumnom mlijeku i mliječnim proizvodima daje najbolji uvid u kvalitetu proizvodnje određenog proizvođača (KOZAČINSKI i sur., 2003.).

2.4.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je ubikvitaran mikroorganizam koji je prisutan u tlu, na bilju te u fecesu životinja. Također, bakterija može biti prisutna u sirovom mesu, sirovom mlijeku i ribi. Živi u vlažnoj sredini i razmnožava se na temperaturama između 0 i 45 °C, dok je optimalna temperatura za njezin rast i razvoj od 30 do 37 °C. Optimalni pH je između 7,2 i 7,6, ali je sposobna preživjeti izuzetno niske ili pak visoke pH vrijednosti. Sol je ne uništava, tako da

preživljava postupak salamurenja. Prema Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/2013), odnosno Uredbi (EZ) 2073/2005, *Listeria monocytogenes* se ispituje u gotovom proizvodu tijekom roka trajanja. *Listeria monocytogenes* je patogena bakterija i sukladno propisima njezine granične vrijednosti su 100 CFU/g uzorka ili odsutnost u 25 g uzorka. Kriterij od 100 CFU/g primjenjuje se ako proizvođač može dokazati nadležnom tijelu i/ili drugim tijelima nadležnim za provođenje inspekcije da proizvod ne prelazi granicu od 100 cfu/g tijekom roka trajanja, dok se kriterij „odsutnost u 25 g“ primjenjuje prilikom kontrole proizvoda prije stavljanja na tržište, kada subjekt ne može dokazati nadležnom tijelu i/ili drugim tijelima nadležnim za provođenje inspekcije da proizvod neće prijeći granicu od 100 cfu/g tijekom roka trajanja. Ukoliko se utvrdi prisutnost listerije u mliječnom proizvodu serija iz koje je uzet uzorak se povlači, obavještava se nadležna veterinarska služba i poduzimaju se potrebni koraci uz stručnu pomoć. Analizu je potrebno ponoviti za potvrdu učinkovitosti popravni postupaka (ZDOLEC i sur., 2015.).

2.4.2. Stafilokokni enterotoksini

Ispitivanje stafilokoknih enterotoksina se provodi u procesu proizvodnje sukladno Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/2013). Stafilokokni enterotoksini ne smiju biti prisutni u mliječnim proizvodima, odnosno moraju biti odsutni u 25 g uzorka. Ukoliko je u proizvodu ustanovljeno više od 100.000 CFU/g koagulaza pozitivnih stafilokoka tada se određuju stafilokokni enterotoksini te ako se utvrdi prisutnost stafilokoknih enterotoksina u mliječnom proizvodu serija iz koje je uzet uzorak se povlači, obavještava se nadležna veterinarska služba i poduzimaju se potrebni koraci uz stručnu pomoć. Za potvrdu učinkovitosti popravni postupaka je potrebno ponoviti analizu.

2.4.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli je bakterija koja čini fiziološku mikrofloru probavnog sustava životinje i čovjeka. Razmnožava se u različitim okolinama ako za to postoje uvjeti kao što su vlaga i toplina. Određeni sojevi bakterije su patogeni, kako za životinju tako i za čovjeka. Ispitivanja bakterije se provode tijekom procesa proizvodnje. Sirevi koji su proizvedeni iz toplinski obrađenog mlijeka, *E. coli* može biti prisutna između 100 i 1000 CFU/g u uzorku.

2.4.4. Koagulaza pozitivni stafilokoki

Koagulaza pozitivni stafilokoki su saprofitne bakterije, i čine fiziološku mikrofloru vimena. Razmnožavati se mogu na temperaturama između 6 i 48 °C, a optimalna temperatura za njihov razvoj je 38 °C. Optimalni pH za njihovo razmnožavanje je između 5 i 7,5, a mogu i preživjeti u okolini do 9,8. Bakterija sama po sebi nije opasna za zdravlje ljudi, već su to stvoreni enterotoksini koje bakterija stvara u pogodovnim uvjetima. Pasterizirano mlijeko će uništiti bakteriju, dok će enterotoksini i dalje biti prisutni. Ispitivanja bakterije se provode tijekom procesa proizvodnje. Proizvode je potrebno kontrolirati nakon dodavanja sirila, kada je broj stafilokoka najviši, a to je otprilike nakon 72 sata. Dopuštena količina u proizvedenim sirevima može biti između 100 i 1000 CFU/g uzorka.

