

# Mikrobiološka kontrola Paris punjenog čajnog peciva

---

Švigir, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:931689>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



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

Repository / Repozitorij:

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



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**

**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**PIVARSTVO**

Helena Švigir

**MIKROBIOLOŠKA KONTROLA PARIS PUNJENOG  
ČAJNOG PECIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

Karlovac, 2015.



Veleučilište u Karlovcu  
Stručni studij prehrambene tehnologije  
Pivarstvo

Mentor: Josip Čulig, dipl.ing. – viši predavač

Komentor: Marija Horvat, dipl.ing.,univ.spec.

Matični broj studenta : 0314611004

Helena Švigir

**MIKROBIOLOŠKA KONTROLA PARIS PUNJENOG  
ČAJNOG PECIVA**

ZAVRŠNI RAD

Karlovac, 2015.

*Zahvaljujem mentoru, Josipu Čuligu, dipl.ing. – višem predavaču na pomoći koju mi je pružio tijekom studiranja da ovaj završni rad dobije svoj konačni izgled.*

*Također se zahvaljujem Mariji Horvat dipl.ing., univ.spec. voditeljici mikrobiološkog laboratorija koja mi je bila velika pomoć u planiranju i izvođenju eksperimenata, te obradi podataka. Gospođo Marija, puno vam hvala.*

*Neizmjerno hvala mojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studiranja i što su mi omogućili da studij uspješno privedem kraju.*

# Mikrobiološka kontrola Paris punjenog čajnog peciva

## Sažetak

U radu su opisane i provedene mikrobiološke analize na svakom pojedinom uzorku ulaznih sirovina, poluproizvoda, te na gotovom proizvodu – Paris, punjeno čajno pecivo 300g . Mikrobiološki parametri svih uzoraka su u skladu s preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje, ožujak 2011.) koje je propisalo Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja i Uredbe 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Ovisno o uzorcima, mikrobiološke analize obuhvaćaju se određivanjem različitih mikroorganizama: aerobne mezofilne bakterije, kvasce, plijesni, *Salmonella spp*, Enterobacteriaceae, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, sulfitreducirajuće klostridije. Mikrobiološka kontrola provodi se na temelju jednog uzorka, te se zbog toga uzima manja vrijednost MDK (maksimalno dopuštena koncentracija). Provedena analiza potvrđuje visoku kvalitetu Koestlin d.d. proizvoda te njihovo stalno poboljšavanje, kao i unaprjeđenje poslovnih procesa uz usku suradnju s Prehrambeno – biotehnoološkim fakultetom u Zagrebu. Rezultat takvog suvremenog pristupa Koestlin d.d. u proizvodnji konditorskih proizvoda je i posjedovanje certifikata ISO9001.

**Ključne riječi:** sirovine, punjeno čajno pecivo, mikrobiološki parametri

# **Microbiological control Paris filled muffin**

## **Abstract**

This thesis describes the microbiological analysis carried out on each sample of raw materials, semi-finished and finished of Paris filled biscuits products. Microbiological parameters of all samples are according to standard. Depending on samples, microbiological analysis encompassed the determination of the different microorganisms: aerobic mesophilic bacteria, yeasts, molds, *Salmonella spp*, Enterobacteriaceae, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* depending on samples. Microbiological controls are carried out on the basis of a single sample, and therefore takes less value TWA (maximum allowable concentration). The analysis confirms the high quality Koestlin Inc. products and their continuous improvement, as well as improving business processes through close working with pre - in Zagreb. The result of such a modern approach Koestlin d.d. in confectionery products and owning the certificate of ISO9001.

**Key words**: raw materials, filled biscuit, microbiological parameters

# SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	I
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Definicija pojma čajno pecivo .....	4
2.2. Sirovine iz kojih se proizvodi Paris punjeno čajno pecivo .....	4
2.2.1. Pšenično brašno .....	4
2.2.2. Šećeri (ugljikohidrati).....	5
2.2.3. Mljevenje kristal šećera i izrada vanili šećera .....	5
2.2.4. Šećerni sirup .....	5
2.2.5. Masti .....	6
2.2.6. Sirutka u prahu .....	6
2.2.7. Kuhinjska sol.....	6
2.2.8. Arome .....	7
2.3. Mikrobiološka kontrola .....	7
2.3.1. Mikrobiološka kontrola sirovina i poluproizvoda .....	9
2.4. Proces proizvodnje čajnih peciva .....	11
2.4.1. Priprema i zamjesa .....	11
2.4.2. Oblikovanje, pečenje i hlađenje .....	12
2.4.3. Punjenje čajnih peciva .....	12
2.4.4. Pakiranje čajnih peciva .....	12
2.4.5. Mikrobiološka kontrola poluproizvoda i gotovog proizvoda .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. Materijal.....	16
3.1.1. Uzorci .....	16
3.2. Metode rada .....	17
3.2.1. Pufirirana peptonska voda .....	18
3.2.2. Plate Count Agar .....	18
3.2.3. Salmonella Enrichment Broth – Rappaport and Vassiliadis (RVS Broth) .....	18
3.2.4. XLD (Xylose Lsine Deoxycholate) Agar .....	18
3.2.5. Dichloran-glicerol (DG18) Agar .....	19
3.2.6. VRBG Agar .....	20
3.2.7. Sulphite Polymyxin Sulphadiazine (SPS) Agar .....	20
3.2.8. Bair-Parker Base Agar.....	21
3.2.9. ½ Fraser bujona .....	21



3.2.10. PALCAM agar.....	22
3.2.11. Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama – tehnika brojanja kolonija na 30°C .....	22
3.2.12. Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni .....	24
3.2.13. Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae .....	25
3.2.14. Horizontalna metoda za otkrivanje Salmonella spp .....	28
3.2.15. Izolacija sulfitreducirajućih klostridija .....	31
3.2.16. Horizontalna metoda za brojenje Listeria monocytogenes .....	32
3.2.17. Petrifilm Enterobacteriaceae .....	33
4. REZULTATI .....	36
4.1. Rezultati ispitivanja sirovina, poluproizvoda i gotovog proizvoda .....	37
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI.....	44
7. LITERATURA .....	46
8. POPIS SLIKA I TABLICA .....	49

## **1. UVOD**

Paris punjeno čajno pecivo izrađuje se po originalnoj i jedinstvenoj Koestlin recepturi koja je rezultat rada, sada već stoljetne tradicije. Pecivo je specifično po veoma prhkoj strukturi i blagim bouquet aromama koje proizlaze iz posebnog načina izrade, pomno čuvanog kao dio Koestlinove tradicije. Na tržištu se nalazi punjen kremom, prelit kakao preljevom i kao čajno pecivo. Sastojci čajnog peciva su brašno, punilo 20% (šećer, biljne masti: djelomično hidrogenirana palmina mast, djelomično dehidrogenirana sojina mast, arome), palmina mast, šećer, sirutka u prahu, sol, tvari za rahljenje: amonijevi karbonati i natrijevi karbonati, te regulator kiselosti: difosfati, aroma. (Koestlin, 2004.)

Mikrobiološka kontrola provedena je zbog provjere sukladnosti s kriterijima propisanim u Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu, provjere mikrobiološke sigurnosti hrane za koju ne postoje propisani mikrobiološki kriteriji te dobivanja općih podataka o mikrobiološkom statusu određenih proizvoda stavljenih na tržište.

Visoku kvalitetu svojih proizvoda i poslovnih procesa te njihovo stalno poboljšavanje, Koestlin d.d. od 20. lipnja 2002. godine potvrđuje posjedovanjem certifikata ISO9001. Analizirajući potencijalne opasnosti na cijelom putu proizvoda uspostavili su kontrolne i kritične kontrolne točke te implementirali mjere za održavanje parametara u zadanim granicama. Dana 19. lipnja 2007. su certificirani prema strogim zahtjevima IFS-a (International Food Standard), a 9. prosinca 2009. prema BRC-u (British Retail Consortium). Uz vlastiti suvremeno opremljeni i registrirani laboratorij (kemijski i mikrobiološki) za sva potrebna ispitivanja i analize, Koestlin usko surađuje i s Prehrambeno – biotehnoškim fakultetom u Zagrebu. (Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu, 15.11.2005.)

Površine koje dolaze u direktni kontakt s hranom i proizvodima održavaju se prema napisanim uputama i s odgovarajućim sredstvima. Pribor za čišćenje (metle, krpe, četke, lopatice) moraju biti izrađene od umjetnih materijala (plastika, sintetička vlakna). Prema Planu ispitivanja mikrobiološke čistoće objekta (82000314) uzimaju se brisevi nakon čišćenja i dezinfekcije: brisevi ruku radnika i brisevi čiste odjeće (bijele i tamne). U tu svrhu koristi se metoda brisa i HY-Lite sistem. Aparat mjeri količinu svjetlosti koja se izražava u RLU (relativnim jedinicama svjetlosti). (Koestlin d.d., 7.1.2011.)

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Definicija pojma čajno pecivo**

Pod nazivom "čajno pecivo" je proizvod izrađen od mekog tijesta koje sadrži kao osnovne sirovine: brašno, masnoće i šećer i druge dodatke. Mora sadržavati najmanje 10% masti računato na ukupnu masu gotovog proizvoda s 5% vode.

Prema načinu oblikovanja i strukturi tijesta čajna peciva koja se rade u „KOESTLIN“ d.d. se dijele na:

1. formirana – tijesto je sitno, grudičavo, suho i kratko. Oblik se dobije prolaskom tijesta između gumenog i form valjka.
2. rezana – tijesto je povezano i kratko, veće masnoće i vlage od tijesta za formirana čajna peciva. Oblik se dobije istiskivanjem kroz oblik ploče automata i rezanjem žicom na željenu visinu.
3. dresirana – tijesto je povezano, glatko i vrlo mekano s elastičnim karakteristikama. Oblik se dobije istiskivanjem kroz ploču automata čije je kretanje usklađeno s brzinom trake.

Pod nazivom "punjeno čajno pecivo" je proizvod dobiven stavljanjem mase za punjenje između dva pečena čajna peciva. Mora sadržavati najmanje 15% mase za punjenje računato na ukupnu količinu gotovog proizvoda s 5% vode. Punjena čajna peciva predviđena su za široku potrošnju. Konzumiraju se bez dodatne termičke obrade ili obogaćivanja. (Interni dokument Koestlin d.d.,15.4.2000.)

