

Utjecaj sinergije modificirane atmosfere i ambalažnih materijala na trajnost svježeg sira

Čondrić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:128:934604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



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 REPOZITORIJ

Veleučilište u Karlovcu

Stručni studij prehrambene tehnologije

Prerada mlijeka

IVANA ČONDRIĆ

**UTJECAJ SINERGIJE MODIFICIRANE ATMOSERE I
AMBALAŽNIH MATERIJALA NA TRAJNOST SVJEŽEG
SIRA**

ZAVRŠNI RAD

Karlovac, rujan 2017.

Veleučilište u Karlovcu

Stručni studij prehrambene tehnologije

Prerada mlijeka

IVANA ČONDRIĆ

**UTJECAJ SINERGIJE MODIFICIRANE ATMOSERE I
AMBALAŽNIH MATERIJALA NA TRAJNOST SVJEŽEG
SIRA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: Sandra Zavadlav, dipl. ing.

Matični broj studentice: 0314613090

Karlovac, rujan 2017.

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici Sandri Zavadlav, dipl. ing. na nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog rada. Hvala na poticajnim primjedbama, prijedlozima te dobrim namjerama.

Srdačno zahvaljujem cijelom kolektivu Dukat d.d. Tvornica Sirela, osobito mentorici na praksi Marijanki Pleskalt, dipl. ing. na savjetima i pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela. Također, hvala na stečenim znanjima i iskustvu koji su me pripremili za budući rad u prehrambenoj industriji.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri i prijateljima na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci.

Utjecaj sinergije modificirane atmosfere i ambalažnih materijala na trajnost svježeg sira

Sažetak

Svježi sir proizveden u industriji je proizvod dobiven od pasteriziranog mlijeka djelovanjem selekcioniranih mikrobnih kultura. Ne podvrgava se zrenju i ima kratak vijek trajanja. Cilj ovog rada bio je odrediti zajednički utjecaj pakiranja u modificiranoj atmosferi i različitih ambalažnih materijala (tri različite polimerne višeslojne folije) na mikrobiološku trajnost svježeg sira. Uzorci su istraživani na prisutnost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, te kvasaca i plijesni. Također, mjereni su pH vrijednost svježeg sira i volumni udio kisika u pakovini. pH vrijednost sireva tijekom vremena je stabilna, bez većih oscilacija s tendencijom blagog smanjenja bez obzira na vrstu korištene folije za pakiranje u modificiranoj atmosferi, dok volumni udio kisika u pakovini za redovnu foliju i foliju debljine 1200 μm raste, a za foliju debljine 1000 μm s barijerom se smanjuje za vrijeme skladištenja. Folija debljine 1000 μm s barijerom se pokazala kao najbolji ambalažni materijal za pakiranje industrijski proizvedenog svježeg sira u modificiranoj atmosferi, jer produljuje mikrobiološku trajnost sira na trideset dana.

Ključne riječi: ambalažni materijali, mikrobiološka kvaliteta, modificirana atmosfera, svježi sir

Synergistic effect of modified atmosphere and packaging materials on durability of fresh cheese

Summary

Fresh cheese produced in industry is a product obtained from pasteurized milk by the action of selected microbial cultures. It is not subject of ripening and has a short life span. The aim of this study was to determine the joint influence of packaging in a modified atmosphere and different packaging materials (three different polymer multilayer films) on the microbiological durability of fresh cheese. Samples were analyzed for the presence of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and yeasts and molds. Also, the pH value of fresh cheese and the volume of oxygen in the pack were measured. The pH of the cheese during the time is stable without major oscillations with a tendency of mild decrease, regardless of the type of packing used in the modified atmosphere, while the volume of oxygen in the pack for regular foil and the foil with a thickness of 1200 μm increases and for a foil thickness of 1000 μm with the barrier decreases during storage. The foil with a thickness of 1000 μm with the barrier has been shown to be the best packaging material for industrial-produced fresh cheese packed in a modified atmosphere, as it extends the microbiological durability of cheese for thirty days.

Key words: microbiological quality, modified atmosphere, fresh cheese, packaging materials

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Definicija sira i podjela sireva	2
2.2. Nutritivna i zdravstvena vrijednost sira.....	5
2.3. Nepoželjni mikroorganizmi u proizvodnji svježeg sira.....	6
2.4. Pakiranje u modificiranoj atmosferi	9
2.4.1. Plinovi koji se koriste za pakiranje u modificiranoj atmosferi.....	11
2.5. Ambalažni materijali	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Svježi sir.....	15
3.1.2. Hranjive podloge.....	15
3.1.3. Kemikalije.....	16
3.1.4. Aparatura i pribor.....	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Industrijska proizvodnja svježeg sira.....	17
3.2.2. Mikrobiološke metode.....	21
3.2.2.1. Priprema uzoraka sireva	21
3.2.2.2. Priprema 2%- tne otopine natrij citrata.....	22
3.2.2.3. Priprema fiziološke otopine.....	22
3.2.2.4. Priprava decimalnih razrjeđenja	22
3.2.2.5. Određivanje kvasaca i plijesni	22
3.2.2.6. Određivanje bakterija <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2.2.7. Određivanje bakterija <i>Escherichia coli</i>	23
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti sira	23
3.2.4. Određivanje volumnog udjela kisika u pakovini pomoću Oxybaby M+	24
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA	30
5.1. Mikrobiološka analiza svježeg sira.....	30
5.2. pH vrijednost svježeg sira.....	31
5.3. Volumni udio kisika u pakovini	32

6.	ZAKLJUČCI.....	33
7.	LITERATURA	35
8.	POPIS PRILOGA	42

1. UVOD

Svježi sir je proizvod dobiven zgrušavanjem pasteuriziranog mlijeka s mezofilnom kulturom bakterija mliječne kiseline i kimozinom. Ne podvrgava se zrenju, konzumira se svjež, nakon završenog ocjeđivanja gruš. Karakterističnog je srednje kiselog, osvježavajućeg okusa, bijele je boje i konzistencije koja se «lista» (Radošević i sur., 2007). Baš kao i polazna sirovina za proizvodnju sira, tj. mlijeko, sadrži niz nutritivnih sastojaka esencijalnih za ljudsko zdravlje. U početku je bio način konzerviranja mlijeka, odnosno proizvod koji čuva prehrambene vrijednosti mlijeka na dulji period.

Sirarstvo je prošlo dug put od spontane fermentacije mliječnog šećera u mješinama nomadskih plemena 7000 – 6000 godina prije Krista na području „plodnog polumjeseca“, smještenom između rijeka Eufrata i Tigrisa, do modernih sirana kakve poznajemo danas (Dalby, 2009; Havranek i sur., 2014). Iako je princip proizvodnje ostao isti, razvojem znanosti i tehnologije, ne samo da se uklanjaju pogreške koje mogu nastati prilikom fermentacije, nego se sve više pozornosti poklanja pakiranju sira, odnosno metodi pakiranja i vrsti korištenih ambalažnih materijala. Temeljni zahtjev pakiranja i ambalaže za hranu jeste očuvanje izvorne kvalitete i svježine hrane s naglaskom na zdravstvenu ispravnost (sigurnost hrane), odnosno da ju čuva od različitih kemijskih, mehaničkih, mikrobioloških utjecaja u cilju povećanja roka valjanosti (trajnosti) upakiranog sadržaja (Vujković i sur., 2007).

Prateći trend „povratka u prirodu“ i sve rigoroznije zahtjeve kupaca (pakiranja bez konzervanasa) sve se više kao metoda pakiranja koristi pakiranje u modificiranoj atmosferi (Gregurek, 2015; Vujković i sur., 2007). Pakiranje u modificiranoj atmosferi (MA) je tehnološki postupak u kojem se zamijeni atmosfera unutar ambalaže prehrambenog proizvoda odgovarajućom smjesom plinova, kako bi se produžila trajnost proizvoda. Za uspješnu primjenu ove tehnologije potrebno je postići optimalni sastav atmosfere u pakiranju, te odabrati odgovarajući ambalažni materijal (Lovrić, 2003).

Svrha ovog rada je procijeniti učinak sinergije načina pakiranja, tj. pakiranja u modificiranoj atmosferi i vrste ambalažnog materijala na duljinu mikrobiološke trajnosti svježeg sira proizvedenog u industrijskim uvjetima. Analiza uzoraka je rađena u Laboratoriju za kontrolu kvalitete Dukat d.d., Tvornice Sirela, sukladno Mikrobiološkim kriterijima za hranu Uredbe Komisije (EZ) br. 2073/2005, čija je provedba definirana Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija sira i podjela sireva

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09 i 141/13), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon zgrušavanja mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sireva dopuštena je uporaba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih enzima zgrušavanja i/ili dopuštenih kiselina za zgrušavanje.

Sir se definira i kao fermentiran ili nefermentiran proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka, obranog mlijeka ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina te otjecanjem sirutke, uz dodatak sirila ili nekoga drugog zamjenskog enzima zgrušavanja (Havranek i sur. 2014.)

Sama riječ sir u svjetskim jezicima svoje porijeklo ima u grčkom *formos* ili latinskom *caseus*. *Formoi* je naziv košare načinjene od rogoza (koja je i danas u uporabi) u kojoj se cijedio sir koji je poprimio oblik košare. Tako grčko podrijetlo riječi sir nalazimo u francuskom jeziku *formage*, talijanskom *formaggio* i španjolskom *formaje*. Kao posljedicu rimskih osvajanja imamo širenje latinskog izvora riječi sir: u nizozemskom *kaas*, portugalskom *queijo*, engleskom *cheese* i njemačkom *käse* (Matijević, 2015).

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sira (NN 20/09, 141/13) sirevi se mogu podijeliti obzirom na udio vode koji sadrže (tablica 1) te s obzirom na udio mliječne masti (tablica 2).

Tablica 1. Naziv sira obzirom na udio vode u bezmasnoj suhoj tvari sira (Pravilnik o sirevima i proizvodima od sira, 2013).

