

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Srbija

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.33:637.07

PROCENA MIKROBIOLOŠKOG RIZIKA KOD SIREVA PROIZVEDENIH OD SIROVOG MLEKA

UVOD

Procenu mikrobiološkog rizika kod sireva proizvedenih iz sirovog mleka potrebno je sagledati kroz okvir složenog međudelovanja nekoliko intrinzičnih i ekstrinzičnih parametara koji diktiraju potencijal rasta, preživljavanja i/ili inhibicije patogenih mikroorganizama. U ovom radu predstavljamo glavne komponente procene mikrobiološkog rizika, pre svega, nalaz i zastupljenost patogenih mikroorganizama u sirevima proizvedenim od sirovog mleka, efekat pojedinih faza proizvodnje, fizikohemijske karakteristike specifične za matriks pojedinih sireva (pH, sadržaj soli, aktivnost vode), kao i zahteve rasta specifičnih uzročnika alimentarnih oboljenja.

Ključne reči: procena mikrobiološkog rizika • sirevi proizvedeni iz sirovog mleka

Kvalitativna procena rizika u kategoriji sireva proizvedenih iz sirovog mleka podrazumeva analizu specifičnog mikrobiološkog hazarda, epidemiološke dokaze koji potkrepljuju karakterizaciju rizika, kao i ostale relevantne podatke u cilju određivanja

- a) da li utvrđeni hazard predstavlja, odnosno u kojoj verovatnoći predstavlja rizik po zdravlje ljudi
- b) gde tokom procesa proizvodnje sireva hazard može biti ispoljen, kao i veličinu njegove promene.

Daleko detaljnije, procena rizika specifično:

- identifikuje mikrobiološke hazarde;
- identifikuje faktore rizika koji mogu uticati na verovatnoću kontaminacije sireva proizvedenih od sirovog mleka sa mikrobiološkim hazardom, kao i značaj istih faktora;
- ispituje uticaj procesnih parametara tokom proizvodnje na identifikovane mikrobiološke hazarde;
- uključuje probablističke modele u određivanju sudbine (inaktivacija, preživljavanje/rast, produkcija toksina) *E. coli*, *S. aureus* i *Listeria monocytogenes* u sirevima. Takvi modeli, po svojoj prirodi, su konzervativni, kako se ne razmatraju svi potrebni „input“ parametri. Naime, stopa rasta mikroorganizama u matriksu sira nikako nije statična pojava, i uslovljena je brojnim fizičkim i hemijskim promenama u stalno prisutnoj dinamici. Najznačajniji parametri, pored svakako temperature, podrazumevaju dodatak starter kulture gde

kao direktnu posledicu metaboličke i sintetičke aktivnosti kulture imamo povećanje koncentracije mlečne kiseline, sniženje pH vrednosti, kao i produkciju antagonističkih komponenti. Od navedenih parametara jedino je redukcija pH vrednosti uključena u modelisanje. Pored toga, takvi modeli ne uzimaju u obzir trajanje lag faze, koja dodatno minimizuje rast mikroorganizama i redukuje verovatnoću ispoljavanja hazarda, kao ni inhibicioni efekat prisutne mikroflore na osnovu mehanizma kompetitivnog isključenja (Breidt i Fleming, 1998; Gimenez i Dalgaard, 2004), ali ni varijabilnost u dinamici i kinetici rasta različitih sojeva.

- procenjuje rizik po zdravlje ljudi usled izloženosti potrošača značajnim patogenima povezanim sa sirevima proizvednim od sirovog mleka.

Codex alimentarius (Codex CAC/GL 30, 1999) je uspostavio internacionalno prepoznatljiv okvir za sprovođenje procene mikrobiološkog rizika. Procena rizika objedinjuje 4 zasebna mehanizma: identifikaciju hazarda, karakterizaciju hazarda, procenu izloženosti i karakterizaciju rizika. Kvalitativan pristup ovoj problematici podrazumeva karakteristike identifikovanih hazarda (identifikacija i karakterizacija hazarda) i procenu verovatne izloženosti ovim hazardima (procenu izloženosti), kako bi bila moguća konačna procena rizika (karakterizacija rizika). Modul karakterizacije hazarda kategorizuje svaki identifikovani hazard na osnovu verovatnoće ispoljavanja bolesti (infektivna doza) i ozbiljnosti manifestovanog bolesnog stanja (ugro-

Adresa autora:
Doc. dr Snežana Bulajić, Univerzitet u Beogradu,
Fakultet veterinarske medicine, Katedra za
higijenu i tehnologiju namirnica animalnog
porekla, Bulevar oslobođenja 18, 11000
Beograd, Srbija, tel.: +381 11 2685 653
e-mail: snezanab@vet.bg.ac.rs

ženost zdravlja ljudi). Modul procene izloženosti razmatra verovatnoću prisustva hazarda u proizvodu, kao i efekat procesnih parametara, specifičnih za svaki zasebni entitet sira, na sam hazard. Karakterizacija rizika kombinuje podatke karakterizacije hazarda i modula izloženosti kako bi se postigla konačna kategorizacija rizika. Pojednostavljeno rečeno, pri karakterizaciji hazarda enterohemoragičnih sojeva *E. coli* u odnosu na ekstra tvrde sireve proizvedene iz sirovog mleka, hazard se smatra visokim, kombinujući podatke o niskoj infektivnoj dozi (<10 cfu/ml) sa ozbiljnim posledicama po zdravlje usled konzumacije kontaminiranih sireva. Međutim, modul procene izloženosti, rangira verovatnoću prisustva hazarda kao nisku, usled ne tako česte kontaminacije ekstra tvrdih sireva sa dotičnim patogenom, kao i usled činjenice da tokom procesa proizvodnje dolazi do eliminacije *E. coli*. Time, u konačnoj karakterizaciji rizika, sažimanjem napred navedenih podataka, sam rizik se procenjuje kao nizak.