## **2.2. Sirovine iz kojih se proizvodi Paris punjeno čajno pecivo**

### *2.2.1. Pšenično brašno*

Brašno se dobiva mljevenjem pšenice te se ovisno o njenim osobinama dobivaju brašna različita po sastavu i tehnološkim osobinama. Ono je količinski najznačajnija sirovina u konditorskoj industriji, a svojom kvalitetom znatno utječe na kvalitetu proizvoda. Brašna sadrže škrob 64-75 %, proteine 9-15 %, vlage 13-14 %, lipida 3-5 %, topivih šećera 2-4 %,

masti 1-2 %, celuloze 0,1-2 %, pepela (mineralne soli) 0,4-1,7 % masenih udjela, te sadrži vitamine (B1, B2, E, provitamin nikotinsku kiselinu) te enzime (dijastaza, proteaza, lipaza, oksidaza). Sastav brašna ne ovisi samo o osobinama i sastavu pšenice već i o načinu mljevenja. Povećanjem stupnja mljevenja raste udio pepela, proteina i masti u brašnu, ali raste i udio sirovih vlakana, dok udio škroba pada. Također raste i udio enzima i vitamina. Brašna s manjim udjelom pepela tehnološki su pogodnija i daju na izgled ljepše proizvode. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

### *2.2.2. Šećeri (ugljikohidrati)*

Šećeri su organski spojevi vrlo rašireni u prirodi. U konditorskoj industriji služe za zaslađivanje keksa i proizvoda srodnim keksima. Najčešće se koriste saharoza (disaharid sastavljen od glukoze i fruktoze koji tvori bijele kristale dobro topive u vodi). Zatim invertni šećer, glukoza, fruktoza, šećerni sirup, sladni ekstrakt i izo-šećeri. Saharoza je običan šećer dobiven iz šećerne repe ili šećerne trske. Konzumira se u čistom stanju i kristalnom obliku. Saharoza je dobro topiva u vodi, a njena topivost se povećava s porastom temperature otopine. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

### *2.2.3. Mljevenje kristal šećera i izrada vanili šećera*

Postupak mljevenja šećera je sljedeći: kristal šećer sipa se u prihvatnik odakle se transportnom trakom doprema do čekićara gdje se melje u šećer u prahu. Takav šećer se pakira u platnene vreće u kojima se transportira u pripremu rada. Dio šećera se prahu upotrebljava se za izradu vanilin šećera koji se dobiva miješanjem šećera u prahu s vanilinom u miješalici (GOSTOL). (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

### *2.2.4. Šećerni sirup*

Šećerni sirup dobiva se kuhanjem šećera, vode i limunske kiseline pri temperaturi od 104 °C tijekom 2,5 sata. Kuhanje se povodi u bazenu s dvostrukim stjenkama među kojima cirkulira vodena para. U bazenu se prvo dozira voda preko vodomjera, a zatim se preko elevatora iz

prihvatnika dodaju šećer i limunska kiselina. Tijekom kuhanja otopina se kontinuirano miješa, a bazen je zatvoren. Dobiveni šećerni sirup istače se u ne hrđajuće spremnike kojima se transportira do mjesta potrošnje. Šećerni sirup koristi se u proizvodnji čajnih peciva i keksa. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

#### 2.2.5. *Masti*

Masti su organski spojevi. Prema kemijskom sastavu su esteri glicerola i viših masnih kiselina pa se svrstavaju u trigliceride. Ne otapaju se u vodi, ali se otapaju u organskim otapalima. Masti su spojevi sa zasićenim masnim kiselinama (palmitinska, stearinska), te su zato pri sobnoj temperaturi u krutom ili polukrutom agregatnom stanju. Prema porijeklu se masti dijele na biljne i životinjske, a prema agregatnom stanju na čvrste i tekuće (ulja). U konditorskoj industriji koriste se prirodne biljne, biljne hidrogenizirane (obične smjese) i prirodne životinjske (maslac). Prhkost proizvoda, meku strukturu i sjajnu površinu proizvoda dobiva se upravo dodavanjem određene količine masti. U proizvodnji keksa i čajnih peciva tijekom mehaničke obrade miješanja, masti povećavaju volumen apsorpcijom zraka i internih plinova iz okoline. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

#### 2.2.6. *Sirutka u prahu*

Sirutka u prahu je bijelo-žućkaste boje, specifičnog okusa i mirisa. Sirutka u prahu se dodaje u proizvode od brašna zbog poboljšanja hranjive vrijednosti i dobivanja specifičnog okusa. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

#### 2.2.7. *Kuhinjska sol*

Kuhinjska sol dodaje se pri zamjesu tijesta zbog poboljšanja okusa a i dodavanjem soli u tijesto dolazi do očvršćivanja ljepaka, time sol utječe i na konzistenciju tijesta. Ukoliko se sol dodaje u količini većoj od optimalne (2 %) uzrokuje smanjenje rastezljivosti ljepka, čime se i smanjuje kvaliteta proizvoda. Pri dodavanju soli u proizvode od fermentiranog tijesta mora se

voditi računa o redoslijedu dodavanja soli jer ona otežava razvoj kvasca. Kvaliteta kuhinjske soli ispituje se organoleptički. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

#### 2.2.8. *Arome*

Arome su koncentrirani preparati koji se dodaju namirnicama zbog poboljšanja okusa i mirisa. Prema porijeklu mogu se podijeliti na:

1. Prirodne arome dobivaju se iz eteričnih ulja ili esencija, a smjesa su aromatičnih ugljikovodika, alkohola, aldehida, fenola, etera, estera i organskih kiselina. Dobivaju se od biljaka ili njihovih dijelova tehnološkim postupcima kao što su destilacija, prešanje ili ekstrakcija.
2. Prirodno-identične arome dobivaju se od prirodnih sirovina tehnološkim postupcima, a rezultat su arome topive u etanolu.
3. Umjetne arome uglavnom se dobivaju kemijskom sintezom iz sirovina koje nisu prirodnog podrijetla. (Interni dokument Koestlin d.d., 9.4.2012.)

### **2.3. Mikrobiološka kontrola**

Mikrobiološkom kontrolom hrane utvrđujemo prisutnost patogenih, potencijalno patogenih mikroorganizama i njihovih toksina koji mogu ugroziti zdravlje ljudi. (Centar za kontrolu namirnica, 2011.)

Određuje se :

- mikrobiološka kontrola,
- kontrola mikrobiološke čistoće objekata za proizvodnju i promet hrane,
- nadzor kritičnih kontrolnih točaka (HACCP),
- ispitivanje prisutnosti bakterijskih toksina u hrani.



Najčešći bakterijski uzročnici koji se prenose hranom, a izazivaju bolesti su:

- *Salmonella* spp.
- *Listeria monocytogenes*
- *Staphylococcus aureus*

Mikroorganizmi uzročnici kvarenja:

- aerobne mezofilne bakterije
- kvasci i plijesni
- sulfitreducirajuće klostridije
- Enterobacteriaceae

Svi uzorci (sirovine, poluproizvodi) uzeti su sterilnim priborom i pohranjeni u sterilne vrećice u količini 100g. Gotov proizvod, Paris punjeno čajno pecivo, uzet je u originalnoj ambalaži.

Metoda odabira uzorka je metoda slučajnog odabira. Uzorkovanje sirovina provodi se tako da se uzima homogeni uzorak koji se nalazi u vrećama, bačvama ili nekih drugim pakiranjima. Uzorci se uzimaju iz originalnog pakiranja jedinice u kojoj se namirnica nalazi. Dok za gotove proizvode uzima se nasumce jedno komercijalno pakiranje.

Povećan broj aerobnih mezofilnih bakterija u hrani indikator je starosti i lošije mikrobiološke kakvoće (kontaminacije i/ili početka kvarenja). Prisutnost enterobakterija u namirnicama indikator je fekalnog zagađenja odnosno nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i rukovanja sa namirnicama. Prisutnost kvasaca i plijesni u hrani se smatra indikatorom kvarenja i starosti proizvoda. Salmonela u hrani posljedica je nedovoljnog kuhanja i pečenja, nedovoljne pasterizacije i loše higijene, ona se kuhanjem uništava. Namirnica iz koje se izolirana *Salmonella* spp. smatra se zdravstveno neipravnom i zahtjeva epidemiološku obradu objekta i osoblja u kojem je dotična namirnica proizvedena i/ili zatečena. *Staphylococcus aureus*, iako kod nekih ljudi normalni stanovnik nosne šupljine i ždrijela (asimptomatski kliconoše), je vrlo važan patogen u mikrobiologiji namirnica jer je uzročnik stafilokoknog otrovanja. Ova je bakterija najotpornija od svih nesporogenih bakterija; ima sposobnost tolerancije visokog sadržaja soli, ekstremnih pH i visokih temperatura (60 °C/60 minuti), preživljava sušenje i otporna je na djelovanje mnogih dezinfekcijskih sredstava i antibiotika. Sulfitreducirajuće klostridije su *Clostridium* vrste (*Clostridium perfringens* i *Clostridium*

botulinum) najznačajniji u mikrobiologiji namirnica. Karakteristika ovih bakterija je stvaranje spora u nepovoljnim uvjetima (visoka i niska temperatura, sušenje, kemijska obrada), te rast u uvjetima bez kisika. *Clostridium perfringens* stvara toksine koji uzrokuju intoksikaciju (otrovanje) hranom. *Clostridium botulinum* stvara toksine u hrani, koji su izuzetno jaki biološki otrovi (neurotoksini).

Namirnice u kojima se ustanovi prisutnost bilo kojih od navedenih mikroorganizama smatraju se zdravstveno neispravnima. (Biram zdravlje, 2003.)

Ispitivanja se provode na temelju jednog uzorka te se zbog toga uzima manja vrijednost MDK ( $m, m^c$ ). MDK se izražava kao maksimalna dopuštena koncentracija.

### 2.3.1. Mikrobiološka kontrola sirovina i poluproizvoda

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu u sirovinama se određuju preporučeni mikrobiološki parametri za sirovine (Tablica 1).

**Tablica 1.** Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za sirovine  
(Vodič za mikrobiološke kriterije, 2011.)

Sirovina	Preporučeni mikroorganizmi	Kriteriji
Brašno	Aerobne mezofilne bakterije Enterobacteriaceae Plijesni	$m=10^5$ cfu/g $m=10^4$ cfu/g $m=10^4$ cfu/g
Šećer	Aerobne mezofilne bakterije <i>Salmonella spp.</i> Enterobacteriaceae Kvasci / Plijesni	$m=10^3$ cfu/g n.n. u 25 g $m=10$ cfu/g $m=10$ cfu/g
Biljna mast	Aerobne mezofilne bakterije Enterobacteriaceae Kvasci / Plijesni	$m=10$ cfu/g $m=10$ cfu/g $m=10$ cfu/g
Sirutka u prahu	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Sulfitreducirajuće klostridije	n.n. u 25 g $M=10$ cfu/g $m=10$ cfu/g

	Aerobne mezofilne bakterije Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i>	m=10 <sup>5</sup> cfu/g M=10 cfu/g n.n. u 25 g
Kuhinjska sol	Aerobne mezofilne bakterije Plijesni	m=10 <sup>2</sup> cfu/g m=1 cfu/g
Arome	Aerobne mezofilne bakterije Enterobacteriaceae Plijesni	m=10 <sup>2</sup> cfu/g M=10 cfu/g m= ≤1 cfu/g

Za Paris punjeno čajno pecivo korišteno je brašno T-400 i T-850. U oba brašna određivane su aerobne mezofilne bakterije (2.,3.,4. razrjeđenje), plijesni (1.,2.,3. razrjeđenje) i Enterobacteriaceae na Petrifilm-u.

U šećeru, šećeru u prahu, vanilin šećeru i šećernom sirupu određivanja, nisu isti mikrobiološki parametri: aerobne mezofilne bakterije (1.,2. razrjeđenje), plijesni i kvasci (1. razrjeđenje), Enterobacteriaceae i *Salmonella*.

Prvo razrjeđenje rađeno je kod određivanja aerobnih mezofilnih bakterija i plijesni u biljnoj masti, aromama i kuhinjskoj soli. Enterobacteriaceae su određivane u biljnoj masti i aromama, a kvasci samo u biljnoj masti.

U sirutki u prahu određene su aerobne mezofilne bakterije (1.,2.,3. razrjeđenje) te *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, sulfitreducirajući klostridiji i *S.aureus* (1.razrjeđenje).

Uz sirovine, napravljena je i mikrobiološka analiza šećer praha, vanilin šećera i šećernog sirupa (Tablica 2).

**Tablica 2.** Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za poluproizvode  
(Vodič za mikrobiološke kriterije, 2011.)