NAZIV SIRA	UDIO VODE U BEZMASNOJ SUHOJ TVARI SIRA (%)
ekstratvrđi	<51
tvrdi	49-56
polutvrđi	54-69
meki	>67
svježi	69-85

*ne odnosi se na svježe sireve proizvedene od vrhnja

Tablica 2. Naziv sira s obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari sira (Pravilnik o sirevima i proizvodima od sira, 2013)

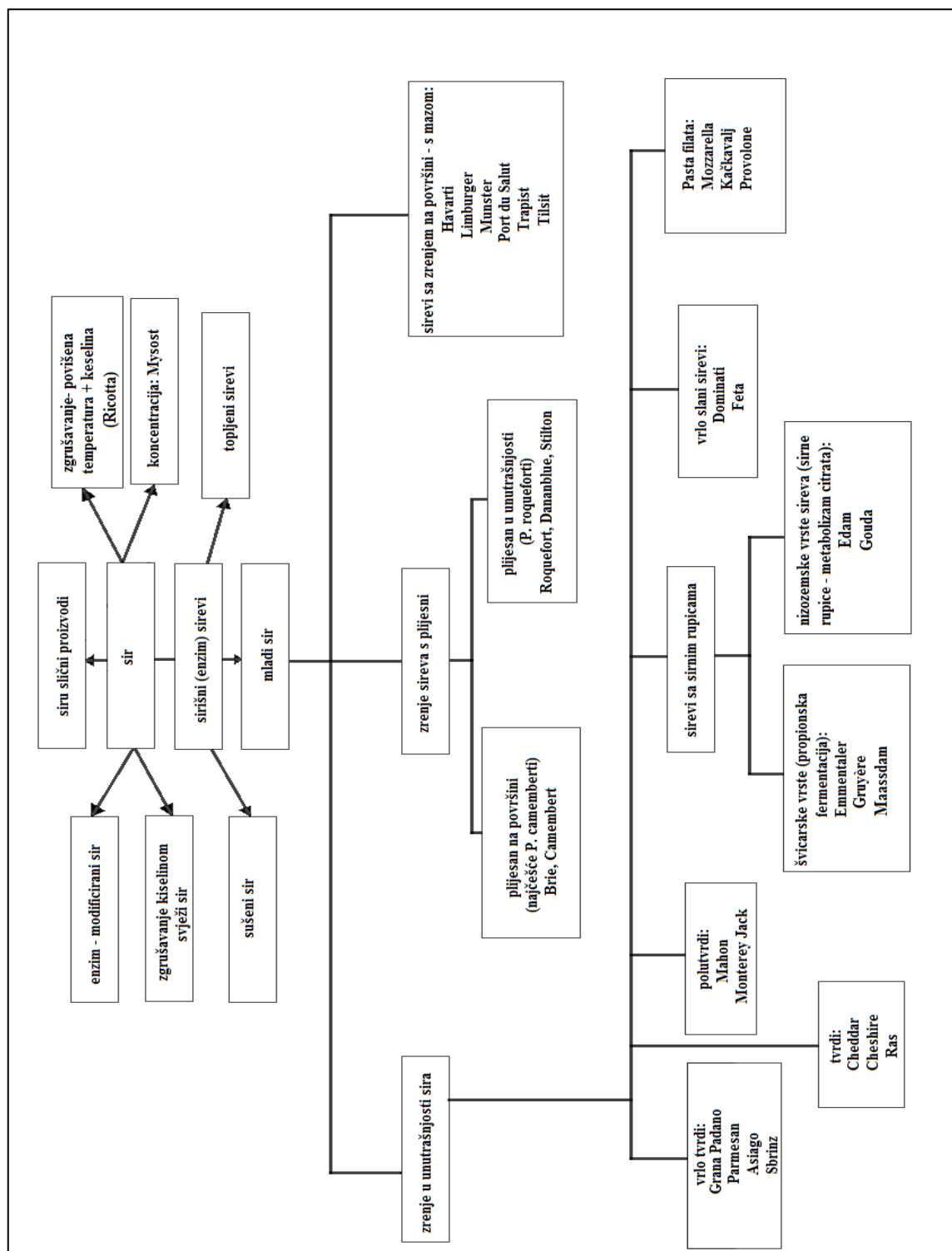
NAZIV SIRA	UDIO MLIJEČNE MASTI U SUHOJ TVARI (%)
ekstramasni	≥ 60
punomasni	≥ 45 i < 60
masni	≥ 25 i < 45
polumasni	≥ 10 i < 25
posni	< 10

Osim ove klasifikacije sira postoje i podjele prema drugim skupnim svojstvima:

- prema vrsti proteina (kazeinski ili albuminski te mješoviti),
- prema vrsti mlijeka (kravlji, ovčji, kozji, bivolji i/ili njihovih mješavina),
- prema načinu grušanja (kisel, slatki, mješoviti),
- prema sličnom procesu proizvodnje (npr. gouda i edamac; sirevi u salamuri; sirevi parenog tijesta; sirevi s “mazom”; sirevi s plemenitim plijesnima; svježi sirevi; sirni namazi; topljeni sirevi za mazanje ili rezanje; svježi sirevi od sirutke- albuminski),
- prema načinu zrenja (svježi sirevi, bez zrenja; sirevi sa zrenjem u zrionici ili salamuri; sirevi sa zrenjem sirne grude, tzv. čedarizacija ili/i zrenje u zrionici ili zamotani u posebne folije),
- prema području ili mjestu proizvodnje (izvorno podrijetlo) pa se navode kao vrste tradicijskih sireva, koji se više manje proizvode prema autohtonoj tehnologiji (Tratnik 2012).

Na slici 1 prikazana je najlogičnija klasifikacija sireva na osnovi metode zgrušavanja mlijeka (sirilo/enzim, zgrušavanje kiselinom, kombinirano zgrušavanje povišenom temperaturom i kiselinom). Potom se tako dobivene glavne skupine dijele na podskupine na osnovu tehnoloških parametara. U ovoj su shemi sirišni/enzimski sirevi (oko 75% svih vrsta sireva) podijeljeni u 10 razmjerno ujednačenih skupina (vrlo tvrdi, tvrdi i polutvrđi sirevi,

švicarske i nizozemske vrste sireva, sirevi koji zriju u salamuri, Pasta filata vrste, sirevi s plijesnima na površini, plavi sirevi i sirevi s mazom na površini).



Slika 1. Klasifikacija sireva i siru sličnih proizvoda u osnovne skupine na bazi načina zgrušavanja mlijeka i zatim klasificiranje na podskupine na bazi tehnoloških parametara ili karakteristika zrenja (Gregurek, 2015.)

2.2. Nutritivna i zdravstvena vrijednost sira

U pravilnoj prehrani, siru pripada posebno mjesto zbog njegovih nutritivnih svojstava. Osim što je koncentrat proteina visoke biološke vrijednosti, dobar je izvor vitamina topljivih u mastima (A, D, E, K) i važan izvor riboflavina, iako količina vitamina B skupine u siru može varirati. Sir je bogat izvor mineralnih tvari, osobito kalcija i fosfora (Jerónimo i Malcata, 2015). Treba istaknuti da 100 grama tvrdog sira (parmezana ili ementalera) može 100% zadovoljiti dnevnu potrebu kalcija u organizmu odrasle osobe, te 40 do 50% fosfora (Tratnik i Božanić, 2012).

Nutritivna vrijednost sira ovisi o karakteristikama samoga mlijeka od kojega se isti proizvodi i uvjetima proizvodnje sira. Kao rezultat te sprege dobijemo jedinstvenu nutritivnu vrijednost za svaku vrstu sira.

Smatra se da je konzumiranje 50 do 100 grama svježeg sira poželjna prehrambena norma. Tako se unosom 100 grama svježeg sira može osigurati 30 do 40% proteina dnevno potrebnih u prehrani odraslog čovjeka, a unosom 100 grama tvrdog sira oko 40 do 50% (Tratnik i Božanić, 2012).

Energetska vrijednost pojedinih vrsta sireva sira razlikuje (ovisno o udjelu mliječne masti u siru) i može biti od 100 kcal u 100 grama svježeg sira do 450 kcal u 100 grama tvrdog sira (Havranek i sur., 2014).

Osim navedene hranjive vrijednosti sira, potrebno je istaknuti i njegov značaj u smanjenju rizika od zubnog karijesa. Povećano lučenje sline, osobito kada se jede tvrdi sir, ima puferski efekt i neutralizira kiseline koje stvara plak. Velika količina kalcija i fosfora u siru (kalcij i anorganski fosfat u strukturi kazeina, a i Ca^{2+} iona koji su izravno vezani za kazein) reducira demineralizaciju i pospješuje remineralizaciju (Kasket i DePaola, 2002).

Zbog svega navedenog ne iznenađuje podatak da proizvodnja sira na svjetskoj razini iznosi nešto iznad 20 milijuna tona godišnje, od čega Europa i Sjeverna Amerika dominiraju sa udjelom višim od 70% (Bulletin FIL-IDF, 2013). U Hrvatskoj u posljednjih deset godina proizvodnja sira raste i tako je 2000. godine iznosila 19 229 tona i do 2005. porasla do 26 472 tone, a 2011. ukupno je proizvedeno 30 138 tona sireva (HPA, 2012).

2.3. Nepoželjni mikroorganizmi u proizvodnji svježeg sira

Industrijska proizvodnja sira počiva na „radu“ selekcioniranih mikrobnih kultura, ali uvjeti koji to omogućuju su također pogodni za razvoj nepoželjnih kontaminanata. Za acidifikaciju mlijeka koriste se mezofilne starter kulture koje sadržavaju *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ili *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, uz *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Za aromu većine svježih sireva važno je stvaranje diacetila, acetala, laktata i aroma sastojaka (Gregurek, 2015).

Mikroorganizmi, koji su uzročnici kvarenja, svojim prisustvom u mlijeku i mliječnim proizvodima mijenjaju njihova primarna svojstva i osobine, a te promjene su uvjetovane vrstom i brojem mikrobnih uzročnika. Najčešće se te promjene odnose na samo jednu pogrešku okusa, mirisa, arome ili konzistencije mliječnog proizvoda. Međutim, u slučajevima većih mikrobnih kontaminacija, sve te pogreške mogu se dogoditi istovremeno (Samaržija i sur., 2007b). Sve to dovodi do umanjivanja kvalitete mliječnih proizvoda i do poskupljenja same proizvodnje, te može uzrokovati sporadičnu pojavu bolesti vezanih uz mlijeko i mliječne proizvode.

Stoga je osiguranje besprijekornih higijenskih prilika u proizvodnji i preradi mlijeka temeljni preduvjet dobivanja kvalitetnih i zdravstveno ispravnih mliječnih proizvoda (Božanić i sur., 2010).