2.4.5. Bakterije mliječne kiseline (BMK) i enterokoki

Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio prirodne mikroflore mlijeka te imaju izražena probiotička svojstva, uključujući i antimikrobno djelovanje. Svojom metaboličkom aktivnošću utječu i na ukupnu kakvoću svježeg sira. Predstavljaju heterogenu skupinu gram-pozitivnih mikroorganizama koje stvaraju mliječnu kiselinu, tj. krajnji i najvažniji produkt metabolizma. Unutar bakterija mliječne kiseline postoji podjela koja se bazira na morfologiji, sposobnosti fermentiranja glukoze, sposobnosti rasta na različitim temperaturama, sposobnost rasta u zasićenim otopinama soli i toleranciji na kiseli i lužnati medij (AXELSSON, 2004.). Osim mliječne kiseline, bakterije mliječne kiseline stvaraju i različite metabolite koji mogu djelovati i štetno na osjetljivu mikrofloru, na način da stvaraju nepovoljni medij za rast (acidifikacija) ili djeluju na strukturu bakterijske stanice (antimikrobni peptidi) (ZDOLEC i sur., 2007.).

Rod *Enterococcus* zauzima značajno mjesto unutar skupine bakterija mliječne kiseline te je bogata skupina mikroorganizama koje nalazimo posvuda u okolišu. Nalaze se u probavnom sustavu ljudi i životinja te ih se se do prije nekoliko desetaka godina smatralo isključivo kontaminantima hrane. Danas je međutim rod *Enterococcus* prihvaćen kao sastavni dio mikroflore tradicionalnih proizvoda koji pridonose njihovoj specifičnosti (GIRAFFA i sur., 1997.; FULLER, 1989.) te je od posebne važnosti u proizvodnji fermentiranih proizvoda kao što je sir (GELSOMINO i sur., 2001.). Enterokoki su dakle bakterije s dvojakom ulogom u proizvodnji hrane, a u sirevima najčešće su vrste *E. faecalis* i *E. faecium* (ČANŽEK MAJHENIČ, 2006.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje kuhanog sira na tržnici

Za potrebe istraživanja uzorci sireva (n=12) uzorkovani su od 2 proizvođača sa seoskog domaćinstva na gradskoj tržnici grada Koprivnice, u razdoblju od 7. do 17. veljače 2018. godine. Prikupljena su 3 kuhana sira, 3 dimljena kuhana sira, 3 dimljena kuhana sira s ljutom paprikom i 3 nedimljena kuhana sira s ljutom paprikom (Tablica 2.). Uzorci su dostavljeni u prijenosnom hladnjaku na +4 °C do mikrobiološkog laboratorija Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Vrste sireva prema proizvođaču i datumu proizvodnje

TIP SIRA I OZNAKA	OZNAKA PROIZVOĐAČA	DATUM PROIZVODNJE
Kuhani sir 1	P1	7. veljače
Dimljeni kuhani sir 2	P1	6. veljače
Dimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 3	P1	6. veljače
Nedimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 4	P1	7. veljače
Dimljeni kuhani sir 5	P1	8. veljače
Kuhani sir 1	P2	17. veljače
Kuhani sir 2	P2	18. veljače
Dimljeni kuhani sir 3	P2	17. veljače
Nedimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 4	P2	15. veljače
Nedimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 5	P2	16. veljače
Dimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 6	P2	13. veljače
Dimljeni kuhani sir s ljutom paprikom 7	P2	14. veljače

3.2. Laboratorijske pretrage

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 aerobnih mezofilnih bakterija *Escherichia coli*, enterobakterija, bakterija mliječne kiseline, stafilokoka, enterokoka te *Yersinia enterocolitica* i *L. monocytogenes*. Broj aerobnih mezofilnih bakterija određen je na Plate Count agaru (PCA, bioMerieux, Francuska) inkubiranjem na 30 °C 72 h. Broj *E. coli* određen je površinskim nasađivanjem 0,1 ml određenih razrjeđenja uzorka na kromogenu podlogu Rapid Ecoli (BIOKAR, Francuska) te inkubiranjem na 37 °C 24 sata. Enterobakterije su određivane na ljubičasto-crvenom žučnom agaru s glukozom (VRBG, Merck, Njemačka) inkubiranjem na 37 °C 24 sata. Broj bakterija mliječne kiseline određen je površinskim nasađivanjem na de Man, Ragosa, Sharpe agar (MRS, Merck, Njemačka) te M17 agar (Merck, Njemačka) i inkubiranjem na 30 °C 24-48 h, a enterokoki na kromogenu podlogu Compass Enterococcus agar (BIOKAR, Francuska) inkubiranjem na 37 °C 24 h. Broj *Y. enterocolitica* određen je na CIN agaru, a broj *Listeria monocytogenes* određivanaje prema metodi HRN ISO 11290:2. Rezultati su prikazivani kao logaritamske vrijednosti broja kolonija po gramu sira ($\log_{10}$ CFU/g). U sirevima je određen i pH pri čemu se 10 g sira otopi u destiliranoj vodi, a pH izmjeri u iscpini na 25 °C pHmetrom.

3.3. Statistička obrada

U statističkoj obradi rezultata korišten je program Microsoft Excel 2010. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, a broj mikroorganizama logaritmiran. Koeficijent korelacije R određen je u pojedinim grupama sireva unutar mikrobne populacije i pH.