<b>Poluproizvod</b>	<b>Preporučeni mikroorganizmi</b>	<b>Kriteriji</b>
Šećer prah	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i>	m= 10 <sup>5</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g
Šećer vanil	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i>	m= 10 <sup>3</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g
Šećerni sirup	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i>	m= 10 <sup>3</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g

## 2.4. Proces proizvodnje čajnih peciva

### 2.4.1. Priprema i zamjesa

U pripremu se zaprimaju i obrađuju sirovine. Brašno se prosijava, šećer kristal se melje. Kuha se šećerni sirup, izrađuje vanil šećer i prže jezgre (badem, lješnjak). Iskoristivi suhi lom se melje i prosijava. Obradene sirovine se važu i transportiraju do miješalica i miksera. Izrađuje se meko tijesto za čajna peciva i biskvite. Za liniju Sollich zaprima se tekući preljev u spremnike. Za punjenje čajnih peciva izrađuje se punilo. (Interni dokument Koestlin d.d., 15.4.2000.)

#### 2.4.2. *Oblikovanje, pečenje i hlađenje*

Čajna peciva oblikuju se i peku na dvije linije (OKA i Linija čajnih peciva). Izrađeno meko tijesto dozira se liftom u stroj za oblikovanje. Formirana čajna peciva oblikuje se pomoću form valjka. Tijesto za izradu rezanih čajnih peciva na Oka automatu tijesto povlače rebrasti valjci, istiskuju ga kroz ploču za oblikovanje, a žica ga odrezuje. Dresirana čajna peciva dobiju se istiskivanjem kroz dozator kalupa koji kretanjem, u sva 4 smjera, radi razne oblike. Tijesto se istiskuje na pokretnu čeličnu traku, odlazi u peć s direktnim zagrijavanjem (plinskim plamenici iznad i ispod trake). Prolaskom kroz peć tijesto se peče. Hladi se u tunelu za hlađenje, zrakom sobne temperature pomoću ventilatora. U slučaju da se peče poluproizvod za punjenje, nakon hlađenja čajno pecivo se slaže u plastične posude s poklopcem, dok se za liniju Sollich pecivo direktno transportira sistemom transportnih traka sa Čajne linije. Temperature pečenja se kreću između 200-250° C tijekom / 6 do 10 minuta. Nakon pečenja slijedi hlađenje u tunelima dužine 11 m. (Interni dokument Koestlin d.d., 15.4.2000.)

#### 2.4.3. *Punjenje čajnih peciva*

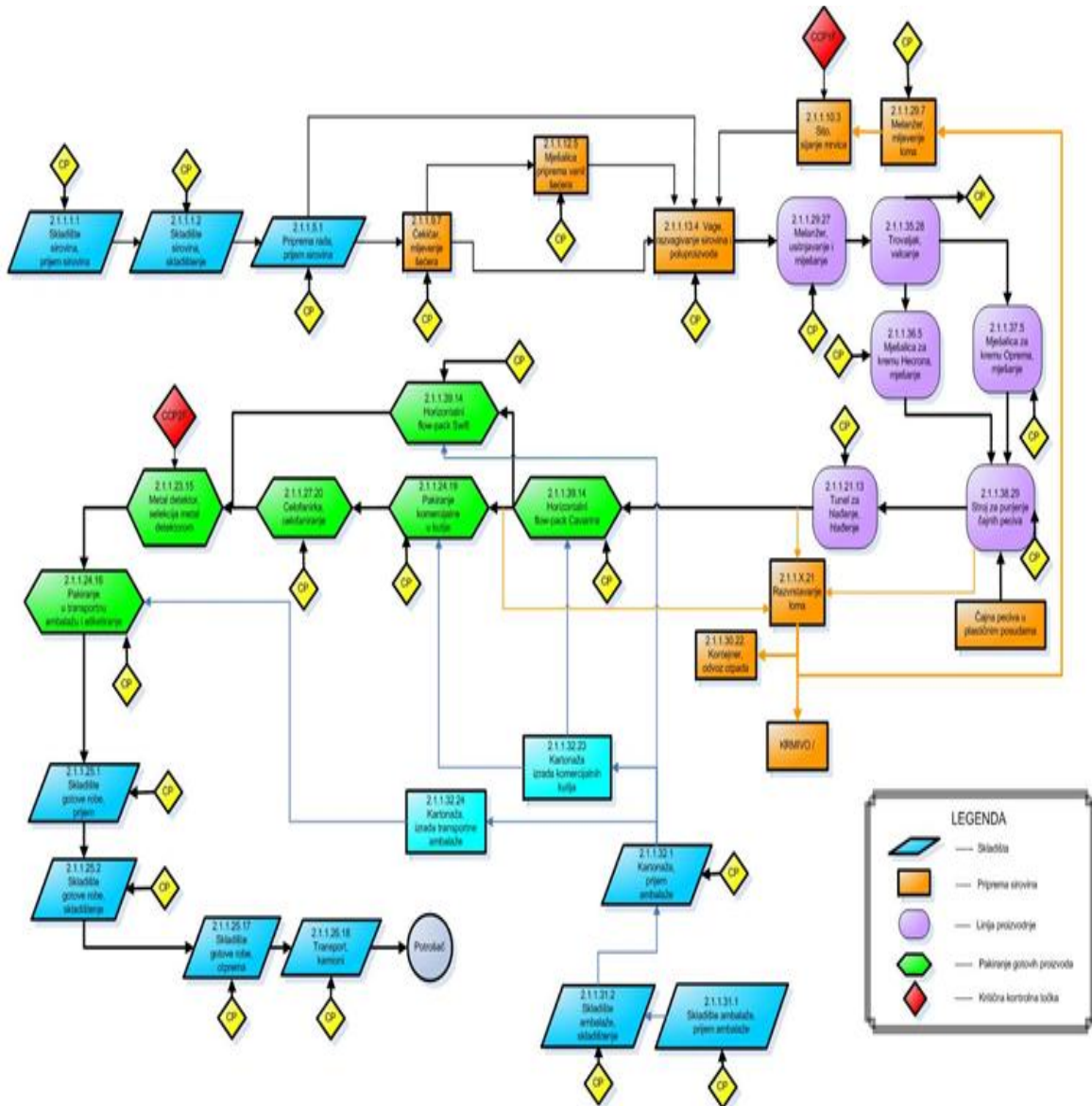
Linija za punjenje HAAS na početku ima vodilice koji se pune gotovim pečenim čajnim pecivima i to tako da su peciva u prvom redu okrenuta naličjem, a u drugom redu licem prema gore. Prvo čajno pecivo vodilicama dolazi do glave mazačice iz koje se na pecivo dozira određena količina kreme.

S obzirom da je krema za punjenje topla, formirani proizvod ulazi u tunel za hlađenje. Princip hlađenja je direktan odnosno radni medij koji ekspandira u kompresoru direktno oduzima toplinu zraka koji zatim struji kroz tunel. Temperatura hlađenja u tunelu je oko 4 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 15.4.2000.)

#### 2.4.4. *Pakiranje čajnih peciva*

Nakon hlađenja, peciva dolaze do jedinice pakiranja. To je horizontalni "flowpack". Peciva se slažu ručno u vodilice slične onima s početka linije. Iz njih dolaze na traku u grupama od četiri ili šest komada i kao takvi pakiraju se u prozirne polipropilenske paketiće. Puni paketići

slazu se u kartonske kutije koje se zatim oblažu prozirnom polipropilenskom folijom. (Interni dokument Koestlin d.d., 15.4.2000.)



**Slika 1.** Tehnološki proces proizvodnje punjenih čajnih peciva na liniji za punjenje HAAS (Interni dokument Koestlin d.d., 15.4.2000.)

#### 2.4.5. Mikrobiološka kontrola poluproizvoda i gotovog proizvoda

Napravljena je i mikrobiološka analiza mrvica čajnog peciva te kreme (punila) (Tablica 3).

**Tablica 3.** Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za poluproizvode  
(Vodič za mikrobiološke kriterije, 2011.)

Poluproizvod	Preporučeni mikroorganizmi	Kriteriji
Mrvice čajnog peciva	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	m= 10 <sup>3</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g m=10 cfu/g
Krema	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	m= 10 <sup>3</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g m=10 cfu/g

**Tablica 4.** Preporučeni mikrobiološki parametri za kekse i proizvode srodne keksu  
(Vodič za mikrobiološke kriterije, 2011.)

Hrana	Preporučeni mikroorganizmi	Kriteriji
Paris punjeno čajno pecivo	Aerobne mezofilne bakterije Kvasci / Plijesni Enterobacteriaceae <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	m= 10 <sup>3</sup> cfu/g m=10 cfu/g m=10 cfu/g n.n. u 25 g m=10 cfu/g

U gotovom proizvodu, kremi i mrvicama čajnog peciva određivani su jednaki mikrobiološki parametri: aerobne mezofilne bakterije (1.,2,3. razrjeđenje), plijesni i kvasci (1. razrjeđenje), Enterobacteriaceae, *Salmonella* i *Staphylococcus aureus*.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Materijal

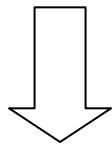
Za istraživanje korišteni su sljedeći materijali:

- Uzorci sirovina, poluproizvoda i gotovog proizvoda ( Koestlin skladište)
- Fiziološka otopina (Ruđer Medicol Ciklotron d.o.o.)
- Plate Count Agar (Biokar Diagnostic, Noack, BK144HA, Francuska)
- Dichloran- Glycerol Agar (DG-18) (Biokar Diagnostic, Noack, BK 170HA, Francuska)
- Pufirirana peptonska voda (Biokar Diagnostic, Noack, BK131HA, Francuska)
- Xylose Lsine Deoxycholate- XLD Agar (Biokar Diagnostic, Noack, BK168HA, Francuska)
- Salmonella Enrichment Broth-Rappaport and Vassiliadis (Merck, 107666, Njemačka)
- Petrifilm (3M Petrifilm Aerobic Count Plates, US)
- VRBG Agar (Biokar Diagnostic, Noack, BK011HA, Francuska)
- RVS Broth (Biokar Diagnostic, Noack, BK148HA, Francuska)
- ½ Fraser bujon (Biokar Diagnostic, Noack, BM01308, Francuska)
- Sulphite Polymyxin Sulphadiazine (SPS) (MERCK, 1.10235.0500, Njemačka)
- Bair-Parker Base Agar (Biokar Diagnostic, Noack, BK055HA, Francuska)
- EGG York Tellurite Emulsion (BS06008)
- Petrijeve zdjelice (Noex, Nowak, BP900I25SQ, Njemačka)

#### 3.1.1. Uzorci

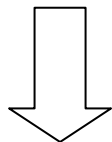
Svi uzorci (sirovine, poluproizvodi) uzeti su sterilnim priborom i pohranjeni u sterilne vrećice u količini 100g. Gotov proizvod, Paris punjeno čajno pecivo, uzet je u originalnoj ambalaži.

LOT	Predstavlja skup svih jedinica s određenim zajedničkim karakteristikama.	Za gotove proizvode – količina proizvedena u jednoj smjeni. Za sirovine – količina koja je stigla po primci u skladište sirovina (kontingent).
-----	--	---



uzorkovanje u sterilnu vrećicu sa sterilnim priborom

LABORATORIJSKI UZORAK	Uzorak koji dobro reprezentira lot, a uzorkuje se u proizvodnji ili skladištima.	Za gotove proizvode – jedno komercijalno pakiranje. Za sirovine – količine navedene u Planu i evidencija ispitivanja sirovina i poluproizvoda
--------------------------	--	--



uzorkovanje u sterilnu vrećicu sa sterilnim priborom

ANALITIČKA PORCIJA	Uzorak koji se uzima za pojedinu analizu.	Veličina ovisi o zahtjevima analitičkih metoda. Za gotove proizvode: Uputa o analizi gotovih proizvoda sirovina: Uputa o analizi sirovina.
--------------------	---	--

**Slika 2.** Uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu (Interni dokument Koestlin d.d. 07.1.2011.)

### 3.2. Metode rada

Eksperimentalni dio sastojao se od dva dijela. U prvom dijelu radi se priprema mikrobioloških podloga i otopina. U drugom dijelu provode se horizontalne metode za brojanje mikroorganizama, kvasaca i plijesni, Enterobacteriaceae, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, određivanje Petrifilm Enterobacteriaceae te izlacija sulfitreducirajućih klostridija.