Proizvodnja sireva od sirovog mleka

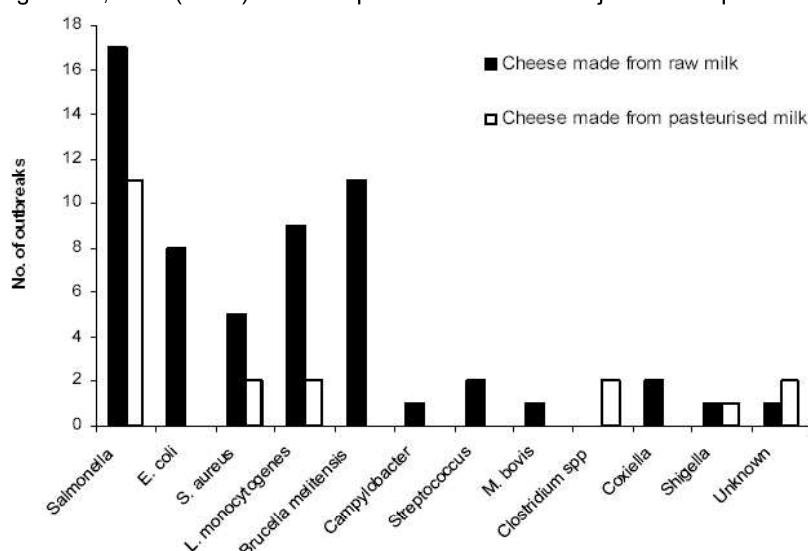
Godišnja proizvodnja sireva od sirovog mleka na području Evropske Unije se procenjuje na približno 700.000 tona; najveći proizvođači su Francuska, Italija i Švajcarska. Radi poređenja, u 2004. godini ukupna proizvodnja sira u Evropi iznosila je 8.550.000 tona (IDF, 2005). Sirevi proizvedeni od sirovog mleka predstavljaju približno 10% od ukupne proizvodnje sireva u EU i Švajcarskoj; varijacije su prisutne među pojedinim evropskim zemljama. Npr., Francuska proizvodi približno 1.600.000 tona sireva sa zrenjem od kojih se 200.000 (15% francuske proizvodnje) proizvodi od sirovog mleka (Lortal, 2005), dok je svega 5.000 tona (1,5% od ukupne proizvodnje sireva) proizvedeno u Španiji tokom 2001. godine (Beuvier i Buchin, 2004). U Švajcarskoj, 59,5% proizvedenih sireva, uključujući Ementaler, Gruyere, Tilsiter i Appenzeler, poreklom su od sirovog mleka (Schaellibaum, 2005).

Alimentarna oboljenja povezana sa konzumacijom sireva proizvedenih od sirovog mleka

Pre uvođenja pasterizacije, proizvodi od mleka su često bili implicirani u slučajevima alimentarnih oboljenja. Još daleke 1884. godine (Zottola i Smith, 1991) dokumentovani su slučajevi alimentarnih oboljenja povezanih sa konzumacijom kontaminiranih sireva. U periodu 1973.-2006., ukupno 84 prijavljena slučaja alimentarnih oboljenja se dovode u vezu sa konzumacijom sireva. Od toga, 69% (58/84) predstavlja sireve poreklom od sirovog mleka, 23% (20/84) su sirevi pro-

melitensis (19%), *Listeria monocytogenes* (15%), *E. coli* (14%), *S. aureus* (9%). *Campylobacter* spp., *Streptococcus* spp., *M. bovis* i *Coxiella* spp. su implicirani isključivo u slučajevima alimentarnih oboljenja povezanih sa konzumacijom sireva od sirovog mleka. Analiza alimentarnih oboljenja povezanih sa konzumacijom sireva u odnosu na regiju je predstavljena u tabeli 1.

U najvećem broju slučajeva (54,7%), oboljenja se registruju na području Evrope, potom sledi USA sa 30,9% registrovanih slučajeva. Ukoliko sagledavamo oboljenja povezana sa konzumacijom sireva poreklom od



Slika 1. ALIMENTARNA OBOLJENJA DOVEDENA U VEZU SA KONZUMACIJOM SIREVA OD SIROVOG I PASTERIZOVANOG MLEKA U ODNOSU NA ETIOLOGIJU UZROČNIKA (1973-2006)

Figure 1. RAW AND PASTEURISED MILK CHEESE OUTBREAKS BY AETIOLOGY (1973-2006)

izvedeni od pasterizovanog mleka, i 7,2% (6/84) su sirevi za koje podaci o poreklu i termičkom tretmanu nisu poznati. Na slici 1 dat je prikaz alimentarnih oboljenja povezanih sa sirevima od sirovog i pasterizovanog mleka u odnosu na etiologiju uzročnika.

U najvećem broju slučajeva (29%), *Salmonella* spp. su implicirani kao uzročnici, potom sledi *Brucella*

sirovog mleka, tada u Evropi bilježimo 62%, odnosno u USA 22,4% slučajeva.

U odnosu na tip sireva, meki sirevi su najvećim delom (27,6%) implicirani kao vehikulum, a s obzirom na vrstu mleka, kozji sirevi u najvećem broju slučajeva (27,6%) predstavljaju inkriminisanu namirnicu (tabela 2.).

Tabela 1. ALIMENTARNA OBOLJENJA POVEZANA SA POTROŠNJOM SIRA U ODNOSU NA REGIJU (1973-2006)

Table 1. OUTBREAKS ATTRIBUTED TO CONSUMPTION OF CHEESE BY REGION (1973-2006)

Region	Sirovo mleko	Pasterizovano mleko	Nepoznato poreklo	UKUPNO
USA	13 (11 kravlje, 2 kozja)	12	1	26
Kanada	6 (5 kravlja, 1 kozje)	2	1	9
Evropa	36 (21 kravlja, 11 kozja, 4 ovčja)	6	4	46
Ostali	3 (2 kravlja, 1 kozje)	-	-	3
UKUPNO	58	20	6	84

Tabela 2. OBOLJENJA POVEZANA SA KONZUMACIJOM SIREVA OD SIROVOG MLEKA U ODNOSU NA TIP SIRA (1973-2006)

