

Mikroorganizmi - uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda

Dubravka Samaržija, Marijana Podoreški, Sanja Sikora,
Andrea Skelin, Tomislav Pogačić

Revijalni prikaz - Review

UDK: 579.676

Sažetak

Mikroorganizmi - uzročnici kvarenja svojim prisustvom u mlijeku i mliječnim proizvodima mijenjaju njihova primarna svojstva i osobine. Nastale promjene, koje se događaju prije i nakon tehnološke obrade, uvjetovane su brojem i vrstom mikrobnih uzročnika. Najčešće se te promjene odnose na samo jednu pogrešku okusa, mirisa, arome ili konzistencije mliječnog proizvoda. Međutim, u slučajevima većih mikrobnih kontaminacija, sve te pogreške mogu se dogoditi istovremeno. Osim toga, svaka i najmanja promjena, uvjetovana prisutnošću mikrobnih uzročnika kvarenja, umanjuje prehrambenu vrijednost proizvoda. Usprkos značenju koje ima za ukupnu kvalitetu, kontrola mikroorganizama uzročnika kvarenja za mljekarsku industriju nije obvezna, te ih u proizvodima kontrolira zanemariv broj proizvođača. U radu je opisan neželjeni učinak mikroorganizama uzročnika kvarenja na kvalitetu sirovog, pasteriziranog i steriliziranog mlijeka, fermentiranih mlijeka, vrhnja, maslaca i sira s namjerom da se potakne važnost i značenje njihove kontrole u mljekarskoj industriji.

Ključne riječi: mikroorganizmi - uzročnici kvarenja, mlijeko, mliječni proizvodi

Uvod

U većini slučajeva, mikroorganizmi - uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda za ljude su neškodljiva skupina mikroorganizama (Bergey 's Manual, 1986.; Magan i sur., 2001.). Međutim, prisustvo te skupine mikroorganizama u većoj ili manjoj mjeri uvijek umanjuje kvalitetu tih proizvoda te je uzrokom značajnih ekonomskih gubitaka (Varnam i Sutherland, 1996.a; Garbutt, 1997.; Randolph, 2006.). Umanjena kvaliteta posljedica je prisutnosti različitih kemijskih i biokemijskih spojeva

koji mijenjaju izgled, miris, teksturu, okus i aromu proizvoda. Tvorba tih spojeva uvjetovana je metaboličkom razgradnjom pojedinih sastojaka proizvoda djelovanjem samih mikroorganizma uzročnika kvarenja, ili djelovanjem njihovih enzima (Sorhaung i Stepainak, 1997.; Walstra i sur., 1999.). Većina mikrobnih vrsta - uzročnika kvarenja je prilagodljive prirode, a pošto su kontaminaciji podjednako podložni sirovo mlijeko kao i mliječni proizvodi, kritička procjena i kontrola mikrobnih uzročnika kvarenja sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda jedini su način kojim osiguravamo njihovu kvalitetu (White, 1998.; Braun i sur., 1999.; Mostert i Jooste, 2002.; Delacroix-Buchnet, 2004.). Iz mlijeka i mliječnih proizvoda najčešće izolirani uzročnici kvarenja su Gram-negativne bakterije *Pseudomonas* spp. i koliformni organizmi. Gram-pozitivne sporetvorne bakterije, *Bacillus* i *Clostridium* spp., bakterije mliječne kiseline, korinebakterije te kvasci i plijesni, po značenju za ukupnu kvalitetu mliječnih proizvoda, druga su izolirana skupina mikroorganizama koja može biti uzročnikom njihovog kvarenja (Marth, 1998.; Frank i Hassan, 2002.).

Svrha ovog rada bila je opisati promjene osobina i svojstava mlijeka i mliječnih proizvoda uzrokovane mikroorganizmima - uzročnicima kvarenja u cilju poticanja opravdanosti njihove stalne kontrole u mljekarskoj industriji.

Sirovo mlijeko

Broj i vrsta mikroorganizama prisutnih u sirovom mlijeku određena je sezonom, higijenskim uvjetima proizvodnje, hranidbom i sustavom hlađenja. Tako, ovisno o čimbenicima, ukupan broj mikroorganizama u svježe pomuženom mlijeku može biti od svega nekoliko tisuća, do više od 10^6 /mL (Frenk i Hassan, 2002.). Sirovo mlijeko, neposredno nakon higijenski provedene mužnje, uvijek sadrži manje od 5 000 mikroorganizama/mL. Dominantnu populaciju tako proizvedenog mlijeka uglavnom čine *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Corynebacterium* spp. te zanemariv broj ostalih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Causin i Bremley, 1985.). Međutim, hlađenje mlijeka odmah nakon mužnje mijenja prirodno prisutnu mikrobnu populaciju, dok se istovremeno u neohlađenom mlijeku mijenja jedino njihova razina kontaminacije. Neohlađeno mlijeko i/ili ohlađeno na sobnu temperaturu ($\geq 13^\circ\text{C}$) sadrži uglavnom Gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* spp. Suprotno, u ohlađenom mlijeku ($4 - 6^\circ\text{C}$) dominantne Gram-pozitivne bakterije zamjenjuju se Gram-negativnim i Gram-pozitivnim

psihrotrofnim bakterijama (Causin i Bremley, 1985.; Lafarge i sur., 2004.). Psihrotrofna mikrobna populacija potječe uglavnom iz okoline gdje se mlijeko proizvodi, od higijenski neispravne vode i nedovoljno čistih muznih uređaja, opreme za transport i pohranu mlijeka (Gaunot, 1986.; Suhren, 1989.; Munsch-Alatossava i sur., 2005.). Brzina kojom će te bakterije doseći razinu kontaminiranosti od $\geq 10^6$ /mL i uzrokovati značajne promjene sirovog mlijeka, ovisna je o njihovu početnom (inicijalnom) broju neposredno nakon mužnje. Međutim, čak i niska početna razina kontaminiranosti tim bakterijama ($< 50\ 000$ /mL) prije pasterizacije bit će $> 10^7$ /mL, ukoliko je mlijeko 3 - 4 dana pohranjeno na temperaturi od 4 - 5 °C (Causin, 1982.; Sorhaug i Stepianiak, 1997.). Iz razloga što ta mikrobna skupina tvori termostabilne hidrolitičke enzime, fosfolipaze, proteinaze i lecitinaze, od kojih su neki stabilni i nakon zagrijavanja na 100 °C/30 minuta, i pasterizirano mlijeko kvalitetom postaje neprihvatljivo za potrošnju, kao i za proizvodnju mliječnih proizvoda visoke kvalitete (Fox, 1981.; McKellar, 1989.; Dogan i Boor, 2003.; Hantsis-Zacharov i Halpern, 2007.). Posljedica njihove enzimatske aktivnosti u ohlađenom sirovom mlijeku su neželjene promjene mliječne masti, bjelančevina i lecitina (Fox i Stepainak, 1983.; Braun i sur., 1999.; Koka i Weimer, 2001.). Strani okus sirovog mlijeka, koji se opisuje kao gorak, okus po voću, kvascima ili kao metalan okus, posljedica je rasta nesporogenih proteolitičkih bakterija, *Proteus*, *Pseudomonas* (posebice *Pseudomonas fluorescens*), *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia* i *Alcaligenes* spp. (Marshall, 1982.; Muir, 1996.; Magan i sur., 2001.). Iz sirovog mlijeka, *Bacillus* spp. su najčešće izolirane Gram-pozitivne sporotvorne psihrotrofne bakterije (Suhren, 1989.; McGuiggan i sur., 1994.). Spore tih bakterijskih vrsta preživljavaju temperature pasterizacije i sterilizacije i na taj način smanjuju održivost mlijeka pohranjenog na temperaturi > 6 °C (Svensson i sur., 2004.). Međutim, pogreška okusa dogodit će se tek kada broj tih bakterija u sirovom mlijeku dosegne razinu od $\geq 10^7$. Kontaminacija sirovog mlijeka psihrotrofnim bakterijama, zbog njihove prilagodljive prirode, niti uz najbolju proizvođačku praksu ne može se u potpunosti izbjeći. Međutim, hlađenjem mlijeka na temperaturi od 2 °C, umjesto na temperaturama između 4 i 7 °C koje su u praksi najčešće korištene temperature hlađenja, statistički se značajno usporava njihov rast, proteolitička te lipolitička aktivnost (Kumarsan i sur., 2007.). Koliformne bakterije, premda neke od tih vrsta pripadaju skupini psihrotrofnih bakterija, druga su skupina Gram-negativnih bakterija koja vrlo često kontaminira sirovo mlijeko. Njihovo prisustvo u mlijeku indicira na fekalnu kontaminaciju te