Na temelju Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13) utvrđena su nadležna tijela i njihove zadaće, obveze subjekata u poslovanju s hranom, službene kontrole te su propisane upravne mjere i prekršajne odredbe za provedbu Mikrobioloških kriterija za hranu Uredbe Komisije (EZ) br. 2073/2005, koji ne dozvoljavaju prisustvo bakterije *Salmonella* spp., niti *Listeria monocytogenes* te propisuju dozvoljene granice koagulaza pozitivnih stafilocoka i *Eschericia coli*. U Mikrobiološkom laboratoriju Dukat d.d. Tvornica Sirela određivana je prisutnost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, te broj kvasaca i plijesni u svježem siru prema parametrima Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10, 153/11), odnosno sukladno preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) koji više nije na snazi.

Listeria monocytogenes je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, nesporogena, psihrotrofna bakterija. Ima sposobnost rasta na temperaturama od -0,1°C do 45°C (optimalna

je 37°C) u rasponu pH vrijednosti od 4,4 do 9,4 (optimalna je 7) i koncentraciji soli od 10% (D'amico, 2014; Cocolin i Rantsiou, 2016; Schoder, 2016).

Patogena je i za ljude i za životinje, te uzrokuje bolest listeriozu, koja je u ljudi rijetka bolest (čini 0,02% od hranom uzrokovanih bolesti), ali kada je klinički dijagnosticirana uzrokuje smrtnost u 25-30% slučajeva. Rizična skupina su stare osobe, trudnice, dojenčad i općenito osobe oslabljenog imuniteta, a fetus se može inficirati preko placente. Razdoblje od inkubacije do pojave bolesti traje između 1 do 70 dana. Vrijeme trajanja bolesti, kao i sami simptomi su različiti, od blagih sličnih virozi, do teških kada je posljedica meningitis, sepsa i bakteremija (Cocolin i Rantsiou, 2016; Schoder, 2016). Posljednja epidemija ove bolesti koja je povezana s mliječnim proizvodima zabilježena je u Austriji, Njemačkoj i Češkoj i rezultirala je s 34 klinička slučaja od kojih su 8 imali smrtni ishod. Izvor zaraze je bio tradicionalni austrijski sir zvan „Quargel“ (Schoder, 2016).

Salmonella spp. je gram-negativna, nesporigena i fakultativno anaerobna bakterija s flagelama raspoređenima uniformno po cijeloj površini stanice pomoću kojih se kreće (Dykes, 2016). Predstavnici roda *Salmonella* smatraju se patogenima i uzročnici su gastroenteritisa, septikemije i enteralne groznice. Probavni sustav mliječnih krava je glavni izvor zaraze salmoneloze (D'Amico, 2014). Prenosi se putem hrane (95% slučajeva) kao što su mlijeko i mliječni proizvodi, jaja, rakovi, školjke, mesni proizvodi te voda. Meso i mlijeko mogu se kontaminirati tijekom klanja, prerade i rukovanja, stoga postoji opasnost od nedovoljno pečenog mesa, nepasteriziranog mlijeka, sladoleda i sira (Markov i sur., 2009).

Meki sirevi i sirevi koje karakterizira niska kiselost podložniji su kontaminaciji *Salmonella spp.* bakterijama, a također visok postotak mliječne masti karakterističan za većinu sireva ih štiti. Naime, te bakterije mogu biti u mliječnoj masti što im omogućava preživljavanje i prolazak kroz želudac, a zatim ulaze u epitelne stanice sluznice crijeva i dolazi do infekcije domaćina (Havranek i sur., 2014). Adaptacija i stalna prisutnost *Salmonella spp.* bakterije u lancu proizvodnje hrane je rezultat njene sposobnosti da se pričvrsti i kolonizira površinu. Lako se prilagode na različite uvjete okoline, što im daje kompetitivnu prednost naspram drugih mikroorganizama i omogućava preživljavanje u različitim prehranbenim proizvodima i prehranbenim proizvodnim lancima (Löfström i sur., 2016).

Escherichia coli je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija čiji se sojevi obično nalaze u tlu i vodi, a također su dio i normalne flore probavnog trakta (D'Amico, 2014; Smith i Fratamico, 2016). Između patogene skupine bakterija koje mogu kontaminirati sir, osobito

patogenom za čovjeka smatra se *E. coli* 0157:H7 koja izaziva hemolitički uremični sindrom (HUS). Prirodan izvor ove patogene bakterije nije u potpunosti definiran, ali se čini da su to ipak muzne krave, koje ih u 2-6% slučajeva fecesom izlučuju u okoliš. Infektivna doza je vrlo niska i pretpostavlja se da je između 10 i 100 organizama dovoljno za nastanak teške bolesti koja može biti smrtonosna za djecu i starije, čiji su simptomi od blage dijareje do hemoralgičnih kolitisa, trajnih oštećenja bubrega, unutrašnjeg krvarenja i oštećenja mozga. Minimalna temperatura potrebna za rast *E. coli* 0157:H7 je 7°C, maksimalna 45°C (optimalna 37°C), a optimalna pH vrijednost između 6 i 7. Odlikuje se velikom otpornošću i brzim razmnožavanjem. Ne preživljava temperaturu pasterezacije mlijeka od 71,7°C/15s. Prema današnjim spoznajama, *E. coli* 0157:H7 ne može rasti u sirevima pH vrijednosti $\leq 5,4$ (Brown, 2011; D'Amico 2014; Havranek i sur. 2014; Smith i Fratamico, 2016). Prisutnost *E. coli* u vodi i hrani pouzdan je indikator fekalnog onečišćenja, tj. loše proizvođačke prakse. *Escherichia coli* kao najpoznatija bakterija ima široku primjenu u biološkim istraživanjima (Markov i sur., 2009).

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna, katalaza pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija koja raste na temperaturi od 7 - 48 °C (optimalna je 37 °C) i u uvjetima pH vrijednosti sredine između 4 - 10 (optimalna je između 6 - 7). U odnosu na sve druge bakterije, *S. aureus* podnosi najnižu količinu raspoložive vode (a_w minimum: 0,83 - 0,86) i vrlo visoke koncentracije soli (15 - 20 %). U siru može biti humanog i animalnog podrijetla (Samaržija i sur. 2007a; D'amico, 2014; Havranek i sur., 2014).

Ova patogena bakterija vrlo često kontaminira sirovo mlijeko jer je najčešći izolirani uzročnik subkliničkog i kliničkog mastitisa muznih životinja (30-40%). Tijekom proizvodnje i čuvanja sira može uzrokovati stvaranje enterotoksina odgovornih za nastanak bolesti kod ljudi (D'amico, 2014; Sabljak i sur. 2014). Konzumacijom kontaminiranog sira oni nepromijenjeni prolaze kroz želudac i crijeva, resorbiraju se u krvotok te uzrokuju mučninu, povraćanje, bolove u želucu i dijareju. Rjeđi simptomi su glavobolja i snižavanje krvnog tlaka, a intoksikacija nastaje unutar 30 minuta do 8 sati nakon konzumacije sira, dok sama bolest traje jedan dan (Samaržija i sur., 2007a).

Svježi sirevi mogu sadržavati *Staphylococcus aureus* jedino u slučaju neaktivne kulture i/ili niske koncentracije prirodne mikrobne populacije sirovog mlijeka, jer je sposobnost rasta bakterije u svježim sirevima inhibirana brzim stvaranjem mliječne kiseline i niske pH

vrijednosti sira (<5) kao posljedice (D'Amico, 2014; Havranek i sur., 2014; Samaržija i sur. 2007a).

Kvasci i plijesni su izolirani iz gotovog proizvoda iako ne preživljavaju pasterizaciju (Sobota Šalamon i sur. 2010). Izvor kontaminacije sira kvascima i plijesnima su zrak, podovi, zidovi, police, te sirarski pribor i oprema (Havranek i sur., 2014).

U proizvodima s niskim udjelom soli kao što su krem sir, svježi sir te sirevi u salamuri (nedovoljno koncentrirane salamure) kvasci predstavljaju važnu skupinu kontaminata. To su nepatogeni organizmi koji u siru mogu biti uzročnici pojave nepoželjnog okusa. Lipolitička aktivnost kvasaca može uzrokovati užegao, gorak okus, heterofermentativna priroda kvasca uvjetuje stvaranje alkohola koji u reakciji sa slobodnim masnim kiselinama uvjetuje okus po voću i CO₂ koji uzrokuje uske otvore ili male okrugle rupice u tijestu sira (Havranek i sur., 2014; Hui i sur., 2004).

Osim što uzrokuju vidljivu diskoloraciju kore sira, dugotrajnim rastom plijesni sir poprima ustajao, pljesniv okus i sposobne su stvarati različite mikotoksine. Većina njih je razmjerno nestabilna u siru pa se smatra dovoljnim ukloniti gornji dio sira da opasnost intoksikacije čovjeka mikotoksinima postane zanemariva. Dakle, osim za sireve koji zriju s plijesnima ili mazom na površini sira, kontaminacija sira kvascima i plijesnima je nepoželjna i smatra se pogreškom (Havranek i sur, 2014).

2.4. Pakiranje u modificiranoj atmosferi

Pakiranje u modificiranoj atmosferi (eng., Modified Atmosphere Packaging – MAP) datira još od daleke 1927. godine kada su nastojanja bila usmjerena na produljenje roka trajanja jabuka stavljajući ih u atmosferu sa reduciranim sadržajem kisika i povećanjem sadržaja ugljičnog dioksida (Goswami i Mangaraj, 2011). Ovaj princip predstavlja osnovu za navedeni tip pakiranja koji i danas predstavlja smjesu tih plinova, a moguća je prisutnost i drugih plinova, kao što je primjerice dušik, u različitim omjerima. Osim ovog načina pakiranja koristi se još i pakiranje u kontroliranoj atmosferi (eng., Controlled Atmosphere Packaging – CAP).

Osnovna razlika između kontrolirane i modificirane atmosfere je u tome da koncentracija plinova u modificiranoj atmosferi može biti mijenjana nakon zatvaranja.

To se dešava uslijed procesa disanja voća i povrća te blago propusne prirode ambalažnih materijala. Također, hrana može sadržavati mikroorganizme koji koriste kisik, a stvaraju CO₂ i vodenu paru. U kontroliranoj atmosferi koncentracija plina se ne mijenja tijekom skladištenja, a to se postiže korištenjem nepropusnih ambalažnih materijala kao što su staklo ili metali i na taj način se postiže kontrola atmosfere unutar namirnica (Muhadbegović i sur., 2015).