Table 2. OUTBREAKS ATTRIBUTED TO RAW MILK CHEESE BY CHEESE-TYPE (1973-2006)

Tip sira	Broj oboljenja	Tip sira	Broj oboljenja
Cheddar/Gouda	3	Meksički	9
Sirevi sa plavim plesnima	1	Kozji	16
Meki	16	Ovčji	4
Sveži	2	Nije utvrđeno	7

Interesantno je zapaziti da mada sirevi od sirovog mleka predstavljaju svega 10% od ukupne proizvodnje sireva, čak u 70% slučajeva su implicirani u slučajevima alimentarnih oboljenja dovedenih u vezu sa potrošnjom sireva. Kao najčešći uzročnici identifikuju se *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *L. monocytogenes* i *E. coli*, a u najvećem broju slučajeva kao vehikulum se potvrđuju tipično sirevi sa visokim sadržajem vode, kod koji ne postoji period zrenja, ili se zrenje odvija u kratkom periodu. Pri analizi i interpretaciji epidemioloških podataka treba biti obazriv kako sistemi nadzora i izveštavanja o pojavi alimentarnih oboljenja nisu jedinstveni, a pored toga, mnogi, pre svega sporadični slučajevi nisu prijavljeni. Procena alimentarnih oboljenja povezanih sa konzumacijom sireva od sirovog mleka je moguća samo na osnovu raspoloživih podataka, i na taj način predstavlja samo „snapshot“ zastupljenosti takvih oboljenja, daleko od realne situacije. Tokom perioda 2006-2008. nastavlja se lista prijavljenih slučajeva oboljenja gde su sirevi implicirani kao vehikulum. U septembru 2008., u Kanadi se registruje 14 slučajeva oboljenja i 1 smrtni slučaj usled kontaminacije sira sa *L. monocytogenes*. U Severnoj Karolini su 2007. godine registrovana tri slučajeva listerioze povezana sa konzumacijom mekih sireva. Irska agencija za bezbednost hrane u septembru 2008., savetuje povlačenje 4 meka sira uvezena iz Francuske usled prisustva *L. monocytogenes*.

Prisustvo patogenih mikroorganizama u sirevima proizvedenim od sirovog mleka

Mikrobiološka ispitivanja i podaci monitoringa pokazuju da patogeni mikroorganizmi mogu biti izolovani iz sireva poreklom od sirovog mleka, pre svega *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., patogeni sojevi *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *S. aureus*. Ipak, procena rizika se uspostavlja samo kod određenih, selekcionisanih patogena uključujući *Campylo-*

bacter spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, enterohemoragični sojevi *E. coli* (EHEC) i *Salmonella* spp. Razlog ovakve selekcije jeste dosta česta kontaminacija sirovog mleka ovim mikroorganizmima, bilo putem direktne transmisije iz mlečne žlezde u slučaju mastitisa, ili pak kao posledica fekalne, odnosno kontaminacije iz okoline. Pored toga, dotični mikroorganizmi su jasno implicirani u slučajevima alimentarnih oboljenja povezanih sa konzumacijom sireva od sirovog mleka. Najznačajniji mikrobiološki hazardi identifikovani u sirevima poreklom od sirovog mleka prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. IDENTIFIKOVANI MIKROBIOLOŠKI HAZARDI POVEZANI SA SIREVIMA PROIZVEDENIM OD SIROVOG MLEKA

Table 3. SUMMARY OF IDENTIFIED MICROBIOLOGICAL HAZARDS ASSOCIATED WITH RAW MILK CHEESES

Organizam	Rasejavanje direktno u mleko [#]	Kontaminacija sirovog mleka ^{##}	Ozbiljnost oboljenja	Implikacija u slučajevima alimentarnih oboljenja
<i>Brucella</i> spp.	da	da	ozbiljno	++
<i>Campylobacter</i> spp.	da	da	ozbiljno [^]	+
Enterohemoragična <i>E. coli</i>	da	da	ozbiljno	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	da	da	veoma ozbiljno	++
<i>Salmonella</i> spp.	da	da	ozbiljno	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{**}	da	da	blago	++

[#] transmisija putem vimena, u slučajevima mastitisa;

^{##} transmisija putem fecesa, okoline;

[^] osetljiva populacija;

+ postoje izveštaji, ali retki;

++ česta implikacija;

** enterotoksin je termostabilan

Procesni parametri koji utiču na bezbednost sireva proizvedenih od sirovog mleka

Proces proizvodnje sireva se može sagledati kao složeno međudejlovanje različitih fizičkih, biohemijskih i bioloških faktora. Starter i pomoćne kulture, kao i nepoželjni mikroorganizmi često zahtevaju slične uslove za rast, preživljavanje ili inaktivaciju (npr. sadržaj vode, koncentracija soli, pH, redoks potencijal, hranjive materije, temperatura i anaerobna/aerobna atmosfera). Sam proces je dinamičke

prirode, i u određenim fazama može delovati bakteriostatski, baktericidno ili stimulatивно na rast različitih mikroorganizama. Nakon muže i hlađenja sirovog mleka, mnogi faktori mogu delovati kao svojevrsne barijere, direktno delujući na potencijal rasta, preživljavanja, aktivnosti ili inaktivacije patogenih mikroorganizama. Takvi faktori podrazumevaju pretreman sirovog mleka u smislu mikrofiltracije ili baktofugiranja, standardizacije i homogenizacije mleka, opseg i stopu acidifikacije na osnovu aktivnosti starter kultura, koncentracija soli, redukovana aktivnost vode kao posledica soljenja i zrenja sireva, sinteza bakteriocina, ali i efekt aditiva koji se primenjuju u proizvodnji sireva. Termički tretmani kao što su termizacija i pasterizacija, u proizvodnji ove kategorije sireva se ne primenjuju.

Frekvencija kontaminacije sirovog kravljeg, ovčijeg i kozjeg mleka sa specifičnim patogenima je prikazana u tabeli 4. Predstavljeni podaci pokazuju značajnu varijabilnost zastupljenosti patogena u odnosu na poreklo mleko.