kontaminaciju zemljom i vodom. Kada su koliformne bakterije prisute u velikom broju uzrokuju pogrešku izgleda i okusa mlijeka radi tvorbe plina i povećanja kiselosti. Tipični predstavnici te skupine bakterija su *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* i *Serratia* spp. (Walker, 1988.; Ledford, 1998.). Kako neke vrste koliformnih bakterija pripadaju skupini enteropatogenih bakterija, njihovo prisustvo u sirovom mlijeku je potencijalno opasno i za zdravlje čovjeka (Desmarcheller i Fegan, 2002.).

Vrste Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija u sirom mlijeku i njihova proteolitička i lipolitička aktivnost navedene su u tablici 1.

Tablica 1: Gram-negativne psihrotrofne bakterije u sirovom mlijeku i njihova proteolitička i lipolitička aktivnost (modificirano prema Muir, 1996.)

Table 1: Psychrotropic Gram negative bacteria in raw milk and their proteolytic and lipolytic activity (modify according to Muir, 1996)

Rod Genus	Izolirani rodovi % Isolates genus %		Enzimatska aktivnost % Enzyme activity %		
	Sirovo mlijeko farma Raw milk farm	Sirovo mlijeko mljekara Raw milk creamery	Lipolitička Lipolytic	Proteolitička Proteolytic	Lipolitička i proteolitička Lipolytic and proteolytic
<i>Pseudomonas</i> (fluorescentni) (fluorescing)	50,5	33,5	5	2	71
<i>Pseudomonas</i> (ne-fluorescentni) (non-fluorescing)	31,5	44,1	32	1	11
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Aeromonas</i>	15,8	8,5	2	2	31
<i>Acinetobacter</i>	0,0	6,2	5	9	36
<i>Flavobacterium</i>	1,3	4,0	6	6	24
<i>Alcaligenes</i>	0,9	1,5	0	0	92

Ukupan n uzoraka = 840 / Total n samples = 840

Pasterizirano i sterilizirano mlijeko

Ispravno provedena pasterizacija i sterilizacija eliminira Gram-negativne psihrotrofne bakterije koje su najčešći uzročnici kvarenja sirovog, pasteriziranog i steriliziranog mlijeka (Rogelj i Bogović, 1990.; Elmher, 1998.; Eneroth i sur., 2000.). Između psihrotrofne mikrobne populacije *Pseudomonas* spp. najčešće su izolirane vrste njihovog kvarenja (Muir, 1996.; Eneroth i sur., 2000.; Dogan i Boor, 2003.). Kvarenje pasteriziranog i steriliziranog mlijeka uvjetovano je rastom tih bakterija u sirovom mlijeku prije toplinske obrade i/ili aktivacijom njihovih termorezistentnih enzima nakon toplinske obrade (Nelson, 1985.; Craven i sur. 1994.; Eneroth i sur., 2000.). Također, kvarenje toplinski obrađenog mlijeka psihrotrofnim mikroorganizmima može biti i posljedica naknadne kontaminacije (Rogelj i Bogović, 1990.; Eneroth i sur., 1998.; Eneroth i sur. 2000.). U slučajevima veće kontaminacije sirovog mlijeka psihrotrofnim bakterijama ($\sim 10^6$ /mL), vrijeme održivosti pasteriziranog mlijeka može biti kraće i do 14 dana od očekivanog (Sorhaug i Stepainak, 1997.; Aaku i sur., 2004.). Suprotno, psihrotrofne termorezistentne Gram-pozitivne bakterije preživljavaju toplinsku obradu mlijeka i nastavljaju svoj rast u ohlađenom mlijeku (Larsen i Jorgensen, 1997.; Huck i sur., 2007.). Za tri vrste, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans* i *Bacillus mycoides* utvrđeno je da su sposobne brzo rasti i razmnožavati se na temperaturama hladionika te tako mogu postati glavni uzročnici kvarenja mlijeka (Meer i sur. 1991.; Muir, 1996.; Lin i sur., 1998.). *B. cereus* u pasteriziranom mlijeku je dominantna vrsta kada je temperatura hlađenja viša od 7 °C, a vrijeme pohrane mlijeka duže (McGuiggan i sur., 1994.; TeGiffel i sur., 1997.; Eneroth i sur., 2000.). Povećanje temperature pohrane ima značajan utjecaj na povećanje broja *B. cereus* bakterije u pasteriziranom mlijeku (tablica 2). Obično je prisutnost te bakterijske vrste u pasteriziranom mlijeku češća tijekom ljetnog (svibanj - listopad), u odnosu na zimski period, a prosječno utvrđeni broj spora je 2,6 - 3,0 \log_{10} /mL (Larsen i sur., 1997.; López-Pedemonte i sur., 2003.). Broj *B. cereus* veći od 10^6 /mL uzrokuje promjenu okusa pasteriziranog mlijeka u nečisti, voćni, gorki, užegli okus te okus po kvascima, a može biti i uzročnikom njegovog slatkog zgrušavanja (Meer i sur., 1991.; Rukure i sur., 2001.). Osim toga, *B. cereus* tvori nekoliko enterotoksina koji mogu izazvati diareju i visoku temperaturu kod ljudi nakon konzumacije pasteriziranog mlijeka (Christiansson, 2002.; Svenson i sur., 2005.). *Bacillus coagulans* i *Bacillus stearothermophilus* su najtolerantnije sporotvorne vrste na temperaturno-vremenski režim sterilizacije, mogu