4. REZULTATI

Rezultati mikrobiološke pretrage i pH grupirani su prema skupinama sireva: kuhani, kuhani dimljeni, kuhani s ljutom paprikom, kuhani dimljeni s ljutom paprikom (Tablica 3).

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke pretrage kuhanih sireva

Parametar	Kuhani sir	Kuhani Dimljeni	Kuhani s ljutom paprikom	Kuhani dimljeni s ljutom paprikom
Aerobne mezofilne bakterije	5,68 ± 1,01	6,15 ± 0,53	6,49 ± 0,38	6,58 ± 0,39
Bakterije mliječne kiseline MRS	5,30 ± 0,85	5,18 ± 0,21	6,22 ± 0,67	5,21 ± 0,40
Bakterije mliječne kiseline M17	4,87 ± 0,47	4,98 ± 0,13	5,24 ± 0,74	5,19 ± 0,22
Enterokoki	2,76 ± 0,57	3,39 ± 0,56	3,28 ± 0,24	2,33 ± 0,59
Enterobakterije	1,46 ± 1,05	1,95 ± 0,47	2,53 ± 0,68	2,03 ± 0,14
Stafilokoki	3,49 ± 1,03	3,17 ± 0,15	3,48 ± 0,52	3,08 ± 0,56
<i>Y. enterocolitica</i>	< 2	< 2	< 2	< 2
<i>E. coli</i>	< 2	< 2	< 2	< 2
<i>L. monocytogenes</i>	< 2	< 2	< 2	< 2
pH	6,11 ± 0,26	5,93 ± 0,20	5,93 ± 0,07	6,09 ± 0,19

Prosječni ukupni broj bakterija u sirevima kretao se od 5,68 (kuhani sir) do 6,58 log₁₀ CFU/g (kuhani dimljeni s ljutom paprikom). U odnosu na standardni kuhani sir, broj bakterija se povećao i primjenom postupka dimljenja i dodatkom ljute paprike, kao i njihovom kombinacijom.

Broj bakterija mliječne kiseline (na MRS-u) također se kretao u sličnom rasponu, od 5,18 (kuhani dimljeni) do 6,22 log₁₀ CFU/g (kuhani s ljutom paprikom). Pri tome se uočava da je značajno povećanje ove populacije bilo uvjetovano dodavanjem ljute paprike (približno 1 log veći broj u odnosu na preostale skupine sireva).

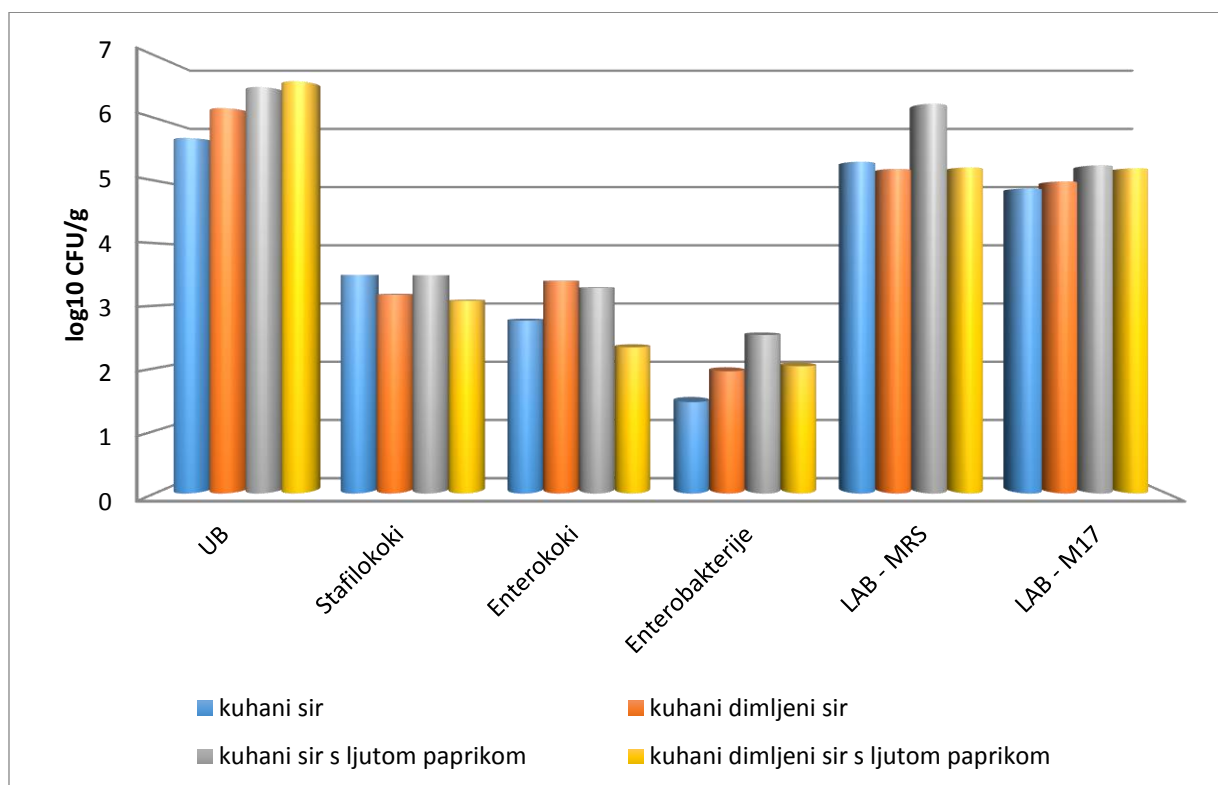
Broj laktokoka (M17) kretao se od 4,87 (kuhani sir) do 5,24 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani s ljutom paprikom). Dodavanje ljute paprike pokazalo je najveći utjecaj i na populaciju laktokoka.

