# Provjera ispravnosti označavanja svježih sireva proizvedenih od toplinski obrađenog mlijeka

**Lipovšćak, Maja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:547782

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

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

MAJA LIPOVŠĆAK

# PROVJERA ISPRAVNOSTI OZNAČAVANJA SVJEŽIH SIREVA PROIZVEDENIH OD TOPLINSKI OBRAĐENOG MLIJEKA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET
PROIZVODNJA I PRERADA MLIJEKA

MAJA LIPOVŠĆAK

# PROVJERA ISPRAVNOSTI OZNAČAVANJA SVJEŽIH SIREVA PROIZVEDENIH OD TOPLINSKI OBRAĐENOG MLIJEKA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Doc. dr. sc. Nataša Mikulec

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana

_____ s ocjenom _____

pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Neven Antunac_____
2. Doc. dr. sc. Nataša Mikulec _____
3. Doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit _____

**O MENTORU**

Dr. sc. Nataša Mikulec rođena je 14.05.1976. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu (I. Mećar) i srednju školu (Gornjogradska gimnazija). Diplomirala je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2000. g. Dobitnica je dekanove nagrade za rad naslova „Određivanje olova u mlijeku plamenom i elektrotermalnom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom“. Od 2001. g. zaposlena je kao stručni suradnik u Zavodu za mljekarstvo. Odlukom Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na 2. redovitoj sjednici u a.g. 2016./2017., održanoj 08.11.2016. izabrana je na radno mjesto docenta - rukovoditelj Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode. Tijekom rada na Agronomskom fakultetu aktivno je sudjelovala (i sudjeluje) na znanstvenim projektima MZOŠ RH, te na međunarodnom projektu SEE-ERA.NET Plus Joint Call. Doktorski rad (disertaciju) naslova „Promjene sadržaja topljivih peptida i aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira“ obranila je 14. lipnja 2010. Znanstveno se usavršavala na Institutu Ruđer Bošković od 2006.-2009. godine. U nastavnu djelatnost uključena je od 2004. u izvođenju vježbi na predmetima „Mlijeko i mliječni proizvodi“ te „Mljekarstvo“. Od 2007. kao suradnik uključena je u izvođenje vježbi na Bs studiju: „Mlijeko i mliječni proizvodi“, „Laboratorijska tehnologija“, „Prerada mlijeka na OPG“, te na Ms studiju: „Kemija i fizika mlijeka“, „Sirarstvo“ te „Biokemija i tehnologija zrenja sira“. Od 2013. imenovana je Rukovoditeljem Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode, akreditiranom prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025. Voditelj je VIP projekta „Inovativna tehnologija u kontroli mljekomata u cilju povećanja kvalitete i konkurentnosti proizvođača mlijeka“ Ministarstva poljoprivrede odobrenog za financiranje 2015.g. Aktivno je sudjelovala na VIP projektu Ministarstva poljoprivrede odobrenog za financiranje 2012.g. „Kontrola kvalitete sireva na tržištu u cilju povećanja konkurentnosti“ kao i u objavljivanju stručnih radova. Koautor je Priručnika o kontroli označavanja sireva na tržištu Republike Hrvatske. Član je: Hrvatske mljekarske udruge, radne skupine za međulaboratorijske usporedbe Hrvatske akreditacijske agencije te ekspert Hrvatske akreditacijske agencije za akreditacijsku shemu ispitni laboratoriji prema normi HRN EN ISO/IEC 17025 za područja T3, T11, P9 (mlijeko). Član je Upravnog odbora CROLAB-a u mandatu 2015.-2019. godina. Predsjednica je odbora HZN/TO 566 -Mlijeko i mliječni proizvodi. Aktivno se služi engleskim jezikom.

**ZAHVALE**

Ovim putem želim se zahvaliti svim zaposlenicima Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, a posebno dr. sc. Jasminki Špoljarić na prigodnoj tehničkoj i praktičnoj pomoći prilikom analize aktivnosti alkalne fosfataze. Također veliko hvala Dijani Plavljanić i Biljani Radeljević na nesebičnoj pomoći prilikom analiza i interpretacija rezultata. Isto tako ovim putem želim zahvaliti Ivi Horvat Kesić i Hrvoju Šandoru na stručnim smjernicama i uputama prilikom analitičkog djela ovog istraživanja. Najveću zahvalu dugujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nataši Mikulec uz čiji sam obim znanja, stručnosti i pedagoške taktičnosti nadopunila svoje akademsko obrazovanje te ga okrunila ovim radom u čijem je nastajanju bila od izuzetno velike pomoći.

Također bih željela izraziti i veliku zahvalnost mojim roditeljima, mami Slavici i tati, dr. sc. Bojanu Lipovšćaku čija me bezuvjetna ljubav formirala u osobu kakva sam danas i bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

**SAŽETAK**

Ulaskom Hrvatske u Europsku Uniju pojačane su kontrole ispravnosti svih prehrambenih proizvoda. Važnost ispravnosti deklaracije time je dodatno uvećana, ne samo kako bi proizvođač lakše plasirao svoj proizvod, već kako bi se spriječila obmana potrošača.

Cilj rada bio je provjeriti ispravnost označavanja svježih sireva s obzirom na toplinsku obradu mlijeka te utvrditi ispravnost pasterizacije mlijeka u proizvodnji svježih sireva. S obzirom da ova metoda do sada nije korištena za utvrđivanje ispravnosti pasterizacije u Republici Hrvatskoj, jedan od ciljeva je utvrditi i graničnu vrijednost alkalne fosfataze za svježe sireve proizvedene u RH. Analize sira obuhvatile su određivanje udjela mliječne masti u siru prema HRN EN ISO 1735:2008 i suhe tvari u siru prema referentnoj metodi HRN EN ISO 5534:2008. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze iz sira određivana je na instrumentu Fluorophos prema normi HRN EN ISO 11816-2:2016: „Mlijeko i mliječni proizvodi – Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze – 2. Dio: Fluorimetrijska metoda za sir“.

Dobiveni rezultati pokazali su kako niti industrijski proizvedeni sirevi a niti oni proizvedeni na OPG nemaju ispravne deklaracije. Kod industrijski proizvedenih sireva određenim uzorcima se udio masti u siru ne poklapa s kategorizacijom sira prema udjelu masti, odnosno deklarirani su kao polumasni dok je analizom udjela masti utvrđeno da pripadaju kategoriji posnih, odnosno masnih sireva. Kod sireva proizvedenih na OPG na jednom je uzorku, koji je deklariran kao sir proizveden od sirovog mlijeka, utvrđeno kako se radi o termiziranom mlijeku.

Sukladno dobivenim rezultatima možemo zaključiti kako su sustavne kontrole u skladu s Europskim, a i Hrvatskim normama, neophodne kako bi se pratilo označavanje proizvoda na tržištu, te smanjila obmana potrošača.

Ključne riječi: alkalna fosfataza, pasterizacija, označavanje sireva, svježi sir

**SUMMARY**

Since Croatia entered the EU, higher controls for all food products were established. The importance of properly labeled products is, by that, additionally increased, not only to enable manufacturers to sell their product with less effort, and also economically improve current situation in Croatia, but also to protect the customer from beeing deceived.

The aim of this research was to determine if cheeses are properly labeled considering heat treatment and also to determine correctness of milk pasteurization in fresh cheese production.

Considering that this method was not used in Croatia in order to determine correctness of milk pasteurization, one of the goals was also establishing border limits of alkaline phosphatase for fresh cheeses produced in Croatia.

Analytical methods included determination of fat content in cheese by using HRN EN ISO 1735:2008 method, and dry matter content by using HRN EN ISO 5534:2008 method.

Alkaline phosphatase activity in cheese was determined on Flurophos instrument by using HRN EN ISO 11816-2:2016 method "Milk and dairy products – determination of alkaline phosphatase activity – part 2. - Fluorimetric method for cheese."

Results indicated that both industrial and domestic cheeses have improper labels.

Certain samples of industrial cheeses that were labeled as medium fat, after fat content analysis, turned out to be fat or low fat cheese types. One of the domestic cheese samples that was labeled as cheese produced of raw milk was also improperly labeled due to the fact that it was produced out of thermised milk.

According to results we can conclude that controls conducted accordant to European and Croatian standards are required in order to keep track of correct product labeling and also protecting the customer from beeing decieved.

Key words : alkaline phosphatase , pasteurization, cheese labeling, fresh cheese

SADRŽAJ

Prilog 1 (O mentoru)

Prilog 2 (Povjerenstvo)

Prilog 3 (Zahvale)

Sažetak

1.Uvod.....1

1.1. Povijest i podjela sireva.....1

1.2. Sirarstvo u Hrvatskoj.....4

1.3. Proizvodnja svježih sireva.....8

1.4. Važnost označavanja proizvoda.....9

1.5. Važnost određivanja aktivnosti alkalne fosfataze.....11

2. Materijali i metode.....14

2.1. Priprema uzoraka sireva.....15

2.2. Mjerenje pH vrijednosti sira.....17

2.3. Određivanje suhe tvari.....18

2.4. Određivanje masti.....19

2.5. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze.....20

2.5.1. Priprema uzorka sira za određivanje aktivnosti ALP.....23

2.5.2. Kalibracija instrumenta Fluorophos i određivanje aktivnosti ALP.....25

3. Rezultati i rasprava.....27

3.1.Rezultati mjerenja pH vrijednosti sira.....28

3.2 Rezultati određivanja suhe tvari .....30

3.3. Rezultati određivanja masti u siru.....31

3.4. Rezultati određivanja aktivnosti alkalne fosfataze.....33

4. Zaključak.....37

5. Literatura.....38

6.Životopis autora.....41

# 1. UVOD

## 1.1. Povijest sirarstva i podjela sireva

Sir kao jedna od najvažnijih namirnica u današnjem svijetu, nastala je gotovo spontano kemijskom pretvorbom sastojaka mlijeka, pretpostavlja se još oko 8.000 g. pr. Kr. Tijekom povijesti bio je osnovna hrana i često jedini izvor proteina. Arheološka istraživanja prve zapise o siru proizvedenom od ovčjeg i kozjeg mlijeka povezuju s kolijevkom civilizacije, bogatom dolinom smještenom između dviju rijeka Eufrata i Tigrisa. Da sir ima dugotrajnu i neizostavnu ulogu u prehrani čovječanstva potvrđuju i biblijski navodi (Job 10,10, 1520. pr. Kr. i 1 Sam 17, 18; 2 Sam 17, 29, 1017. pr. Kr.), dok stvarni pisani povijesni tragovi o njegovoj proizvodnji potječu iz vremena Grčkoga i Rimskog Carstva (Havranek i sur., 2014). Proizvodnja sira kao jedan od najstarijih načina čuvanja mlijeka održao se dugi niz godina sve do današnjeg vremena, kada se uz primjenu moderne tehnologije njegova proizvodnja osim u malim domaćinstvima provodi i u velikim sirarskim pogonima. Proizvodnja sira u svijetu naglo je porasla krajem 19. stoljeća i od tada se neprestano povećava (Tratnik i Božanić, 2012). U posljednjih četrdeset godina proizvodnja sira povećala se s 5,9 milijuna tona na više od 20 milijuna tona (Bulletin FIL-IDF, 2012). Sir danas zauzima brojne police supermarketa, tržnica, sveprisutan je u svim oblicima i proizveden od različitih vrsta mlijeka.