Početna faza proizvodnje sira se odnosi na acidifikaciju, koagulaciju, sečenje, obradu i zagrevanje grušča, izdvajanje surutke i soljenje, odnosno sve one operacije koje prethode zrenju sira. Kod velikog broja sireva, acidifikacija se ostvaruje na osnovu aktivnosti selekcionisanih sojeva bakterija mlečne kiseline. Odabir sojeva koji ulaze u sastav starter kulture se vrši na osnovu zahtevanog opsega acidifikacije, proteolitičke aktivnosti, formiranja gasa i sinteze aromogenih komponenti saglasno sa dirigovanim uslovima pH, kiselosti, koncentracije soli i

Tabela 4. FREKVENCIJA KONTAMINACIJE SIROVOG MLEKA SA SPECIFIČNIM PATOGENIMA

Table 4. SUMMARY OF PREVALENCE DATE FOR RAW MILK CONTAMINATION

Organizam	Kontaminacija sirovog mleka		
	Kravlje*	Kozje*	Ovčije*
<i>C. jejuni</i>	ND-40%	ND-0,04%	ND
<i>S. aureus</i>	9,7-100%	ND-96,2%	7-33,3%
<i>L. monocytogenes</i>	1-60%	ND-5,8%	46%
<i>E. coli</i> (EHEC)	ND-33,5%	ND-16,3%	ND-12,7%
<i>Salmonella</i> spp.	ND-11,8%	ND	ND

* međunarodni podaci
ND- nije određeno

Tabela 5. pH LIMITI POTREBNI ZA RAST POJEDINIH PATOGENIH MIKROORGANIZAMA (ICMSF, 1996)

Table 5. pH LIMITS REQUIRED FOR GROWTH FOR VARIOUS PATHOGENS (ICMSF, 1996)

Patogen	Minimum	Optimum	Maksimum
<i>Campylobacter</i> spp.	4,9	6,5-7,5	9
<i>Salmonella</i> spp.	3,8	7-7,5	9,5
<i>L. monocytogenes</i>	4,4	7,0	9,5
<i>S. aureus</i>	4,0	6-7	10
<i>E. coli</i>	4,4	7-7,5	9,5
	2,5-3,0 (acidotolerantni sojevi)		

Tabela 6. TEMPERATURE RASTA POJEDINIH PATOGENIH MIKROORGANIZAMA (ICMSF, 1996)

Table 6. TEMPERATURE GROWTH CONDITIONS FOR VARIOUS PATHOGENS (ICMSF, 1996)

Patogen	Minimum (°C)	Maksimum (°C)	Optimum (°C)
<i>L. monocytogenes</i>	-1,5	45	37
<i>Salmonella</i> spp.	7	46	35-43
<i>E. coli</i>	7	48	37
<i>Campylobacter</i> spp.	30	45	42-43
<i>S. aureus</i>	7	48	35-40
<i>S. aureus</i> (toksin produkujući sojevi)	10	48	40-45

temperaturnih profila, koji predstavlja-ju specifičnost procesa proizvodnje zasebnih entiteta sireva. Po dodavanju kulture (obično se dodaju u broju 10^6 - 10^7 cfu/ml), starter mikroorganizmi uspostavljaju dominaciju, i na osnovu mehanizma kompetitivnog isključenja, iskorištavanja dostupnih hranljivih materija, ali i inhibitornog efekta na osnovu sniženja pH vrednosti i povećanja nivoa organskih kiselina, one mogućavaju razvoj populacije patogena (Fox i sar., 2000). Time su vijabilnost i produktivnost starter kulture od posebnog značaja budući da smetnje u fermentaciji mogu dovesti do rasta i razmnožavanja patogenih mikroorganizama, ali i mikroflore kvara, ug rožavajući tako mikrobiološku stabilnost proizvoda (Cogan, 2003). Stopa (brzina) redukcije pH (vreme postizanja zahtevane pH vrednosti) je karakteristična za svaki sir i iznosi 5-6 sati za Cheddar i Cottage tip sira, odnosno 12 sati za danske i švajcarske sireve (Fox i sar., 2000). Postizavanje

odgovarajuće pH vrednosti na kraju procesa fermentacije od kritičnog je značaja za redukciju rasta patogena u gotovom proizvodu. Većina mikroorganizama zahteva neutralni pH za optimalni rast, i ne rastu i/ili sasvim slabo rastu na pH vrednostima ispod 5. Kod većine tvrdih sireva, pH gruš na kraju procesa fermentacije iznosi 5,0-5,4, dok kod mekih, kiselokoagulišućih sireva (Cottage, Quarg) i pojedinih varijeteta slatkokoagulišućih sireva (Camembert i Brie) pH vrednost iznosi 4,6. U tabeli 6. date su pH vrednosti pri kojima se odvija rast pojedinih patogenih mikroorganizama. Potrebno je naglasiti da se pH limiti (minimalne i maksimalne vrednosti potrebne za rast) moraju sagledati u sadejstvu sa ostalim faktorima kao što su temperatura, aktivnost vode i koncentracija soli.

Tokom koagulacije dolazi do grušanja proteina mleka (kazein), a mlečna mast, voda i u vodi rastvorljive komponente bivaju zarobljene u mreži

proteina. Koagulacija proteina mleka tokom konverzije mleka u gruš ostvaruje se ograničenom proteolizom selekcionisanih proteinaza (sirilo), acidifikacijom do ostvarene pH vrednosti 4,6 (izoelektrična tačka kazeina), ili kombinacijom acidifikacije (pH oko 5,2) i zagrevanja (90°C). Koagulacija je temperaturno zavisni proces, kako kravlje mleko ne koaguliše na temperaturama nižim od 18°C (Fox i sar., 2000). Koagulacija se obično sprovodi pri temperaturi optimalnog rasta mezofilnih starter kultura koja se kreće u opsegu 32-37°C (Broome i sar., 2003), iako je optimalna temperatura za koagulaciju mleka 40-45°C. Zagrevanje i održavanje temperature mleka na temperaturi potrebnoj za koagulaciju favorizuje rast patogenih mikroorganizama, u slučaju njihovog prisustva u mleku. Ukoliko starter kultura nije aktivna, ili su prisutne rezidue antibiotika, ili pak dolazi do kontaminacije kulture fagama, što za posledicu ima poremećaj u procesu fermentacije, ostvaruje se sredina pogodna za razvoj patogenih mikroorganizama. Minimalne, optimalne i maksimalne temperature rasta pojedinih patogenih mikroorganizama su prikazane u tabeli 6.