Broj se enterokoka kretao od 2,33 (kuhani dimljeni s ljutom paprikom) do 3,39 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani dimljeni sir). Populacija enterokoka se u odnosu na kuhani sir povećala zasebno dodavanjem ljute paprike te dimljenjem, dok se kombinacijom ta dva parametra broj enterokoka zapravo neznatno smanjio.

Broj enterobakterija kretao se od 1,46 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani sir) do 2,53 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani sir s ljutom paprikom). U svim sirevima se broj povećavao u odnosu na kuhani sir, a ponovno najveći je utjecaj imao dodatak ljute paprike.

Broj stafilokoka se kretao od 3,08 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani dimljeni s ljutom paprikom) do 3,49 $\log_{10}$ CFU/g (kuhani sir). Vidljivo je da se dodatkom ljute paprike broj stafilocoka ne mijenja, dok je postupak dimljenja doveo do blagog smanjenja ove populacije.

pH sireva kretao se u rasponu 5,93 (dimljeni, s ljutom paprikom) do 6,11 (kuhani sir).



Graf 2. Prosječni broj ($\log_{10}$ CFU/g) mikrobnih populacija u kuhanim sirevima

Tablica 4. Odabrani koeficijenti korelacije mikroorganizama i pH prema skupinama sireva

Vrsta sira	Pozitivna korelacija (R)	Negativna korelacija (R)
Kuhani	UB:STAF 0.85 STAF:ENTKOK 0.80 ENTOKOK:ENT 0.98 ENTOKOK:LAB 0.97 ENT:LAB 0.99 LAKKOK:pH 0.59	ENTKOK:LAKKOK -0.97 ENT:LAKKOK - 0.92 LAB:LAKKOK - 0.90 <u>LAB:pH - 0.88</u>
Kuhani dimljeni	UB:STAF 0.90 UB:ENTKOK 0.89 ENT:LAB 0.98 LAB:pH 0.74 <u>LAB:LAKKOK 0.52</u>	UB:LAKKOK - 0.96 ENTKOK:LAKKOK - 0.98
Kuhani s ljutom paprikom	UB:LAKKOK 0.94 STAF:ENT 0.99 ENTOKOK:LAKKOK 0.81	STAF:ENTKOK - 0.99 STAF:LAKKOK - 0.80 ENTOKOK:ENT – 0.99 <u>LAB:pH – 0.97</u>
Kuhani dimljeni s ljutom paprikom	UB:STAF 0.99 <u>LAB:LAKKOK 0.97</u> LAB: pH 0.85 LAKKOK: pH 0.72	LAB:ENT – 0.95 LAKKOK: ENT - 0.99

UB ukupni broj, STAF stafilokoki, ENTKOK enterokoki, ENT enterobakterije, LAB bakterije mliječne kiseline, LAKKOK laktokoki

Iz tablice 4 vidljivo je da se korelacije mikrobnih skupina bitno razlikuju između promatranih vrsta sireva, što može biti posljedica primjene dimljenja i dodatka ljute paprike. Ipak izdvaja se zajednička pozitivna korelacija ukupnog broja bakterija i stafilokoka, bakterija mliječne kiseline i laktokoka te enterobakterija i bakterija mliječne kiseline. Negativne korelacije koje dominiraju su one laktokoka i enterokoka, laktokoka i enterobakterija, bakterija mliječne kiseline i pH.