MAP može produljiti rok trajanja hrani na 25 do 30 dana (Farmer, 2013). Postavlja se pitanje kako ostvariti aktivnu modifikaciju. To je izvedivo na način da se vakuumira ambalažna jedinica i zamjeni atmosfera unutar ambalaže kombinacijom odabranih plinova ili da se dodaju tvari koje vežu kisik, ugljični dioksid, etilen ili vodenu paru. Svojstva plinova koji se koriste su sljedeća: nezapaljivi su, fungicidni, netoksični, i bez utjecaja na senzorska svojstva proizvoda. Također, moraju se lako raspršivati, biti pristupačni i jeftini. Ugljični dioksid je plin koji je najprikladniji za ovaj tip pakiranja. Međutim, zbog njegove topivosti u vodi i mastima koja može dovesti do kisele reakcije obično se koristi smjesa dušika i ugljičnog dioksida. Važno je i pravilno odabrati ambalažu. Bitno je da je ona nepropusna za plin i vodenu paru kako bi se unutar nje mogla zadržati modificirana atmosfera kroz dulji vremenski period. Također moraju biti i dobra mehanička svojstva poput otpornosti na bušenje, kidanje i istezanje uslijed težine (Vujković i sur., 2007).

Prednosti pakiranja namirnica u modificiranoj atmosferi:

- povećanje roka trajanja upakiranih proizvoda,
- povećanje efikasnosti proizvodnje i distribucije,
- dodavanje malo ili nimalo konzervansa dovodi do povećanja prodaje proizvoda koji zadovoljavaju sve strože zahtjeve potrošača za prirodnom i zdravom hranom,
- bolji, odnosno svježiji izgleda proizvoda,
- ova se ambalaža lakše otvara: „easy open“ (Goswami i Mangaraj, 2011; Muhadbegović i sur., 2015; Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2011)

Nedostaci pakiranja namirnica u modificiranoj atmosferi:

- različite vrste plinova i njihovi omjeri za različite tipove proizvoda,
- potreba za specijaliziranom i skupom opremom,
- potreba za edukacijom proizvodnog osoblja,
- potreba za kontrolom temperature,
- gubitak svih prednosti kada je pakiranje otvoreno od strane potrošača ili ako je oštećeno,
- MAP zahtjeva posebnu vrstu skladištenja, jer neka se pakiranja ne smiju slagati jedna na drugo što može stvoriti dodatne troškove (Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2011).

2.4.1. Plinovi koji se koriste za pakiranje u modificiranoj atmosferi

U normalnim uvjetima u zraku je 78.8% dušika, 20.96% kisika, 0.03% ugljičnog dioksida, a ostatak čine inertni plinovi. Ukoliko se promjeni sastav atmosfere oko hrane trajnost joj se može produljiti. Zamjena kisika je važna jer on pospješuje rast i razvoj mnogih mikroorganizama te izaziva oksidacijske reakcije sastojaka hrane, što rezultira promjena u teksturi, boji, okusu i nutritivnim vrijednostima hrane (Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2011).

Za uspješnu primjenu ove tehnologije potrebno je postići optimalan sastav atmosfere u pakiranju, tj. moraju se dobro poznavati svojstva i uloge zaštitnih plinova i svojstva pakirane hrane. Za hranu s niskim udjelom masti i visokom vlažnosti primarni zadatak MAP je sprečavanje mikrobiološke aktivnosti, dok je za hranu s visokim udjelom masti i niskim udjelom vode bitna zaštita od oksidacijskih promjena (Lovrić, 2003). Što manja količina kisika je poželjna za mnoge vrste hrane kako bi se spriječio rast aerobnih mikroorganizama i smanjila oksidacija.

Ugljični dioksid (CO₂) ima antibakterijsko djelovanje i koristi se u svrhu inhibicije mikroorganizama koja ovisi o vrsti mikroorganizama, koncentraciji CO₂, temperaturi atmosfere, periodu uporabe CO₂ i aktivnosti vode u hrani. Bakteriostatski efekt CO₂ se povećava sa smanjenjem temperature i optimalan je na temperaturama nižim od 5°C (Goswami i Mangaraj, 2011; Muhadbegović i sur, 2015; Rodriguez-Aguilera i Oliveira,

2011). Efikasno neutralizira rast mikroorganizama kao što su plijesni i većinu jednostavnih aerobnih bakterija (kada ga je najmanje 20% u smjesi plinova) dok njegova efikasnost otpada u sprečavanju rasta aerobnih bakterija. Koristi se prilikom pakiranja mesa i mesnih prerađevina jer je veoma efikasan u sprečavanju razvoja *Pseudomonasa* koji je najčešći uzročnik kvarenja ohlađenog mesa. Široko se primjenjuje kod pekarskih proizvoda i sireva da spriječi razmnožavanje plijesni, kod pakiranja ribe i morskih plodova gdje ima bakteriostatsku funkciju. Neki proizvodi od mesa i ribe pakirani u čistoj atmosferi CO₂ postaju kiseliji zato što se on lako rastvara u masti. CO₂ se rastvara u tečnoj hrani i reagira s vodom formirajući ugljičnu kiselinu koja smanjuje pH hrane čineći je kiselom (Muhadbegović i sur., 2015; Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2011).

Dušik (N₂) je inertni plin koji nema antibakterijsko djelovanje i njegov osnovni zadatak je istjerivanje kisika iz ambalaže i sprječavanje oksidacije u hrani s niskom aktivnosti vode (Goswami i Mangaraj, 2011). Ne rastvara se u vodi ili mastima, a zbog jeftine cijene je često korišteni plin za MAP. Dušik zamjenjuje CO₂ u ambalaži koja postaje lako kiselkasta, kao što su, na primjer krem sirevi. Sprječava ili znatno smanjuje mogućnost biološkog kvarenja hrane: razmnožavanje plijesni, bakterija i napadi insekata (Muhadbegović i sur., 2015).

Kisik (O₂) je nepoželjan u pakiranju jer potiče razvoj mikroflore, ima veliki oksidacijski potencijal koji uzrokuje neželjene kemijske promjene sastojaka hrane. Ipak, postoje slučajevi gdje je visok sadržaj kisika u atmosferi poželjan jer njegov sadržaj od 2.1% sprječava rast anaerobnih bakterija kao npr. *Clostridium botulinum* (pakiranje ribljih proizvoda). Kisik u pakiranju svježeg mesa pruža dodatnu svježju crvenu boju, ali je zato njegova trajnost lošija. Uz dobru higijenu i hlađenje u blizini točke smrzavanja trajnost proizvoda je prihvatljiva i uz uporabu kisika. Poželjnost kisika u MAP ovisi o kemijskom sastavu namirnice i funkcionalnih svojstava dodatnih kultura mikroorganizama kod fermentiranih proizvoda (Muhadbegović i sur., 2015).

Iako je njihova primjena još uvijek ograničena, drugi plinovi koji mogu biti pronađeni u MAP su: ugljični monoksid (CO), sumpor dioksid (SO₂), argon (Ar) i etanol (C₂H₅OH) (Rodriguez-Aguilera i Oliveira, 2011).

Za pakiranje svježeg sira se za MAP koristi smjesa dušika i ugljičnog dioksida. CO₂ u pakiranju ne bi smjelo biti više od 20 do 30% kako bi se izbjeglo povećanje kiselosti, promjene u konzistenciji sira i implozija pakovanja. Uspješnost MAP najviše ovisi o početnom stupnju kontaminacije i ako pretpostavimo da je ona niska, kao i nepropusnost

ambalaže, uspjeh pakiranja ovisit će o kisiku. Količina zaostalog kisika mora biti manja od 2%, a ukoliko se udio smanji na 1% postižu se zadovoljavajući rezultati skladištenja (Vujković i sur., 2007; Cunha i Fonseca, 2016).

2.5. Ambalažni materijali

Za uspješnu primjenu MAP potrebno je postići optimalni sastav atmosfere u pakiranju i održati ga prikladnim, u pravilu višeslojnim, polimernim ambalažnim materijalima: filmovi-folije (Lovrić, 2003).

Pod ambalažnim materijalima u općem smislu podrazumijevaju se osnovne sirovine za proizvodnju (drvo, metali, staklo, tekstilne sirovine, nemetali i druge sirovine), a pod ambalažnim materijalima u užem smislu materijali pripremljeni za neposrednu proizvodnju ambalaže (papir - papirna ambalaža, aluminijski limovi – metalna ambalaža: limenke, poklopci i sl.). Pod pojmom primarne ambalaže podrazumijevaju se posude različitog oblika i veličine, načinjene od ambalažnih materijala u užem smislu, u koje se pakira, transportira, skladišti i prodaje bilo koja roba ili namirnica (Vujković i sur., 2007).

Barijerni efekt je tip interakcija kojim se izražava intenzitet mogućeg prolaza tvari iz okoline (plinovi, vodena para, mikroorganizmi, zračenje) kroz ambalažni materijal u pakiranu hranu. Barijerna svojstva ambalaže imaju veliki utjecaj na održivost i kvalitetu proizvoda. Ukoliko su na primjer poznati podaci za propusnost kisika kroz polimerni materijal, moguće je pomoću sofisticiranih metoda za određivanje propusnosti materijala na plinove i vodenu paru, izračunati održivost proizvoda ako je poznata količina kisika koju proizvod može vezati bez posljedica na kvalitetu (Muhadbegović i sur., 2011).

Prilikom izbora ambalažnih materijala za pakiranje u modificiranoj atmosferi mora se uzeti u obzir sljedeće:

- vrstu ambalaže u odnosu na njenu krutost potrebnu za proizvod,
- njihova barijerna svojstva (na primjer propusnost za plin ili smjesu plinova koji su korišteni za MAP),
- propusnost za vodenu paru,
- njihova obradivost, čvrstoća, trajnost i čistoća,

- svojstva protiv zamagljivanja koja omogućavaju dobru vidljivost proizvoda,
- pouzdanost vara,
- otpornost na kemijsku razgradnju,
- kompaktnost ambalaže nakon zatvaranja,
- ne smiju biti toksični i trebaju biti kemijski inertni,
- sposobnost materijala da se na njima može tiskati,
- komercijalna prikladnost s ekonomskom izvedivosti.

Najčešće korišteni ambalažni materijali za MAP su plastični polimeri i to: EVOH, etilen/vinil-alkohol; PVC, poli (vinil-klorid); PVDC, poliviniliden klorid; PET, poli (etilen-tereftalat); PP, polipropilen; PE, polietilen; amorfni poliestar i najlon. LDPE, polietilen niske gustoće i PVC imaju takva svojstva propusnosti koja ih čine prikladnim za pakiranje proizvoda koji dišu, dok se PVDC i poliestar koriste za proizvode s niskom stopom respiracije. Obično ambalažni materijali s barijernim svojstvima nemaju dobra svojstva varenja pa se onda za pakiranje u modificiranoj atmosferi koriste višeslojni polimerni filmovi (Cunha i Fonseca, 2016; Goswami i Mangaraj, 2011; Robertson, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Svježi sir

Uzorci svježeg sira proizvedenih industrijski koji su korišteni u ovom ispitivanju uzeti su iz pogona Dukat d.d. Tvornica Sirela.