### 3.2.1. *Puferirana peptonska voda*

Način djelovanja: Bujon je bogat nutrientima i omogućava brzo oživljavanje subletalnih bakterija i njihov intenzivan rast. Prisutni fosfati onemogućuju oštećenje bakterija uslijed promjena pH medija.

Priprema podloge: Otopite 20 g/l hladne destilirane vode, te zagrijavajte dok se potpuno ne otopi. Autoklavirajte 20 minuta na 121°C. Pripremljeni bujon je proziran i žućkasti. pH:  $7.0 \pm 0.2$  na 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.2. *Plate Count Agar*

Podloga je namijenjena za određivanje ukupnog broja mikroorganizama u hrani.

Priprema podloge: Otopite 20,5 g u 1 litri destilirane vode, miješajte dok se podloga ne otopi, razlite u tikvice i autoklavirajte 15 ili 20 minuta na 121° C. Pripremljena podloga je prozirna i žućkaste boje. pH:  $7,0 \pm 0.2$  na 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.3. *Salmonella Enrichment Broth – Rappaport and Vassiliadis (RVS Broth)*

Za selektivno obogaćivanje Salmonella sa izuzetkom S. typhi i S. paratyphi A iz namirnica i drugih materijala.

Priprema podloge: Otopite 42,5 g/litri, zagrijavajte lagano, ako je potrebno prenesite u epruvete, autoklavirajte lagano 20 min na 121 °C. Bujon je bistar i tamno plav. pH:  $5.2 \pm 0.2$  kod 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.4. *XLD (Xylose Lsine Deoxycholate) Agar*

Način djelovanja: Degradacija ksiloze, laktoze i surkoze u kiselinu uzrokuje promjenu boje fenol crvenog u žuto. Nastanak hidrogen sulfida je indiciran solima tiosulfata i željezo (II) soli koje reagiraju stvarajući precipitat crnih željezo sulfida u kolonijama. Kolonije koje

dekarboksiliziraju lizin u kadaverin mogu se prepoznati po ljubičastoj koloraciji oko kolonija kao i po povećanju pH. Ove reakcije mogu se dogoditi paralelno ili sukcesivno, uslijed toga pH indikator može pokazati različite boje ili može promijeniti boju od žute u crvenu tijekom produženja inkubacije. Hranjiva podloga je slabo inhibitorna.

Priprema podloge: Izvažite 55 g XLD agara, dodajte 1000 ml sterilne destilirane vode u tikvicu uz miješanje, zagrijte do vrenja dok se potpuno ne otopi. Odmah ohladite podlogu na 47-50°C u vodenoj kupelji koja je namještena na toj temperaturi. Protresite tikvicu da bi se brže ohladila. Razlijte u sterilne ploče. Petrijeva zdjelica sa XLD agarom se spaljuju plamenikom. Kada se ohlade i okreće se s dnom prema gore i čuvaju u hladnjaku. Ne autoklavirajte! Pripremljena podloga je bistra i crvena. pH: 7,4 ±0,2 kod 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.5. *Dichloran-glicerol (DG18) Agar*

Namjena: Dichloran-glicerol (DG-18) agar se preporuča za brojenje kvasaca i plijesni koje se razvijaju u proizvodima s niskim  $a_w$  (manje od 0,96). Mediji pronalazi posebne aplikacije za brojenje i izolaciju kserofilnih mikroorganizama koji se mogu naći u dehidriranim ili ekstremno suhim proizvodima, kao što su jako zaslađena ili slana jela, suho voće, žitarice, kolači i keksi, brašno i meso ili riblji dehidrirani proizvodi. Medij favorizira kontrolirani rast u odnosu na veličinu i širinu micelija i kolonije kvasca, čime omogućava lakše i točnije brojenje. Triptone i glukoza osiguravaju rast gljivica i plijesni. Koncentracija glicerola od 18% utječe na smanjenje sadržaja vode od 0,999 do 0,955. Dichloran inhibira rast nepoželjnih kolonija i smanjuje veličinu drugih kolonija. Prisutnosti kloramfenikola utječe na smanjenje bakterijskih zagađivača.

Priprema: Odvagne se 29,6 g i otopi u 1 litri destilirane ili demineralizirane vode. Dodaj 220,0 g glicerola. Uz stalno miješanje podloga se otopi, razlije u tikvice i autoklavira na 121 °/15 min. pH 5,6 ± 0,2. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.6. VRBG Agar

Namjena: Selektivni agar predložen za izolaciju i prebrojavanje svih vrsta Enterobacteriaceae u namirnicama.

Način djelovanja: Crystal violet i žučne soli inhibiraju popratnu bakterijsku floru. Degradacija glukoze popraćena je nastajanjem kiseline koja se indicira promjenom boje u crveno i zona precipitiranih žučnih kiselina u okolini kolonija. Sve *Enterobacteriaceae* detektirane su tako da rastvaraju glukozu u kiselinu. Hranjiva podloga međutim nije potpuno specifična za te organizme pošto i neke druge popratne bakterije (npr. *Aeromonas*) također pokazuju ove reakcije.

Priprema podloge: Otopite 39,5 g u 1 litri sterilne destilirane vode i grijte na plameniku do vrenja uz miješanje dok se potpuno ne otopi. Nakon toga ne zagrijavajte dulje od 2 minute.

Ne autoklavirajte! Nemojte pregrijati! Oko 15 ml agara razlijeva se u Petrijeve zdjelice, svaka zdjelica se pali plamenikom i kada se ohlade okrenu se s poklopcem prema dolje (da se ne stvaraju kapljice) i čuvaju u hladnjaku.

Pripremljena podloga je bistra i tamno crvena. pH: 7,4 ±0,2 kod 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.7. Sulphite Polymyxin Sulphadiazine (SPS) Agar

Način djelovanja: Sulfit polimiksin sulfadiazin agar sadrži širok spektar hranjivih sastojaka. Sulfit u sulfid reducira većina klostridia (uključujući *Cl. perfringens*). Sulfid reagira sa željeznim citratom čime nastaju crne kolonije. Ostali su sulfit-reducirajući mikroorganizmi uglavnom suprimirani polimiksinom i sulfadiazinom (sulfapirimidinom). Nizak sadržaj sulfita omogućava rast čak i klostridia osjetljivih na sulfite koje također mogu pokazati adekvatno zacrnjenje kolonija (PUT i suradnici 1961; BEERNS i suradnici 1961).

Priprema: Otopite 40 g/litri, autoklavirajte 20 min na 121 °C. Pripremljena podloga je prozirna i žuto-smeđe obojena. pH: 7.0 ± 0.2 na 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.8. *Bair-Parker Base Agar*

Način djelovanja: Podloga sadrži litij klorid i telurit radi inhibicije rasta prateće mikroflore, dok piruvat i glicin selektivno stimuliraju rast *Staphylococca*. *Staphylococcus* kolonije imaju dva karakteristična svojstva kada rastu u ovom neprozirnom mediju ( neprozirna podloga, radi sadržaja žutanjka jajeta):

- a) nastaju karakteristične zone i prstenovi kao rezultat lipolize i proteolize
- b) redukcijom telurita u telur nastaje crno obojenje

Reakcija žutanjka i reakcija telurita pojavljuju se obično zajedno s pozitivnom reakcijom koagulaze i stoga mogu služiti kao indeks za kasnije.

Također je potrebno dodati emulziju žutanjka s teluritom koja omogućava detekciju aktivnosti lecitinaze i redukcije telurita.

Priprema podloge: Otopite 58 g/l destilirane vode, autoklavirajte 20 minuta na 121°C.

Ohladite do 45-50°C, umiješajte u podlogu 50ml emulzije žutanjaka s teluritom i izlijte u ploče. Ploče su opalescentne i žuto-smeđe boje. pH: 7,4 ±0,2 kod 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.9. $\frac{1}{2}$ *Fraser bujona*

Namjena: Selektivni medij za primarno (*Fraser*  $\frac{1}{2}$ ) i sekundarno (*Fraser* 1) obogaćivanje *Listerian spp.* u hrani.

Način djelovanja: Ta dva bujona (*Fraser*  $\frac{1}{2}$  i *Fraser* 1) su neznatno puferirana tako da smanjuju stvaranje kisele flore koja štetno utječe na rast *Listeria spp.* Nakon obogaćivanja prisutnost *Listeria spp.* se detektira kada bujon promijeni boju iz žute u tamno smeđu (hidroliza esculina). Ta boja se ne mijenja sustavno, tako da je važno napraviti izolaciju na selektivnom mediju (*PALCAM* ili *OXFORD* ili *RAPID`L.mono*) da bi bili sigurni na prisustvo *Listeria spp.* (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.10. PALCAM agar

Namjena: PALCAM Listeria selektivni agar je visoko selektivni medij koji omogućava rast *Listeria monocytogenes*, dok u isto vrijeme inhibira Gram negativne i većinu Gram pozitivnih pratećih bakterija.

Način djelovanja: *Listeria monocytogenes* u mediju razrađuje esculin na glukozu i esculetin. Esculetin sa željezo (III) ionima stvara kompleks koji boji bakterije u maslinastozelene s crnim rubom.

Priprema podloge: Gotovu dehidriranu podlogu otopite prokuhavanjem u vodi. Autoklavirajte 15 min na 121 °C. Rastopite sadržaj jedne bočice PALCAM Listeria selektivnog saplementa u 1ml sterilne destilirane vode i dodajte sterilnom mediju ohlađenom na 50°C. Ukoliko je potrebno isperite bočicu saplementa sa 1 ml sterilne destilirane vode. Dobro izmiješajte i zalijte ploče. Pripremljene ploče (sa saplementom) su čiste i tamno-crvene. pH: 7,2 ±0,2 kod 25 °C. (Interni dokument Koestlin d.d., 5.4.2014.).

### 3.2.11. Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama – tehnika brojanja kolonija na 30°C

Podloga: Plate Count Agar

Priprema početne otopine i decimalnih razrjeđenja: Određivanje aerobnih mezo-filnih bakterija provodi u sterilnim uvjetima uz plamenik. 20g uzorka sterilnim priborom (pincetom ili žlicom) odvagane se u sterilnu vrećicu, zalije sa 180ml sterilne fiziološke otopine (44°C-47°C) i dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razrjeđenje. Za sve namirnice za čije je mikrobiološko ispitivanje potrebno više razrjeđenja, uzima se sa sterilnom pipetom 1ml osnovnog (decimalnog) razrjeđenja i prenosi u epruvetu sa 9ml sterilne fiziološke otopine. Pipeta se zamjeni čistom sterilnom pipetom i postupak se ponavlja za sva daljnja decimalna razrjeđenja.

Inokulacija: Postupak se radi u duplikatoru (na dvije petrijeve ploče) za svako razrjeđenje.

Ako je moguće, za inokulaciju se odabiru ona razrjeđenja (najmanje dva u nizu), na kojima će zbroj kolonija na ploči biti između 15 i 300.