Sir je fermentirani ili nefermentirani proizvod dobiven koagulacijom mlijeka, obranog mlijeka, djelomično obranog mlijeka, vrhnja, stepke ili kombinacijom navedenih sirovina, izdvajanjem sirutke, uz dodatak sirila ili nekog drugog koagulacijskog enzima (Havranek i sur., 2014). Proizvodnja sireva predstavlja važnu gospodarsku granu u prehrambenoj svjetskoj industriji. Točan broj svih vrsta sireva u svijetu teško je odrediti. Smatra se da postoji više od 2200 različitih vrsta, no ta brojka raste svakim danom. Nove vrste sireva proizvode se i danas, te se sir kao prehrambena namirnica prilagođava željama i potrebama potrošača. Sirevi se međusobno razlikuju po organoleptičkim osobinama, koje su posljedica različitih načina tehnološkog postupka proizvodnje, pa je podjela sireva u određene skupine otežana. Sirevi se najčešće dijele prema vrsti mlijeka od kojeg su proizvedeni, udjelu mliječne masti i konzistenciji sira, te tehnološkom postupku proizvodnje. Najveći broj sireva proizvodi se od kravljeg mlijeka, zatim ovčjeg i kozjeg mlijeka, te manje od bivoljeg odnosno mješavine različitih vrsta mlijeka.

Danas se većina sireva proizvodi od termički obrađenog mlijeka, dok samo neke zemlje poput Francuske, Njemačke i Švicarske dozvoljavaju proizvodnju pojedinih vrsta sireva isključivo od sirovog mlijeka (Kirin, 2016). Prema IDF-u oko 500.000 tona sireva u Europi je proizvedeno upravo od sirovog mlijeka (IDF Factsheet, 2016). Mikroorganizmi, kao i enzimi koji se nalaze u mlijeku odgovorni su za raznolikost okusa i varijanti tih proizvoda. Sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka su posebni po tome što predstavljaju tradiciju proizvodnje sireva zemlje u kojoj su proizvedeni.

Velika opasnost kod proizvodnje sireva krije se u patogenim bakterijama koje mogu biti prisutne u sirovom mlijeku, zato pojedini proizvođači odabiru pasterizaciju kao metodu suzbijanja opasnosti. Međutim, ukoliko se vrši kontrola proizvodnje, sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka ne predstavljaju zdravstvenu opasnost za potrošača. Način na koji se postiže sigurna proizvodnja sireva proizvedenih od sirovog mlijeka je provođenje visokih higijenskih standarda tijekom proizvodnje, koji podrazumijevaju poštivanje dobre higijenske prakse tijekom proizvodnje uz provedbu mikrobioloških kontrola (Havranek i sur., 2014).

Prema najstarijem načinu podjele sireva, odnosno konzistenciji sirnog tijesta ili udjelu suhe tvari sira, sirevi se dijele na ekstra tvrde, tvrde, polutvrde, meke i svježe (Tablica 1).

*Tablica 1. Naziv sira s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira*

| Naziv sira s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira | Udio vode u bezmasnoj tvari sira (%) |
|---|---|
| Ekstra tvrdi sir | < 51 |
| Tvrdi sir | 49-56 |
| Polutvrdi sir | 54-69 |
| Meki sir | >67 |
| Svježi sir* | 69-85 |

*ne odnosi se na svježe sireve proizvedene od vrhnja
*Izvor: Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/2009, 141/2013)*

Prema udjelu mliječne masti, odnosno udjelu mliječne masti u suhoj tvari sira, sirevi se dijele na ekstra masne, punomasne, masne, polumasne i posne (Tablica 2).

*Tablica 2. Vrste sira s obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari sira*

| Vrsta sira obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari | Udio mliječne masti u suhoj tvari (%) |
|---|---|
| Ekstra masni | ≥60 |
| Punomasni | ≥45 i <60 |
| Masni | ≥25 i <45 |
| Polumasni | ≥10 i <25 |
| Posni | <10 |

*Izvor: Pravilnik o sirevima i proizvodima od sira (NN 20/2009, 141/2013)*

Sirevi se razlikuju i prema načinu zrenja, pa tako ima sireva koji zriju s bakterijama i sireva koji zriju s plemenitim plijesnima. Sirevi koji zriju s bakterijama dijele se na one koji zriju s bakterijama pretežno na površini sira, odnosno pretežno u unutrašnjosti sira. Ista podjela vrijedi i za sireve koji zriju s plijesnima. Ovisno o načinu zrenja, izdvajaju se sirevi koji ne zriju (Havranek i sur., 2014).

## 1.2. Sirarstvo u Hrvatskoj

Unatoč činjenici da se broj muznih krava, kao i količine isporučenog mlijeka od 2010. do 2015. godine u Republici Hrvatskoj kontinuirano smanjuju, proizvodnja sira u konstantnom je porastu (www.clal.it). Prema dostupnim podacima Državnog zavoda za statistiku, od 2005. do 2008. godine proizvodnja sira se povećala sa 24.900 tona 30.800 tona. U novije vrijeme, odnosno u vremenskom razdoblju od 2010. pa sve do 2015. g, u Republici Hrvatskoj proizvodnja sira se povećala za 5,4%, odnosno u 2010. g proizvodnja je iznosila 29.000 tona dok je u 2015. g zabilježeno čak 34.000 tone proizvedenog sira (www.clal.it) (Tablica 3).

*Tablica 3. Statistički podaci proizvodnje, uvoza i izvoza mliječnih proizvoda u RH u razdoblju od 2010. do 2015. godine* (*Izvor: http://clal.it/en/?section=stat_croazia* )

| HRVATSKA | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| x 1000 tona | 2010. | 2011. | 2012. | 2013. | 2014. | 2015. |
| Sirovina | | | | | | |
| Broj krava (u tisućama) | 182,0 | 184,0 | 178,0 | - | - | - |
| Isporučeno mlijeko | 624,0 | 626,0 | 602,0 | 504,0 | 513,0 | 513,0 |
| Mliječni proizvodi | | | | | | |
| Maslac | 4,6 | 4,7 | 4,3 | 3,9 | 4,0 | 4,1 |
| Sir | 29,0 | 30,0 | 31,0 | 32,0 | 32,0 | 34,0 |
| Punomasno mlijeko u prahu | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Obrano mlijeko u prahu | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Izvoz | | | | | | |
| Skupno mlijeko | 3,0 | 2,8 | 0,5 | 0,3 | 1,1 | 2,4 |
| Mlijeko u | 23,0 | 26,0 | 24,0 | 15,0 | 11,0 | 13,0 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ambalaži | | | | | | |
| Maslac | 1,3 | 1,3 | 1,6 | 1,9 | 1,9 | 0,5 |
| Sir | 2,1 | 2,1 | 2,6 | 2,5 | 2,4 | 5,9 |
| Proteini sirutke u prahu | 4,1 | 2,8 | 2,5 | 2,3 | 2,4 | 2,9 |
| Uvoz | | | | | | |
| Skupno mlijeko | 14,0 | 31,0 | 45,0 | 119,0 | 110,0 | 141,0 |
| Mlijeko u ambalaži | 30,0 | 37,0 | 35,0 | 30,0 | 18,0 | 22,0 |
| Kondenzirano mlijeko | 7,5 | 5,6 | 4,4 | 5,1 | 2,0 | 1,8 |
| Maslac | 1,1 | 1,3 | 1,6 | 2,2 | 2,8 | 3,1 |
| Sir | 12,0 | 12,0 | 12,0 | 14,0 | 18,0 | 23,0 |

Izvoz sireva proizvedenih u RH nije zanemariv. U vremenskom razdoblju od 2010. od 2015. g, porastao je za više od 60 % (od 2.100 tona na 5.900 tona). Međutim, povećao se i uvoz sireva. U odnosu na 2010. godinu, u 2015. g uvezeno je više od 45 % sireva. Hrvatska najviše sireva izvozi u zemlje bivše Jugoslavije, odnosno u Sloveniju, Bosnu i Hercegovinu, Srbiju, Crnu goru i Makedoniju**.** Porast izvoza sireva u te zemlje također je povećan u razdoblju od 2010. do 2015. godine. Najznačajniji izvoz sira zabilježen je u Sloveniju, koji je u 2015. godini u odnosu na 2010. godinu porastao za više od 90 % (sa 177 na 2.933 tona), odnosno u Srbiju za koju je zabilježen porast izvoza za više od 98 % (s 13 na 656 tona).

Izvoz u Bosnu i Hercegovinu u vremenskom razdoblju od 2010. do 2015. godine bio je promjenjiv te jenajniža vrijednost izvoza od 913 tona zabilježena u 2013. godini, a maksimalna 1.517 tona u 2015. godini. Izvoz sireva u Crnu Goru u stalnom je porastu. U istom vremenskom razdoblju izvoz sireva u Crnu Goru porastao je 4 puta (s 34 tone na 303 tone), dok se izvoz sireva u Makedoniju smanjio za 1,7 % (s 376 tona na 222 tone).

Osim u zemlje bivše Jugoslavije, Republika Hrvatska sireve izvozi u susjednu Mađarsku, Češku, Irak i Sjedinjene Američke Države (Tablica 4).

*Tablica 4. Izvoz sireva iz Hrvatske od 2010. do 2015. godine* (*Izvor: http://www.clal.it/en/section=stat_croazia*)

| IZVOZ (t) Zemlja | 2010. | 2011. | 2012. | 2013. | 2014. | 2015. | +/- % u odnosu na 2014. | +/- % u odnosu na 2013. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Slovenija | 177 | 291 | 278 | 424 | 553 | 2933 | + 431% | +592% |
| BiH | 1443 | 1374 | 1434 | 1121 | 913 | 1517 | +66,05% | +35,26% |
| Srbija | 13 | 14 | 209 | 247 | 349 | 656 | +88,01% | +165% |
| Crna Gora | 74 | 104 | 184 | 241 | 200 | 303 | +51,50% | +25,80% |
| Makedonija | 376 | 329 | 382 | 342 | 194 | 222 | +14,16% | -35,16% |
| Irak | - | - | - | - | - | 81 | - | - |
| Mađarska | - | - | - | 0 | 7 | 48 | +618% | +100% |
| Kosovo | 17 | 33 | 13 | 29 | 32 | 27 | -16,36% | -5,57% |
| SAD | 22 | 16 | 16 | 24 | 18 | 25 | +44,57% | +4,12% |
| Češka | - | - | 0 | 1 | 5 | 23 | +317% | - |

Iz prikazanog u tablici 4. vidljivo je da izvoz sireva proizvedenih u Hrvatskoj raste, na što je imala utjecaja konstantna modernizacija proizvodnje čime su sirevi proizvedeni u RH sve konkurentniji na europskom tržištu. Ne smijemo odbaciti niti činjenicu kako se procvat izvoza dogodio 2013. godine što se može pripisati ulasku Hrvatske u Europsku uniju te ukidanju carinske zaštite. Hrvatski su proizvodi sada dostupniji Europskom tržištu, a i sama kvaliteta sireva, te općenito mlijeka i ostalih mliječnih proizvoda se znatno poboljšala ponajviše zbog usvajanja standarda Europske unije.