3.1.2. Hranjive podloge

Hranjiva podloga za određivanje broja bakterija *Staphylococcus aureus*

Baird Parker agar – selektivna podloga za određivanje stafilokoka sastava (g/L): pepton iz kazeina 10,0; ekstrakt govedine 5,0; ekstrakt kvasca 1,0; natrijev piruvat 10,0; glicin 12,0; litijev-klorid 5,0; agar 15,0. pH vrijednost podloge iznosi $7,2 \pm 0,2$. Sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta pa se podloga treba ohladiti na 50°C uz dodatak Rabbit plasma fiber supply.

Hranjiva podloga za određivanje broja bakterija *Escherichia coli*

TBX (tripton žučni X-glukuronid) agar - kromogena, selektivna podloga za brojenje, diferencijaciju i identifikaciju β -glukoronidaza pozitivne *E. coli* u hrani prema ISO 16649-2 (TBX Agar), sastava (g/L): tripton (pepton iz kazeina 20,0; žučne soli broj 3 1,5; agar 15,0; X-glukuronid 0,075. pH vrijednost podloge iznosi $7,2 \pm 0,2$, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.

Hranjiva podloga za određivanje broja kvasaca i plijesni

Oksitetraciklin kvasni agar s dodatkom glukoze (OGYE agar) – selektivna podloga za dokazivanje i određivanje broja živih stanica kvasaca i plijesni u svim vrstama materijala (namirnice, klinički uzorci i dr.) sastava (g/L): kvasni ekstrakt 5,0; D (+) glukoza 10,0; agar

15,0. Sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta pa se podloga treba ohladiti na 50°C uz dodatak oksitetraciklina 1mL/110 mL.

3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda
- natrijev klorid
- trinatrijev-dihidroksicitrat
- kalcijev klorid
- sirilo
- mezofilne starter kulture
- bioprofit
- dušik
- ugljični dioksid

3.1.4. Aparatura i pribor

- žlica
- Erlenmeyerova tikvica
- mikser
- menzura
- staklena zrnca
- vaga
- vortex
- digitalna vaga
- bunsenov plamenik
- autoklav
- čaša
- redovna folija
- folija debljine 1000 µm s barijerom
- folija debljine 1200 µm
- stakleni štapić

- epruvete
- termostat
- mikropipeta od 100 μL i 1000 μL
- štapić po drigalskom
- Petrijeva ploča
- pH- metar
- tarionik
- Oxybaby M+

3.2. Metode

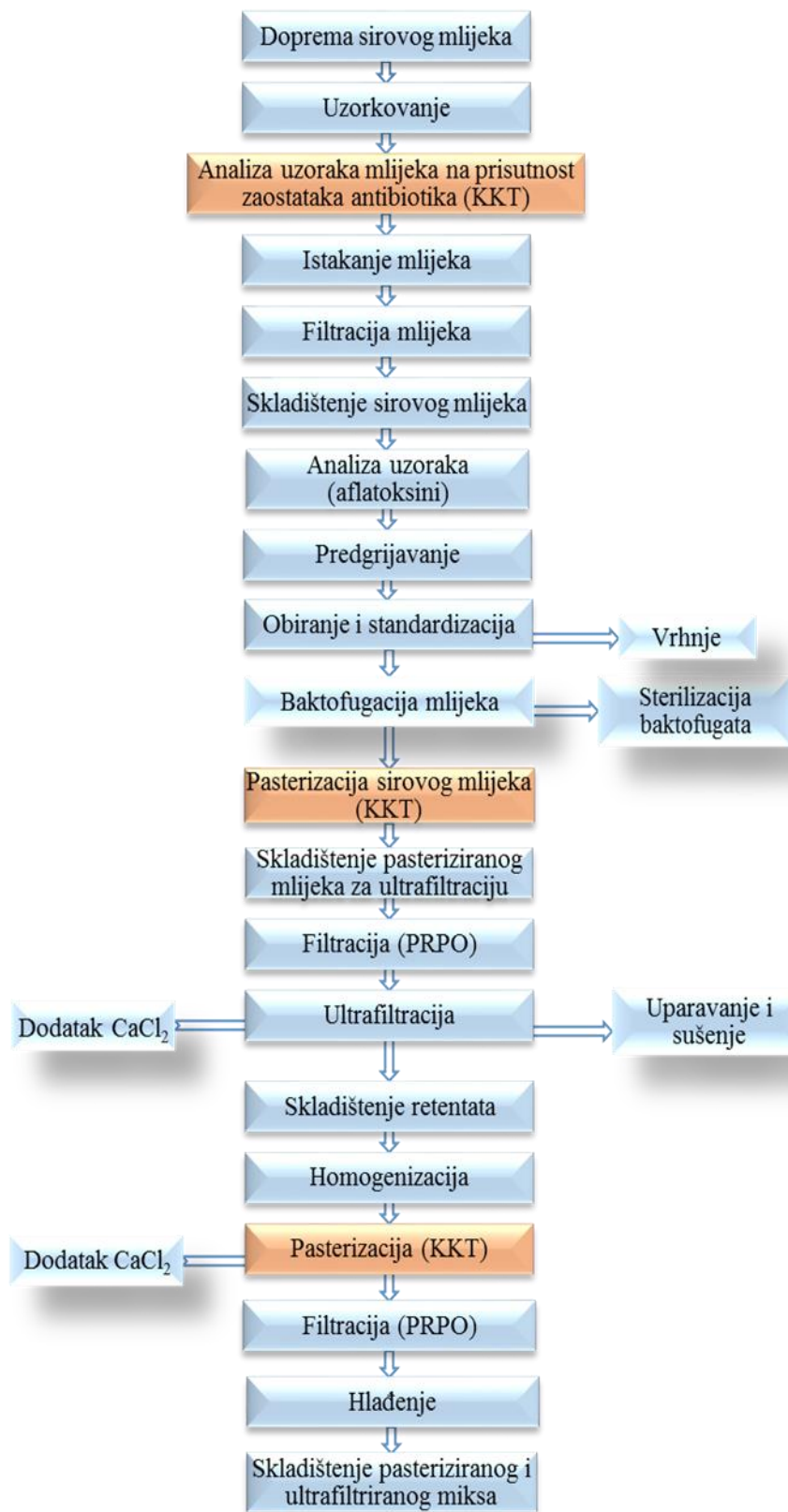
3.2.1. Industrijska proizvodnja svježeg sira

Svježi mekani sirevi imaju svoje specifičnosti u odnosu na druge vrste sireva i to su:

- visok sadržaj vode (do 80%, ali s različitim sadržajem masti),
- kratak vijek trajanja,
- proizvod je odmah nakon proizvodnje prikladan za konzumaciju (nema perioda zrenja),
- blago kiseli do miješani okus (ovisno o sadržaju masti),
- uporabu male količine sirila i nema prešanja gruš (Božanić, 2015; Robinson 1993).

Ovim specifičnostima je prilagođena je i industrijska proizvodnja svježeg sira te se sve više pozornosti poklanja i samom pakiranju kako bi se produljio rok trajanja.

U industrijskoj proizvodnji svježeg sira koriste se pasterizirano mlijeko (zdravstvena sigurnost) i selekcionirana mikrobna kultura (uniformnost karakteristika sira), dok je za tradicionalnu proizvodnju karakteristična uporaba termički neobrađenog mlijeka i korištenje prirodne i/ili autohtone mikrobne kulture, što su glavne razlike između ova dva načina proizvodnje sira (Samaržija i sur., 2006; Montel i sur., 2014).



Slika 2: Hodogram obrade i pripreme mlijeka za industrijsku proizvodnju sira

KKT je kritična kontrolna točka, tj. bilo koja točka ili procedura u određenom procesu prerade hrane gdje gubitak kontrole može rezultirati neprihvatljivim rizikom po zdravlje, a kritički limiti na KKT su vrijednosti koje razdvajaju prihvatljivo od neprihvatljivog i propisani su za svaku KKT ponaosob (Pravilnik o pravilima uspostave sustava i postupaka temeljenih na načelima HACCP sustava, NN 68/15).

PRPO su preduvjetni operativni programi (Prerequisite Programs), odnosno osnovni uvjeti i aktivnosti koji se moraju provoditi u prehrambenom lancu kao što su: održavanje higijene proizvodnje, prerade i okoliša. Smanjuju potencijalne rizike i osiguravaju da oni ne utječu na kvalitetu i sigurnost proizvedene hrane te moraju biti dokumentirani. Preduvjetni programi se moraju verificirati, a to znači potvrditi objektivnim dokazima da su utvrđeni zahtjevi ispunjeni i organizacije koje žele uvesti HACCP prvo moraju ispuniti zahtjeve preduvjetnih programa (ISO 22000).

Nakon što je mlijeko obrađeno i pripremljeno za proizvodnju svježeg sira ono se transportira putem cjevovoda do tanka. U tank se potom dodaju mezofilna kultura, bioprofit (promotor rasta) i tekuće sirilo. Fermentacija mlijeka se odvija pri temperaturi od 24 - 28°C, obično 10 - 18h do oblikovanja gruša pH 4,5 - 4,7, djelovanjem mezofilne kulture mliječnih bakterija (Sobota Šalamon i sur., 2010; Tratnik i Božanić, 2012).

Poslije fermentacije gruš se istjeruje iz tanka na trake „Alpma“ linije za cijedenje. Potom se sir skuplja u bazenima od inox-a i pakira strojem za pakiranje „Waldner“ u modificiranoj atmosferi. Kontrola pakovina je bitna stavka u procesu proizvodnje nakon čega slijedi hlađenje i skladištenje proizvoda.

Obrada i priprema mlijeka za proizvodnju svježeg sira prilikom industrijske proizvodnje prikazani su slikom 2.