uzrokovati kiselu koagulaciju i siru sličan okus i miris steriliziranog mlijeka. Slatka koagulacija steriliziranog mlijeka posljedica je rasta *Bacillus subtilis*. Međutim, ukoliko se ne radi o izuzetno velikom broju, *Bacillus* spp. nemaju utjecaj na održivost pasteriziranog i steriliziranog mlijeka, kao niti na promjenu okusa (Collins, 1981.; Grififiths i sur., 1988.; IDF Bulletin, 2000.) U steriliziranom mlijeku termostabilne proteinaze psifrotrofnih Gram-negativnih bakterija hidrolizom kazeina izazivaju destabilizaciju micela kazeina i koagulaciju sličnu koagulaciji himozinom (Law i sur., 1977., Mitchel i Marshall, 1989.; Humamoto i sur., 1993.). Na osnovu utvrđenih rezultata istraživanja kvalitete mlijeka, općenito, može se s velikom vjerojatnosti zaključiti da su gotovo sve neželjene promjene okusa, mirisa i prehrambene vrijednosti pasteriziranog i steriliziranog mlijeka uvjetovane psihrotrofnim bakterijama. Te pogreške nastaju zbog specifične enzimske ekstracelularne razgradnje proteina i masti koja se događa zbog rasta psihrotrofne Gram-negativne i Gram-pozitivne mikrobne populacije u sirovom mlijeku, a koja se nastavlja i nakon njegove toplinske obrade (Law, 1979.; McGuiggan i sur., 1994.; Braun i sur., 1999.; Boor i Murphy, 2002.).

Tablica 2: Rast *B. cereus* ($\log \text{cfu mL}^{-1}$) u pasteriziranom mlijeku pohranjenom na različitim temperaturama (izvor: Christiansson, 2002.)

Table 2: Growth of *B. cereus* ($\log \text{cfu mL}^{-1}$) in pasteurized milk at various storage temperatures (sources: Christiansson, 2002)

Dani pohrane Day of storage	Temperatura pohrane / Storage temperature			
	6 °C	7 °C	8 °C	9 °C
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	0,0	1,0
5	-	-	1,0	2,4
6	-	0,5	2,0	3,7
7	0,2	1,3	3,0	5,0
8	0,6	2,0	4,0	nd*
9	1,0	2,8	5,0	nd*
10	1,4	3,5	nd*	nd*

nd* - nije utvrđeno / nd* - not determined

Fermentirana mlijeka

Fermentirana mlijeka radi niske pH vrijednosti medija (~ 4,2 - 4,6) nisu pogodna sredina za većinu bakterija uzročnika kvarenja (Rosslund i sur., 2005.; Robinson i sur., 2002., 2006.). Kisela sredina u fermentiranom mlijeku, međutim, može favorizirati rast kvasaca i plijesni koji mijenjaju izgled i okus proizvodu (Fleet, 1990.; Jordano i sur., 1991.; Robinson i sur., 2002.). Plijesni *Alternaria* spp. ili *Aspergillus* spp. uzročnici su promjene izgleda čvrstog jogurta pojavom bijelih ili plavih kolonija u formi filma ili prerastaju cijelu površinu proizvoda. Promjene okusa koji se opisuju kao užegli i okus po siru ili gorak okus, posljedica su hidrolitičkog djelovanja njihovih enzima na mliječnu mast i protein (Rašić i Kurman, 1978.; Robinson i sur., 2006.). Suprotno, te plijesni rijetko su uzročnici kvarenja tekućeg jogurta zbog nedovoljno aerobne sredine tekućeg jogurta. Nepoželjnu promjenu mirisa i okusa te smanjenje kvalitete u fermentiranom mlijeku mogu uzrokovati i plijesni, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida* te *Geotrichum* spp. (Jordano i sur., 1991.; Gilliland, 1998.; Magan i sur., 2001.). Kvasci *Saccharomyces* spp., *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* mogu rasti u čvrstom i tekućem fermentiranom mlijeku, neovisno imaju li ili nemaju sposobnost fermentacije laktoze (Walker, 1988.; Tamime i Robinson, 2007.). Kvarenje fermentiranog mlijeka postaje vidljivo kad populacija kvasaca dosegne razinu od 10^5 - 10^6 organizama/g (Seiler, 2002.). Prvi vidljivi znak kontaminacije fermentiranog mlijeka je bubrenje pakovine uzrokovano prekomjernom tvorbom plina. Na površini proizvoda pojavljuju se prozirne, vlažne kolonije kvasaca, a okus i miris proizvoda ima izrazito obilježje po kvascima. Kod čvrstih proizvoda dolazi i do pojačane sinereze (Rašić i Kurman, 1978.; Magan i sur., 2001.; Viljoen i sur., 2003.). U slučajevima znatne kontaminacije kvascima može se dogoditi i pucanje pakovine fermentiranog mlijeka. Prisutnost kvasaca i plijesni u fermentiranom mlijeku uglavnom je posljedica naknadne infekcije proizvoda preko nedovoljno čistih uređaja te kontaminiranog zraka mljekare. Uzrok kontaminaciji kvascima i plijesnima vrlo često su i kontaminirani dodaci, prvenstveno voće, koji se koriste u proizvodnji voćnih varijanti fermentiranog mlijeka (Robinson i sur., 2002.; Robinson i sur., 2006.).

Vrhnje i maslac

Mikrobna populacija uzročnika kvarenja vrhnja i maslaca prvenstveno je ovisna o mikrobnjoj populaciji sirovog mlijeka (Spreer, 1998.a, 1998.b;

Wilbey, 2002.). Zato je osnovni preduvjet za uspješnu proizvodnju vrhnja i maslaca dobra bakteriološka kvaliteta sirovog mlijeka i što kraće vrijeme njegove pohrane na niskim temperaturama (2 - 6 °C). Naime, zbog visokog postotka mliječne masti koju ti proizvodi sadrže, bilo koja mikrobna pogreška sadržana u mliječnoj masti postaje u vrhnju i maslacu višestruko izražena (Varnam i Sutherland, 1996.a; Varnam i Sutherland, 1996.b). Osim toga, neovisno koji način proizvodnje vrhnja i maslaca se koristi, tehnologija proizvodnje u usporedbi s proizvodnjom pasteriziranog i/ili steriliziranog mlijeka je višestruko kompleksnija. Razlog kompleksnije proizvodnje su odvojene tehnološke operacije koje se koriste u proizvodnji tih proizvoda te je mogućnost mikrobne kontaminacije znatno veća (Spreer, 1998.a; Spreer, 1998.b). Za najkritičnije točke u proizvodnji smatraju se vrijeme nakon toplinske obrade i promjene temperatura tijekom njihove pohrane i distribucije (Wilbey, 2002.). Kako se danas u proizvodnji vrhnja i maslaca koristi gotovo isključivo ohlađeno mlijeko, dominantni uzročnici kvarenja i smanjene održivosti tih proizvoda su također psihrotrofni mikroorganizmi. *Pseudomonas* spp. radi tvorbe termostabilnih enzima lipaza i proteinaza uzrokuju kvarenje vrhnja i maslaca hidrolitičkom razgradnjom proteina i mliječne masti (Causin, 1982.; Cox, 1993.; Spreer, 1998.; Marth, 1998.; McPhee i Griffiths, 2002.). *Pseudomonas fragi* ili rjeđe *Pseudomonas fluorescens* uzročnici su vrlo česte pogreške užeglog okusa tih proizvoda zbog svoje lipolitičke sposobnosti razgradnje masti do slobodnih masnih kiselina. *Pseudomonas putrefaciens* može rasti na površini maslaca na temperaturi od 4 - 7 °C i nakon 7 - 10 dana uzrokovati miris po truleži zbog oslobađanja određenih organskih kiselina, posebice izovalerične kiseline te površinske pjegavosti na maslacu (Jay, 1992.; Koka i sur., 2001.; Munsch-Alatossava i sur., 2005.). Učinak naknadne kontaminacije psihrotrofnim mikroorganizama na održivost pasteriziranog vrhnja prikazuje tablica 3.