Sečenje i zagrevanje gruš. Sadržaj vode u siru najvećim delom je određen opsegom sinerezisa po koagulaciji. Brzina i opseg odvijanja sinerezisa uslovljeni su sastavom mleka, posebno koncentracijom kalcijuma i kazeina, pH surutke, temperaturom zagrevanja gruš, kao i intenzitetom mešanja gruš-surutka mešavine. Sinerezis značajno koncentriše mast i kazein u matriksu gruš za faktor 6-12 u zavisnosti od tipa sira (Fox i sar., 2000). Istiskivanje surutke za posledicu može imati i koncentrisanje patogena usled njihova zarobljavanja u matriksu gruš. Zagrevanje gruš usporava ili u potpunosti inhibira rast starter kulture, potpomaže kontrakciju gruš i posledično istiskivanje surutke. Temperature zagrevanja gruš variraju u odnosu na tip sira i način acidifikacije. Za meke i polutvrde sireve temperature zagrevanja se kreću u opsegu 30-38°C (Banks, 2003; Van den Berg, 2003); za tvrde sireve 38-55°C (Bachmann i sar., 2003); a kod sireva gde se koagulacija mleka odvija kombinacijom acidifikacije i temperature kao što su Cottage, Quark, Queso Blanco, Ricotta, Mascarpone, temperature zagrevanja su dosta visoke i iznose 90°C (Fox, 2004; Lucey, 2003). Ukoliko su temperature zagrevanja ispod 48°C, patogeni mikroorga-

Tabela 7. D-VREDNOSTI PATOGENIH MIKROORGANIZAMA (ICMSF, 1996)
Table 7. EFFECT OF TEMPERATURES (D- VALUES) GREATER THAN 50°C ON PATHOGENS (ICMSF, 1996)

Organizam	Efekat temperature
Patogeni sojevi <i>E. coli</i>	D ₅₀ = 31 min (mleko bivolice) D ₅₅ = 5,5 min (obrano mleko) D ₅₅ = 6,6 min (punomasno mleko) D _{57,2} = 1,3 min (obrano mleko)
<i>L. monocytogenes</i>	D ₅₀ = 31, 67 min (rekonstituisano obrano mleko u prahu) D _{52,2} = 24 min (sterilisano punomasno mleko) D _{52,2} = 37 min (komercijalno sterilno, puno mleko) D ₅₅ = 4,5 min (rekonstituisano obrano mleko u prahu) D _{57,8} = 6,25 min (sirovo obrano mleko) D _{57,8} = 4,83 min (sirovo punomasno mleko)
<i>Salmonella typhimurium</i>	D _{51,4} = 49 min (laboratorijski medijum + 10% SM mleka) D _{54,7} = 7,5 min (laboratorijski medijum + 10% SM mleka) D _{55,2} = 4,7 min (laboratorijski medijum + 10% SM mleka) D _{55,7} = 3,2 min (laboratorijski medijum + 10% SM mleka)
<i>S. aureus</i>	D ₅₀ = 10 min (mleko) D _{54,5} = 27 min (10 rekonstituisano obrano mleko u prahu) D ₅₅ = 3 min (mleko)

nizmi imaju mogućnost rasta sve do momenta kada postignuta kiselost grušā ne inhibira razvoj populacije patogena. Letalni efekti viših temperatura (temperature iznad 48°C) na patogene mikroorganizme date kroz vrednosti decimalne redukcije (D-vrednosti) predstavljeni su u tabeli 7.

Soljenje je zadnja operacija u procesu proizvodnje sireva. Dodata so zaustavlja rast starter kulture i promovise sinerezis. Koncentracija soli i vreme soljenja ima velikog uticaja i na promene pH unutar matriksa sira. Koncentracija soli kod različitih tipova sira iznosi 0,7-7% (Fox i sar., 2000). Zajedno sa pH, redoks potencijalom, i aktivnošću vode deluje inhibitory na patogene i mikroorganizme kvara. Ipak, tokom početne faze, so se ne distribuira podjednako kroz masu grušā; kod površinskog soljenja potrebno je vreme da so difundira i ravnomerno se rasporedi kroz matriks grušā. Većina mikroorganizama, sa izuzetkom *S. aureus* i *L. monocytogenes*, nema sposobnost rasta pri koncentraciji soli od 4% (% w/w). *S. aureus* može rasti i u prisustvu 6,5% NaCl, a *L. monocytogenes* raste u sredini sa 10% NaCl (Cogan, 2003). Kod mnogih varijeteta sireva, koncentracija soli postiže nivo 1,6-2,5%, što je nedovoljno da inhibira rast većine patogena prisutnih u siru.

Efekat zrenja na bezbednost sireva proizvedenih od sirovog mleka.