Kada se govori o uvozu sireva u Hrvatsku, glavni uvoznik je Njemačka (Tablica 5). Uvoz sireva iz Njemačke, u razdoblju od 2010. g do 2015. g povećan je s 6.427 tona na 11.624 tone (oko 45 %). Drugi glavni uvoznik je Nizozemska koja je izvoz sireva u Hrvatsku u petogodišnjem razdoblju povećala gotovo 6 puta (sa 682 tone na 3.971 tonu). Slovenija je također jedan od vodećih izvoznika sireva u Hrvatsku. U vremenskom razdoblju od 2010. g, uvoz sireva iz Slovenije u odnosu na 2015. g porastao je 2,3 % (sa 796 tona na 1.817 tona). Usporede li se

uvezene količine sira (1.817 tona) s izvezenim količinama sira (2.933 tona) u 2015. g, može se zaključiti kako je izvoz sireva veći za 1,6 puta od uvoza sireva iz Slovenije.

Tablica 5. Uvoz sireva od 2010. do 2015. godine.

(*Izvor:http://www.clal.it/en/section=stat_croazia)*

| Uvoz | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zemlja | 2010. | 2011. | 2012. | 2013. | 2014. | 2015. | +/- % u odnosu na 2014. | +/- % u odnosu na 2013. |
| Njemačka | 6427 | 6534 | 7647 | 8762 | 9708 | 11624 | +19,74% | +32,6% |
| Nizozemska | 682 | 1112 | 523 | 1198 | 2966 | 3971 | +33,88% | +231% |
| Slovenija | 796 | 698 | 524 | 892 | 993 | 1817 | +83,04% | +104% |
| Italija | 610 | 617 | 605 | 758 | 916 | 1266 | +38,25% | +67,06% |
| Poljska | 186 | 167 | 111 | 255 | 797 | 1230 | +54,43% | +382% |
| Austrija | 370 | 315 | 315 | 438 | 372 | 581 | +56,40% | +32,69% |
| Litva | 410 | 234 | 260 | 173 | 601 | 574 | -4,41% | +232% |
| Francuska | 354 | 369 | 350 | 323 | 372 | 410 | +10,25% | +26,76% |
| Srbija | 217 | 235 | 244 | 250 | 319 | 368 | +15,51% | +47,20% |
| Mađarska | 33 | 22 | 72 | 90 | 160 | 289 | +80,95% | +221% |

## 1.3. Proizvodnja svježih sireva

Proizvodnja svježih sireva u Republici Hrvatskoj odvija se u industrijskim pogonima, malim mljekarama ili obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG).

Tehnologija proizvodnje svježih sireva u pravilu je jednostavna. Ukoliko se sir proizvodi u industrijskim uvjetima, mlijeko se najprije pasterizira, te se potom hladi. Nakon toga slijedi dodavanje mljekarske kulture u mlijeko zagrijano do 32-35˚C. Potom se dodaje sirilo, u koncentraciji koju određuje sirar. Prosječno vrijeme koje je potrebno za podsirivanje mlijeka, odnosno formiranja gruša je oko 45 minuta do sat vremena. Čvrstoća gruša procjenjuje se uranjanjem sirarske lopatice u gruš, pri čemu bi on trebao pucati poput porculana, uz vidljivo izdvajanje zelenkaste sirutke. Do formiranja gruša dolazi djelovanjem bakterija *Lactobacillus acidophilus* te *Bifidobacterium bifidum*, najprije djeluju u mlijeku, a kasnije u grušu. Proizvedena mliječna kiselina utječe i na sam okus gruša koji se opisuje kao okus po svježem, a bitan je u proizvodnji svježih sireva. Dobiveni gruš se reže i cijedi u kalupima ili sirarskim maramama, a moguće je i dogrijavanje gruša, kako bi se pospješilo otjecanje sirutke. Gruš se reže na listiće ili kockice, hladi te puni u kalupe, odnosno odgovarajuću ambalažu.

Svježi sirevi su blagog okusa, karakterizira ih visok udio vode, niski udio mliječne masti te pojačana kiselost (Kirin, 2016). Ambalaža u kojoj se prodaju je najčešće od plastike, zapremine 250 do 500 g, uz poneku iznimku. Industrijski proizvedeni sirevi imaju istaknutu deklaraciju na ambalaži na kojoj je naznačeno od koje vrste mlijeka je sir proizveden, udio mliječne masti (%) i rok iskoristivosti samog proizvoda (Pravilnik NN 141/2013).

## 1.4. Važnost označavanja proizvoda

U današnje vrijeme, doba globalizacije tržišta, posebice ulaskom Hrvatske u EU, od velikog je značaja usklađivanje hrvatskog tržišta s europskim tržištem i europskom politikom kao i zaštita potrošača. Jedan od načina postizanja tih uvjeta je pravilno označavanje proizvoda (Mikulec i Špoljarić, 2014). Naime, sva hrana koja se nalazi na tržištu Republike Hrvatske mora biti označena, reklamirana te prezentirana sukladno odredbama Zakona o hrani (NN 81/2013, 14/2014) i Zakona o informiranju potrošača o hrani (NN 56/2013, 14/2014, 56/2016)na osnovu kojih im se omogućava da budu informirani pri odabiru hrane koju konzumiraju, a u cilju sprječavanja dovođenja potrošača u zabludu. Potrošač ne smije biti u zabludi, odnosno hrana mora biti označena na način da ne dolazi do obmane potrošača s lažnim navodima o svojstvima, sastavu, količini, podrijetlu, postupku proizvodnje i roku iskoristivosti. Kontrolu označavanja proizvoda potrebno je provoditi kako bi se povećalo povjerenje potrošača, kako bi se spriječila obmana samog potrošača, kako bi se poboljšala ispravnost navedenih podataka na proizvodu. Na taj bi se način domaćim proizvodima omogućio ravnopravan položaj s proizvodima s međunarodnog tržišta.

Proizvodnja sireva jedan je od rastućih segmenata industrijske proizvodnje, također proizvodnja sireva  je, možemo reći i odraz kulturnog identiteta zemlje u kojoj je sir proizveden. Proizvod koji ne zadovoljava kvalitetom, te nepravilnim označavanjem, stvara negativne društvene posljedice jer dovodi do smanjenog interesa potrošača za istim. Važno je napomenuti da postoje sankcije za proizvođača koji distribuira nezadovoljavajući proizvod, odnosno proizvod koji ne zadovoljava uvjete kvalitete. Proizvodi smanjene kvalitete, te proizvodi koji potrošača dovode u zabludu i odvlače ga od kupnje, nisu poželjni na tržištu,. Jedan od ciljeva domaće proizvodnje trebao bi biti širenje domaćeg tržišta. Do širenja tržišta može doći ukoliko su proizvodi prihvatljivi široj populaciji, te ukoliko su ti proizvodi prepoznatljivi. Stoga možemo reći kako bi usvajanjem prakse o pravilnom označavanju proizvoda, proizvodi postali konkurentniji, a sama proizvodnja bi postala ekonomski isplativija (Mikulec i Špoljarić, 2014). Uloga sustava kontrole hrane je osigurati potrošaču osnovno pravo, a to je da kupljeni proizvod ne ugrožava njegovo zdravlje i ekonomski interes. Potrošač ne smije, niti želi biti prevaren. U tu svrhu doneseni su *Zakon o hrani* (NN 81/2013) te ostali pravilnici o higijeni i službenim kontrolama u proizvodnji hrane, kojima je glavni cilj zaštita života i zdravlja ljudi te zaštita

interesa potrošača. Naravno da su još neke od uloga zakona i pravilnika globalni interes Hrvatske koji se odnosi na domaće, ali i na međunarodno tržište. U svakom proizvodnom procesu postoje zakoni koji ga određuju; u ovom slučaju, odnosno u proizvodnji sira postoje *Zakon o hrani* (NN 81/2013 ), *Pravilnik o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane* ( NN 63/2011), *Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva* (NN 20/2009 i 141/2013).

Navedenom legislativom propisani su zahtjevi kakvoće kojima u proizvodnji i stavljanju na tržište moraju udovoljavati sirevi i proizvodi od sireva, a odnose se na: nazive, definicije te opće zahtjeve kojima moraju udovoljavati; zatim na sastav, dodane sastojke i druge tvari koje se upotrebljavaju u proizvodnji i preradi; kao i dodatne zahtjeve označavanja (NN 141/2013, NN 14/2014).

Fluorometrijska metoda određivanja aktivnosti alkalne fosfataze u mlijeku, odnosno siru koristi se za utvrđivanje da li je postupak pasterizacije mlijeka ispravno proveden, odnosno da li je sir proizveden od pasteriziranog mlijeka (HRN EN ISO 11816-1 (2013); HRN EN ISO 11816-2 (2016)).

Pasterizacija mlijeka koristi se u proizvodnji pojedinih sireva, s ciljem uništavanja svih patogenih mikroorganizama, koji se mogu pojaviti u mlijeku i u daljnjoj preradi, odnosno proizvodnji sira te uzrokovati pogreške u kvaliteti sireva kao i štetne posljedice po zdravlje ljudi. Toplinska obrada mlijeka pri nižim temperaturama od temperature pasterizacije, također se koristi za smanjenje broja nepoželjnih mikroorganizama, uz očuvanje koagulacijskih sposobnosti mlijeka. Što se tiče sireva proizvedenih od sirovog mlijeka, važno je da deklaracija proizvoda sadrži informaciju da je sir proizveden od sirovog mlijeka, zbog potencijalnog zdravstvenog rizika koji ova skupina namirnica predstavlja za osjetljivu skupinu potrošača poput djece, trudnica ili starijih osoba. Prema Egger i sur., (2016) mlijeko se u malim mljekarama često termički obrađuje u uvjetima slabije kontrole. Također, jedan od problema je zabrana proizvodnje i uvoz sireva proizvedenih od nepasteriziranog (sirovog) mlijeka, koju provode pojedine zemlje. Iz navedenih činjenica, proizašla je potreba za jednostavnom i sigurnom metodom kojom se može utvrditi da li je mlijeko ispravno pasterizirano. Od iznimne je važnosti, ne samo zaštita potrošača, već uspostava bolje kontrole uvoza i izvoza, odnosno trgovine i plasmana sireva na hrvatskom, ali i na europskom tržištu.