Slika 3. Hodogram proizvodnje svježeg sira

3.2.2. Mikrobiološke metode

Mikrobiološke analize provedene su na 35 različitih uzoraka svježeg sira za tri različite vrste folija pri pakiranju u modificiranoj atmosferi uz mjerenje količine kisika u svakoj pakovini i to u dvije šarže sa dva puta po pet uzoraka i jednoj šarži sa tri puta po pet uzoraka. Za svaki pojedini mikroorganizam ispitivanje je provedeno u dvije paralele po svakom razrjeđenju nakon prvog i dvadesetčetvrtog dana hladnog čuvanja pri temperaturi od 4 - 8°C uz dodatno ispitivanje jedne šarže tridesetog dana čuvanja. Svim uzorcima izmjerena je kiselost i udio kisika (u pakovini).

Broj mikroorganizama u ispitivanim uzorcima svježeg sira određen je indirektnim brojanjem kolonija naraslih iz uzoraka nacijepljenih na hranjivu podlogu (Kochova metoda). Broj mikroorganizama utvrđen ovom metodom ne predstavlja pravi broj živih mikroorganizama u pojedinom uzorku svježeg sira, nego samo broj onih koji su se mogli razviti u vidljive kolonije pod uvjetima rasta koje nalažu u prvom redu sastav supstrata („agara“), temperatura i trajanje inkubacije. Tako dobivene vrijednosti označavaju se kao CFU vrijednost (Colony Forming Units). Određuje se broj živih bakterija, uz pretpostavku da se iz svake pojedine stanice na ili u čvrstom hranjivom supstratu u Petrijevim pločama razvila po jedna odvojena kolonija (Božanić i sur., 2010).

Mikrobiološka analiza uzoraka rađena je prema parametrima Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10), sukladno preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), odnosno određivani su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, te kvasci i plijesni.

3.2.2.1. Priprema uzoraka sireva

Usitnjavanjem 20 g svježeg sira u mikseru uz dodatak 180 mL 2%-tne otopine natrij citrata prethodno zagrijanog na 45°C (uz njegovo postupno dodavanje čime se postiže bolje emulgiranje) pripremljen je uzorak sira. Potom je sadržaj miksera kvantitativno prenesen u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zncima i prije pipetiranja snažno promućkan kako mi se što bolje homogenizirao. Tako se dobiva osnovno razrijeđenje (Božanić i sur., 2010; Sabadoš, 1996).

3.2.2.2. Priprema 2%-tne otopine natrij citrata

U 1000 mL destilirane vode otopljeno je 20 g trinatrijevog-dihidroksicitrata tako što je destilirana voda zagrijavana na 45-50°C te nakon toga dodano 20g soli. Nakon što je sva sol otopljena, pripremljena otopina je autoklavirana na 121°C tijekom 20 minuta (Božanić i sur., 2010).

3.2.2.3. Priprema fiziološke otopine

9 g natrijevog klorida otopljeno je u 1000 mL destilirane vode te otpipetirano po 9 mL u epruvete, začepljeno i atoklavirano na 121°C tijekom 20 minuta (Božanić i sur., 2010).

3.2.2.4. Priprema decimalnih razrjeđenja

1 mL prethodno pripremljenog i homogeniziranog uzorka sira prenese se sterilnom mikropipetom u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Nastalo razrjeđenje (10^{-1}) je dobro homogenizirano te je iz te epruvete 1 mL prenesen u drugu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine pri čemu je dobiveno 10^{-2} razrjeđenje polaznog uzorka. Postupak se ponavljao dok se nije dobio željeni broj decimalnih razrjeđenja (Božanić i sur., 2010).

3.2.2.5. Određivanje kvasaca i plijesni

1mL uzorka se mikropipetom prenese u sterilne Petrijeve zdjelice i prelije s 10 mL sterilnog rastopljenog OGYE agara (ohlađenog na približno 50°C) s dodatkom oksitetraciklina te se kružnim pokretima dobro izmiješa i ostavi na sobnoj temperaturi da se ohladi. Inkubacija se provodila 120 sati (5 dana) pri 25°C. Kolonije kvasaca su krem do bijele boje, a plijesni su nitaste kolonije različitih boja.

3.2.2.6. Određivanje bakterija *Staphylococcus aureus*

Mikropipetom je uzeto 1mL uzorka prvog razrijeđenja te dobro razmazano po već (prema proizvođačkim specifikacijama pripremljenoj) Baird Parker agar podlozi s dodatkom Rabbit plasma fiber supply u Petrijevoj zdjelici. Test je pozitivan ako su 24 sata nakon inkubacije na 37°C prisutne bijele, sive ili crne kolonije s prozirnom zonom oko poraslih kolonija.

3.2.2.7. Određivanje bakterija *Escherichia coli*

1 mL pripremljenog uzorka razrjeđenja 10^{-1} uzeto je mikropipetom te jednolično raspoređeno u Petrijevu zdjelicu sa unaprijed pripremljenom TBX agar podlogom. Bakterijska vrsta *Escherichia coli* raste kao plavo-zelene kolonije na TBX agaru nakon 24 sata pri temperaturi inkubacije od 37°C.

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti sira

Mjerenje pH vrijednosti sira provedeno je pH-metrom koji se prije uporabe baždario uranjanjem u otopine poznate pH vrijednosti. Uzorak sira je prethodno pomiješan s destiliranom vodom u omjeru 3:10, tj. 9 g sira je u tarioniku pomiješano s 30mL destilirane vode i kvantitativno preneseno u čašu.

U ovako pripremljen uzorak uroni se elektroda pH-metra i na ekranu mjernog instrumenta očita se pH vrijednost. Nakon svakog mjerenja elektrode se pažljivo operu vodom, a potom isperu destiliranom vodom kako na njima ne bi zaostao masni sloj (Božanić i sur., 2010; Sabadoš, 1996).

3.2.4. Određivanje volumnog udjela kisika u pakovini pomoću Oxybaby M+

Princip određivanja volumnog udjela kisika (O_2) pomoću uređaja Oxybaby M+ temelji se na selektivnoj apsorpciji pojedinih sastojaka u odgovarajućim apsorpcijskim sredstvima, tj., mjeri se na principu redoks reakcije u elektrokemijskoj ćeliji. Uzorak plina iz pakovine s proizvodom uzme se pomoću pomoću igle instrumenta, s time da se dio površine pakovine za ubadanje igle pojača pripadajućom samoljepljivom plastificiranom trakom.

Sadržaj O_2 u usisnoj plinskoj mješavini stvara, u elektrokemijskoj ćeliji slab električni napon koji je razmjeran udjelu O_2 . Taj se napon mjeri i pretvara u oblik koncentracijske vrijednosti, koji se zatim prikazuje na zaslonu.

4. REZULTATI

Tablice 3, 4 i 5 su prikaz rezultata mikrobiološke analize uzoraka industrijski proizvedenog svježeg sira uz uporabu redovne folije, folije debljine 1000 µm s barijerom, te folije debljine 1200 µm kao ambalažnog materijala tijekom 24 i 30 (za foliju debljine 1000 µm s barijerom) dana čuvanja sira u hladnjaku. Pakiranje u modificiranoj atmosferi za sve uzorke je isto, tj. korišteni su plinovi N₂ i CO₂ u omjeru 70:30.

Tablica 6 prikazuje pH vrijednosti svih uzoraka industrijski proizvedenog svježeg sira nakon prvog, dvadesetčetvrtog i tridesetog dana hladnog čuvanja (za foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom).

U tablici 7 nalaze se volumni udjeli kisika u pakovini industrijski proizvedenog sira pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom, te foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže prvog, dvadesetčetvrtog i tridesetog dana čuvanja u hladnjaku.

Tablica 3. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju za izradu ambalaže (podebljano su označeni uzorci van granica preporuka Vodiča (2011)).

Redovna folija				
Mikroorganizam	Uzorak iz iste šarže	N (CFU/g)		Maksimalno dopušteno* (CFU/g)
		1. dan	24. dan	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	
	3.	<10	<10	
	4.	<10	<10	
	5.	<10	<10	
<i>Escherichia coli</i>	1.	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	
	3.	<10	<10	
	4.	<10	<10	
	5.	<10	<10	
Kvasci i plijesni	1.	<100	1300	Kvasci: 10 ³ Plijesni: 10 ²
	2.	<100	1200	
	3.	100	3500	
	4.	300	<100	
	5.	<100	<100	

*Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011)

Tablica 4. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 i 30 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom za izradu ambalaže

Folija debljine 1000 mikrometara s barijerom					
Mikroorganizam	Uzorak iz iste šarže	N (CFU/g)			Maksimalno dopušteno* (CFU/g)
		1. dan	24. dan	30. dan	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.	<10	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	<10	
	3.	<10	<10	<10	
	4.	<10	<10	<10	
	5.	<10	<10	<10	
<i>Escherichia coli</i>	1.	<10	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	<10	
	3.	<10	<10	<10	
	4.	<10	<10	<10	
	5.	<10	<10	<10	
Kvasci i plijesni	1.	<100	<100	<100	Kvasci: 10 ³ Plijesni: 10 ²
	2.	<100	<100	100 **	
	3.	<100	<100	<100	
	4.	<100	<100	<100	
	5.	<100	<100	<100	

*Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011)

**Plijesni

Tablica 5. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže (podebljano su označeni uzorci van granica preporuka Vodiča (2011))

Folija debljine 1200 mikrometara				
Mikroorganizam	Uzorak iz iste šarže	N (CFU/g)		Maksimalno dopušteno* (CFU/g)
		1. dan	24. dan	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	
	3.	<10	<10	
	4.	<10	<10	
	5.	<10	<10	
<i>Escherichia coli</i>	1.	<10	<10	10 ²
	2.	<10	<10	
	3.	<10	<10	
	4.	<10	<10	
	5.	<10	<10	
Kvasci i plijesni	1.	<100	2100	Kvasci: 10 ³ Plijesni: 10 ²
	2.	300	1900	
	3.	100	2800	
	4.	<100	1700	
	5.	<100	600	

*Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011)

Tablica 6. pH vrijednost industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 1., 24. i 30. dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom, te foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže

Redovna folija				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
pH	1.	4,47	4,39	/
	2.	4,47	4,41	/
	3.	4,46	4,38	/
	4.	4,48	4,40	/
	5.	4,47	4,37	/
Folija debljine 1000 mikrometara s barijerom				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
pH	1.	4,50	4,41	4,34
	2.	4,50	4,40	4,33
	3.	4,49	4,39	4,34
	4.	4,49	4,38	4,35
	5.	4,48	4,39	4,32
Folija debljine 1200 mikrometara				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
pH	1.	4,47	4,39	/
	2.	4,48	4,38	/
	3.	4,46	4,40	/
	4.	4,47	4,38	/
	5.	4,47	4,40	/

/ - nije provedena analiza

Tablica 7. Volumni udio kisika u pakovini industrijski proizvedenog sira pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom, te foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže 1., 24. i 30. dana čuvanja u hladnjaku

Redovna folija				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
O ₂ (%)	1.	1,1	4,5	/
	2.	1,4	3,2	/
	3.	2,2	7,1	/
	4.	1,0	4,1	/
	5.	1,4	4,8	/
Folija debljine 1000 mikrometara s barijerom				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
O ₂ (%)	1.	1,2	0,1	0,0
	2.	0,2	11,7	0,0
	3.	0,5	0,1	0,0
	4.	1,3	0,1	0,0
	5.	0,7	0,1	0,0
Folija debljine 1200 mikrometara				
	Uzorak iz iste šarže	1. dan	24. dan	30. dan
O ₂ (%)	1.	1,1	3,5	/
	2.	1,0	4,4	/
	3.	2,2	5,1	/
	4.	1,4	5,2	/
	5.	1,4	4,4	/

/ - nije provedena analiza

5. RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj sinergije pakiranja u modificiranoj atmosferi i vrste ambalažnog materijala na duljinu mikrobiološke trajnosti svježeg sira. Pakiranje je za sve tri različite vrste folija koje su korištene kao ambalažni materijal provedeno u modificiranoj atmosferi N₂ i CO₂ u istom omjeru, tj. 70:30.