5. RASPRAVA

Sastav mikroflore kuhanih sireva ovisi o brojnim čimbenicima poput mikrobiološke kvalitete mlijeka, toplinskoj obradi mlijeka, osjetljivosti mikroflore na kiseljenje, manipulaciji sirevima, dodacima, vanjskom onečišćenju i dr. Nekoliko istraživanja kvalitete kuhanih sireva u Hrvatskoj bave se i mikrobiološkim parametrima. Tako ŠTEFEKOV (1990.) u varijantama podravsko bilogorskog kuhanog sira ne nalazi nesukladnosti u pogledu tada važećih mikrobioloških kriterijati. u uzorcima nije utvrđen nezadovoljavajući broj *S. aureus*, *E. coli*, sulfitreducirajućih klostridija i *Proteus* vrsta. KIRIN (2006.) na uzorku od 13 kuhanih sireva iz domaćinstava Sjeverozapadne Hrvatske nalazi nesukladnosti zbog nalaza *E. coli* te kvasaca i plijesni. Navodi kako visok broj kvasaca i plijesni može biti posljedica uvjeta držanja sira nakon proizvodnje te vremena i intenziteta dimljenja sireva. ĐORĐEVIĆ (2015.) u istraživanju mikroflore kuhanih sireva iz okolice Duge Rese obuhvatila je parametre: *L. monocytogenes*, koagulaza pozitivne stafilokoke, *Salmonella* spp., *E. coli* i *Pseudomonas* spp. U pretraženim uzorcima sira (n=10) niti u jednom nisu utvrđene bakterije roda *Salmonella*, *E. coli* niti bakterija *Pseudomonas* spp. *L. monocytogenes* je izolirana iz jednog uzorka, kao i nepatogene *L. grayi* (isti uzorak) te *L. ivanovii* (3 uzorka). Autorica navodi nalaz od >1000 koagulaza pozitivnih stafilokoka u svim uzorcima. MIŠLOV (2015.) u kuhanim sirevima s područja Slavonije nalazi mikrobiološke nesukladnosti u vidu nalaza *E. coli* (2 od 7 uzoraka) te kvasaca i plijesni (5 od 7 uzoraka) iznad najviše dozvoljenih granica (M). SALOPEK (2016.) u kuhanim sirevima 2 gospodarstva ne nalazi *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *E. coli*. Navodi pozitivni nalaz u uzorcima s „gospodarstva A“ koagulaza pozitivnih stafilokoka, no biokemijskom identifikacijom *S. aureus* nije potvrđen. Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka kretao se od 10^2 /g (gospodarstvo B) do najviše 3×10^3 /g (gospodarstvo A). Kvasci i plijesni su utvrđeni na „gospodarstvu A“ u uzorku sira prvog dana analize, te potom nakon pohrane od sedam dana u svim pretraženim uzorcima sira. Uzorak mlijeka iz kojeg su sirevi proizvedeni nije sadržavao kvasce i plijesni.

Općenito rezultati našeg istraživanja djelomično su usporedivi s navedenim radovima, u smislu zadovoljavanja propisanih mikrobioloških kriterija. Tako ni u našem istraživanju ne nalazimo *L. monocytogenes*, no uz primjenjivani kriterij od <100 CFU/g. Podlogu za odabir ovog kriterijima nalazimo u studiji ZDOLECA i sur. (2015.) koji su radi dokazivanja sukladnosti kuhanih sireva (10 mini sirana, 30 uzoraka) s mikrobiološkim kriterijima za *L. monocytogenes* tijekom roka trajanja proizvoda proveli kemijska i mikrobiološka ispitivanja: određivanje aktiviteta vode, pH, prateće mikroflore, te broj *L. monocytogenes* u 1g, odnosno

prisutnost u 25 grama proizvoda. Izvršena je i umjetna inokulacija bakterije *L. monocytogenes* (challenge test) u kuhani sir te određivan potencijal rasta bakterije tijekom pohrane na $+ 6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pored navedenog, određivani su mikrobiološki pokazatelji sukladno preporučenim kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (Ministarstvo poljoprivrede, 2011) – *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, kvasci, te dodatno koliformi i enterokoki. Navedeni mikroorganizmi određivani su na kraju deklariranog roka trajanja (30 dana) te u produženom roku trajanja od 45 dana. U toj studiji broj *L. monocytogenes* bio je ispod granice detekcije metode brojanja *L. monocytogenes* ($<10/\text{g}$), odnosno u okviru je propisanih kriterija tijekom roka trajanja ($<100\text{ CFU/g}$), te *L. monocytogenes* nije izolirana iz 25g uzorka. Prosječni pH je na početku iznosio $5,92 \pm 0,12$, a na kraju roka trajanja (30. dan) $5,98 \pm 0,18$, dok je aktivitet vode bio $0,969 \pm 0,019$, odnosno $0,950 \pm 0,010$. Challenge testom provedenim na kuhanom siru pokazano je da tijekom roka trajanja od 30 dana, u slučaju kontaminacije na razini do 50 cfu/g , *L. monocytogenes* neće rasti iznad dozvoljene granice od 100 CFU/g budući da je potencijal rasta bio manji od 0.5 log. Potencijal rasta bio je podjednak u svim uzorcima različitih proizvođača. Popratna, kompetitivna mikrobna populacija (bakterije mliječne kiseline) je bila stabilna i potencijalno može imati antimikrobno djelovanje na *L. monocytogenes*. U studiji (ZDOLEC i sur., 2015.) prosječni broj bakterija mliječne kiseline u kuhanim sirevima iznosio je $4,76 \pm 0,70\text{ log CFU/g}$, enterokoka $2,85 \pm 0,80\text{ log CFU/g}$, a kvasaca $2,07 \pm 0,72\text{ log CFU/g}$. U našem istraživanju se populacija bakterija mliječne kiseline i enterokoka u kuhanim sirevima nalazi unutar ovih vrijednosti. Izmjerene pH vrijednosti utvrđene u našem istraživanjima također su sukladne rezultatima navedene studije.