1 ml uzorka zalije se s 12-15 ml PCA ohlađenog na 44-47° C. Promiješati inokulum sa agarom i pustiti da se stisne. Vrijeme koje protekne od pripreme primarnog razrjeđenja i trenutka kada se sredstvo izlije na ploče ne smije biti dulje od 45 min. (Međunarodni standardi, 3. izdanje, 1.2.2003.)

Inkubacija i brojenje: Petrijeve zdjelice se s dnom prema gore inkubiraju u termostatu na  $30 \pm 1^\circ\text{C}/72 \pm 3$  sata. Pregledati ploče i izbrojiti porasle kolonije. Izračunati broj mikroorganizama prisutnih u uzorku prema formuli:

$$N = C / V(n_1 + 0,1n_2) \cdot d$$

N –izračunati broj kolonija

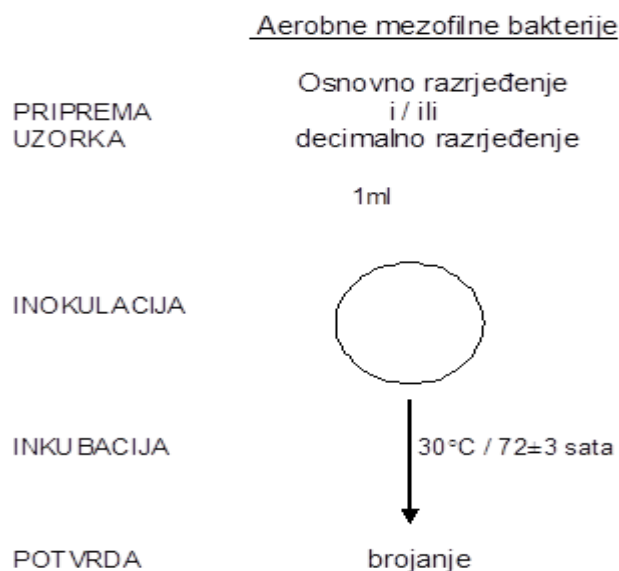
C - zbroj kolonija

V - volumen inokuluma

$n_1$  - broj petrijevki s prvim razrjeđenjem

$n_2$  - broj petrijevki s drugim razrjeđenjem

d - stupanj razrjeđenja prvog zadržanog razrjeđenja



**Slika 3.** Shematski prikaz određivanja aerobnih mezo filnih bakterija  
(Međunarodni standardi, 3. izdanje, 1.2.2003.)



### 3.2.12. Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni

Podloga: Dichlbran-glycerol agar (DG18)

Priprema početne otopine i decimalnih razrjeđenja: Iz ispitnog uzorka pripremiti početnu otopinu (20 g uzorka i 180 ml sterilne fiziološke otopine) i decimalna razrjeđenja.

Inokulacija: Postupak se radi u duplikatoru (na dvije Petrijeve ploče) za svako razrjeđenje.

Pripremiti i kontrolnu ploču sa 15 ml agara, radi provjere sterilnosti. Sterilnom pipetom prenijeti 1 ml ispitnog uzorka u petrijeve zdjelice, zaliti sa 15 ml agara ohlađenog na  $45^{\circ}\pm 1C$ . Promiješati inokulum sa agarom i pustiti da se stisne. (International standard, First edition, 1.7.2008.)

Inkubacija i brojenje: Inkubirati na  $25^{\circ}\pm 1C$ / 5 dana. Porasle kolonije broje se 3.,4. i 5. dan inkubacije. U postupku se zadržavaju petrijevke sa manje od 150 poraslih kolonija. Izračunati broj kvasaca i plijesni (N) prisutnih u uzorku prema formuli:

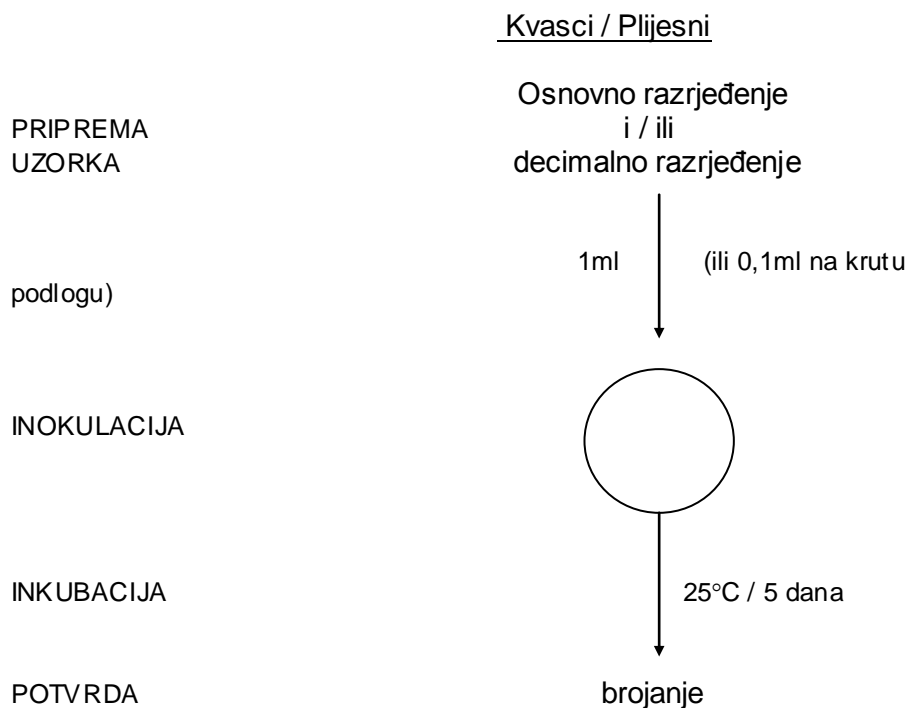
$$N = \Sigma c / (n_1 + 0,1 n_2) \cdot d$$

$\Sigma c$  – zbroj kolonija na zadržanim petrijevkama

$n_1$  - broj zadržanih petrijevki sa prvim razrjeđenjem

$n_2$  - broj zadržanih petrijevki sa drugim razrjeđenjem

$d$  - stupanj razrjeđenja prvog zadržanog razrjeđenja



**Slika 4.** Shematski prikaz određivanja Kvasaca / Plijesni  
(Internationalstandard, First edition, 1.7.2008.)

### 3.2.13. Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Enterobacteriaceae*

#### Biokemijski potvrdni testovi

Predobogaćivanje: U sterilnu vrećicu odvagane xg uzorka i doda 9xml puferirane peptonske vode (BPW) i homogenizira se. U BPW-u se pripremi jedno ili više deseterostrukih razrjeđenja, ovisno o očekivanoj razini kontaminacije. Alikvotni dijelovi (10 ml) ovog početnog razrjeđenja uliju se u tri epruvete. Zatim se 3x1 ml početnog razrjeđenja doda u 9 ml BPW-a i 3x1 ml svakog daljnjeg razrjeđenja doda se u 9ml BPW-a. Epruvete se inkubiraju na 37°C/18±2 sata.

Selektivno obogaćivanje: U epruvetu s 10 ml tekućeg bujona za obogaćivanje (EE bujon) nacijepi se 1 ml pred obogaćene kulture. Epruvete se inkubiraju na 37°C/24±2 sata.

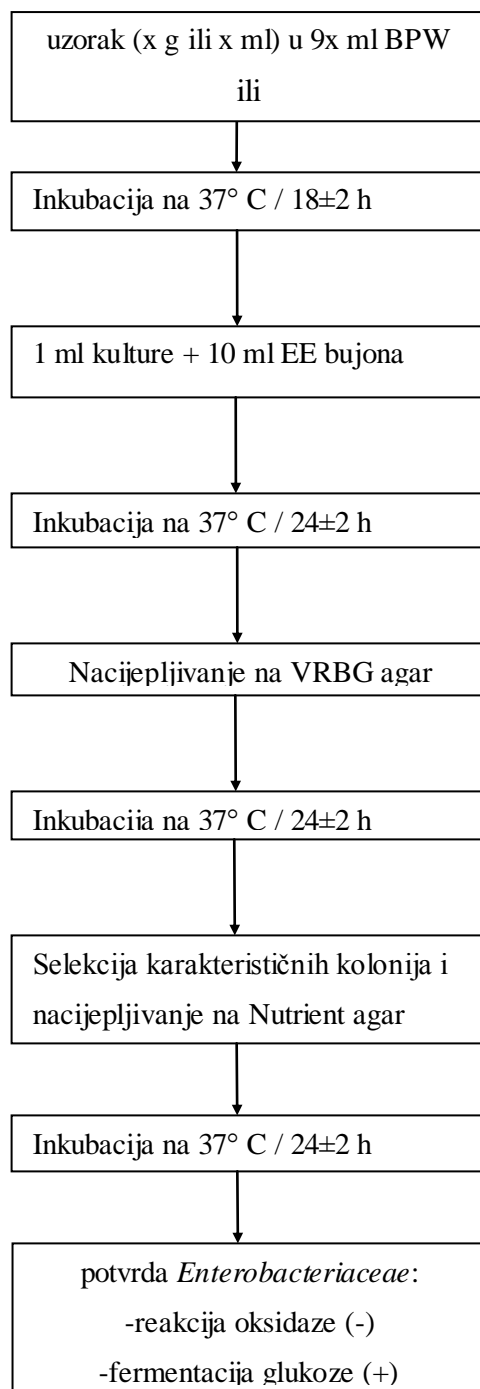
Selektivna izolacija: Iz selektivnog bujona uzorak se mikrobiološkom ušicom (u sterilnim uvjetima) precjepkuje se na krutu podlogu (ljubičasto-crveni žučni glukozni agar). Tako precjepkana podloga ide na inkubaciju na  $37^{\circ}\text{C}/24\pm 2$  sata.

Potvrda: Karakteristične kolonije su ružičasto do crvene ili purpurne boje (sa ili bez precipitacijskih prstenova). Od kolonija za koje se pretpostavlja da su enterobakterije, uzgoji se subkultura na neselektivnoj podlozi i potvrdi pomoću testova za fermentaciju glukoze i nazočnost oksidaze. Na Petrijeve posude sa hranjivim agarom (Nutrient agar) precjepite svaku od kolonija koje ste odabrali za potvrđivanje. Te posude zatim inkubirajte na  $37^{\circ}\text{C}/18\pm 2$  sata. Iz svake od inkubiranih Petrijevih posuda odaberite po jednu dobro izoliranu koloniju za potvrdne biokemijske testove.

#### Biokemijski potvrdni testovi:

Reakcija oksidaze: Pomoću ušice (ne od nikla/kroma) uzmite jednu količinu od svake dobro izolirane kolonije i nacjepite na filter- papir navlažen reagensom oksidaze ( ili na neki disk koji se može nabaviti na tržištu-držati se uputa proizvođača). Test smatrajte negativnim ako boja filter-papira u roku 10 sek ne potamni.

Fermentacijski test: Pomoću ušice uzmite bris istih kolonija koje ste odabrali a koje su dale negativan rezultat testa oksidaze i nacjepite u epruvetu koje sadrže glukozni agar. Inkubirajte te epruvete na  $37^{\circ}\text{C}/18\pm 2$  sata. Ako cijeli sadržaj epruvete požuti, smatrajte to pozitivnom reakcijom. (Hrvatska norma, 1. Izdanje, 2008.)



**Slika 5.** Shematski prikaz određivanja *Enterobacteriaceae*  
(Hrvatska norma, 1. izdanje, 2008.)

### 3.2.14. Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp

Predobogaćivanje: U sterilnu vrećicu odvagane se 25 g uzorka i doda se 225 g puferirane peptonske vode. Inkubira se na 37°C/24 sata.