## 1.5. Važnost određivanja aktivnosti alkalne fosfataze

Fosfataze su grupa enzima prisutna u mnogim organizmima. Kataliziraju reakciju hidrolize estera fosforne kiseline. Ovisno o vrsti hidrolitičke reakcije, fosfataze se dijele u četiri skupine. Prisutne su u svim organizmima od prokariota do eukariota. Alkalna fosfataza (ALP; EC 3.1.3.1) je monoesteraza koja katalizira hidrolizu monoestera (Ninios, 2013). Kod čovjeka je prisutna u tkivima cijelog organizma, najviše u jetri, žučovodu, bubrezima, kostima i posteljici. Gen za alkalnu fosfatazu nalazi se na prvom kromosomu humanog genoma, kod odraslih osoba dolazi iz jetre, a kod djece iz kostiju. Povišene vrijednosti alkalne fosfataze mogu ukazati na prekomjernu razgradnju kostiju te ukazati na bolest kao što je npr. osteoporoza. Povišene vrijednosti alkalne fosfataze kod djece i trudnica u određenom stadiju trudnoće su normalne jer upućuju na povećanu izgradnju kostiju, što opet ukazuje na to da djeca rastu. Snižene vrijednosti alkalne fosfataze kod ljudi mogu ukazivati na pothranjenost, nedostatak proteina u prehrani, nedostatak cinka i magnezija, te je normalna pojava kod bolesnika na dijalizi (Ninios, 2013).

Alkalna fosfataza je jedan od 60 enzima koji se nalaze u sirovom mlijeku. Količina alkalne fosfataze u kravljem mlijeku ovisi o pasmini, stadiju laktacije i količini proizvedenog mlijeka (Ninios, 2013). Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze koristi se od 1935. godine za određivanje uspješnosti postupka pasterizacije (Scintu, 2000). Kod ispravno pasteriziranog mlijeka, većina enzimske aktivnosti je inaktivirana ili oslabljena. Ukoliko je vrijednost alkalne fosfataze nakon pasterizacije u mlijeku i dalje visoka, sumnja se na ispravnost postupka pasterizacije, odnosno mogućnost da je u pasterizirano mlijeko naknadno dodano sirovo mlijeko ili enzimska aktivnost potječe od alkalne fosfataze mikrobnog porijekla.

Prvi pouzdani test za utvrđivanje djelovanja pasterizacije na enzime razvili su englezi Kay i Graham 1933. godine. Test se temelji na inaktivaciji enzima alkalne fosfataze. Na razvoju i primjeni kolorimetrijskih tehnika u svrhu mjerenja aktivnosti alkalne fosfataze za kontrolu uspješnosti pasterizacije mlijeka radili su mnogi autori (Kay i Graham, 1935., Scharer, 1938., Aschaffenburg i Mullen, 1949. cit. Rocco, 2004). Po jednostavnosti, praktičnosti i učinkovitosti ističu se fosfatazni test po Aschaffenburgu i Mullenu (Rašić, 1960; Rocco, 2004) te brzi Scharer-ov test. Navedene metode imaju određene nedostatke, kao što su opasnost od kontaminacije fenolom, nestabilnost reagencija te otežano vizualno mjerenje, naročito kod graničnih slučajeva (Dick H. Kleyn, <drinc.ucdavis.edu/dairychem1_new.htm>).

Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) u svrhu utvrđivanja ispravnosti postupka pasterizacije može se primijeniti i u kontroli sireva. Sir, koji se proizvodi od sirovog mlijeka, može se kategorizirati prema vrsti od koje mlijeko potječe. Prema vrsti mlijeka razlikuju se kravlji, ovčji i kozji sirevi. Također, sirevi se međusobno razlikuju prema sadržaju vlage, pa se razlikuju tvrdi, polutvrdi i meki sirevi, te prema postupku termičke obrade sirevi proizvedeni od sirovog, termiziranog i pasteriziranog mlijeka, kod kojih je uočena najveća razlika u prisutnosti aktivne ALP u siru kao gotovom proizvodu Alkalna fosfataza je povezana s masnom globulom mlijeka, te se nalazi adsorbirana na površini njezine membrane.(Hodašček, 2012).

Pasterizacija je postupak (režim) termičke obrade mlijeka, koji uključuje temperaturu od 72°C u trajanju od 15 sekundi ili temperaturu od 63°C u trajanju od 30 minuta ili bilo koji drugi temperaturno-vremenski režim koji za rezultat ima ekvivalentni učinak inaktivacije enzima alkalne fosfataze. Za kravlje mlijeko to znači da će enzimski test aktivnosti alkalne fosfataze neposredno nakon provedenog opisanog tretmana pasterizacije imati negativan rezultat, tj. aktivnost nižu od 350 mU/L (Commission Regulation (EC) No 2074/2005; HRN EN ISO 11816-1, 2013). Za razliku od pasterizacije, nakon provedenog postupka termizacije sirovog mlijeka, barem 15 sekundi pri temperaturi između 57°C i 68°C u mlijeku zaostaje aktivnost alkalne fosfataze, te je test pozitivan (Pravilnik veterinarske inspekcije, 1999; Hodošček, 2012). Iz navedenih činjenica može se zaključiti da aktivnost alkalne fosfataze u sirevima ovisi o toplinskoj obradi mlijeka te može varirati od vrijednosti nižih od 10 mU/g do 8000 mU/g sira. Europski referentni laboratorij za mlijeko i mliječne proizvode (EURL MMP) u Parizu, ovlašten od „The Generale Directorate Health & Food Safety (DG SANTE) EU komisije, je u suradnji sa Sveučilištem u Milanu proveo detaljno istraživanje naslova: „*Study for setting a European legal limit for the Akaline Phosphatase activity in pasteurized cow's milk cheeses*“ u cilju uspostavljanja granične vrijednosti na europskoj razini za aktivnost alkalne fosfataze (ALP) u siru, kako bi se u svrhu službenih kontrola mogli razlikovati sirevi proizvedeni od ispravno pasteriziranog mlijeka (Ghezzal, 2017).

Glavni parametri koji utječu na aktivnost ALP u siru su toplinski tretman mlijeka odnosno temperatura pri kojoj se sirno zrno zagrijava, zatim veličina sirnog koluta, te tehnološki postupak proizvodnje (Egger, 2016; Ghezzal, 2017). Provedena je studija izvodljivosti na sirevima proizvedenim u velikim i malim siranama u standardiziranim uvjetima kao i studija na

komercijalnim. Kao rezultat provedenog istraživanja određena je privremena granica koja odgovara 10 mU/g za sireve proizvedene od pasteriziranog mlijeka. U svrhu provjere primjenjivosti privremene granice od 10 mU/g za pasterizirane sireve proizvedene u EU. EURL MMP proveo je i koordinirao studiju na 680 uzoraka sireva, analiziranih u Nacionalnim referentnim laboratorijima za mlijeko i mliječne proizvode, 15 zemalja članica EU, koristeći fluorometrijsku metodu opisanu u standardu (HRN EN ISO 11816-2, 2016). Istraživanje je ukazalo da se ovom metodom kod nekih vrsta sireva, poput Mozzarelle iz skupine *pasta filata* sireva, ne može utvrditi da li se radi o siru proizvedenom od pasteriziranog ili sirovog mlijeka jer u samom procesu proizvodnje temperatura gruša doseže 70-75°C što uzrokuje inaktivaciju ALP u siru. Također, metoda nije primjenjiva za plave sireve, odnosno sireve s dodatkom plijesni *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. vrsta. Istraživanja koje je proveo EURL MMP potvrdilo je predloženu graničnu vrijednost od 10 mU/g za sireve proizvedene od pasteriziranog kravljeg mlijeka proizvedene u EU, osim za sireve specifičnih spomenutih kategorija (Egger, 2016, Ghezzal, 2017).

Cilj rada bio je provjeriti ispravnost označavanja svježih sireva s obzirom na toplinsku obradu mlijeka te utvrditi ispravnost pasterizacije mlijeka u proizvodnji svježih sireva. S obzirom da ova metoda do sada nije korištena za utvrđivanje ispravnosti pasterizacije u Republici Hrvatskoj, jedan od ciljeva je utvrditi i graničnu vrijednost alkalne fosfataze za svježe sireve proizvedene u RH. Analize sira obuhvatile su određivanje udjela mliječne masti u siru prema HRN EN ISO 1735:2008 i suhe tvari u siru prema referentnoj metodi HRN EN ISO 5534:2008. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze iz sira određivana je na instrumentu Fluorophos prema normi HRN EN ISO 11816-2:2016: „Mlijeko i mliječni proizvodi – Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze – 2. Dio: Fluorimetrijska metoda za sir“.

## 2. MATERIJAL I METODE

U svrhu utvrđivanja pravilnog označavanja svježih sireva, ukupno je uzorkovano 9 uzoraka svježih, polumasnih sireva iz industrijske proizvodnje i 3 uzorka svježih sireva proizvedenih na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu (OPG-u). Industrijski proizvedeni sirevi uzorkovani su metodom slučajnog odabira u maloprodajnom trgovačkom lancu, dok su sirevi proizvedeni na OPG-u kupljeni na gradskoj tržnici Kvatrić.

Analize sireva za utvrđivanje pravilnog označavanja sireva prema važećem Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2013), obuhvaćale su određivanje udjela masti u siru prema rutinskoj metodi, koja se temelji na međunarodnim normama HRN EN ISO 3433:2009 i HRN EN ISO 3432:2009; zatim određivanje udjela suhe tvari u siru prema referentnoj metodi HRN EN ISO 5534:2008, te određivanje masti u suhoj tvari sira (računski). Sirevima je također izmjerena pH vrijednost prema internoj radnoj uputi (RU 4.2.1-FA-3), Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode, te je u svrhu utvrđivanja pravilnog postupka pasterizacije određivana aktivnost ALP na instrumentu Fluorophos, prema normi HRN EN ISO 11816-2:2016. Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu Microsoft Office Excel (2007).

Sve analize u svrhu izrade ovog diplomskog rada provedene su u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode, Zavoda za mljekarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, akreditiranom prema normi HRN EN ISO/IEC 17025:2007.

## 2.1. Priprema uzoraka sira

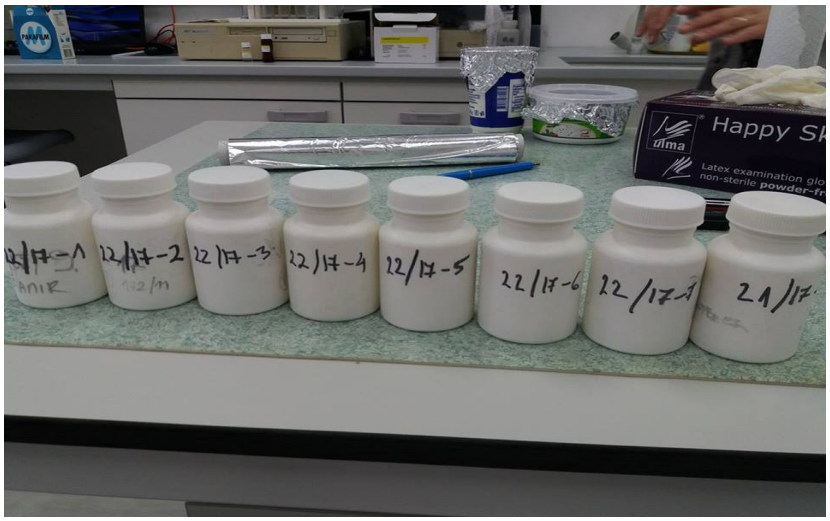
Uzorcima sira dodijeljena je šifra, te su podaci navedeni na deklaraciji proizvoda zapisani u svrhu utvrđivanja ispravnosti označavanja gotovog proizvoda (Tablica 6).