Od ostalih potencijalnih opasnosti, u našim uzorcima ne nalazimo patogenu *Y. enterocolitica* koja je, poput *L. monocytogenes*, psihrofilna bakterija te može rasti na temperaturama hlađenja hrane (BIJELIĆ i sur., 2017.). Za razliku od prije pobrojanih istraživanja, stafilokoke koje smo izolirali ubrajamo u koagulaza-negativne što ih čini saprofitskom i nepatogenom florom. Također, za razliku od podataka KIRINA (2006.) i MIŠLOV (2015.), naši uzorci nisu sadržavali bakteriju *E. coli* što se može objasniti razlikama u higijeni proizvodnje, toplinskoj obradi mlijeka i postprocesnoj higijeni.

Populacija bakterija mliječne kiseline, uključujući laktobacile (MRS), laktokoke (M17) i enterokoke u kuhanimsirevima nije prema našim saznanjima istraživana u Hrvatskoj te su ovo prvi preliminarni rezultati i nije ih moguće usporediti s drugim radovima. Jasno je da populacija bakterija mliječne kiseline u kuhanom siru mora biti skromnija u odnosu na sireve s dodatkom starter kultura i sireva koji zriju, što je razvidno iz rezultata prijašnjih istraživanja ove

mikroflora mekih, polutvrđih i tvrdih sireva na tržištu RH (VRDOLJAK i sur., 2016., BARUN i sur., 2016.). U tom smislu se očekuje i viši pH kuhanog sira u odnosu na navedene sireve. To je također vidljivo i iz naših rezultata pri čemu broj bakterija mliječne kiseline ne korelira s kretanjem pH vrijednosti koji je očito uvjetovan stupnjem zakiseljavanja dodatkom octene kiseline. pH vrijednosti kuhanog sira slične su vrijednostima pH mekog sira skute kojeg navode VRDOLJAK i sur. (2016.) te škripavca (ZDOLEC i sur., 2016.).

U pogledu utjecaja dodatka ljute paprike i postupka dimljenja, iz naših rezultata je vidljivo da dolazi do blagog porasta ukupne mikrobne populacije. Navedeno znači da se antimikrobno djelovanje ljute paprike i dima nije očitovalo, te da je porast ukupnog broja bakterija, kao i pojedinih istraživanih mikrobnih skupina, najvjerojatnije nastao unosom mikroflora iz paprike. Također, možemo pretpostaviti da dodatna manipulacija sirevima pri dimljenju može dovesti do dodatne kontaminacije.

6. ZAKLJUČAK

1. Ukupni broj bakterija u kuhanom siru povećava se dodavanjem ljute paprike i dimljenjem sira
2. Dimljeni kuhani sir s dodatkom ljute paprike mikrobiološki je siguran proizvod
3. Populaciju bakterija mliječne kiseline u kuhanom siru potrebno je dodatno istražiti u kontekstu održivosti i kvarenja sira

7. LITERATURA

1. AXELSSON, L. (2004.): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. U: Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., (eds.): Marcel Dekker, Inc., New York, 1-67.
2. BARUN, G., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, K. SEVERIN, J. GRBAVAC, N. ZDOLEC (2016.): Sastav mikroflore mekih, polutvrdih i tvrdih sireva na hrvatskom tržištu. Hrvatski veterinarski vjesnik 24, 7-8, 80–85.
3. BIJELIĆ, T., V. DOBRANIĆ, S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, Z. DUMBOVIĆ, N. ZDOLEC (2017.): Rast *Yersinia enterocolitica* O:3 u mljevenome svinjskom mesu. Vet. Stn. 48, 1, 25–29.
4. CHARLES, D.J. (2013.): Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources, Springer, New York, USA. doi: 10.1007/978-1-4614-4310-0.
5. ČANŽEK MAJHENIČ, A. (2006.): Enterococci: yin - yang microbes. Mljekarstvo, 56, 5-20.
6. DENYER, S.P., G.S.A.b. STEWART(1998.): Mechanisms of action of disinfectans, International Biodeterioration and Biodegradation 41, 261-268. doi: 10.1016/S0964-8305(98)00023-7.
7. ĐORĐEVIĆ, M. (2015.): Mikrobiološka kakvoća kuhanog sira iz okolice Duge Rese. Diplomski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
8. FILIPOVIĆ, I., N. ZDOLEC, V. DOBRANIĆ (2016.): Effect of spices on *Vibrio parahaemolitus* survival and growth. Vet. arhiv 86,1, 125–134.
9. FULLER, R. (1989.): Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365 – 378.
10. GELSOMINO, R., M. VANCANNEYT, S. CONDON, J. SWINGS, T.M. COGAN (2001.): Enterococcal diversity in the enviroment o fan Irish Cheddar – type cheesemaking factory. Int. J. Food Microbiol., 71, 177-188
11. GIRAFFA, G., D. CANNIUTI, E. NEVIANI (1997.). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential tehnological use. J. Food Protect. 60, 732 – 738.