Selektivno obogaćivanje: 0,1 ml pred-obogaćene kulture iz puferirane peptonske vode prenese se sterilnom pipetom u 10 ml RV bujona, a 10 ml osnovnog razrjeđenja u tikvicu s MKTTn bujonom. Inkubacija RV bujona se provodi na 41,5°C/24 sata, a MKTTn bujona na 37°C/24 sata.

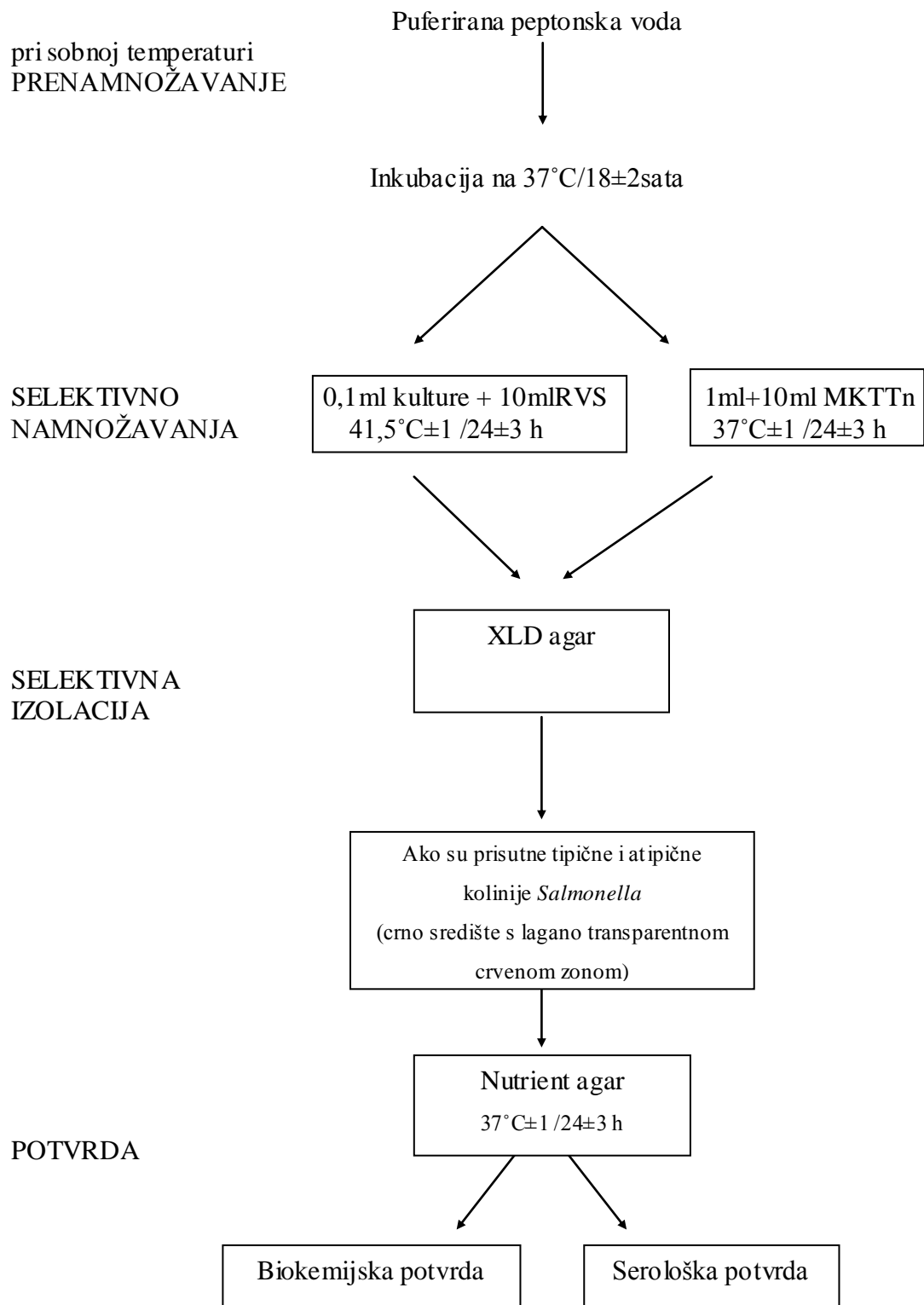
Selektivna izolacija: Iz selektivnog bujona uzorak se mikrobiološkom ušicom (u sterilnim uvjetima) predcjepkuje se na XLD podlogu (crvene boje) u tri poteza, s tim da se kod svakog razmazivanja mikrobiološka ušica spali na plameniku. Tako precjepkana podloga ide na inkubaciju na 37°C/24 sata.

Potvrda: Iz svake ploče testira se karakteristična kolonija. Ako je test negativna testiraju se sljedeće četiri označene kolonije na Nutrient agar i inkubiraju se na 37°C/24 sata. Dalje slijede biokemijska i serološka potvrda. (Hrvatska norma, 1. Izdanje, 2003.)

Izgled kolonija na XLD agaru:

Kolonije su slične boji podloge, prozračne, → *Salmonella*  
sa crnim centrom

Žute, s prozirnom zonom precipitacije → *Escherichia coli, Enterobacter, Aeromonas*



**Slika 6.** Shematski prikaz određivanja *Salmonella spp*  
(Hrvatska norma, 1. izdanje, 2003.)

### 3.2.5. Horizontalna metoda za brojanje *Staphylococcus aureus*

Podloga: Bair-Parker Base Agar

EGG York Tellurite Emulsion

Priprema početne otopine i decimalnih razrjeđenja: U sterilnu vrećicu odvagane se xg uzorka i zalije sa 9 x ml sterilne fiziološke otopine (45°C) te se ostavi 20-tak minuta da se homogenizira.

Inokulacija i inkubacija: Pomoću sterilne pipete na svaku od dvije Petrijeve posude s agarom nanosite 0,1 ml ispitnog uzorka, ako se radi o tekućini ili 0,1 ml početne suspenzije (razrjeđenje  $10^{-1}$ ) u slučaju drugih proizvoda. Ponovite postupak za razrjeđenje  $10^{-2}$  te za daljnja decimalna razrjeđenja ako je to potrebno. Inokulat pažljivo i što je moguće brže razmažite po površini agara, nastojeći da ne dodirujete stranice posude, koristeći štapić za razmazivanje. Pustite pločice da se osuše u poklopljenoj Petrijevoj posudi oko 15 min na sobnoj temperaturi. Pločice idu u termostat na inkubaciju na 35 °C ili 37°C/24±2 sata, te ih reinkubirati kroz slijedeća 24±2 sata na istoj temperaturi. Nakon prvih 24 sata označiti svaku tipičnu koloniju. Nakon reinkubiranja označiti nove tipične kolonije. Označiti treba i prisutne atipične kolonije.

Brojanje i potvrđivanje kolonija (test koagulaze): Tipične kolonije su crne ili sive boje, sjajne i konveksne (promjera 1,5-2,5 mm nakon inkubacije od 48 sati) i okružene jednom bistrom zonom. Nakon inkubacije od najmanje 24 sata, u istoj bistroj zoni može se, u području koje je izravno u dodiru s kolonijama, pojaviti jedan opalescentan prsten. Atipične kolonije mogu imati jednu od slijedećih morfologija: sjajno crne kolonije, sa ili bez uskog bijelog ruba; bistrane zone nema ili je jedva vidljiva, a opalescentnog prstena ili nema ili je jedva vidljive sive kolonije bez bistrane zone. U postupku brojenja ostavljaju se one ploče koje sadrže 15-300 kolonija sa 150 tipičnih i/ili atipičnih kolonija u dva uzastopna razrjeđenja. Za potvrđivanje se odabire po 5 kolonija sa svake ploče. Odabrane kolonije precjepuju se u epruvetu sa mozak-srce bujonom i inkubiraju se na 35°C ili 37°C/24±2 sata. Po 0,1 ml kulture se dodaje u epruvetu sa 0,3 ml kuniće plazme i inkubiraju se na 35°C ili 37°C. Nakon 4-6 sati epruvete se pregledavaju na prisustvo koaguluma. Ukoliko je test negativan, epruvete se pregledavaju

nakon 24 sata. Koagulaza pozitivnim testom smatra se kada je više od pola početnog volumena plazme u epruveti koagulirano. (Hrvatska norma, 1. izdanje, 2004.)

### 3.2.15. *Izolacija sulfitreducirajućih klostridija*

Podloga: Sulphite Polymyxin Sulphadiazine (SPS)

Priprema početne otopine i decimalnih razrjeđenja: U sterilnu vrećicu odvagane se x g uzorka i zalije sa 9 x ml sterilne fiziološke otopine (45°C) te se ostavi 20-tak minuta da se homogenizira. Pripremi se jedno ili više deseterostrukih razrjeđenja, ovisno o očekivanoj razini kontaminacije. Uzorak se kuha na 80°C / 10 min u vodenoj kupelji.

Inokulacija i inkubacija: Kada se ohladi 1 ml se pipetom prenese u epruvetu s pripremljenom hranjivom podlogom otopljenog sulfitnog agara. Nacjepljivanje se radi tako da se pipeta s uzorkom kružnim pokretima povlači od dna prema vrhu epruvete. Kada se podloga u epruveti stvrdne zalije se podlogom za određivanje ukupnih mikroorganizama ili kvasaca da bi se stvorili anaerobni uvjeti (klostridij raste samo anaerobno). Nacjepljena podloga inkubira se na 37°C / 20±2 sata.

Identifikacija: Rast karakterističnih crnih kolonija u dubini podloge ili bez stvaranja plina, ili difuzno crnjenje podloge uz stvaranje plina i cijepanje podloge ili bez stvaranja plina označava se kao pozitivan predhodni test, tj. kao znak vjerojatne prisutnosti sulfitoreducirajućih klostridija u uzorku. Izolacija se dalje izvodi tako da se karakteristične crne kolonije boje po Gram-u. Istovremeno se kultura mikrobiološkom ušicom prenese na krvni agar koji se inkubira aerobno na 37°C / 24 sata. Namaz Gram pozitivnih štapića sa sporama ili bez spora u mikroskopskom preparatu i izostanak rasta na krvnom agaru smatra se dokazom prisutnosti sulfitoreducirajućih klostridija u ispitanom uzorku. (Koestlin d.d., 9-04/2014.)



### 3.2.16. Horizontalna metoda za brojenje *Listeria monocytogenes*

Podloga: Pufirirana peptonska voda ili ½ Fraser bujona

Razrjeđivanje i priprema inicijalne suspenzije: Xg uzorka zalije se sa 9 x ml pufirirane peptonske vode ili ½ Fraser bujona bez selektivnih dodataka (u slučaju kada se na istom uzorku rade i metoda dokazivanja i metoda brojenja). Oživljavanje oštećenih stanica odvija se na 20°C±2°/ 1sat ±5 min.

Inokulacija i izdvajanje: 0,1 ml kulture razmazati sterilnim štapićem na dvije ploče s PALCAM agarom (razmazivanje obaviti što brže, nastojeći da štapićem za razmazivanje ne dodirujete stranice ploče). Ostavite petrijeve ploče oko 15 min na sobnoj temperaturi laboratorija da bi se inokulat upio u agar.