Neželjeni okus vrhnja i maslaca koji se opisuje kao užegao, po sladu ili atipičan te crnu diskoloraciju maslaca uzrokuju plijesni *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Penicillium* i *Cladosporium* (Varnam i Sutherland, 1996.a, 1996.b; Kornacki i Flowers, 1998.; Angelidis i sur., 2005.). Gorak okus vrhnja može biti uzrokom prisutnosti brojnih vrsta mikroorganizama. Međutim, zna se da je taj okus rezultat mikrobne proteolize koja podiže razinu hidrofobnih peptida i/ili određenih glicerida nastalih lipolitičkom razgradnjom masti

Tablica 3: Utjecaj naknadne kontaminacije psihrotrofnim bakterijama na održivost pasteriziranog vrhnja (modificirano prema McPhee i Griffiths, 2002.)

Table 3: Effect of postpasteurization contamination by psychrotrophic bacteria on shelf-life of cream (modify according to McPhee i Griffiths, 2002)

Održivost vrhnja / Shelf-life of cream					
Nekontaminirano / No contamination			Kontaminirano / Contaminated		
°C	Dani Days	BP/ PC*/cfu mL ⁻¹	°C	Dani Days	BP/ PC*/cfu mL ⁻¹
3 - 5	49 - 28	4 x 10 ³	3 - 5	11 - 6	7 x 10 ⁵
7 - 10	35 - 20	7 x 10 ⁵	7 - 10	7 - 5	5 x 10 ⁷

BP/ PC* - Broj psihrotrofnih bakterija / Psychrotroph count

Tablica 4: Usporedba mikrobnog rasta u vrhnju bakteriološki dobre i loše kvalitete, pohranjenom na 5 °C (modificirano prema Wilbey, 2002.)

Table 4: Comparison of microbial growth in good and poor cream held at 5 °C (modify according to Wilbey, 2002)

Dani Days	Kvalitetno vrhnje / Good cream 5 °C		Nekvalitetno vrhnje / Poor cream 5 °C	
	UB/TC*	K/C**	UB/TC*	K/C**
0	1,9	-	20,0	-
1	2,1	-	20,0	-
2	3,2	-	25,0	+
3	2,9	-	25,0	++
4	2,1	-	67,0	+++
6	2,5	-	560,0	+++
	prihvatljivo		neprihvatljivo	

UB/TC* - Ukupan broj bakterija / Total bacterial count

K/C** - Koliformne bakterije / Coliforms

(Wilbey, 2002.). Uzročnici te pogreške, osim *Proteus* spp. i drugih Gram-negativnih bakterijskih vrsta, mogu biti i neke vrste kvasaca i plijesni (Seiler, 2002.; Boer i sur., 2003.) Suprotno, mikrobne pogreške vrhnja i maslaca, neovisno o složenosti tehnološkog procesa, su zanemarive kada su ti proizvodi proizvedeni od sirovog mlijeka koje je sadržavalo manje 20 000 bakterija/mL (Kornacki i Flowers, 1998.). Usporedba mikrobnog rasta u vrhnju proizvedenom od kvalitetnog mlijeka i mlijeka slabe bakteriološke kvalitete prikazana je u tablici 4. Početno slabija mikrobna kvaliteta vrhnja (velik broj bakterija), nakon 5 - 6 dana pohrane uzrokom je prekiselog i nečistog mirisa i okusa finalnog proizvoda.

Sir

Vidljive mikrobne pogreške sira događaju se u momentu kada je u siru, zbog dominantnosti mikroorganizama uzročnika kvarenja, umanjena i/ili u potpunosti zaustavljena aktivnost mikroorganizama iz sastava mikrobnih kultura (autohtone, nedefinirane, definirane). U praksi, proces kvarenja sira nastaje zbog samo nekoliko, a najčešće zbog samo jedne mikrobne vrste. Ovisno o vrsti i broju mikroorganizama, pogreška sira može se odnositi samo na pogrešku mirisa, okusa ili teksture tijesta sira, ili na sve pogreške istovremeno (Walstra i sur., 1999.a; Cogan, 2002.; Bintis i Papademas, 2002.). Opseg bilo koje pojedinačne, ili svih pogrešaka istovremeno, može biti jače ili slabije izražen, ali sir je uvijek slabije kvalitete. Razlog tome je činjenica da svaki sir u svakom momentu sadrži veliki broj enzima različitih mikrobnih vrsta, ali dominantnost određene vrste, osim trenutnih uvjeta u mediju, određuju metabolički fenomeni, koji za neke mikrobne vrste znače stimulaciju, a za druge inhibiciju rasta (Garbutt, 1997.; Fox i sur., 2000.; Choisy i sur., 2000.; Makalar i sur., 2003.). Obzirom na brojnost različitih vrsta sira (> 2000) koje se međusobno mogu i značajno razlikovati, vrlo je teško jednoznačno opisati mikrobne pogreške koje se odnose na sve sireve (Spreer, 1998.c; Walstra, 1999.; Walstra, 1999.b; Corsetti i sur., 2001.). Tako su jedino mikrobne pogreške zgrušavanja mlijeka zajedničke svim vrstama, a manifestiraju se produženim vremenom zgrušavanja i umanjenom kvalitetom sirnog gruša. Uzročnici te pogreške uglavnom su psihrotrofne Gram-negativne bakterije, najčešće *Pseudomonas* spp. i/ili njihovi termostabilni proteolitički enzimi (Fox, 1981.; McSweeney, 1997.; McPhee i Griffiths, 2003.). Enzimi tih bakterija ostaju u sirnom grušu te kasnije uzrokuju atipičan okus, posebice polutvrdih i tvrdih sireva koji dugo zriju (Fox, 1981.). Međutim, mikrobne lipaze, u odnosu na proteinaze, odgovornije su za neželjeni okus sira budući se adsorbiraju na masne globule u