12. HAN, J., M. BRITTEN, D. St-GELAIS, CP. CHAMPAGNE, P. FUSTIER, S. SALMIERI, M. LACROIX (2011.): Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. Food Res. Int. 44, 494-497. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.026 19.
13. HILL, A. (1995.): Chemical species in cheese, Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese. Plenum Press, NY.
14. KIRIN, S. (1980): Domaće vrste sireva bilogorskopodravске regije i mogućnosti njihove industrijske proizvodnje, Mljekarstvo 30 (4), 111-116
15. KIRIN, S. (2004.): Kvargli, Mljekarstvo 54 (4), 315-325
16. KIRIN, S. (2006.): Domaći kuhani sir. Mljekarstvo 56 (1) 45-58.
17. KOVAČEVIĆ, D., J. PLEADIN, K. MASTANJEVIĆ, J. FRECE, J. (2014.): Opasnosti od površinske kontaminacije plijesnima u tradicionalnoj proizvodnji kulena. Meso 16 (2) 162-168.
18. KOZAČINSKI, L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ, B.KUKURUZOVIĆ (2003.): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 53, 17-22.
19. KRVAVICA, M., J. ĐUGUM, A. KEGALJ, M. VRDOLJAK (2013.): Dimljenje - postupci i učinci na mesne proizvode. Meso 15 (3) 202-207.
20. MIŠLOV, M. (2015): Kemijski sastav i svojstva kuhanog sira s područja Slavonije. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
21. NOVAK, I. (2011.): Kvaliteta kuhanih svježih sireva od kravljeg i ovčjeg mlijeka te sirutke. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
22. OLMEDO, R.H., V. NEPOTE, N.R. GROSSO (2013.): Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils, LWT- Food Sci. Technol. 53, 409-417.
23. PROESTOS, C., N. CHORIANOPOULOS, G.J.E. NYCHAS, M. KOMAITIS (2005.): RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. J. Agr. Food Chem. 53, 1190-1195. doi: 10.1021/jf040083t.

24. SALOPEK, L. (2016): Kakvoća i mikrobiološka ispravnost kuhanog sira. Diplomski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
25. SHAN, B., Y.Z. CAI, M. SUN, H. CORKE (2005.): Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agr. Food Chem.* 53, 7749-7759. doi: 10.1021/jf051513y.
26. SHAN, B., Y.T. CAI, J.D. BROOKS, H. CORKE (2007.): The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 112-119. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.00.
27. SHAN, B., Y.Z. CAI, J.D. BROOKS, H. CORKE (2011.): Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *J. Medic. Food* 14, 284-290. doi: 10.1089/jmf.2010.0009.
28. SKANDAMIS, P., K. KOUTSOUMANIS, K. FASSEAS, G.J.E. NYCHAS (2006.): Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital. J. Food Sci.* 13, 65-75.
29. SOUZA, E.L., T.L.M. STAMFORD, E.O. LIMA, V.N. TRAJANO(2007.): Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18, 409-413. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.11.008
30. SUHAJ, M. (2006.): Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Compos. Anal.* 19, 531-537. doi: 10.1016/j.jfca.2004.11.005.
31. ŠTEFEKOV, I. (1990.): Autohtoni bilogorsko-podravski «kuhani sir» - tradicija i proizvodnja. *Mljekarstvo*, 40 (9), 227- 234
32. TAJKARIMI, M.M., S.A. IBRAHIM, D.O. CLIVER (2010.): Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199-1218. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.
33. TRATNIK, LJ. (1998.): Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, 1998.
34. VALKAJ, K., S. KALIT, M.T. KALIT, W.L. WENDORFF (2013): Hygienic Indicators and Chemical Composition of Prgica Cheese Produced from Raw and Pasteurised Milks, *Czech Journal of Food Sciences* 31, 217-221.