Inkubacija i brojenje: Podloga se inkubira na 37°C / 24±3 sata ( ili naredna 24±3 sata u slučaju slabog ili nikakvog porasta). Nakon 24 h karakteristične kolonije *Listeria spp* razvijaju se kao male ili vrlo male sivkasto zelenkaste ili maslinasto zelene boje, sa crnim središtem, ali uvijek s crnim prstenom. Nakon 48h *Listeria spp* pojavljuju se u obliku zelenih kolonija, promjera oko 1,5-2 mm, s udubljenjem u središtu i okružene crnim prstenom. Na svakoj posudi koja sadrži manje od 150 karakterističnih ili nekarakterističnih kolonija, utvrdite broj kolonija za koje pretpostavljate da su *Listeria spp*. Pokupite pet suspektnih kolonija sa svake ploče i testirati ih. Odabrane kolonije nacijepite na površinu prethodno isušenih ploča od TSYEA agara, te ih inkubirati na 35°C ili 37°C / 24±3 sata. (Hrvatska norma, 1. izdanje, 2008.)

#### Potvrđni test:

Za *Listeria spp*: Reakcija katalaze (+)

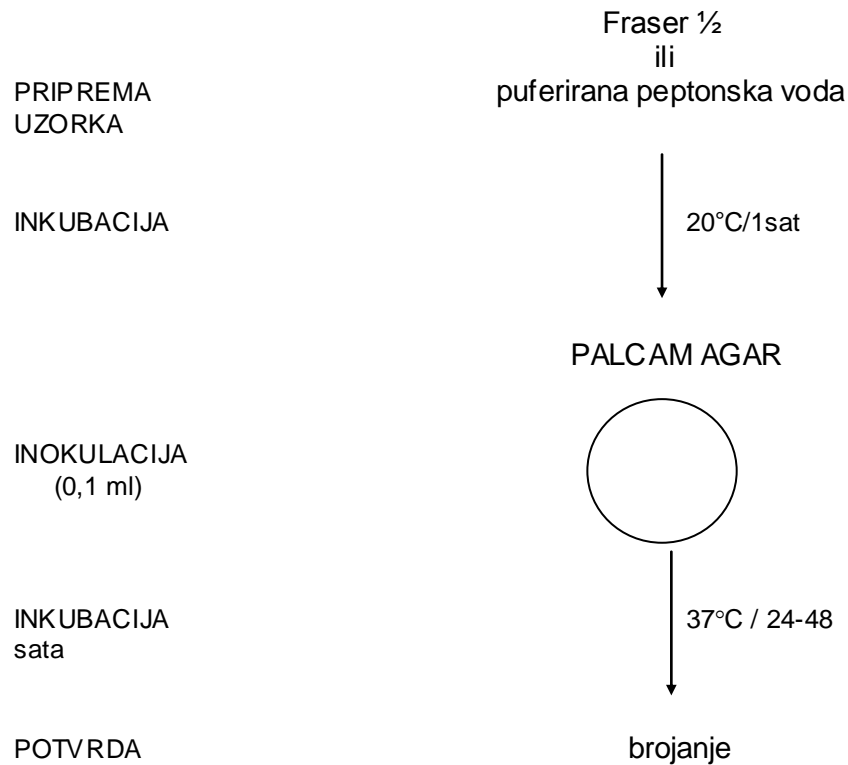
Za *Listeria monocytogenes*: Hemoliza (+)

Gram preparat (pozitivni štapići)

Korištenje ugljikohidrata

Test pokretljivosti (pokretljive)

CAMP test:



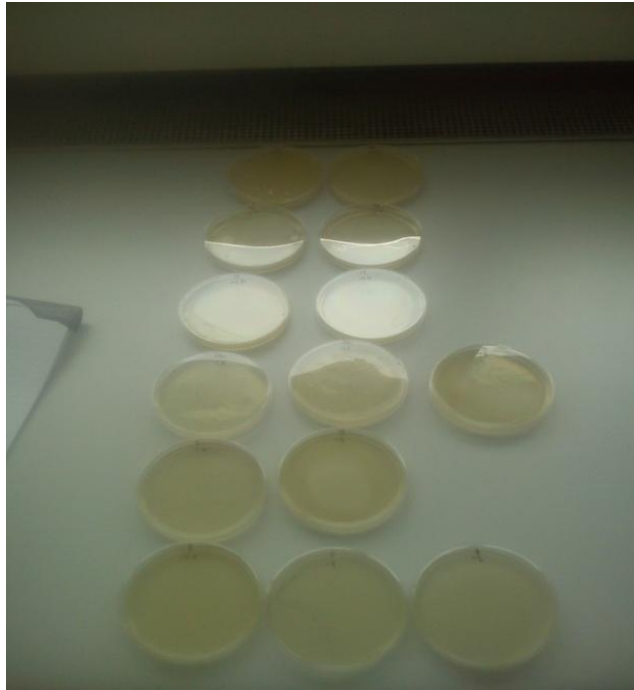
Slika 7. Shematski prikaz detekcije *Listeria monocytogenes*  
(Hrvatska norma, 1. izdanje, 2008.)

### 3.2.17. Petrifilm *Enterobacteriaceae*

Priprema početne otopine i decimalnih razrjeđenja: U sterilnu vrećicu odvagane se xg uzorka i zalije sa 9x ml sterilne peptonske otopine te se homogenizira. Ako je potrebno rade se serijska razrjeđenja.

Inokulacija i inkubacija: Pomoću sterilne pipete na sredinu Petrifilm-a se nanese 1 ml ispitnog uzorka. Uzorak se dispergira laganim pritiskom na centar aplikatora. Petrifilm se položi vodoravno u inkubator. Vrijeme i temperatura inkubacije ovise o referentnoj metodi.

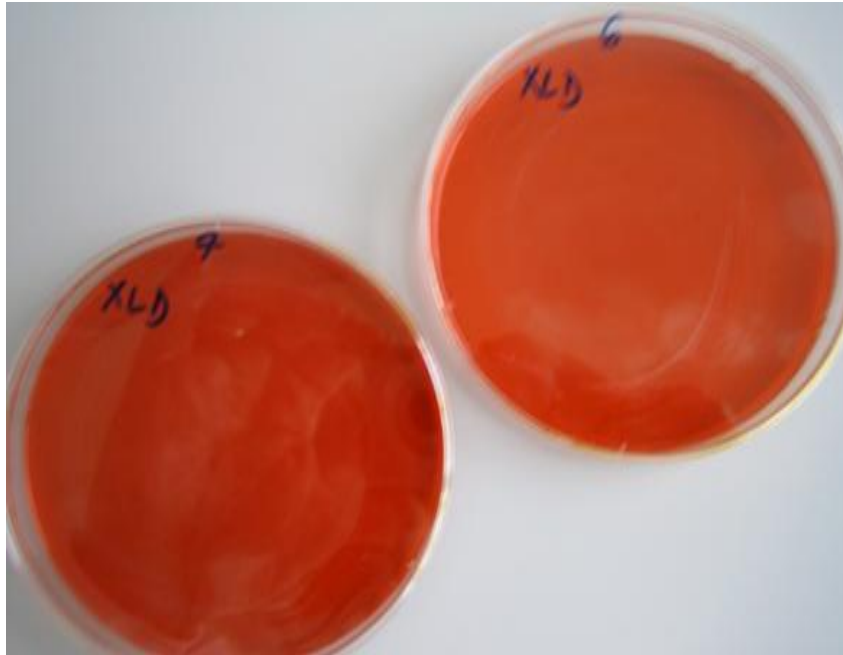
Identifikacija: Enterobakterije su crvene kolonije sa žutim osjenčenjem ili mjehurićima plina. (Interni dokument, Koestlin d.d., 9.4.2014.)



**Slika 8.** DG-18 Agar; čisti uzorci, (Izvor: Helena Švigir)



**Slika 9.** Petrifilm Enterobacteriae ; vanilin šećer-uzorak 5,  
(Izvor: Helena Švigir)



**Slika 10.** XLD Agar, sirutka u prahu-uzorak 6.,  
šećerni sirup-uzorak 7. (Izvor: Helena Švigir)

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Rezultati ispitivanja sirovina, poluproizvoda i gotovog proizvoda

**Tablica 5.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja brašna T-400 – uzorak 1  
i brašna T-850 – uzorak 2

Parametri	Rezultati		MDK
	Uzorak 1.	Uzorak 2.	
Aerobne mezofilne bakterije	1800 cfu/g	2 000 cfu/g	10 <sup>5</sup> cfu/g
Plijesni	20 cfu/g	100 cfu/g	10 <sup>4</sup> cfu/g
Enterobacteriaceae	0	0	10 <sup>4</sup> cfu/g

**Tablica 6.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećer kristala

Parametri	Rezultati cfu/g	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n. u 25 g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g

**Tablica 7.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja biljne masti

Parametri	Rezultati cfu/g	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>3</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n. u 25 g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g

**Tablica 8.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja biljne masti za kreme

Parametri	Rezultati cfu/g	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>3</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n. u 25 g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g

**Tablica 9.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja sirutke u prahu

Parametri	Rezultati cfu/g	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	250	10 <sup>3</sup> cfu/g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n u 25 g	n.n. u 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	n.n. u 25 g
Sulfitreducirajući klostridiji	0	10 <sup>1</sup> cfu/g
<i>S. aureus</i>	0	10 <sup>1</sup> cfu/g

**Tablica 10.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja kuhinjske soli

Parametri	Rezultati cfu/g	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	1 cfu/g
Plijesni	0	10 <sup>2</sup> cfu/g

**Tablica 11.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja arome

Parametri	Rezultat	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 cfu/g
Plijesni	0	≤ 1 cfu/g
Enterobacteriaceae	0	10 <sup>2</sup> cfu/g

**Tablica 12.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećera u prahu

Parametri	Rezultat	MDK
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>3</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n u 25 g

**Tablica 13.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja vanilin šećera

<b>Parametri</b>	<b>Rezultati</b>	<b>MDK</b>
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>3</sup> cfu/g
Kvasci i Plijesni	0	10 cfu/g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>S. aureus</i>	0	10 cfu/g

**Tablica 14.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećernog sirupa

<b>Parametri</b>	<b>Rezultati</b>	<b>MDK</b>
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>3</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n u 25 g

**Tablica 15.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja mrvica čajnog peciva

<b>Parametri</b>	<b>Rezultat</b>	<b>MDK</b>
Aerobne mezofilne bakterije	40	10 <sup>2</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n. u 25 g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>S. aureus</i>	0	10 cfu/g



**Tablica 16.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja kreme (punila)

<b>Parametri</b>	<b>Rezultati cfu/g</b>	<b>MDK</b>
Aerobne mezofilne bakterije	0	10 <sup>2</sup> cfu/g
Kvasci / Plijesni	0	10 cfu/g
<i>Salmonella</i>	n.n. u 25 g	n.n. u 25 g
Enterobacteriaceae	0	10 cfu/g
<i>S. aureus</i>	0	10 cfu/g

**Tablica 17.** Rezultati mikrobiološkog ispitivanja gotovog proizvoda

	<b>Aerobne mezofilne bakterije (10<sup>3</sup> cfu/g)</b>	<b>Kvasci i plijesni(10 cfu/g)</b>	<b>Enterobacteriae (10 cfu/g)</b>	<b><i>Salmonella</i>/25 g</b>	<b><i>S.aureus</i> (10 cfu/g)</b>
Uzorak 1.(L 051)	0	0	0	n.n. u 25 g	0
Uzorak 2.(L 052)	20	0	0	n.n. u 25 g	0
Uzorak 3.(L 053)	0	0	0	n.n. u 25 g	0

## **5. RASPRAVA**

Sigurna hrana je, u svom znanstvenom smislu, ona hrana koja nema negativnih učinaka na čovjekovo zdravlje. Konzumiranje zdravstveno neispravne hrane može dovesti do negativnih učinaka po zdravlje čovjeka neposredno nakon konzumacije, unutar nekoliko sati ili dana. Dokazi o autentičnosti proizvoda, kvaliteti i sigurnosti hrane i krmiva, osposobljenosti proizvođača u prehrambenoj industriji u cilju zaštite kupca, propisani su zakonskim odredbama usklađenim na nacionalnoj i Europskoj razini.