5.1. Mikrobiološka analiza svježeg sira

Mikrobiološka analiza uzoraka rađena je prema parametrima Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10), sukladno preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), odnosno određivani su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, te kvasci i plijesni.

Broj bakterija *Staphylococcus aureus*, bez obzira na vrstu ambalažnog materijala korištenog za pakiranje, bio je ispod granica propisanim Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) u svim uzorcima svježeg sira na kojima je rađena mikrobiološka analiza, što je u skladu istraživanju mikrobiološke kakvoće svježeg sira proizvedenog u industriji (Desović, 2002). Analiza nije napravljena trideseti dan hladnog skladištenja za uzorke svježeg sira pakiranog pomoću redovne folije i folije debljine 1200 mikrometara, jer sir pakiran pomoću ovih ambalažnih materijala imao je uzorke koji su imali veći broj kvasaca i plijesni no što je to propisano.

Prema Vodiču (2011) broj bakterija *Escherichia coli* mora biti manji od 10² CFU/g , što je bio slučaj prvog, dvadesetčetvrtog i tridesetog dana (za foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom) uzorkovanja i ti rezultati su slični onima rađenim u drugom industrijskom pogonu (Desović, 2002). Prisutnost *E. coli* je pokazatelj fekalnog onečišćenja, odnosno nehigijene (Sabljak i sur., 2013) pa su ovi rezultati očekivani u skladu s dobrom provedbom higijene i dezinfekcije u tvornici.

Kvasaca i plijesni prvog dana provedene mikrobiološke analize kod svih uzoraka bilo je manje od granice propisane Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), odnosno uzorci pakirani pomoću sve tri folije su zadovoljavali mikrobiološke standarde kao što je slučaj što prati parametre istraživanja mikrobiološke čistoće svježeg sira proizvedenog industrijski (Desović, 2002).

Dvadesetčetvrti dan uzorkovanja svježeg sira pakiranog pomoću redovne folije tri od pet uzoraka nisu zadovoljavali uvjete propisane Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) pa stoga mikrobiološka analiza nije napravljena trideseti dan hladnog čuvanja.

Folija debljije 1000 mikrometara s barijerom u sprezi s pakiranjem u modificiranoj atmosferi pokazala se izvrsnom za inhibiranje rasta kvasaca i plijesni, te je njihov broj bio manji od granice propisane Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) dvadesetčetvrtog i tridesetog dana uzorkovanja, osim za jedan uzorak dvadesetčetvrtog dana čuvanja gdje je naraslo 100 plijesni što je najveća dozvoljena granica, ali to se može objasniti lošim varom na pakovini (volumni udio kisika je bio veliki samo za taj uzorak).

Kod svježeg sira pakiranog pomoću folije debljine 1200 mikrometara dvadesetčetvrti dan hladnog čuvanja četiri od pet uzoraka imali su veći broj kvasaca od dopuštenog te stoga analiza trideseti dan nije napravljena.

Iako se kvasci i plijesni nalaze u svježem mlijeku, kvarenje mliječnih proizvoda pomoću kvasaca i plijesni obično je rezultat postpasterizacijske kontaminacije, budući da su sveprisutni u tvornicama i prenose se putem zraka (D'Amico, 2014). Osim toga, optimalno rastu pri sniženoj pH vrijednosti kakvu ima svježi sir (Sabljak i sur., 2013).

5.2. pH vrijednost svježeg sira

Tijekom čuvanja sirevima je određivana pH vrijednost (tablica 6). Iz rezultata vidimo da je stabilna, bez većih oscilacija što je u skladu istraživanja koje su proveli Gammariello i sur. (2009) na industrijski proizvedenom svježem siru pakiranom u modificiranoj atmosferi. pH vrijednosti kretale su se u rasponu od 4,32 do 4,50, što su nešto niže vrijednosti od sireva uzorkovanih u ranije navedenom istraživanju, što se može objasniti drugom vrstom svježeg sira proizvedenog bez dodataka starter kultura.

Tendencija blagog smanjenja pH vrijednosti tijekom vremena bez obzira na vrstu korištene folije za pakiranje u modificiranoj atmosferi je rezultat toga što laktobacili nisu inhibirani djelovanjem CO₂ (Mannheim i Soffer, 1996).

Za uzorke svježeg sira pakiranog u redovnoj foliji i foliji debljine 1200 mikrometara mjerenje pH vrijednosti nije provedeno trideseti dan hladnog skladištenja, jer sir nije zadovoljavao mikrobiološke standarde dvadesetčetvrtog dana mjerenja.

5.3. Volumni udio kisika u pakovini

Volumni udio kisika mjeren je u pakovini industrijski proizvedenog sira pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom i foliju debljine 1200 mikrometara.

Tijekom hladnog skladištenja svježeg sira možemo zamijetiti slične rezultate kod sireva kod kojih su korištene redovna folija i folija debljine 1200 mikrometara, odnosno dolazi do porasta volumnog udjela kisika u pakovini dvadesetčetvrti dan skladištenja. To se dešava zbog propusnosti kisika ambalažnih materijala (Khoshgozaran i sur., 2012). Također, nema velike razlike u količini kisika prvog dana mjerenja za ove dvije folije. Trideseti dan mjerenja nisu izvršena, jer sir nije zadovoljavao mikrobiološke standarde.

Kod sira pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom prvi dan mjerenja se zamjećuju manje vrijednosti volumnog udjela kisika u pakovini u odnosu na one pakirane koristeći redovnu foliju i foliju debljine 1200 mikrometara i to nam govori o nepropusnosti ambalažnog materijala s barijerom. Od pet uzoraka kod njih tri je volumni udio kisika manji od 1%, a za ostala dva iznosi 1,20% i 1,30% što daje naslutiti da će se postići zadovoljavajući uvjeti skladištenja (Vujković i sur., 2007; Cunha i Fonseca, 2016). Dvadesetčetvrti dan skladištenja došlo je do smanjenja volumnog udjela kisika u pakovini kod 4 uzorka, dok je kod jednog zabilježeno veliko povećanje količine kisika što je vjerojatno posljedica oštećenja pakovine ili lošeg vara tako da taj rezultat možemo odbaciti. Posljednjeg tj. tridesetog dana mjerenja sav kisik u pakovinama svježeg sira je potrošen. Smanjenje volumnog udjela kisika tijekom čuvanja sireva vjerojatno je posljedica respiracije aerobne mikroflore te oksidativnih i enzimatskih reakcija koje uključuju kisik (Gammariello i sur., 2009; Khoshgozaran i sur., 2012).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju mikrobiološke i kemijske analize industrijski proizvedenog svježeg sira može se zaključiti sljedeće:

1. Svi zaprimljeni uzorci sireva su bili mikrobiološki ispravni prvi dan uzorkovanja, što ukazuje na veliku mikrobiološku čistoću industrijski proizvedenog svježeg sira. To ujedno govori i o dobroj proizvođačkoj praksi, odnosno pozornosti koja se posvećuje čišćenju i dezinfekciji samog postrojenja te higijeni radnika koji su i izravnom kontaktu s proizvodnom linijom.
2. Sama ambalaža je bila higijenski vrlo čista na što ukazuje visoka mikrobiološka čistoća svježeg sira, jer je gotov proizvod prije istraživanja bio određeno vrijeme ambalažiran.
3. Niti u jednom uzorku nije bilo bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* iznad granica propisanih Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011).
4. Od ukupno 35 analiziranih sireva 7 njih je bilo mikrobiološki neispravno.
5. pH vrijednost sireva je stabilna, bez većih oscilacija s tendencijom blagog smanjenja tijekom vremena bez obzira na vrstu korištene folije za pakiranje u modificiranoj atmosferi.
6. Redovna folija i folija debljine 1200 μm su propusne za kisik i slično se ponašaju što se očituje iz povećanja volumnog udjela kisika u pakovini tijekom vremena.
7. Tridesetog dana mjerenja sav kisik u pakovinama svježeg sira pakiranog pomoću folije debljine 1000 μm s barijerom je potrošen što ukazuje na njenu nepropusnost za kisik u odnosu na prethodne dvije folije. Samo smanjenje volumnog udjela kisika tijekom čuvanja sireva vjerojatno je posljedica respiracije aerobne mikroflore te oksidativnih i enzimatskih reakcija koje uključuju kisik.
8. Folija debljine 1000 μm s barijerom se pokazala kao najbolji ambalažni materijal za pakiranje industrijski proizvedenog svježeg sira u modificiranoj atmosferi, jer

sprečava prodor kisika iz okoline u pakovinu i time razvoj nepoželjnih mikroorganizama, što je u skladu s ranijim istraživanjima u kojima se navodi da ukoliko se volumni udio kisika smanji na 1% postižu se zadovoljavajući rezultati skladištenja.

9. Industrijski proizveden svježi sir pakiran u modificiranoj atmosferi pomoću folije debljine 1000 μm s barijerom mikrobiološki je ispravan i trideseti dan čuvanja.