Tokom čuvanja sireva određeno vreme pod specifičnim uslovima temperature i vlažnosti, razvijaju se brojne biohemijske reakcije odgovorne za

modifikaciju ukusa, arome i teksture. Jedinствене karakteristike pojedinih sireva razvijene kao rezultat procesa zrenja, velikim delom su uslovljene specifičnošću proizvodnog procesa, odnosno fizičko-hemijskim sastavom (prvenstveno sadržaj vode, nivo NaCl, i pH), nivoom rezidualne aktivnosti primenjenog koagulantā, tipom starter kulture, a u mnogim slučajevima i sekundarnim kulturama, bilo dodatim sa namerom kao pomoćne kulture ili kao posledica kontaminacije, tzv. nestarterska mikroflora bakterija mlečne kiseline. Kod većine slatkokoagulišućih sireva zrenje se odvija u periodu od 3 nedelje (Mozzarella) do duže od dve godine (Parmigiano Reggiano ili ekstra zreli Cheddar sir). Zrenje podrazumeva i promenu mikroflora, lizu i smrt ćelija starter kultura, te razvoj nestarterske mikroflora. Aktivnost vode se smanjuje tokom perioda zrenja kako matriks sira gubi vodu, a dodata so vezuje slobodnu vodu čineći je ti-

me nedostupnom za mikroorganizme. Gruyere ima bržu stopu sniženja aktivnosti vode u poređenju sa Emmentaler, pre svega usled faze površinskog soljenja sira tokom zrenja. Aktivnost vode može varirati kroz unutrašnji matriks sira, pri čemu su varijacije veće kod većih sireva kao što je Emmentaler, a manje izražene kod manjih sireva (Appenzeller). Ova pojava se objašnjava temperaturnim gradijentom u siru tokom ranih stadijuma fermentacije, gubitkom vode u periodu zrenja, NaCl gradijentom, ali i mikrobom aktivnošću (Fox i sar., 2000). Aktivnost vode tipična za pojedine sireve je data u tabeli 8.

Patogeni mikroorganizmi su osetljivi na niske vrednosti aktivnosti vode. Kako vrednost aktivnosti vode pada, produžava se trajanje lag faze rasta, generacijsko vreme se produžava i time se smanjuje stopa rasta mikroorganizama. Sirevi sa relativno visokom aktivnošću vode (meki sirevi) podržavaju rast patogenih mikroorganizama. Aktivnost vode ispod 0,92 inhibira rast patogenih mikroorganizama, sa izuzetkom *S. aureus* (tabela 9).

Temperatura pri kojoj se odvija zrenje sireva predstavlja kompromisno rešenje između dva zahteva: 1) potrebe kontrole rasta potencijalno patogenih i mikroorganizama kvara i 2) potrebe promovisanja reakcija zrenja i rasta sekundarne mikroflora. Više temperature omogućavaju brže zrenje intenziviranjem aktivnosti starter i nestarterske mikroflora, ali i rast nepoželjne mikroflora. Zrenje Cheddar sira se odvija pri temperaturi od 6-8°C, Camembert 10-15°C (Fox i sar., 2000). Tokom prve 2-3 nedelje, zrenje Emmentaler se odvija pri temperaturi od oko 12°C, a potom se temperatura povećava na 20-24°C tokom 2-4 nedelje kako bi se omogućio rast propionobakterija i fermentacija laktata do

Tabela 8. AKTIVNOST VODE RAZLIČITIH SIREVA (FOX I SAR., 2000)
Table 8. TYPICAL WATER ACTIVITY VALUES FOR VARIOUS CHEESES (FOX et al., 2000)

Varijetet sira	Aktivnost vode
Parmesan	0,917
Sbrinz	0,940
Gruyere	0,948
Gouda	0,950
Appenzeller	0,960
Tilsiter	0,962
Gorgonzola	0,970
Emmentaler	0,972
Brie	0,980
Camembert	0,982
Cottage	0,988

Tabela 9. MINIMALNA AKTIVNOST VODE POTREBNA ZA RAST
PATOGENIH MIKROORGANIZAMA (ICMSF, 1996)Table 9. MINIMUM WATER ACTIVITY FOR THE GROWTH OF VARIOUS
PATHOGENS (ICMSF, 1996)

Patogen	Minimalna aktivnost vode
<i>E. coli</i>	0,95
<i>Salmonella</i> spp.	0,94
<i>L. monocytogenes</i>	0,92
<i>S. aureus</i>	0,86
<i>Campylobacter</i> spp.	0,99

propionata, acetata i CO₂. Generalno, temperature zrenja su suboptimalne, ali ne i inhibitorne za patogene mikroorganizme.

Ostali faktori koji deluju na rast patogenih mikroorganizama u siru.

Autohtona mikroflora, prirodni inhibitorni mehanizmi sirovog mleka, oksidoredukcionni potencijal, kao i produkcija organskih i masnih kiselina te primena aditiva takođe mogu imati inhibitorni efekat na preživljavanje i rast patogenih mikroorganizama u matriksu sira. Glavni prirodni antimikrobni sistemi mleka su laktoferin, laktoperoksidaza/tiocijanati/hidrogen peroksid sistem (LP sistem), i u manjem opsegu lizozim, specifični imunoglobulini, folat i vit B₁₂ vezujući sisteme. Laktoperoksidaza je indogeni enzim mleka i u prisustvu hidrogen peroksida i tiocijanata ispoljava bakteriostatski efekat na mnoge mikroorganizme (inhibicija u određenom opsegu bakterija mlečne kiseline, kolidforma i različitih patogena), i baktericidni efekat na specifične Gram negativne bakterije (*Pseudomonas* spp. i *E. coli*). Jednom aktiviran, efekat LP sistema je ograničenog trajanja i uslovljen je inicijalnom kontaminacijom mleka, vrstom i sojevima mikroorganizama, ali i temperaturom čuvanja mleka. LP sistem, kao deo integrisanog mehanizma za poboljšanje kvaliteta i bezbednosti mleka, ne može se smatrati zamenom za postojeće tehnološke mere, kao što su hlađenje i termički tretman, već pre komplementarnom alternativom, pre svega u situacijama gde navedene mere nisu moguće.