U suvremenim svjetskim konditorskim industrijama kontrole proizvoda provode se svakodnevno u samoj proizvodnoj liniji, dok se službene kontrole proizvoda provode "nasumično" na polici trgovina.

U Republici Hrvatskoj mikrobiološki kontaminanti u hrani regulirani su prema preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje, ožujak 2011) čija je provedba osigurana Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima (NN 81/13) i Uredbom (EC) 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

Za Paris punjeno čajno pecivo provedenim mikrobiološkim ispitivanjima uzoraka utvrđena je sukladnost s mikrobiološkim kriterijima i ispunjavanje zadanih parametara i kriterija.

Iz rezultata prikazanih u tablici 6, vidljivo je da u brašnima T-400 i T-850 nisu izolirane Enterobacteriaceae, ali su izolirane aerobne mezofilne bakterije (1800 cfu/g iz brašna T-400; 2000 cfu/g iz brašna T-850). Na DG -18 agaru izolirane su plijesni: 20cfu/g iz brašna T-400 i 100cfu/g iz brašna T-850. Ove dobivene vrijednosti u potpunosti zadovoljavaju sve propisane kriterije sigurnosti hrane. (Wang i suradnici, 2007.)

Na uzorcima biljne masti, biljne masti za kreme, kristal šećera, šećera u prahu, vanil šećera, kuhinjske soli, arome i kreme nije bilo rasta ni jednog traženog mikrobiološkog organizma.

Analiza sirutke u prahu pokazala je prisutnost samo aerobnih mezofilnih bakterija u iznosu 250 cfu/g što je ispod MDK( $10^3$ cfu/g), ali i odsustvo svi traženih patogenih mikroorganizama. (Baković, Tratnik, 1979.)

Mrvice čajnog peciva, od analiziranih mikrobioloških parametara, sadržavale su samo aerobne mezofilne bakterije (40cfu/g). To je zadovoljavajući rezultat, budući da mrvice kao

poluproizvod prolaze još nekoliko faza transporta i manipulacije prije nego dođu u gotov proizvod. Takav rezultat ukazuje na dobro provedene higijenske mjere, kako prostora i strojeva, tako i ruku radnika. (Petrović, 2014.).

Mikrobiološka analiza Paris punjenog čajnog peciva napravljena je na tri Lot-a; 051, 052, 053. Iz tablice 18 vidi se da su rezultati svih uzoraka bili u skladu s MDK. Na drugom uzorku L 052 izolirano je 20cfu/g aerobnih mezofilnih bakterija. Ovakav rezultat može se pripisati u samom tehnološkom procesu punjena, budući da su sve sirovine i poluproizvodi mikrobiološki zadovoljili na samom ulazu u proizvodnju, a imajući i na umu da su termički obrađeni u toku procesa. (Horvat, Koestlin d.d., 2011.)

Koestlin d.d. na liniji proizvodnje kontinuirano provodi ispitivanja mikrobiološke ispravnosti sirovina u proizvodnji Paris čajnog peciva ako i ostalih konditorskih proizvoda iz svog asortimana. Jednako tako, a s obzirom da uzročnici različitih oboljenja mogu biti i mikroorganizmi koji potječu iz primarne proizvodnje ili se javljaju u tijeku proizvodnje, pakiranja i transporta, Koestlin d.d. propisane higijenske i sanitarne mjere provodi također kontinuirano i prema zadanim planovima.

## **6. ZAKLJUČCI**

U ovom radu obrađena je kontrola mikrobioloških sirovina koje se koristi u proizvodnji čajnih keksa.

Rezultati kontrole mikrobioloških sirovina potrebnih za proizvodnju Paris punjenog čajnog peciva provedeni u ovom radu u Koestlin d.d. pokazali su sukladnost s propisima.

Na temelju provedenih mikrobioloških kontrola, sirovine i poluproizvodi za Paris punjeno čajno pecivo su:

1. u skladu s vrijednostima koje preporučuje Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3.izmijenjeno izdanje, ožujak 2011) čija je provedba osigurana Zakonom o higijenu hrane i mikrobiološkim kriterijima (NN 81/13),
2. na svim sirovinama i poluproizvodima nije izoliran ni jedan patogen mikroorganizam,
3. rezultati mikrobiološke analize gotovog proizvoda Paris punjeno čajno pecivo 300g (L 051; L052; L 053) bili su u skladu s preporučenim MDK vrijednostima.

S obzirom da su u mikrobiološkom kriteriju u ovom radu provedene kontrole Paris punjenog čajnog peciva i rezultati ispitivanja zadovoljavajući, može se zaključiti da je navedeno pecivo visoke kvalitete i u potpunosti zadovoljava sve propisane kriterije sigurnosti hrane. Time se Koestlin d.d. svrstava među vodeće europske konditorske industrije.

## **7. LITERATURA**

1. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2011): Plan ispitivanja mikrobiološke čistoće objekta (82000314), Koestlin d.d., 7.1.2011.
2. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2004.): Uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu Interni dokument (82000314), Koestlin d.d. 7.1.2011.)
3. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2014): Izolacija sulfitreducirajućih klostridija, Uputa o mikrobiološkoj analizi, Interni dokument (82000 303) Koestlin d.d., 9-04/2014
4. International standard ISO, First edition (2008.): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds, Part 1: Colony count technique in products with water activity greater then 0,95, International standard ISO 21527-1:2008, First edition, 1.7.2008.
5. Međunarodni standard ISO, Treće izdanje (2003.): Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama – Tehnika brojanja kolonija na 30°C, Međunarodni standard ISO 4833:2003, Treće izdanje, 1.2.2003.
6. Hrvatska norma HRN ISO, Prvo izdanje (2008.): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojanje *Enterobacteriaceae* - 1.dio, Hrvatska norma HRN ISO 21528-1:2004-1, Prvo izdanje, travanj 2008.
7. Hrvatska norma HRN, Prvo izdanje (2003.): Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella spp*, Hrvatska norma HRN EN ISO 6579:2003, Prvo izdanje, rujan 2003.
8. Hrvatska norma HRN, Prvo izdanje (2008.): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes*- 2.dio, Hrvatska norma HRN EN ISO 11290-2:1998/Amd1:2004; EN ISO 11290-2:1998/A1:2004, Prvo izdanje, travanj 2008.
9. Hrvatska norma HRN, Prvo izdanje (2004.): Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Vodoravni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -1.dio, Hrvatska norma HRN EN ISO 6881-1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6881-1:1999+A1:2003, Prvo izdanje, lipanj 2004.
10. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2014.): Petrifilm Enterobacteriaceae, Uputa o mikrobiološkoj analizi, Interni dokument, (8200303), Koestlin d.d., 9.4.2014.
11. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2011.): Plan ispitivanja mikrobiološke čistoće objekta (82000314), Koestlin d.d., 7.1.2011
12. Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013.): Uredba komisije (EZ) o mikrobiološkim kriterijima za hranu br.2073/2005,15.11.2005.



13. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2014.): Uputa za pripremu podloga, Interni dokument (82000317), Koestlin d.d., 5.4.2014.
14. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011.): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3.izmijenjeno izdanje), Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Ožujak 2011.
15. Petrović, M. (2014.): Promjene kvalitativnih svojstava čajnog peciva od pšeničnog brašna nakon skladištenja, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2014.
16. Baković, Tratnik (1979.): Mogućnost korištenja sirutke u prehrani, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb 1979.
17. Wang, Zhao, Jiang (2008.): Učinak hidrolizata glutena i njegovih frakcija dobivenih ultrafiltracijom na svojstva tijesta i kakvoću kruha, College of Light Industry and Food Science
18. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2014.): Mikrobiološke analize Paris punjenog čajnog peciva, Interni dokument Koestlin d.d., 1.3.2014.
19. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2012.): Sirovine za proizvodnju Paris punjenog čajnog peciva, Interni dokument (82000322), Koestlin d.d., 9.4.2012.
20. Koestlin d.d. Tvornica keksa i vafla (2000.): Proces proizvodnje čajnog peciva, Interni dokument (82000415), Koestlin d.d., 15.4.2000.
21. Koestlin (2004.): Koestlin proizvodi, Punjena čajna peciva, Paris original 300 g, <http://www.koestlin.hr/proizvodi/punjena-cajna-peciva/paris>, pristupljeno, 10.9.2015.
22. Centar za kontrolu namirnica (2011.): Mikrobiološka ispitivanja, <http://www.ckn.pbf.hr/mikrobioloska-ispitivanja.php>, pristupljeno, 21.9.2015.
23. Biram zdravlje (2003.): ZZJZDNZ, rječnik pojmova, [http://www.zzjzdnz.hr/hr/o\\_nama/rjecnik\\_pojmova](http://www.zzjzdnz.hr/hr/o_nama/rjecnik_pojmova), pristupljeno, 7.10.2015.

## **8. POPIS SLIKA I TABLICA**

Slika 1. Tehnološki proces proizvodnje punjenih čajnih peciva na liniji za punjenje HAAS .	13
Slika 2. Uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu (Interni dokument, Koestlin d.d. 07.1.2011.).....	17
Slika 3. Shematski prikaz određivanja aerobnih mezo filnih bakterija .....	23
Slika 4. Shematski prikaz određivanja K vasača / Plijesni .....	25
Slika 5. Shematski prikaz određivanja <i>Enterobacteriaceae</i> .....	27
Slika 6. Shematski prikaz određivanja <i>Salmonella spp</i> .....	29
Slika 7. Shematski prikaz detekcije <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
Slika 8. DG-18 Agar; čisti uzorci, (Izvor: Helena Švigir) .....	34
Slika 9. Petrifilm Enterobacteriae ; vanilin šećer-uzorak 5,.....	34
Slika 10. XLD Agar, sirutka u prahu-uzorak 6., .....	35
Tablica 1. Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za sirovine .....	9
Tablica 2. Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za poluproizvode .....	11
Tablica 3. Preporučeni mikrobiološki parametri i kriteriji za poluproizvode .....	14
Tablica 4. Preporučeni mikrobiološki parametri za kekse i proizvode srodne keksu .....	14
Tablica 7. Rezultati mikrobioloških ispitivanja brašna T-400 – uzorak 1 .....	37
Tablica 8. Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećer kristala .....	37
Tablica 9. Rezultati mikrobioloških ispitivanja biljne masti.....	37
Tablica 10. Rezultati mikrobioloških ispitivanja biljne masti za kreme .....	37
Tablica 11. Rezultati mikrobioloških ispitivanja sirutke u prahu .....	38
Tablica 12. Rezultati mikrobioloških ispitivanja kuhinjske soli .....	38
Tablica 13. Rezultati mikrobioloških ispitivanja arome .....	38
Tablica 14. Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećera u prahu .....	38
Tablica 15. Rezultati mikrobioloških ispitivanja vanilin šećera .....	39
Tablica 16. Rezultati mikrobioloških ispitivanja šećernog sirupa .....	39
Tablica 17. Rezultati mikrobioloških ispitivanja mrvica čajnog peciva .....	39
Tablica 18. Rezultati mikrobioloških ispitivanja kreme (punila).....	40
Tablica 19. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja gotovog proizvoda .....	40