siru pa se neželjena lipoliza odvija do kraja zrenja sira, dok se proteinaze velikim dijelom izlučuju sirutkom (Fox i Stepaniak, 1983.; Stead, 1986.; Cox, 1993.). Sporije stvaranje mliječne kiseline i zbog toga produženo vrijeme koagulacije proteina pripisuje se i kontaminaciji mlijeka koliformnim bakterijama. *Bacillus*, *Micrococcus*, *Microbacterium* i *Enterococcus* spp. bakterije koje preživljavaju uobičajenu temperaturu pasterizacije (72 °C/15 sekundi), druga su sljedeća skupina mikroorganizama koja može uzrokovati pogrešku produženog zgrušavanja mlijeka te umanjiti kvalitetu gruš (Johnson, 1998.; Caceres i sur., 1997.; Rukure i Bester, 2001.; Giraffa, 2003.; Čanžek Majhenič, 2006.). Kako ta skupina bakterija vrlo slabo raste u mlijeku, uzročnici kvarenja postaju jedino u slučajevima kada je njihov broj u mlijeku $\geq 10^6$ /mL. Izgled mikrobne pogreške teksture tijesta sira ovisi o skupini kojoj sir pripada. Tako je želatinozna i/ili sluzava tekstura svježih sireva (55 - 80 % vlage) direktna posljedica kontaminiranosti sira Gram-negativnim psihotrofnim mikroorganizmima, najčešće *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* i *Pseudomonas putida* bakterijama (Brocklehurst i Lund, 1985.; Fox i sur., 2000.). Indirektno, slaba/loša tekstura svježih sireva posljedica je djelovanja termostabilnih proteolitičkih enzima tih bakterija. Rastresitu (nepovezanu) teksturu svježih sireva uzrokuju mikroorganizmi koji stvaraju plin (uglavnom CO₂ i H₂). Najčešće izolirani uzročnici su: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* i *Flavobacterium* (Scott, 1998.; Fox i sur., 2000.). Rano nadimanje sireva je mikrobna pogreška teksture tijesta polutvrđih i tvrdih sireva (Walker, 1988.). Takav sir na prerezu ima manji ili veći broj malih do srednje velikih okruglih rupica, ili se pogreška vidi u obliku uskih dugoljastih otvora, pukotina, zareza (Kosikovski i Mistry, 1997.). Pogreška ranog nadimanja potom lančano izaziva druge mikrobne pogreške teksture, okusa i mirisa sira. Koliformne bakterije, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* spp. najčešće su izolirani uzročnici ranog nadimanja sira. Uzročnici pogreške ranog nadimanja sira mogu biti i kvasci koji imaju sposobnost hidrolize laktoze (Fleet, 1990.; Westall i Filtenborg, 1998.; Desmarcheller i Fegan, 2002.). U odnosu na tvrde sireve, rano nadimanje češća je pogreška polutvrđih sireva (Fox i sur., 2000.). Mikrobna pogreška teksture tijesta - kasno nadimanje, karakteristična je za polutvrde i tvrde sireve i događa se na kraju perioda zrenja sira. Uzročnici su anaerobni, ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji obilno stvaraju plinove CO₂ i H₂ (Choisy i sur., 2000.; Rukure i Bester, 2001.; Cogan i Befesford, 2002.). Ovisno o količini stvorenog

plina i stupnju elastičnosti/čvrstoći tijesta, kasno nadimanje sira prepoznaje se po nekoliko malih atipičnih očiju (rupica), ili češće po većem broju velikih očiju (rupa) razasutih u tijestu sira. Vrlo često tu pogrešku karakteriziraju i napukline i/ili pukotine u tijestu sira (Kosikovski i Mistry, 1997.; Fox i sur., 2000.; Cogan i Befesford, 2002.). Između različitih mikrobnih vrsta koje uzrokuju kasno nadimanje sira, *Clostridium* spp. su najčešće izolirani uzročnici (Ingham i sur., 1998.; Aureli i Franciosa, 2002.). Za razliku od uzročnika pogreške ranog nadimanja sira, koji moraju biti prisutni u velikom broju ($\geq 10^6$ /g), potreban broj *Clostridium* spp. bakterija u mlijeku za pogrešku kasnog nadimanja izrazito je mali (Aureli i Franciosa, 2002.). Na primjer, dovoljno je samo 5 - 10 spora *C. tyrobutyricum* u litri mlijeka za kasno nadimanje sira Gaude. Međutim, ovisno o vrsti, izolirani broj spora iz pokvarenog sira je između 10^4 do 10^7 /g za *C. tyrobutyricum* te između 10^3 do 10^6 /g za *C. sporogenes* (Yi-Cheng i Ingham, 2000.). Osim *Clostridium* spp. bakterija, kasno nadimanje sira mogu izazvati i ostali anaerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi, odnosno oni mikroorganizmi koji su sposobni stvarati plin razgradnjom laktoze, laktata, citrata i uree prisutne u siru te katabolizmom aminokiselina. Međutim, kasno nadimanje sira koje nastaje dekarboksilacijom glutaminske kiseline u CO_2 i 4-aminomaslačnu kiselinu odnosi se jedino na sireve za čiju se proizvodnju koristi termofilna mikroba kultura sastavljena od sojeva *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus helveticus* (Chapman i Sharpe, 1985.; Johnson, 1998.; Scott, 1998.). Otvori/pukotine/rupice u tijestu sira, koji nastaju kao posljedica kasnog nadimanja tako mogu biti uzrokovani obligatnim heterofermentativnim laktobacilima te fakultativno anaerobnim laktobacilima sekundarne mikrobne populacije koja uvijek kontaminira sir. Za vidljivi oblik pogreške ti mikroorganizmi moraju biti prisutni u broju $\geq 10^6$ /g sira. Premda mnogo rjeđe, izgledom isti oblik pogreške kasnog nadimanja sira, mogu uzrokovati *Bacillus* spp., koliformni organizmi, kvasci, laktokoki, streptokoki, propionske bakterije i *Leuconostoc* spp. (Johnson, 1998.; Scott, 1998.; Rukure i Bester, 2001.; Stepaniak, 2002.; Boer i sur., 2003.). Pogreška okusa sira nedjeljiva je od pogreške mirisa, arome i teksture sira. Ona se može opisati kao zbir svih tehnoloških i mikrobnih pogrešaka tijekom proizvodnje (McSweeney, 1997.; Urbach, 1997.; Spreer, 1998.c). Mikrobne pogreške okusa, nastale isključivim djelovanjem mikroorganizama uzročnika kvarenja (*Pseudomonas* spp., koliformni mikroorganizam, kvasci i plijesni) opisuju se jednom riječi - strani okus. Poblži opis pogreške uvjetovan je mikrobnom vrstom koja je pogrešku izazvala. Tako su mikroorganizmi koji uzrokuju rano