Efekat kompetitivne mikroflora na preživljavanje i rast patogenih mikroorganizama je demonstriran u nekoliko studija. Wang i sar. (1997) ispituju preživljavanje i/ili rast nekoliko sojeva *E. coli* O157:H7 u sirovom i pasterizovanom mleku pri temperaturi od 5°C, 8°C, 15°C, i 22°C u periodu od 28 dana. Pri 8°C, zabilježen je rast u sirovom mleku za 2-3 log cfu/ml u poređenju sa povećanjem od 4 log cfu/ml

u pasterizovanom mleku. Objašnjenje autori vide u kompeticiji ostvarene od strane autohtone mikroflora sirovog mleka, koja je pri pasterizaciji mleka eliminisana. Autori objavljuju i podatak da *E. coli* O157:H7 može rasti i pri temperaturi od 8°C sa povećanjem populacije za 1-2 log cfu/ml tokom 4 dana. *L. monocytogenes* ima dužu lag fazu i daleko sporije raste (1,9 puta) u Camembert siru proizvedenom od sirovog u poređenju sa analogom proizvedenim od pasterizovanog mleka.

Redoks potencijal predstavlja meru sposobnosti hemijskih i biohemijskih sistema da se oksidiraju (gube elektrone) ili redukuju (stiču elektrone). Tačan mehanizam na osnovu kojeg dolazi do sniženja redoks potencijala u siru nije poznat. Ipak, gotovo sasvim sigurno velikim delom se odnosi na fermentaciju laktoze do mlečne kiseline aktivnošću startera, kao i redukciji male količine kiseonika u mleku do vode. Na osnovu ovih reakcija, sir generalno predstavlja anerobnu sredinu u kojoj su fakultativno ili obligativno anaerobni mikroorganizmi sposobni da rastu.

Preživljavanje i rast patogenih mikroorganizama u siru zavisi i od intrinzič faktora kao što su inicijalni broj mikroorganizama, njihovo fiziološko stanje (faza rasta), karakteristike soja kao što su tolerancija na nizak pH, povišene koncentracije soli, redukovanu aktivnost vode, primenjeni termički tretman i rezistencija na bakteriocine sintetisane od strane bakterija mlečne kiseline.

Zakonitost jeste da kombinacija više inhibitornih faktora koji deluju kao specifične barijere, daleko pre, nego pojedinačni procesni parametri ili fizikohemijske karakteristike matriksa sira, ima veći uticaj na preživljavanje i posledični rast i aktivnost patogenih mikroorganizama. Preživljavanje i rast patogena je favorizovano u sredinama sa visokim sadržajem vode, neutralnim pH i malom koncentracijom soli, a manjim ili većim delom inhibirani u neprijateljskoj atmosferi (visoka temperatura dogrevanja gruš, kao i pro-

duženi period zrenja sa kombinovanim delovanjem niske pH vrednosti, veće koncentracije soli, redukovano (sadržaja vode).

Kvalitativna procena rizika kod pojedinih kategorija sireva proizvedenih iz sirovog mleka

Pregled mikrobioloških hazarda i rizika po zdravlje kod pojedinih kategorija (ekstra tvrdi, švajcarski tip sireva, Cheddar, Feta i Camembert) sireva proizvedenih iz sirovog mleka dat je u tabeli 10.

Za *Campylobacter* spp. je utvrđeno da predstavlja neznatan rizik kod ekstra tvrdih, ali i švajcarskih tipova sira. Ekstra tvrdi sirevi predstavljaju dobro poznatu familiju italijanskih sireva, u stilu parmezana, kao što su Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Romano, Asiago i Montasio, te švajcarski Sbrinz sir. Tipičan proces proizvodnje ovih sireva podrazumeva primenu relativno visokih temperatura dogrevanja gruš (>45°C) i dug period zrenja što rezultira u niskom sadržaju vode, generalno manje od 35%. Švajcarski sirevi se na osnovu konzistencije klasifikuju kao tvrdi ili polutvrdi sirevi. Karakterišu se propionskom fermentacijom koja vodi formiranju okaca i mehaničkih otvora, a na osnovu produkcije CO₂, odnosno nepotpune fuzije komadića gruš. Rizik prisustva *Campylobacter* spp. u Cheddar, Feta i Camembert siru nije analiziran. *Campylobacter* spp. se karakteriše veoma specifičnim zahtevima rasta: mikroaerofilna priroda, temperatura rasta 32-45°C, kao i nemogućnost preživljavanja u slabo kiselim sredinama, ili u prisustvu soli u koncentraciji većoj od 2%. Na osnovu postavljenih zahteva, matriks Cheddar, Feta i Camembert sira ne podržava rast dotičnog mikroorganizma.

Za *E. coli* je utvrđeno da predstavlja nizak rizik kod ekstra tvrdih i švajcarskih tipova sireva, ali se zato utvrđuje visok rizik usled nalaza *E. coli* u Cheddar, Feta i Camembert siru kako procesni parametri i generisano fizikohemijsko okruženje istih sireva ne dovodi do značajne redukcije broja.

Visoke temperature dogrevanja gruš i dug period zrenja gde se na osnovu uspostavljenih fizikohemijskih parametara generiše dosta nepovoljna sredina koja ne podržava rast *Salmonella* spp., obrazlažu činjenicu da se salmonele smatraju neznatnim rizikom kod iste kategorije sireva. Sudbina *Salmonella* spp. u Cheddar, Feta

i Camembert siru nije analizirana. Generalno, populacija salmonela se povećava tokom početnih faza proizvodnje, da bi u kasnijem toku tokom zrenja sireva došlo do redukcije broja.

S. aureus predstavlja neznatan do nizak rizik kod sireva proizvedenih iz sirovog mleka. Ipak, procenu je potrebno obaviti pažljivo, i voditi računa o početnom nivou kontaminacije sa *S. aureus*, kao i mogućnosti rasta i produkcije enterotoksina tokom faze fermentacije. Neadekvatno hlađenje mleka, te poremećaji u fermentaciji (nema brzog razvoja acidifikacije i uspostavljanja niske pH vrednosti od sušinskog značaja za restrikciju rasta i produkciju enterotoksina) podržavaju rast i razvijanje kritične populacije ($>10^5$ cfu/ml), odnosno broja potrebnog da se produkuju dovoljne količine termostabilnog enterotoksina kako bi došlo do manifestacije bolesti.