35. VALKAJ, K., S. KALIT, K. SALAJPAL, M. ZUBOVIĆ, T. MARKOVIĆ (2014): Chemical and Microbiological Characterization of Turoš Cheese, *Agriculturae Conspectus Scientificus* 79, 201-207.
36. VEREŠ, M. (2004.): Principi konzervisanja namirnica, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2004.
37. VRDOLJAK, J., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. ZDOLEC (2016.): Microbiological quality of soft, semi-hard and hard cheeses during the shelf life. *Mac. Vet. Rev.* 39, 1, 59–64.
38. VUKOVIĆ, K.I. (2012.): Osnove tehnologije mesa. IV. izdanje. Veterinarska komora Srbije, Beograd.
39. WITKOWSKA, A.M., D.K. HICKEY, M. ALONSO-GOMEZ, M. WILKINSON (2013.): Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria, *Journal of Food Research* 2, 37-54. doi: 10.5539/jfr.v2n4p37
40. ZDOLEC, N., S. LAZIĆ, L. KOZAČINSKI, M. HADŽIOSMANOVIĆ, I. FILIPOVIĆ (2007.): The inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from fresh cow cheese. *Mljekarstvo* 57, 1, 5–13.
41. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, R. BOŽANIĆ, S. KALIT, V. MAGDIĆ, A. PEJAKOVIĆ (2015.): Istraživanje o sukladnosti s kriterijima za bakteriju *Listeria monocytogenes* u kuhanom siru do isteka roka trajanja – Sircro. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
42. ZDOLEC, N., I. FILIPOVIĆ, V. DOBRANIĆ, S. KALIT, V. KRAPLJAN, J. PEJAKOVIĆ (2016.): Potencijal rasta *Listeria monocytogenes* u kuhanom siru i siru škripavcu tijekom roka trajanja. Knjiga sažetaka 42. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, str. 91–92.
43. ŽIVKOVIĆ, J. (1986.): Higijena i tehnologija mesa. II. dio. GRO Tipografija, Đakovo i Veterinarija, Zagreb.

8. SAŽETAK

U radu je istražen utjecaj dodavanja ljute paprike i dimljenja na mirofloru kuhanog sira iz Podravine. Po tri nedimljena sira, dimljena, sira s ljutom paprikom i dimljena sira s ljutom paprikom pretražena su na broj aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline (laktobacila i laktokoka), enterokoka, stafilokoka, enterobakterija, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes*. Dodatkom ljute paprike i/ili primjenom dima ukupni broj bakterija je povećan za 0.5-0.9 log₁₀ CFU/g, a sličan trend je bio vidljiv i u broju bakterija mliječne kiseline i enterobakterija. Populacija enterokoka je u dimljenim sirevima s dodanom ljutom paprikom neznatno smanjena. Broj *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* i *E. coli* bio je ispod praga detekcije (< 2 log₁₀ CFU/g). U odnosu na pretražene parametre, sve vrste kuhanog sira u ovom istraživanju mikrobiološki su ispravne. Potrebne su daljnje analize izolata bakterija mliječne kiseline iz kuhanih sireva radi uvida u njihovu ulogu u održivosti ili kvarenju ove vrste sira.

Ključne riječi: kuhani sir, mikroorganizmi, dim, ljuta paprika

9. SUMMARY

THE EFFECT OF SMOKING AND HERBAL SUPPLEMENTS ON SAFETY OF COOKED CHEESE

In this work the effect of smoking process and addition of hot pepper on the microbial flora of cooked cheese was evaluated. Three samples of each cooked cheese, smoked cooked cheese, cooked cheese with hot pepper and smoked cooked cheese with hot pepper were tested for total viable count, lactic acid bacteria, enterococci, staphylococci, enterobacteria, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*. By addition of red pepper and/or applying smoking process the total microbial count was increased by 0.5 - 0.9 log CFU/g. Similar trend was also observed in lactic acid bacteria and enterobacteria counts. Enterococci decreased slightly by smoking cheese and adding of hot pepper, while *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *E. coli* were below detection limit ($< 2 \log_{10}$ CFU/g). Based on tested parameters, all variants of cooked cheese were microbiologically safe. Further analysis of lactic acid bacteria isolates is needed to get better insight in role of lactic acid bacteria in shelf-life and spoilage of these cheese types.

Keywords: cooked cheese, microorganisms, smoke, hot pepper

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30.04.1993. godine u Koprivnici. 2008. godine završila sam Osnovnu školu „Braća Radić“ u Koprivnici te iste godine upisala Opću gimnaziju „Fran Galović“ u Koprivnici. Maturirala sam 2012. godine i upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme osnovne škole pohađala sam tečaj engleskog jezika u školi za strane jezike „Hello“ te sam u gimnaziji učila talijanski jezik i upisala tečaj talijanskog jezika u školi za strane jezike „Arcobalena“.

Tijekom studiranja sam radila poslove preko Student servisa i 2016. godine volontirala sam u ambulanti privatne prakse „Pets2vets“ u Koprivnici.

Za vrijeme studiranja sam shvatila da ono što me ispunjava i veseli kao osobu u veterinarstvu jest javno zdravstvo, odnosno poslovi vezani s izravnim ili neizravnim utjecajem na zaštitu zdravlja ljudi.