nadimanje sira razlogom pogreške okusa i mirisa koje se opisno izražavaju kao strani miris i okus, po trulom, po amonijaku, po gnoju (fekalijama), pokvaren i slično. Promijenjeni okus i miris sireva, uzrokovan uzročnicima kasnog nadimanja, opisuje se kao izrazito gorak, miris i okus po maslačnoj kiselini (Cocolin i sur., 2004.). Osim za sireve koji zriju s plijesnima ili mazom na površini sira, kontaminacija sira kvascima i plijesnima nepoželjna je i smatra se pogreškom za sve ostale sireve (Addis i sur., 2001.) Pogreške se očituju u promjeni mirisa, okusa i teksture tijesta te promjenama na kori (vanjskoj površini) sira. Heterofermentativna priroda kvasaca uvjetuje stvaranje alkohola i CO₂ u siru, tako da se pogreška vrlo jednostavno može pripisati kvascima i u slučajevima kada kolonije kvasaca nisu vidljive (Westall i Filtenborg, 1998.; Boer i sur., 2003.; Masoud i Jakobsen, 2003.). Okus sira se mijenja, a opisuje se pojmom - okus po kvascima. Lipolitička aktivnost kvasaca može izazvati užegao, gorak okus, a slobodne masne kiseline u kombinaciji s alkoholom uvjetuju okus po voću (Seiler, 2002.). Rjeđe, kvasci uzrokuju uske otvore ili male okrugle rupice u tijestu sira. Kvasci su i uzročnici sluzave kore, djelomične diskoloracije ili ružičaste boje vanjskog izgleda sira (Farkye i Vadamuthu, 2002.; Johnson, 1998.). Među inim pogreškama vanjskog izgleda sira pojava smeđe boje (pigmentacije) smatra se ozbiljnom pogreškom vanjskog izgleda (Carreira i sur., 1998.). Smeđenje kore je pogreška koja se može javiti kod svih polutvrdih i tvrdih sireva (Ementalcac, Tilzit, Provalone, Grana Padano, Pekarino Romano, Parmesan itd). Proces može zahvatiti cijelu površinu sira i poprimiti potpuno tamnosmeđu boju. Ponekad, ta smeđa boja može penetrirati od 1 - 3 cm ispod kore u unutrašnjost sira (Walstra i sur., 1999.a). Smeđeljubičasta pigmentacija na prerezu te na površini sira pogreška je i sireva koji zriju djelovanjem plemenitih plijesni (npr. Brie, Gorgonzola). Smeđenje kore i/ili površine kao i unutrašnjosti sira, vrlo često započinje u prvoj fazi zrenja između 8 i 12 dana (Johnson, 1998.; van den Tempel i Nielsen, 2000.). U tom razdoblju obično se najprije javlja viskozni crvenkasti film (maz) koji potom postepeno poprima smeđu boju. Pranje i premještanje sira u uvjete viših temperatura i niže relativne vlage ne eliminira započeti proces, već se proces nastavlja, a kora sira je na kraju zrenja potpuno tamnosmeđe boje. Identificirani mikrobn uzročnici te pojave bakterijske su vrste *Pseudomonas* i *Brevibacterium* te kvasci i plijesni, a posebice *Yarrowia lipolitica* i *Candida catenulata*. Pogreška sluzavosti kore polutvrdih i tvrdih sireva pripisuje se istovremenom djelovanju kvasaca i proteolitičkom djelovanju *Pseudomonas* spp. bakterija (Carreira i sur., 1998.). Neke vrste mekih sireva, npr.

Romadur, Limburger, Tilzit, Camembert zriju djelovanjem mikrobne populacije na površini sira. Specifičnost tih vrsta sireva je u izuzetno kompleksnoj interakciji različitih mikrobnih vrsta koje sudjeluju u formiranju izgleda, okusa i teksture tih sireva (Scott, 1998.; Corsetti i sur., 2001.). Zbog tih posebnosti bilo koja promjena mikrobnih interakcija nužno negativno utječe na sve ostale karakteristike sira. Iz tih razloga nemoguće je definirati točan uzrok pogreške površine mekih sireva (Addis i sur., 2001.; Cogan, 2002.). Za meke sireve koji zriju djelovanjem bakterija na površini sira, a jednim se imenom nazivaju bakterije crvenog maza («coryneform bakterije»), najozbiljnijom pogreškom smatra se kontaminacija plijesnima. Rastom plijesni onemogućen je rast tih bakterija koje presudno utječu na formiranje karakterističnog okusa tih vrsta sireva (Johnson, 1998.; Farkye i Vadamuthu, 2002.). Kontaminacija površine sireva plijesnima, u smislu negativnog djelovanja na okus, posebno je značajna za meke sireve koji zriju duže od 4 tjedna (npr. Tilzit). Plijesniv sir - opis je te pogreške. Površina takvih sireva obično je prekrivena bijelim, plavim, zelenim, ili sivim kolonijama koje mogu pripadati vrstama *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, ali i mnogim drugim vrstama plijesni (Gripon, 1997.) Oku nevidljiva kontaminacija plijesnima, uglavnom je vezana na vrste *Fusarium* plijesni (Farkye i Vadamuth, 2002.). Čestom pogreškom vanjskog izgleda mekih sireva, za koje je karakteristična fermentacija djelovanjem bakterija mliječne kiseline, smatra se pojava narančastih mrlja (Masoud i Jakobsen, 2003.). Uz *Brevibacterium linens*, uzročnici te pogreške mogu biti i *Staphylococcus saprophyticus* ili *Staphylococcus equorum* bakterije.

Zaključak

Mikroorganizmi - uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda umanjuju kvalitetu i smanjuju vijek trajanja proizvoda te značajno poskupljuju proizvodnju. Svrha ovog rada bila je ukratko opisati neželjene promjene sirovog, pasteriziranog, steriliziranog mlijeka, fermentiranih mlijeka, vrhnja, maslaca i sira i istaknuti najčešće izolirane mikrobne uzročnike tih promjena. Redovita kontrola i identifikacija mikroorganizama uzročnika kvarenja u mljekarskoj industriji značajno doprinosi poboljšanju kvalitete proizvoda i povećanju dobiti.

SPOILAGE MICROORGANISMS IN MILK AND DAIRY PRODUCTS

Summary

Spoilage microorganisms cause changes of primary characteristics and properties of milk and dairy products. The product defects depends on the specific species and number of microorganisms involved in pre- and post-technological processing. Most often, these changes are related to single undesirable sensory characteristic, smell, flavour or consistency. However, in the case of heavier microbial contamination all these undesirable characteristics can occur simultaneously. Besides, even small changes caused by presence of spoilage microorganisms lead to decreased quality of milk and various dairy products. Despite of the importance for the overall quality, the control of spoilage microorganisms for dairy industry is not obligated and therefore, only a few producers control them. Therefore, the present study describes the undesirable effect of spoilage microorganisms on quality of raw, pasteurized and sterilized milk, fermented milk, butter, sour cream and cheeses with the intention to emphasize the importance and significance of their control in the dairy industry.