*Tablica 6.Uzorci svježih sireva i karakteristike navedene na deklaraciji proizvoda*

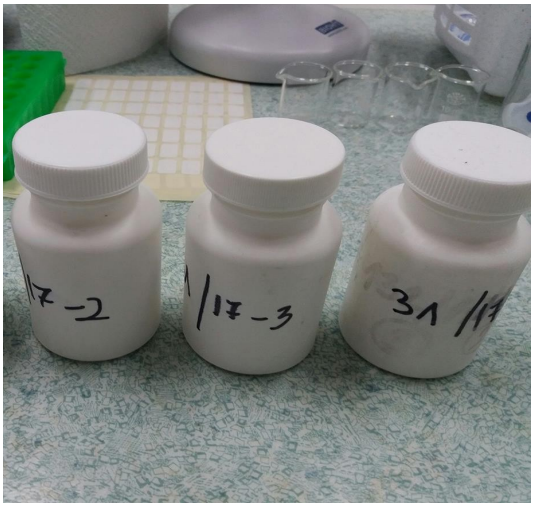
| Redni broj uzorka | Laboratorijska šifra uzorka | Težina pakiranja (g) | Tip sira | Mliječna mast u suhoj tvari sira (%) | Pasterizacija da/ne | Rok trajanja |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 22/17 -1 | 500 | svježi polumasni | 15 | da | 28.01.2017. |
| 2. | 22/17 -2 | 500 | svježi polumasni | 15 | da | 31.01.2017. |
| 3. | 22/17 -3 | 250 | svježi polumasni | 15 | da | 30.01.2017. |
| 4. | 22/17 -4 | 400 | svježi polumasni | min 10 | da | 28.01.2017. |
| 5. | 22/17 -5 | 500 | svježi polumasni | min 15 | da | 30.01.2017. |
| 6. | 22/17 -6 | 375 | svježi polumasni | do 25 | da | 28.01.2017. |
| 7. | 22/17 -7 | 800 | svježi polumasni | min 15 | da | 23.01.2017. |
| 8. | 21/17 -2 | 500 | svježi polumasni | min 20 | da | 03.02.2017. |
| 9. | 31/17-1 | 500 | svježi polumasni | do 25 | da | 03.02.2017. |
| 10. | 31/17 -2 | 500 | svježi polumasni | 14 | ne | 30.01.2017. |
| 11. | 31/17 -3 | 566 | svježi | - | - | - |
| 12. | 31/17 -4 | 557 | svježi | - | - | - |

U svrhu utvrđivanja udjela masti u siru, udjela suhe tvari u siru i mjerenje pH- vrijednosti uzorci sira pripremljeni su homogenizacijom, odnosno miješanjem žlicom ili špatulom, kako bi se nastala kondenzirana vlaga ugradila u uzorak, budući gubitak vlage utječe na povećanje sadržaja

masti. Pripremljeni i homogenizirani uzorci sira s odgovarajućim šiframa, prikazani su na slikama 1 i 2. Istovremeno ostatak sira u originalnoj ambalaži čuvan je u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C, u svrhu određivanja aktivnosti enzima ALP.




*Slika 1. Homogenizirani uzorci industrijski proizvedenih svježih sireva, u posudicama za čuvanje uzoraka prije početka analize (iz osobne arhive)*



*Slika 2. Homogenizirani uzorci svježih sireva, proizvedeni na OPG-u u posudicama za čuvanje uzoraka prije početka analize (iz osobne arhive)*

## 2.2. Mjerenje pH-vrijednosti sira

Pomoću pH metra „*Seven Multi*“ (Mettler Toledo, Švicarska), izmjerena je prema uputi proizvođača pH-vrijednost u uzorcima sireva (Slika 3).

Pribor:

Ubodna elektroda za sir

Standard (pH 4,01±0,2)

Standard (pH 7,00±0,2)

Destilirana voda

Staklena čaša

Ubodna elektroda koja se koristi za mjerenje pH-vrijednosti sira, čuva se u zasićenoj 3 M otopini KCl. Prije početka mjerenja elektroda se ispire s destiliranom vodom. Umjeravanje se provodi standardnim puferima poznate pH-vrijednosti (pH 4,01±0,2 i pH 7,00±0,2). Između mjerenja pH-vrijednosti različitih uzoraka (sireva), elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom. Mjerenje pH-vrijednosti za svaki uzorak, izmjeren je pet puta uzastopno, te je za rezultat izračunata srednja vrijednost.



*Slika 3. Mjerenje pH-vrijednosti sira (iz osobne arhive)*

2.3. Određivanje suhe tvari sira

Ukupna suha tvar analiziranih uzoraka sireva određena je referentnom metodom (HRN EN ISO 5534:2008).

Pribor:

Aluminijska posudica s poklopcem

Pijesak (morski ili kvarcni)

Vaga

Sušionik

Eksikator

Postupak:

U suhu aluminijsku posudicu stavi se otprilike 10 g suhog pijeska te se posudica zajedno s poklopcem i pijeskom važe. Doda se 2-3 g sira, te se zatvorena posudica sa sirom ponovno važe. Izvagane posudice s uzorcima sireva suše se u sušioniku 3 sata pri temperaturi od 102 °C (Slika 4). Posudice se zatim vade iz sušionika, zatvaraju i stavljaju u eksikator na hlađenje. Ohlađene posudice se važu, te se suše po sat vremena pri istoj temperaturi do konstantne mase. Suha tvar je

za svaki uzorak sira određena u paraleli (dva puta).



*Slika 4. Sušenje uzoraka sireva u sušioniku (iz osobne arhive)*

2.4. Određivanje udjela masti u siru

Određivanje udjela masti u uzorcima sira provedeno je prema referentnoj metodi HRN EN ISO 1735:2008.

Pribor:

Butirometar za sir 0 - 40%

Vaga, analitička

Sumporna kiselina $H_2SO_4$, p.a.

Izoamilni alkohol, p.a.

Vodena kupelj za butirometre (temperatura 65°C ± 2°C)

Pipete

Centrifuga za centifugiranje butirometara

Postupak:

U čašicu butirometra, prethodno označenu odgovarajućom šifrom, za svaki uzorak sira odvagne se točno 3 g sira. Svaka čašica butirometra zatvori se i odlaže u zasebnu posudu (Slike 5 i 6).



*Slika 5. Vaganje uzoraka sireva u čašicu butirometra ( iz osobne arhive)*



*Slika 6. Odvagani uzorci sireva u butirometru (iz osobne arhive)*

Odvaganim uzorcima sireva dodaje se 10 mL sumporne kiseline, kroz gornji otvor butirometra, tako da sumporna kiselina dosegne nivo gdje se tijelo butirometra spaja sa skalom, odnosno da pokrije čašicu sa sirom. Butirometri se zatim zagrijavaju u vodenoj kupelji 20 - 30 min pri temperaturi od 70°C do otapanja sira. Kad se sir otopi, suspenziji se dodaje 1 mL izoamilnog alkohola, pažljivo promiješa i dopuni sumpornom kiselinom do oznake od 30-35% na skali butirometra. Suspenzija se zagrijava na 65°C i nakon toga centrifugira 7 min pri 1130 okretaja u minuti. Na skali butirometra očita se postotak masti (masna faza je žute boje).

## 2.5. Određivanje aktivnosti ALP sira

Aktivnost ALP u siru određena je prema referentnoj metodi HRN EN ISO 11816-2: 2016, Mlijeko i mliječni proizvodi – Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze 2. dio: Fluorimetrijska metoda za sir.

Princip mjerenja aktivnosti ALP

Aktivnost ALP mjeri se kontinuiranim direktnim, fluorimetrijskim, kinetičkim određivanjem. ALP iz uzorka (sira) hidrolizira, ne-fluorescirajući aromatski monofosforni ester, 2'-[2-benzotiazolil]-6'-hidroksibenzotiazol fosfat, supstrat pri čemu nastaje visoko fluorescentni produkt. Fluorimetrijsko određivanje aktivnosti ALP izvodi se pri temperaturi od 38°C, u trajanju od 3 minute, kada se koristi instrument Fluorophos (Slika 7).




*Slika 7. Fluorophos (iz osobne arhive)*

Određivanje uključuje pred-inkubaciju supstrata i uzorka nakon čega slijedi višestruko kinetičko očitanje brzine reakcije. Test traje 3 minute, u prvoj minuti dokazi do uspostave ravnoteže, kako bi uzorak mogao postići temperaturu od 38°C. Mjerenje same aktivnosti počinje tek početkom druge minute i traje do samoga kraja, odnosno do kraja treće minute.

<u>Pribor:</u>

Instrument Fluorophos FLM 200

Kivete

Pipete

Termo blok (38°C)

Termometri

Vibracijska miješalica

Staklene epruvete

Staklene Pasteurove kapalice

Staklene čaše (5 i 10 mL)

Homogenizator (Ultra turrax)

Odmjerne tikvice od (10 i 25 mL)

Plastične posudice s poklopcem

Centrifuga (s mogućnošću vrtnje od 1000 × g, + 4°C)

Pufer za ekstrakciju sira (Fluorophos cheese extraction buffer)

Fluorophos supstrat (ne-fluorescirajući aromatski monofosforni ester, 2'-[2-benzotiazolil]-6'-hidroksibenzotiazol fosfat, 580 g/mol)

Pufer za supstrat (2,4 mol/L dietanolamin pufer, pH 8,0)

Kalibracijske otopine (A, B i C)

Otopina za dnevnu kontrolu instrumenta (Daily Instrument Control Solution)

Kit za kontrolu pasterizacije (Phospha Check pozitivna, negativna i normalna kontrola)

2.5.1. Priprema uzorka sira za određivanje aktivnosti ALP

U staklene čašice od 10 mL odvaže se s točnošću od 1 mg, 0,3 do 0,5 g homogeniziranog sira, te se na sir doda 5 mL pufera za ekstrakciju sira (Slika 8) i ostavi stajati 5 do 10 min na sobnoj temperaturi.