7. LITERATURA

1. Almena-Alistel, M. Mietton, B. (2014) Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective, U: Donnelly, C.W. (ur.), *Cheese and Microbes*, ASM Press, USA, 39-71.
2. Anonymus (2017) OXYBABY® M+ O₂/CO₂ – mobile gas analyzer for quality control of modified atmosphere packaging (MAP), <http://www.oxybaby.com/oxybaby-m/>, pristupljeno 01.09.2017.
3. Božanić, R. (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi, U: Matijević, B., ur., *Sirarstvo u teoriji i praksi*, priručnik, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 47-59.
4. Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda*, priručnik, Plejada, Zagreb.
5. Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, Vol. 11, 259–274.
6. Bulletin of the International Dairy Federation (2013) *The World Dairy Situation*, No. 470.
7. Brown, A. (2011) *Understanding food: principles and preparation*, Wadsworth, USA.
8. Bylund, G. (2003) *Dairy processing handbook*, Tetra Pack Processing Systems AB, Lund, Sweden.
9. Cocolin, L.S., Rantsiou, K. (2016) Listeria: Detection, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 3, 556-560.
10. Cunha, L.M., Fonseca, S.C. (2016) Chilled Foods: Modified Atmosphere Packaging, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 2, 19-22.

11. Cutter, C.N. (2002) Microbial control by packaging: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.42, Iss. 2, 151-161.
12. D'Amico, D.J. (2014) Microbiological Quality and Safety Issues in Cheesemaking, U: Donnelly, C.W., ur., *Cheese and Microbes*, ASM Press, USA, 251-309.
13. Dalby, A. (2009) *Cheese: A Global History*, Reaktion Books Ltd., London.
14. Desović, N. (2002) *Svježi sir i mikrobiološka kontrola svježeg sira*. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno – biotehnološki fakultet.
15. Dykes, G.A. (2016) Salmonella: Detection U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 4., 689-694.
16. Farmer, N. (2013) *Trends in packaging of food, beverages and other fast-moving consumer goods (FMCG)*, Woodhead Publishing Limited, UK.
17. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. (2000) *Fundamentals of cheese science*, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
18. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. (2004) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1., General aspects, 3. izd, Academic Press, London, UK, 163–242.
19. Gammariello, D., Conte, A., Attanasio, M., Del Nobile, M.A. (2009) Effect of modified atmospheres on microbiological and sensorial properties of Apulian fresh cheeses, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3, 370-378.
20. Gregurek, Lj. (2015) *Proizvodnja sireva-teorija i praksa*, Probiotik d.o.o., Zagreb.
21. Goswami, T.K., Mangaraj, S. (2011) Advances in polymeric materials for modified atmosphere packaging (MAP), U: J.M., Lagarón, ur., *Multifunctional and*

Nanoreinforced Polymers for Food Packaging, Lagarón, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

22. Harbutt, J. (2000) *Svjetska enciklopedija sira*, Hrvatsko izdanje, Naklada Fran, Zagreb.
23. Hui, Y.H., Goddik, L. M., Hansen, A. S., Josepson, J., Nip, W., Stanfield, P. S., Toldra, F. (2004) *Handbook of food and beverage fermentation technology*, Routledge, USA.
24. Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014) *Sirarstvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
25. HPA (2012) *Kontrola kvalitete poljoprivrednih proizvoda*, Godišnji izvještaj.
26. Jerónimo, E., Malcata, F.X. (2016) Cheese: Composition and Health Effects, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 1, 741-747.
27. Kalit, S. (2015) Opće sirarstvo, U: Matijević, B., ur., *Sirarstvo u teoriji i praksi*, priručnik, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 29-45.
28. Kashket, S., DePaola, D. P. (2002) Cheese and the development and progression of dental caries, *Nutrition Review*, Vol. 60, No. 4, 97-103.
29. Khoshgozaran, S., Azizi, M.H., Bagheripoor-Fallah, N. (2012) Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review, *Dairy Science and Technology*, Vol. 92, Issue 1, 1–24.
30. Kindstedt, P.S. (2014): The Basics of Cheesemaking, U: Donnelly, C.W., ur., *Cheese and Microbes*, ASM Press, USA, 17-39.
31. Kirin, S. (2009) Bjelovarski domaći svježi meki sir, *Mljekarstvo*, 59 (2), 148-154.

32. Lee, H., Kim, K., Choi, K. H., Yoon, Y. (2015) Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* in natural and processed cheese in Korea, *Journal of Dairy Science*, Vol. 98, Iss.9, 5931–5945.
33. Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, Hinus, Zagreb.
34. Löfström, C., Hansen, T., Maurischaft, S., Malorny, B. (2016) Salmonella: Salmonellosis, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 4., 701-705.
35. Mannheim, C.H., Soffer, T. (1996) Shelf-life extension of Cottage cheese by modified atmosphere packaging, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, Vol. 29, No 8, 767-771.
36. Markov K., Frece J., Čvek D., Delaš F. (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo*, 59 (3), 225-231.
37. Marsh, K., Bugusu, B. (2007): Food Packaging-Roles, Materials and Environmental Issues, *Journal of Food and Science*, Vol. 72, No.3, 39-55.
38. Mastromatteo, M., Conte, A., Del Nobile, M.A. (2010) Combined Use of Modified Atmosphere Packaging and Natural Compounds for Food Preservation, *Food Engineering Reviews*, Vol. 2, Issue 1, 28-38.
39. Matijević, B. (2015) Sir kroz povijest, U: Matijević, B., ur., *Sirarstvo u teoriji i praksi*, priručnik, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 11-28.
40. Montel, M-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Dominique A. Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. (2014) Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota

- with associated benefits, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 177,136–154.
41. Muhadbegović, B., Juul, N.V., Jašić, M. (2015) *Ambalaža i pakiranje hrane*, OFF-SET, Tuzla, BiH.
42. Murcia, M.A., Martínez-Tomé, M., Nicolás, M.C., Vera, A.M. (2003) Extending the shelf-life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging, *Food Microbiology* 20, 671-679.
43. Pavičić, Ž. (2006) *Mlijeko od mužnje do stola*, Gospodarski list d.d., Zagreb.
44. *Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu*, Narodne novine, broj 74/08, 156/08, 89/10 i 153/11.
45. *Pravilnik o pravim uspostave sustava i postupaka temeljenih na načelima HACCP sustava*, Narodne novine, broj 68/15.
46. *Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva*, Narodne novine, broj 20/09 i 141/13.
47. Robinson, R.K. (1993) *Modern Dairy Technology Vol. 2: Advances in Milk Product*, Elsevier Applied Science, London and New York.
48. Radošević, V., Tonković, K., Gregurek, L.J., Kos, B., Šušković, J. (2007) Proizvodnja svježeg probiotičkog sira s dodatkom transglutaminaze, *Mljekarstvo*, 57 (1), 15-29.
49. Robertson, G.L. (2009) *Food Packaging and Shelf Life*, U: Robertson, G.L., ur., *Food Packaging and Shelf Life, A Practical Guide*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, 1-17.
50. Rodriguez-Aguilera, R., Oliveira, J.C. (2009) Review of Design Engineering Methods and Applications of Active and Modified Atmosphere Packaging Systems, *Food Engineering Reviews* 1(1):66–83.

51. Sabadoš, D. (1996) *Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda: II dopunjeno izdanje*, Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb.
52. Sabljak, V., Lisak-Jakopović, K., Barukčić, I., Pejaković, A., Božanić, R. (2014) Određivanje trajnosti svježeg sira, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, Vol. 8, No. 3-4, 115-122.
53. Samaržija, D., Antunac, N., Havranek, J., Pecina, M. (2006) Zaštita izvornosti sira, *Mljekarstvo*, Vol. 56, No. 1, 35-44.
54. Samaržija D., Damjenović S., Pogačić T. (2007a) *Staphylococcus aureus* u siru, *Mljekarstvo*, 57 (1), 31-48.
55. Samaržija D., Podoreški M., Sikota S., Skelin A., Pogačić T., (2007b) Mikroorganizmi- uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda, *Mljekarstvo*, 57 (4), 251-273.
56. Smith, J.L., Fratamico, P.M., (2016) *Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: Food Poisoning and health Effects, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 2, 539-544.
57. Schoder, D. (2016) *Listeria: Listeriosis*, U: Caballero, B., Finglas, P., M., Toldrá, P., ur., *Encyclopedia of Food and Health*, First Edition, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, Vol. 3, 561-566.
58. Singh, T.K., Cadwallader, K.R. (2008) *Cheese*, U: Chandan, R.C., ur., *Dairy Processing and Quality Assurance*, Wiley-Blackwell, USA, 273-309.
59. Sobota Šalamon, B., Božanić, R., Dobša, J. (2010) Analiza varijabli koje utječu na mikrobilošku kvalitetu u proizvodnji svježeg sira, *Mljekarstvo* Vol. 60, No. 4, 252-259.

60. Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
61. *Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu*, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011).
62. Vujković, I., Galić. K., Vereš, M. (2007) *Ambalaža za pakiranje namirnica*, Tectus, Zagreb.
63. *Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu*, Narodne novine, broj 81/2013.

8. POPIS PRILOGA

Slika 1. Klasifikacija sireva i siru sličnih proizvoda u osnovne skupine na bazi načina zgrušavanja mlijeka i zatim klasificiranje na podskupine na bazi tehnoloških parametara ili karakteristika zrenja (Gregurek, 2015.), str. 4

Slika 2. Hodogram obrade i pripreme mlijeka za industrijsku proizvodnju sira, str.18

Slika 3. Hodogram proizvodnje svježeg sira, str. 20

Tablica 1. Naziv sira obzirom na udio vode u bezmasnoj suhoj tvari sira (Pravilnik o sirevima i proizvodima od sira, 2013), str. 2

Tablica 2. Naziv sira s obzirom na udio mliječne u suhoj tvari sira (Pravilnik o sirevima i proizvodima od sira, 2013), str. 3

Tablica 3. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju za izradu ambalaže (podebljano su označeni uzorci van granica preporuka Vodiča (2011)), str. 25

Tablica 4. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 i 30 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom za izradu ambalaže, str. 26

Tablica 5. Broj mikroorganizama u uzorcima industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 24 dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže (podebljano su označeni uzorci van granica preporuka Vodiča (2011)), str. 27

Tablica 6: pH vrijednost industrijski proizvedenog svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja sira u hladnjaku 1., 24. i 30. dana pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom, te foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže, str 28

Tablica 7: Volumni udio kisika u pakovini industrijski proizvedenog sira pakiranog u modificiranoj atmosferi koristeći redovnu foliju, foliju debljine 1000 mikrometara s barijerom, te foliju debljine 1200 mikrometara za izradu ambalaže 1., 24. i 30. dana čuvanja u hladnjaku, str. 29