L. monocytogenes predstavlja neznatan do nizak rizik kod sireva proizvedenih iz sirovog mleka, ali ujedno i visok rizik ukoliko se razmatra oseljiva populacija ljudi (mlade osobe, stari ljudi, imunokompromitovane individue, trudnice) i to u kategoriji švajcarskog Appenzeller, Tilsiter i Teta de Moine, Camembert i Feta sira. *L. monocytogenes* može rasti i pri niskim temperaturama i u širokom pH opsegu, pri koncentraciji soli 10-14%, a toleriše i nisku aktivnost vode. Ovakva tolerancija omogućava preživljavanje *Listeria* spp. u mnogim tipovima sira.

ZAKLJUČAK

Premda sirevi od sirovog mleka predstavljaju svega 10% od ukupne proizvodnje, čak u 70% slučajeva su implicirani u slučajevima alimentarnih oboljenja dovedenih u vezu sa konzumacijom sireva. Kao najčešći uzročnici identifikuju se *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *L. monocytogenes* i *E. coli*, a u najvećem broju slučajeva kao vehikulum se potvrđuju tipično sirevi sa visokim sadržajem vode (meki i sveži sirevi).

Proizvodnja sireva se može sagledati sa aspekta složene interakcije nekoliko fizičkih, biohemijskih i bioloških procesa. Svaki od ovih procesa ili uslova ima uticaja na preživljavanje i/ili rast mikroorganizama u matriksu sira. Međudelovanje ovih parametara određuje potencijal preživljavanja, ras-

ta ili smrti, a kombinovani efekat ovih faktora često je veći nego suma zasebnih faktora. Najznačajnije intrinzične faktore predstavljaju sadržaj vode, pH, kiselost, raspoloživost hranjivih materija, redoks potencijal, prisustvo antimikrobnih komponenata, ali i aktivnost kompetitivne mikroflore. Ekstrinzične faktore čine vreme i temperatura čuvanja mleka, procesni parametri, istorija proizvoda i tradicionalna upotreba. Svi ovi uslovi objedinjeno diktiraju potencijal preživljavanja, rasta i/ili supresije rasta i inaktivacije patogenih mikroorganizama. Faktore koji imaju najveći uticaj na mikrobiološku bezbednost sireva proizvedenih iz sirovog mleka čine mikrobiološki kvalitet sirovog mleka, faza acidifikacije, vreme i temperatura dogrevanja grušta, kao i temperatura i period trajanja faze zrenja sireva. Efekat koji navedeni faktori imaju na rast i preživljavanje patogenih mikroorganizama u siru varira značajno u odnosu na pojedine sireve, koje na osnovu specifičnosti vezane za njihove inheretne karakteristike i procesne parametre moramo smatrati zasebnim entitetima.

Usvajajući kvalitativni pristup procene rizika, *C. jejuni/coli*, *E. coli* (EHEC), *Salmonella* spp., *S. aureus* i *L. monocytogenes* predstavljaju neznatan do nizak rizik pri konzumiranju ekstratvrđih i švajcarskih tipova sireva. Prisustvo *L. monocytogenes* u švajcarskim sirevima Appenzeller, Tilsiter i Tete de Moine u odnosu na osetljivu populaciju ljudi se rangira kao visok rizik. Nalaz *E. coli* (EHEC) u Cheddar, Feta i Camembert siru se karakteriše kao visok rizik, kao i *L. monocytogenes* (u odnosu na osetljivu populaciju) kod Feta i Camembert sira.

LITERATURA

- Bachmann, H.P., Bütikofer, U. Isolino, D. (2003) Cheese - Swiss-type cheese. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of Dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 363-371.
- Banks, J.M. (2003) Cheddar-type cheeses. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 356-363.
- Beuvier, E., Buchin, S. (2004) *Raw milk cheeses in: Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 1*. Elsevier, London, UK.
- Breidt, F., Fleming, H.P. (1998) Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl Environ Microbiol.* 64(9): 3159-3165.

- Broome, M.C., Powell, I.B. Limsowth, G.K.Y. (2003) Starter cultures: specific properties. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 269-275.
- CODEX (CAC/GL 30, 1999) Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357CXG_030e.pdf.
- Cogan, T.M. (2003) Public health aspects. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 314-320.
- Fox, P.F. (2004) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1 General Aspects*. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. eds. 3rd, Elsevier Academic Press.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000) *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers.
- Gimenez, B., Dalgaard, P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* 96(1):96-109.
- ICMSF. (1996) *Microorganisms in Food 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. eds. 1 ed, Blackie Academic and Professional, London.
- IDF (2005) *The World Market for Cheese 1995-2004, Sixth Edition - E-Form*. Report No. Bulletin of the IDF No 402/2005, International Dairy Federation.
- Hugo, W.B. eds. *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes*. Academic Press, London pp 219-237.
- Lortal, S. (2005) French raw milk cheeses: what's new? IAFP conference.
- Lucey, J.A. (2003) Acid and acid/heat coagulated cheese. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 350-356.
- Schaellibaum, M. (2005) Hard Swiss cheeses - Approaching Safety. In: IAFP August 14-17, 2005, Baltimore, Maryland.
- Van den Berg. (2003) Dutch-type cheeses. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science, London, pp. 371-378.
- Zottola, E.A. and Smith, L.B. (1991) Pathogens in cheese. *Food Microbiology* 8(3):171-182.
- Wang, G., Zhao, T., Doyle, M.P. (1997) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurised and pasteurised milk. *J Food Prot* 60(6):610-613.

SUMMARY

MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF RAW MILK CHEESES

Bulajić Snežana, Mijačević Zora

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

Microbiological risk assessment of raw milk cheeses must be performed in the framework of complex interplay between several intrinsic and extrinsic parameters which dictate the potential for bacterial pathogens to grow, persist and/or decline in cheeses. In this paper, we discuss the main components of microbiological risk assessment including the incidence and prevalence of foodborne pathogens in raw milk cheeses, effect of manufacturing steps during cheesemaking, physicochemical characteristics of individual cheese matrix (pH, salt content, and water activity) and the growth requirement of specific foodborne pathogen.

Key words: microbiological risk assessment • raw milk cheeses