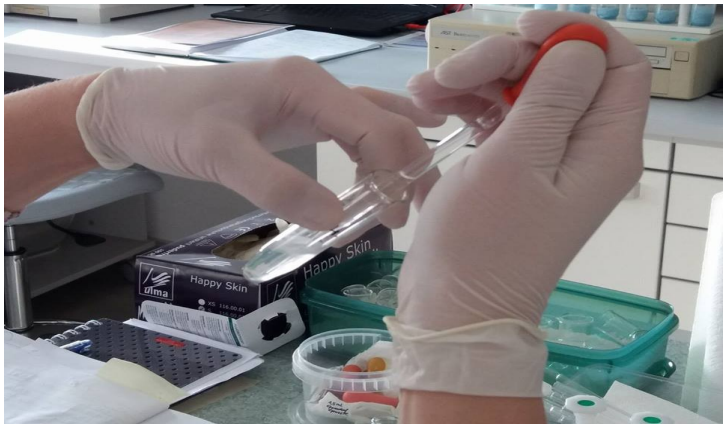

*Slika 8. Priprema uzoraka svježeg sira za određivanje aktivnosti ALP (iz osobne arhive)*

Sir i pufer homogeniziraju se pomoću homogenizatora Ultra Turrax (Slika 9) 35 sekundi uz 6500 do 7500 okretaja u minuti, nakon čega se prvi alikvot smjese pufera i sira od 5 mL kvantitativno prebaci u odmjernu tikvicu od 25 mL. U staklenu čašicu doda se novih 5 mL pufera i ponavlja postupak homogenizacije s homogenizatorom oko 30 sekundi. Zatim se ponovno alikovot od 5 mL prebaci u odmjernu tikvicu od 25 mL te se postupak ponavlja još dva puta. Puferom za ekstrakciju sira nadopuni se odmjerna tikvica do oznake konačnog volumena od 25 mL. Potrebno je paziti da ne dođe do stvaranja pjene. Pjenu je moguće izbjeći ukoliko se alikvot pažljivo prelijeva uz samu stjenku odmjerne tikvice. Nakon podešavanja konačnog volumena potrebno je sadržaj tikvice dobro promiješati, izvrtanjem. Štap homogenizatora se između svakog uzorka sira ispire prvo vrućom i zatim destiliranom vodom.



*Slika 9. Homogenizator Ultra Turrax za usitnjavanje sira (iz osobne arhive)*

Volumen od 5 mL homogeniziranog uzorka prebaci se u staklenu kivetu za centrifugu i centrifugira na 1000 × g pri + 4°C 10 minuta. Centrifugiranje služi kako bi se izdvojila i uklonila masnoća. Nakon centrifugiranja slabo su uočljiva 3 nježna sloja: pelet (talog), nadtalog (u kojem se nalazi aktivnost ALP) i masnoća na površini. Kivete se nakon centrifugiranja veoma pažljivo prenose kako se slojevi ne bi pomiješali. Pasteurovom pipetom prebaci se 5 mL nadtaloga u čistu čašicu (Slika 10). Na isti način priređeni su svi uzorci analiziranih sireva.




*Slika 10. Pipetiranje nadtaloga u kojem se nalazi ALP (iz osobne arhive)*

### 2.5.2. Kalibracija instrumenta Fluorophos i određivanje aktivnosti ALP

Početak analize na Fluorophos instrumentu započinje provjerom ispravnosti i stabilnosti instrumenta provedbom A/D testa koristeći otopinu za dnevnu kontrolu (Daily Instrument Control Solution), kojom se provjerava optička ispravnost instrumenta. Također se provjerava radna otopina supstrata, te se u svrhu praćenja preciznosti instrumenta koriste pozitivna, negativna i normalna kontrola.

A/D test provodi se tako da u izborniku instrumenta pritisnemo tipku SETUP nakon čega se odabere A/D test. Prostor za kivetu treba biti prazan i zatvoren. Pritiskom na tipku START na ekranu nakon kraćeg vremena trebaju biti ispisani brojevi 302±4. Prethodno 2,0 mL zagrijane otopine za dnevnu kontrolu instrumenta (20 minuta / 38°C) stavlja se u instrument, zatvore se vrata instrumenta, stisne START i očita vrijednost, koja se nakon kraćeg vremena prikaže na ekranu, a trebala bi iznositi oko 602±12. Kontrola radnog supstrata (priređen prema uputama proizvođača i normi HRN EN ISO 11816-2: 2016) provodi se na način da se 2,0 mL inkubira u zagrijanom termo bloku pri 38°C / 20 minuta, nakon čega se vrijednost supstrata provjerava u instrumentu. Supstrat se može koristiti za određivanje aktivnosti ALP ukoliko je vrijednost niža od 1200.

Na nekorištenom kanalu instrumenta prethodno kalibriranom s negativnom kontrolom, provodi se kontrola za provjeru preciznosti pasterizacije pomoću pozitivne, negativne i normalne PhosphaCheck kontrole, prema normi HRN EN ISO 11816-2: 2016.

Prije početka mjerenja aktivnosti ALP u uzorcima sireva potrebno je provesti kalibraciju kanala na kojem se mjeri aktivnost ALP s obzirom na tip mliječnog proizvoda (sira) i udio mliječne masti koji sadrži. Kalibracija instrumenta provedi se s pasteriziranim uzorkom svježeg sira pomoću otopina za kalibraciju (kalibrator A, B i C). U po dvije kivete za svaki kalibrator inkubira se (20 minuta / 38°C) po 2,0 mL svake otopine kalibratora (ukupno 6 kiveta). U svaku kivetu kalibratora pipetira se po 75 µL priređenog nadtaloga pasteriziranog sira za kalibraciju. Reakcijska smjesa promiješa se na vibracijskoj mješalici 5 sekundi. Kivete se vrate u termoblok. Kalibracija se mora provesti unutar 10 minuta od dodatka uzorka za kalibraciju u otopine kalibratora. Instrument automatski računa količinu fluorescencije dobivenu s kalibracijskom otopinom B i C u odnosu na kalibracijsku otopinu A za određivanje kalibracijskog odnosa unutar

instrumenta. Podaci o kalibraciji se pohranjuju u fluorimetru sve do nove kalibracije za odabrani proizvod. Nakon provedene kalibracije, može se započeti s analizom uzoraka sireva koji su prethodno pripremljeni kako je opisano. U označenu kivetu za Fluorophos, pipetira se 2 mL otopine radnog supstrata (priređen prema uputama proizvođača i normi HRN EN ISO 11816-2: 2016) i stavlja u termo blok zagrijan na 38°C i ostavi temperirati 20 minuta. Za vrijeme inkubacije kivete se prekriju parafilmom. Nakon inkubacije dodaje se 75 µL uzorka (priređenog nadtaloga), smjesa se promiješa na vibracijskoj mješalici 5 sekundi obriše pamučnom tkaninom i smjesti u držač za kivete. Zatvore se vrata instrumenta i pokrene reakcija. Test mora započeti unutar 20 sekundi od dodatka uzorka u supstrat.

# 3. REZULTATI I RASPRAVA

Za potrebe izrade diplomskog rada, od ukupno 12 uzorkovanih sireva, analizirano je 11 sireva (osam iz industrijske proizvodnje i tri proizvedena na OPG-ima), dok je jedan sir industrijske proizvodnje poslužio za „nultu“ kalibraciju instrumenta, prema kojem su izmjereni i uspoređeni svi ostali uzorci sireva. Deklaracija na ambalaži sireva proizvedenih na OPG-ima nije bila prisutna kod dva od ukupno tri proizvođača. Najčešća ambalaža u kojoj su se nalazili sirevi proizvedeni na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima su plastične PVC vrećice.

## 3.1 Rezultati mjerenja pH-vrijednosti analiziranih sireva

U tablici 7. prikazani su rezultati mjerenja pH vrijednosti svih analiziranih sireva. Izmjerena pH-vrijednost uzoraka svježih sireva varirala je od 3,96 do 4,76 pH jedinica.

*Tablica 7.Rezultati mjerenja pH-vrijednosti*

| Redni broj uzorka sira | Laboratorijska šifra uzorka | pH* vrijednost |
|---|---|---|
| 1. | 22/17 -1 | 4,65 |
| 2. | 22/17 -2 | 4,68 |
| 3. | 22/17 -3 | 4,76 |
| 4. | 22/17 -4 | 4,70 |
| 5. | 22/17 -5 | 4,73 |
| 6. | 22/17 -6 | 4,73 |
| 7. | 22/17 -7 | 4,70 |
| 8. | 21/17 -2 | 4,75 |
| 9. | 31/17-1 | 4,03 |
| 10. | 31/17 -2 | 4,39 |
| 11. | 31/17 -3 | 3,96 |
| 12. | 31/17 -4 | 4,10 |

**Prikazani rezultati pH-vrijednosti su srednja vrijednost od pet uzastopnih mjerenja.*

U radu Sabljak i sur. (2013) određivana je trajnost svježeg sira, u čiju svrhu je mjerena pH-vrijednost u 12 tradicionalno proizvedenih sireva, od sirovog mlijeka, na OPG-u. Autori navode rezultate analiza mjerenja pH-vrijednosti nakon 1., 3. i 6. dana od dana uzorkovanja sira. pH-vrijednost svježih sireva za vrijeme izrade ovog diplomskog rada određivana je samo 1. dan nakon uzorkovanja iz maloprodajne trgovačke mreže odnosno s gradske tržnice. Sabljak i sur. (2013) kao rezultat mjerenja pH-vrijednosti za 1. dan po uzorkovanju svježih sireva navode nešto veći raspon koji iznosi od 4,46 do 4,79 pH jedinica. Usporedbom rezultata pH-vrijednosti 1. dana po uzorkovanju može se zaključiti kako je raspon pH vrijednosti u kojem su se nalazili

analizirani uzorci sireva uobičajen.

Donja granica pH-vrijednosti uzoraka analiziranih za potrebe ovog diplomskog rada, razlikuje se od donje granice uzoraka opisanih u radu Sabljak i sur., (2013), pogotovo s obzirom na to da uzorak pod rednim brojem 11. čija je pH-vrijednost najniža (3,96) pripada upravo kategoriji svježih sireva proizvedenih na OPG-u, pod pretpostavkom da je isti proizveden od sirovog mlijeka (nema deklaraciju). Sabljak i sur., (2013) također navode kako je tradicionalni svježi sir prema *Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (2008), mikrobiološki ispravan samo prvi dan, što znači da mu je rok valjanosti 1 dan i nakon toga se ne bi smio prodavati na tržnici. Prema znanstvenom mišljenju koje je izradila Hrvatska agencija za hranu (HAH) 2016. godine, na osnovu provedenog istraživanja svježih sireva prikupljenih na tržnicama većih gradova Hrvatske, raspon pH-vrijednosti sireva također se ne podudara s rasponom koji je izmjeren na uzorcima sireva u ovome radu. Donja granica pH-vrijednosti na uzorcima sireva provedenog istraživanja od strane HAH iznosi 4,20 što je nešto više od vrijednosti (3,96) izmjerenih za analizirane sireve u ovome radu.