Key words: spoilage microorganisms, milk, dairy products

Literatura

- AAKU, E.N., COLLISON, E.K., GASHE, B.A., MPUCHANE, S. (2004): Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone Botswana. *Food Control* 15, 181-186.
- ADDIS, E., FLEET, G.H., COX, J.M., KOLAK, D., LEUNG, T. (2001): The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses, *International Journal of Food Microbiology* 69, 25-36.
- ANGELIDIS, A.S., CHRONIS, E.N., PAPAGEORGIOU, D.K., KAZAKIS, I.I., ARSENOGLOU, K.C., STATHOPOULOS, G.A. (2005): Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. *Food Microbiology* 23, 95-100.
- AURELI, P., FRANCIOSA, G. (2002): *Clostridium* spp., *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1, Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 456 -463.
- BERGEY 'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1986), Edited by Williams and Wilkins, Baltimore, London.

- BINTSIS, T., PAPADEMAS, P. (2002): Microbiological quality of white-brined cheese: a review, *International Journal of Dairy Technology* 55 (3), 113-120.
- BOER, DE E., KUIK, D., SEILER, H. (2002): Yeasts in milk and dairy products, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Roginski, H., Fuquay, W.J., Fox, F.P., Academic Press, 2761-2773.
- BOOR, K.J., MURPHY, S.C. (2002): Microbiology of market milks. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 91-122.
- BRAUN, P., FEHLHABER, K., KLUG, C., KOPP, K. (1999): Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage causing bacteria: a possible basis for improved shelf life estimation. *Food microbiology* 16, 531-540.
- BROCKLEHURST, T.H., LUND, B.N. (1985): Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at +7 °C. *Food microbiology* 2, 207-233.
- CACERES, P., CASTILLO, D., PIZARRO, M. (1997): Secondary Flora of Casar de Caceres Cheese: Characterization of *Micrococcaceae*, *International Dairy Journal* 7, 531-536.
- CARREIRA, A. PALOMA, L., LOUREIRO, V. (1998): Pigment producing yeasts involved in the brown surface of ewes cheese, *International Journal of Food Microbiology* 41, 223-230.
- CAUSIN, M. (1982): Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection* 45, 172-207.
- CAUSINS, C.M., BRAMLEY, A.J. (1985): The Microbiology of Raw Milk. U knjizi *Dairy Microbiology*, The Microbiology of Milk, (vol. 1) edited by Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, New York, 119- 164.
- CHAPMAN, H.R., SHARPE, M.E. (1985): Microbiology of cheese. U knjizi *Dairy Microbiology*, The Microbiology of Milk Product, vol. 2., edited by Robinson, R.K., Elsevier Applied Science Publishers, London, 157-244.
- CHOISY, C., DESMAZEAUD, M., GUEGUEN, M., LENOIR, J., SCHMIDT, J.L., TOURNEUR, C. (2000): Microbial phenomena. U knjizi *Cheesemaking from Science to Quality Assurance*, Second edition, Edited by André Eck i Jean-Claude Gillis, Lavoisier Publishing Inc, Paris, 352-411.
- CHRISTIANSSON, A. (2002): *Bacillus cereus*, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1., Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 123-140.
- COCOLIN, L., INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., COMI, G. (2004): The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90, 83-91.
- COGAN, T.M. (2002): Microbiology of Cheese. *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 3, Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 306-314.
- COGAN, T.M., BEFESFORD, T.P. (2002): Microbiology of hard Cheese. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 515-560.

- COLLINS, E.B. (1981): Heat Resistant Psychrotrophic Microorganisms. *Journal of Dairy Science* 64, 157-160.
- CORSETTI, A., ROSSI, J., GOBBETTI, M. (2001): Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses, *International Journal of Food Microbiology* 69, 1-10.
- COX, M.J. (1993): The significance of psychrotrophic *Pseudomonas* in dairy products, *The Australian Journal of Dairy Technology* 48, 108-113.
- CRAVEN, H.M., FORSYTH, S.R., DREW, P.G., MACAULEY, B. J. (1994): A new technique for early detection of Gram-negative bacteria in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* 49, 54-56.
- ČANŽEK MAJHENIČ, A. (2006): Enterococci: yin-yang microbes (review). *Mljekarstvo* 56, 5-50.
- DELACROIX-BUCHNET, A. (2004): Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644 - 5650.
- DESMARCHELLER, P., FEGAN, N. (2002): *Escherichia coli*. *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 4, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 948-954.
- DOGAN, B., BOOR, K.J. (2003.): Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology*, 130-138.
- ELMHER, H.M. (1998): Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and Safety. *Food technology* 52, 57-62.
- ENEROTH, A., AHRNE, S., MOLIN, G. (2000): Contamination of milk with Gram negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology* 57, 99-106.
- ENEROTH, A., CHRISTIANSSON, A., BRENDENHANG, J., MOLIN, G. (1998): Critical contamination site in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal* 8, 829-834.
- FARKYE, N.Y., VADAMUTHU, E.R. (2002): Microbiology of soft cheeses. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 479-514.
- FLEET, G.H. (1990): Yeast in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 199-211.
- FOX, P.F. (1981): Proteinases in dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 35, 233- 253.
- FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., MCSWEENEY, P.L.H. (2000): Microbiology of Cheese Ripening. U knjizi *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 206-232.
- FOX, P.F., STEPANIAK, L. (1983): Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas flourescens* strain AFT36. *Journal of Dairy Research* 50,77-89.

- FRANK, J.F., HASSAN, A.N. (2002): Microorganisms associated with milk. *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 3, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 1786-1795.
- GARBUTT, J. (1997): Factor affecting the growth of microorganisms. U knjizi *Essentials of Food Microbiology*, Garbutt, J., Arnold, London, 54-86.
- GILLILAND, S. E. (1998): Fermented Milks and Probiotics. U knjizi *Applied Dairy Microbiology*, edited by Marth, E.H., Steele, J.L., Marcel Dekker, Inc., New York, 195-212.
- GILMOUR, A., ROWE, M.T. (1985): Micro-Organismus Associated with milk. U knjizi *Dairy Microbiology*, The Microbiology of Milk, vol. 1., edited by Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, New York, 35-76.
- GIRAFFA, G. (2003): Functionality of enterococci in dairy products, *International Journal of Food Microbiology* 88, 215-222.
- GOUNOT, A.M. (1986): Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experimentia* 42, 1192-1197.
- GRIFFITHS, MW., PHILLIPS, J.D.(1988): Modelling the Relation Between Bacterial Growth and Storage Temperature in Pasteurised Milk of Varying Hygienic Quality. *Journal of the Society of Dairy Technology* 41, 96-102.
- GRIPON, J.C. (1997): Flavour and texture i soft cheese. U knjizi *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, second edition, Edited by Law, B.A., Blackie Academic and Professional, London, 193-206.
- HANTSIS-ZACHAROV, E., HALPERN, M. (2007): Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7162-7168.
- HUCK, J.R., HAMMOND, B.H., MURPHY, S.C., WOODCOCK, N. H., BOOR, K.J. (2007): Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *Journal of Dairy Science* 90, 4872-4883.
- IDF BULLETIN (2000): *Bacillus thermodurans*. Detection and Identification of Spore-Forming Bacteria., International Dairy Federation, 357/2000
- INGHAM, S.C., HASSLER, J.R., TSAI, Y., INGHAM, B.H. (1998): Differentiation of lactate fermenting, gas producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal Of Food Microbiology* 43, 173-183.
- JAY, J. M. (1992): Characteristics and Growth of Psychrotrophic Microorganisms. U knjizi *Modern Food Microbiology*, edited by Jay, J.M., Van Nostrand-Reinhold, New York, 415-441.
- JOHNSON, M.E. (1998): Cheese Products. U knjizi *Applied Dairy Microbiology*, edited by Marth, E.H., Steele, J.L., Marcel Dekker, Inc., New York, 213-249.
- JORDANO, R., MEDINA, L.M., SALMERON, J. (1991): Contaminating microflora in fermented milk. *Journal of Food Protection* 54, 131-132.