3.2. Rezultati određivanja udjela suhe tvari u siru

*Tablica 8. Rezultati određivanja udjela suhe tvari svježih sireva*

| Redni broj uzorka sira | Laboratorijska šifra uzorka | Suha tvar* (g/100 g) | Udio vode u bezmasnoj tvari sira (%) |
|---|---|---|---|
| 1. | 22/17 - 1 | 21,81 | 85,15 |
| 2. | 22/17 - 2 | 20,74 | 83,41 |
| 3. | 22/17 - 3 | 21,44 | 81,40 |
| 4. | 22/17 - 4 | 15,12 | 87,06 |
| 5. | 22/17 - 5 | 19,41 | 81,82 |
| 6. | 22/17 - 6 | 20,67 | 83,94 |
| 7. | 22/17 - 7 | 25,73 | 79,01 |
| 8. | 21/17 - 2 | 20,38 | 83,59 |
| 9. | 31/17- 1 | 19,95 | 84,26 |
| 10. | 31/17 - 2 | 17,86 | 87,62 |
| 11. | 31/17 - 3 | 21,49 | 81,57 |
| 12. | 31/17 - 4 | 15,88 | 85,84 |

**Suha tvar za svaki uzorak sira određena je u paraleli.*
*Prikazani rezultat je srednja vrijednost dva određivanja.*

U tablici 8.vidljivo je da udio suhe tvari sira varira od 15,12 do 25,73 g/100 g. Prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* (NN 141/2013), jasno je kako kategoriji svježih sireva pripadaju oni sirevi koji u bezmasnoj tvari sira sadrže od 69 do 85% vode. Taj se zahtjev ne primjenjuje na sireve proizvedene od vrhnja. Udio vode u bezmasnoj tvari sira izračunava se prema formuli:

$$V_{bm} = V \times 100 / 100 - m$$

gdje je:

$V_{bm}$ = sadržaj vode u bezmasnoj tvari sira (%)
$V$ = sadržaj vode u siru (%) gdje je $V=100 - suha\ tvar$
m = sadržaj masti u siru

Prema izračunatom udjelu vode u bezmasnoj tvari sira, koja varira u rasponu od 79,01% do

87,62%, može se zaključiti kako svi sirevi pripadaju kategoriji svježih sireva, a prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* (NN 141/2013), iako uzorci pod rednim brojem 1, 4 i 10 imaju nešto viši udio vode u bezmasnoj tvari sira od vrijednosti koju propisuje *Pravilnik*.

### 3.3. Rezultati određivanja udjela masti u siru

Analizom određivanja udjela masti u siru moguće je dobiti samo rezultate za udio masti u siru, no kako je na deklaraciji proizvoda naveden udio masti u suhoj tvari sira, dobivene rezultate potrebno je preračunati. Sadržaj suhe tvari u siru izračunava se prema formuli u koju se uvrštavaju vrijednosti dobivene određivanjem sadržaja vode, odnosno suhe tvari sira i sadržaja masti.

$$M_{stv} = m \times 100 / 100 - \%\ vode$$

$M_{stv}$ = *% masti u suhoj tvari*

*m = % masti u siru*

*Tablica 9.Rezultati određivanja udjela masti u siru i suhoj tvari sira*

| Redni broj uzorka sira | Laboratorijska šifra uzorka | Udio masti u siru (g/100 g) | Izračunati udio masti u suhoj tvari sira (%) | Vrijednost na deklaraciji proizvoda min. udio masti u suhoj tvari sira (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 22/17 - 1 | 7,00 | 31,65 | 15 |
| 2. | 22/17 - 2 | 5,00 | 23,99 | 15 |
| 3. | 22/17 - 3 | 3,50 | 16,54 | 15 |
| 4. | 22/17 - 4 | 2,50 | 16,53 | 10 |
| 5. | 22/17 - 5 | 1,50 | 7,81 | 15 |
| 6. | 22/17 - 6 | 5,50 | 26,55 | 25 |
| 7. | 22/17 - 7 | 6,00 | 23,40 | 15 |
| 8. | 21/17 - 2 | 4,75 | 23,70 | 20 |
| 9. | 31/17- 1 | 5,00 | 25,06 | 25 |
| 10. | 31/17 - 2 | 6,25 | 34,99 | 14 |
| 11. | 31/17 - 3 | 3,75 | 17,23 | Nema deklaracije |
| 12. | 31/17 - 4 | 2,00 | 12,82 | Nema deklaracije |

Iz tablice 9. vidljivo je da rezultati udjela masti u siru variraju u rasponu od 7,81% do 34,99%. Kod većine uzoraka udio masti u siru, naveden na deklaraciji proizvoda, bio je sukladan s vrijednostima provedenih analiza. No potrebno je istaći da je na deklaraciji uzorka br. 6. bio naveden udio masti do 25%, no analizom je utvrđen viši udio masti (26,55 %). Također valja istaknuti kako uzorci broj 1, 6, 9 i 10 sadrže najveći udio masti, te prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sira* (NN 20/2009 i 141/2013) ne bi trebali biti deklarirani kao polumasni sirevi, već pripadaju kategoriji masnih sireva s udjelom masti od 25 do 45%. Nadalje uzorak pod rednim brojem 5, sadrži najmanji udio masti (7,81%) te prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* također ne bi trebao biti deklariran kao polumasni sir, već kao posni, jer mu je udio masti manji od 10%. Osim toga, vrijednost istaknuta na deklaraciji (min 15%) nije u skladu sa rezultatitima analize.

Uzorci sira 11 i 12 kupljeni su na gradskoj tržnici i nisu imali deklaraciju, no prema dobivenim rezultatima mogu se kategorizirati u skupinu polumasnih sireva. Dobiveni rezultati ukazuju da su analizirani uzorci sira 1, 5 i 10 bili nepravilno označeni prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* (2013) odnosno nepravilno deklarirani kao polumasni sirevi.

## 3.4. Rezultati analize aktivnosti alkalne fosfataze

Rezultate, instrument Fluorophos automatski računa i ispisuje na zaslonu na osnovu ugrađenog algoritma u mili jedinicama po litri (mU/L) za priređeni nadtalog analiziranog uzorka sira, ALP1 (u matematičkom izrazu dolje). Prema navedenom izrazu, aktivnost alkalne fosfataze izražena u mU/L preračunava se u milijedinice enzimske aktivnosti po gramu (mU/g),

$$\text{ALP (mU/g)} = \frac{ALP1 \times 25 \times f2}{1000 \times m} \quad \text{gdje je}$$

ALP – numerička vrijednost aktivnosti ALP uzorka (sira), izražena u mili jedinicama enzimske aktivnosti po gramu;

$ALP_1$ – numerička vrijednost aktivnosti ALP u nadtalogu, izražena u mili jedinicama enzimske aktivnosti po litri;

$f_2$ – numerička vrijednost faktora za razrjeđivanje, koji odgovara drugom razrjeđenju početnog nadtaloga kako bi se dobila vrijednost ALP ne viša od 7000 mU/L;

m – masa uzorka sira, u gramima, koja se nalazi u volumetrijskoj tikvici od 25 mL.

Očitanje za ALP1 manje od 10 mU/L odgovara aktivnosti ALP u uzorku sira od 1 mU/g.

Parametri preciznosti rada instrumenta određeni su prije početka mjerenja aktivnosti ALP u uzorcima sira i prikazani su u tablici 9a.

*Tablica 9a. Parametri preciznosti rada instrumenta Fluorophos*

| Vrsta kontrole | Očekivana vrijednost (prema uputama proizvođača i normi HRN EN ISO 11816-2:2016) | Očitana vrijednost |
|---|---|---|
| A/D test | | |
| Očitanje instrumenta s praznim zatvorenim držačem za kivete | 302±4 | 305 |
| Otopina za dnevnu kontrolu instrumenta | 602±12 | 614 |
| Otopina radnog supstrata | < 1200 | 940 |
| Kontrola pasterizacije | Aktivnost ALP (mU/L) | |
| Phospha Check pozitivna kontrola | 500±100 | 450 |
| Phospha Check –N normalna kontrola | < 40 | 22 |
| Phospha Check negativna kontrola | < 10 | < 10 |
| Kalibracijski omjer kanala za provjeru preciznosti parametara pasterizacije | 117,5 | |
| Kalibracijski omjer kanala za mjerenje aktivnosti ALP u uzorcima sireva | 142,7 | |

Rezultati analize aktivnosti alkalne fosfataze u svrhu provjere ispravnosti postupka pasterizacije analiziranih sireva prikazani su u tablici 9b.

*Tablica 9b. Aktivnost alkalne fosfataze u analiziranim uzorcima sira*

| Redni broj uzorka | Laboratorijska šifra uzorka | Aktivnost ALP (mU/L) | Aktivnost ALP u siru (mU/g) | Oznake na deklaraciji Pasterizacija da/ne |
|---|---|---|---|---|
| Industrijski proizvedeni sirevi | | | | |
| 1. | 22/17 - 1 | < 10 | 1 | Da |
| 2. | 22/17 - 2 | < 10 | 1 | Da |
| 3. | 22/17 - 3 | 25,7 | 2 | Da |
| 4. | 22/17 - 4 | 32,4 | 2 | Da |
| 5. | 22/17 - 5 | < 10 | 1 | Da |
| 6. | 22/17 - 6 | < 10 | 1 | Da |
| 7. | 22/17 - 7 | 17,9 | 1 | Da |
| 8. | 21/17 - 2 | < 10 | 1 | Da |
| Sirevi proizvedeni na OPG-u | | | | |
| 9. | 31/17 - 2 | < 10 | 1 | Ne |
| 10. | 31/17 - 3 | 2806 | 209 | - |
| 11. | 31/17 - 4 | < 10 | 1 | - |

Iz tablice 9b je vidljivo da su svi analizirani sirevi, osim uzorka 10, imali vrijednost aktivnosti alkalne fosfataze nižu od 10 mU/g, što prema određenoj graničnoj vrijednosti za aktivnost ALP u sirevima proizvedenim od pasteriziranog mlijeka (Ghezzal, 2017) potvrđuje da su proizvedeni od pasteriziranog mlijeka. Za sireve proizvedene na OPG-ima (oznake 9, 10 i 11) bilo je za očekivati da su proizvedeni na tradicionalan način od sirovog, odnosno nepasteriziranog mlijeka, te da će vrijednost aktivnosti ALP u tim sirevima biti znatno viša. Ta se pretpostavka potvrdila se samo za uzorak broj 9 jer je isti bio pakiran u ambalažu s deklaracijom na kojoj je bilo jasno istaknuto da je sir proizveden od sirovog mlijeka. No, dobiveni rezultat analize aktivnosti ALP je pokazao da se radi o siru koji je proizveden od mlijeka koje je bilo toplinski obrađeno. U istraživanju Egger i sur., (2016), u kojem je analizirano više od 700 različitih uzoraka sira, proizvedenih od pasteriziranog, termiziranog te sirovog mlijeka,

porijeklom iz Francuske, Italije i Švicarske, među sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka, utvrđena je najniža vrijednost aktivnosti ALP za sireve Grana Padano i Parmigiano-Reggiano, koji zriju više od 12 mjeseci. Značajni pad enzimske aktivnosti ALP za te vrste sirevauočen je upravo tijekom zrenja, te je nakon 34 mjeseca zrenja ona iznosila 300 mU/g (Pellegrino i sur, 1996, citirano u Egger, 2016). Vrijeme zrenja sira također utječe na razinu enzimske aktivnosti ALP u siru. Prema rezultatima prikazanim u ovom istraživanju, može se vidjeti da uzorci svježih sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka imaju vrijednosti ALP od 1 do 5 mU/g, što potvrđuje da su proizvedeni od pasteriziranog mlijeka. U kategoriji mekih sireva proizvedenih od termiziranog mlijeka, raspon vrijednosti aktivnosti ALP variro od 60 do 1589 mU/g, dok u kategoriji mekih sireva proizvedenih od sirovog mlijeka taj je raspon značajno viši, od 1913 do 4306 mU/g (Egger, 2016).

U istraživanju Hodošček i sur., (2012), 19 sireva proizvedenih od pasteriziranog mlijeka u Sloveniji, imalo je vrijednost nižu od 10 mU/g. Samo za jedan analizirani uzorak svježeg sira od pasteriziranog mlijeka, određena je aktivnost ALP od 1,57 mU/g. Sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka imali su znatno višu vrijednost ALP koja je odgovarala vrijednosti od 3513 mU/g sira. U studiji EURL MMP (Ghezzal, 2017), koja je obuhvatila 680 uzoraka sireva iz Europe, u kategoriji svježih sireva, sirevi su imali vrijednost aktivnosti alkalne fosfataze nižu od 10 mU/g. Najviša vrijednost (7 mU/g) zabilježena je u uzorku talijanskog industrijski proizvedenog sira.

Iz literature malo doznajemo o podacima enzimske aktivnosti ALP u svježem pasteriziranom, odnosno svježem siru od nepasteriziranog mlijeka. Međutim, na osnovu provedene studije (Ghezzal, 2017) i dostupne literature može se zaključiti kako je granična vrijednost za sir proizveden od pasteriziranog mlijeka niža od 10 mU/g sira, te da je sireve proizvedene od sirovog, odnosno termiziranog mlijeka ona značajno viša. Uzimajući u obzir da su svi uzorci sireva korišteni u analizama za ovaj rad imali vrijednost nižu od 10 mU/g osim uzorka sira oznake 10, čija je vrijednost aktivnosti ALP iznosila 209 mU/g, može se zaključiti kako je uzorak proizveden od toplinski obrađenog mlijeka (termiziranog). Također, može se zaključiti da niti jedan od uzoraka sireva kupljen na gradskoj tržnici nije bio proizveden isključivo od sirovog mlijeka, usprkos očekivanjima.

## 4. ZAKLJUČAK

Prema *Pravilniku o označavanju sireva u Republici Hrvatskoj* (NN 141/2013), deklaracije na sirevima trebale bi biti u skladu s karakteristikama proizvoda, u suprotnom proizvođač može biti kažnjen. U ovom radu, analizom 11 uzoraka svježih, polumasnih sireva, proizvedenih u RH, nasumično odabranih iz maloprodajne trgovačke mreže, prema rezultatima analiza može se zaključiti kako su svi industrijski sirevi bili proizvedeni od ispravno pasteriziranog mlijeka. Rezultati analiza sireva uzorkovanih na gradskoj tržnici, za koje je pretpostavljeno da su proizvedeni od sirovog mlijeka, pokazali su da je jedan od tri proizvoda bio proizveden od termiziranog mlijeka, što nije sukladno s pretpostavkom da su proizvedeni bez termičke obrade. Odnosno, jedan od tri uzorka na koji je bio deklariran kao proizvod proizveden od sirovog mlijeka, bio je ustvari proizveden od termiziranog mlijeka. Nadalje, sirevi oznake 1, 5 i 9 nisu bili označeni sukladno važećim zakonskim propisima, odnosno trebali bi biti deklarirani kao masni, odnosno posni sirevi, iako im je navedeni udio masti u suhoj tvari bio ispravno označen.

Sustavna kontrola u skladu s Europskim, a i Hrvatskim normama, poboljšala bi ispravno označavanje proizvoda na tržištu, te smanjilo obmanu potrošača. Obmanom potrošača smanjuje se njegov interes za određenim proizvodom, a tako i kredibilitet prema hrvatskim proizvođačima, čime se smanjuje ekonomski rast i razvoj. Imajući na umu bojazan proizvođača malog kapaciteta proizvodnje od potencijalne opasnosti zaraze potrošača, može se opravdati korištenje termičke obrade mlijeka (pasterizacije ili termizacije) u svrhu povećanja zdravstvene ispravnosti proizvoda, no odluči li se proizvođač na toplinsku obradu prije proizvodnje, potrebno je regulirati deklaraciju da bude u skladu s proizvodom.

## 5. LITERATURA


1) Clal.it <http://www.clal.it/en/?section=stat_croazia> Pristupljeno 20. veljače 2017.

2) Dick, H. Kleyn: A Brief Interview on alkaline phosphataze methodology <drinc.ucdavis.edu/dairychem1_new.htm> . Pristupljeno 20.siječnja 2017.

3) Egger, L., Nicolas, M., Pellegrino, L. (2016): Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. LWT – Food Sci. Technol. 65: 963-968.

4) Fluorophos ALP test system (2009): – Model FLM200 User's guide. <http://www.aicompanies.com/wp-content/uploads/2016/04/FLM5-Rev18-Model-FLM200-User-Guide.pdf>. Pristupljeno 21. siječnja 2017.

5) Ghezzal, H., Boitelle, A.C., Desbourdes, C., Nicolas, M. (2017): Study for setting a European legal limit for the Akaline Phosphatase activity in pasteurized cow's milk cheeses. (European survey, 2008-2015) Version 1,2, Maisons Alfort Cedex, France.

6) Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014): Sirarstvo. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

7) Hodošček, L., Rupnik, S., Ahčin, K., Biasizzo, M. (2012): Alkaline phosphatase activity in Slovenian cheese made from pasteurized, thermized or raw milk. Acta agriculturae Slovenica, 3: 265-268.

8) HRN EN ISO (2013): Mlijeko i mliječni proizvodi - Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze - 1. dio: Fluorimetrijska metoda za mlijeko i napitke na osnovi mlijeka. No. 11816-1. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

9) HRN EN ISO (2016): Mlijeko i mliječni proizvodi – Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze - 2. dio : Fluorimetrijska metoda za sir. Br. 11816-2. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

10) HRN EN ISO (2008): Sir i proizvodi na bazi topljenog sira - Određivanje sadržaja masti - Gravimetrijska metoda (Referentna metoda). Br. 1735. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

11) HRN EN ISO (2008): Sir i topljeni sir – Određivanje sadržaja suhe tvari (Referentna metoda). Br. 5534. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

12) IDF Factsheet (2016): Raw milk cheeses. <http://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/12/Raw-milk-cheeses.pdf>. Pristupljeno 22. veljače 2017.

13) Kirin, S. (2016): Sirarski priručnik, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

14) Mikulec, N., Špoljarić, J. (2014): Priručnik o kontroli označavanja sireva na tržištu Republike Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

15) Ninios, A.I. (2013): Alkaline phophatase levels in Finnish hard cheeses and milk products [online] <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/41912/Ninios%20AI_Master%20thesis-1.pdf?sequence=1 > . Pristupljeno 20. veljače 2017.

16) Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008): Narodne novine. Broj 74.

17) Pravilnik o označavanju reklamiranju i prezentiranju hrane (2011): Narodne novine. Broj 63.

18) Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009): Narodne novine. Broj 20.

19) Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2013): Narodne novine. Broj 141.

20) Rašić, J. (1960): Značaj fosfatazne probe za kontrolu efikasnosti pasterizacije mlijeka. Institut za mlekarstvo FNRJ, N. Beograd.

21) Rocco, M.R. (2004): Alkaline phosphatase methods. Standard methods for the examination of dairy products. 17th Edition Wehr M., Frank J.F. (eds.). Washington, American Public Health Association: 341-362.

22) RU 4.2.1.-FA-3 (2015): Određivanje pH vrijednosti. Interna metoda Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

23) Rules on the veterinary-sanitary inspection and control of food production establishments, the veterinary-sanitary checks and the conditions for good health standards for foodstuffs and raw materials of animal origin. (Narodne novine Republike Slovenije. NN 100/1999) <http://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjYuLCq4sfSAhUD7BQKHSuXDdwQFggjMAE&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Ffood%2Faudits-analysis%2Fact_getPDF.cfm%3FPDF_ID%3D2412&usg=AFQjCNFyh91Dhb5BCX11ygM_V00ZRpvmbw&sig2=LHQdrMOyry6KGIC1JHKRVQ>. Pristupljeno 06. ožujka 2017.

24) Sabadoš, D. (1996): Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. Zagreb

25) Sabljak, V., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., Pejaković, A., Božanić, R. (2013): Određivanje trajnosti tradicionalnog svježeg sira. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and

Nutrition (CJFTBN) 8 (3-4): 115-122.

26) Scintu, M. F., Daga, E., Ledda, A. (2000): Evaluation of Spectrophotometric and Fluorometric Methods for Alkaline Phosphatase Activity Determination in Ewe's Milk. Journal of Food Protection. 63 (9): 1258–1261.

27) Tratnik, Lj, Božanić, R. (2012): Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

28) Uredba (EU) Europskog parlamenta i Vijeća (2011): OJ European Union No 1169. 25. October. <htpp://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=EN> . Pristupljeno 6. ožujka 2017.

29) Zakon o hrani (2014): Narodne novine. Broj 14.

30) Znanstveno mišljenje (2016): O mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrdim sirevima i njihovim kemijskim parametrima. Hrvatska agencija za hranu. <http://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/ZM-o-mikrobioloskim-opasnostima-u-svjezim-i-polutvrdim-sirevima.pdf>. Pristupljeno 12. veljače 2017.

## 6. ŽIVOTOPIS AUTORA

Maja Lipovšćak univ. bacc. agr., rođena je u Zagrebu gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje, paralelno baveći se vrhunskim sportom (umjetničko, brzo i sinhrono klizanje), ostvarujući značajne rezultate kao članica reprezentacije dugi niz godina. Danas se u svijetu sporta ostvaruje kao nacionalni, međunarodni te vrhovni sudac, a ujedno je svoj doprinos popularizaciji tog sporta dala napisavši 2010. za knjigu Fredija Kramera '*Zagrebački olimpijci*' kratki osvrt na temu Zagrebačkih olimpijaca, koji su predstavljali Hrvatsku na Zimskim Olimpijskim Igrama.

Gimnaziju Lucijana Vranjanina završava 2010. godine kada upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer animalne znanosti. Godinu dana kasnije upisuje i Stručni studij Fizioterapije na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu. U međuvremenu završava preddiplomski studij Animalnih znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, braneći završni rad naslova „*Uporaba molekularne determinacije gena u uzgoju konja*“; te upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka 2013. g.

Godine 2015. napisala je rad za Rektorovu nagradu pod vodstvom prof. dr. sc. Ante Ivankovića, naslova „*Utjecaj veličine farme, sezone i stadija laktacije na sadržaj ureje u mlijeku Holstein krava*“. CEEPUS stipendiju za sudjelovanje u CASEE međunarodnoj zimskoj školi na Sveučilištu u Nitri u Slovačkoj dobila je 2016. g, gdje je stekla dodatnih 10 ECTS bodova (diploma supplement). Uz studentski posao u Fitness Centru u Zagrebu, u slobodno vrijeme bavi se i politikom. Član je Odbora za Regionalni razvoj i fondove EU te je u nadzornom odboru MHDZ Stenjevec.