- KOKA, R., WEIMER, B.C. (2001): Influence of growth conditions on heat stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research* 68, 109-116.
- KORNACKI, J.L., FLOWERS, R.S. (1998): Microbiology of Butter and Related Products. U knjizi *Applied Dairy Microbiology* edited by Marth, E.H., Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc., New York, 109-130.
- KOSIKOVSKI, F.V., MISTRY, V.V. (1999): Control of spoilage bacteria in cheese milk. U knjizi *Cheese and Fermented Milks*, vol. I: Origins and Principles, third edition, Edited by F.V. Kosikovski, L.L.C., Virginia, SAD, 252-265.
- KUMARSAN, G., ANNALVILLI, R., SIVAKUMAR, K. (2007): Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. *Journal of Applied Science Research* 3, 1383-1387.
- LAFARGE, V., OGIER, J.L., GIRARD, MALADEN, V., LEVEAU, J.Y., GRUSS, A., DELACROIX-BUCHNET, A. (2004): Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644-5650.
- LARSEN, H.D., JORGENSEN, K. (1997): The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34, 179-186.
- LAW, B.A. (1979): Review of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research* 46, 573-578
- LAW, B.A., ANDREWS, A.T., SHARPE, M.E. (1977): Gelation of UHT Milk by Proteases from a Strain of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Raw Milk. *Journal of Dairy Research* 44, 145-148.
- LEDFORD, R.A. (1998): Raw Milk and Fluid Milk Products. *Applied Dairy Microbiology* 41, 55-64.
- LIN, S., SCHRAFT, H., ODUMERU, J.A., GRIFFITHS, M.W. (1998): Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43, 159-171.
- LÓPEZ-PEDEMONTE, T.J., ROIG-SAGUÉ, A.X., TRUJILLO, A.J. (2003): Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. *Journal of Dairy Science* 86, 3075-3081.
- MAGAN, N., PAVLOU, A., CHRYSANTHAKIS, I. (2001): Milk - sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sensors and Actuators B* 72, 28-34.
- MAKALAR, P.K., BARKER, G.C., ZWIETERING, M.H., VAN T RIET, K. (2003): Relevance of microbial interactions to predictive microbiology, *International Journal of Food Microbiology* 84, 263-272.
- MARSHALL, R.T. (1982): Relationship between the bacteriological quality of raw milk and the final products a review. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34, 149-157.
- MARTH, E.H. (1998): Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and Safety. *Food technology* 52, 57-62.

- MASOUD, W., JAKOBSEN, M. (2003): Surface ripened cheese: The effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*, *International Dairy Journal* 13, 231-237.
- McGUIGGAN, J.M., GILMOUR, A., LAWRENCE, M.L. (1994): Factors influencing the recovery of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spp from bulk raw milk, *Journal of the Society of Dairy technology* 47, 111-116.
- McKELLAR, R.C. (1982): Factor in Fluencing the Production of Extracellular Proteinases by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology* 53, 305-316.
- McPHEE, J.D. & GRIFFITHS, M.W. (2002): *Pseudomonas* spp, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 2340-2350.
- McSWEENEY, P.L.H. (1997): The flavour of milk and dairy products: III. Cheese taste, *International Journal of Dairy Technology* 50, 123-128.
- MEER, R.R., BAKER, J., BODYFELT, F.W., GRIFFITHS, M.W. (1991): Psyschrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products. *Journal of Food Protection* 54, 968-979.
- MITCHELL; S.L., MARSHALL, R.T. (1989): Properties of Heat-stabile Proteinases of *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Hydrolysis of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science* 72, 864-874.
- MOSTERT, J.F., JOOSTE, P. J. (2002): Quality Control in the Dairy Industry. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 655-725.
- MUIR, D. D. (1996): The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 24-32.
- MUNSCH-ALATOSSAVA, P., ALATOSSAVA, T. (2005.): Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* 161, 334-346.
- NELSON, F.E. (1985): The microbiology of Market Milk. U knjizi *Dairy Microbiology*, vol.1., edited by Robinson, R.K., Elsevier Applied Science, Publishers, London, 165-207.
- RANDOLPH, H. (2006): Identifying spoilage bacteria and potential shelf- life problems. *Dairy Food*, Find Article 1-3
- RAŠIĆ, J.LJ., KURMAN, J.A. (1978): Defects of Yoghurt. U knjizi *Yoghurt Scientific Grounda*, Technology, Manufacture and Preparations, Published by the Authors, Copenhagen, 297-301.
- ROBINSON, R.K., LUCEY, J.A., TAMIME, Y. (2006): Manufacture of Yoghurt. U knjizi *Fermented milk* edited by Tamime, Y., Blackwell Science Ltd, Oxford, 53-71.
- ROBINSON, R.K., TAMIME, A.Y., WSZOLEK, M. (2002): Microbiology of fermented milks. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 376-430.

- ROGELJ, I., BOGOVIĆ, B. (1990.): Utjecaj veličine populacije Gram negativnih psihrotrofa na njihovo preživljavanje pri pasterizaciji. *Mljekarstvo* 12, 323-329.
- ROSSLAND, E., LANGSRUD, T., SORHAUG, T. (2005): Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 103, 69-77.
- ROWE, M.T., JOHANSTON, D.E., KILPATRIC, D.J. DUNSTALL, G., MURPHY, R.J. (1990): Growth and Extracellular Enzymes Production by Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk Stored at Low Temperature. *Milchwissenschaft* 45, 459-499.
- RUKURE, G., BESTER, B.H. (2001): Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. *Food Control* 12, 31-36.
- SCOTT, R. (1998): Cheese faults and cheese grading. U knjizi *Cheesemaking Practice* (third edition), Robinson, R.K., Wilbey, R.A., Kluwer Academic/plenium Publishers, New York, 288-308.
- SEILER, H. (2002): Yeasts in milk and Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., 2761-2769.
- SORHAUG, T., STEPANIAK, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8, 35-41.
- SPREER, E. (1998a): Market Milk, Milk Drinks and Cream Products. U knjizi *Milk and Dairy Product Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 155-198.
- SPREER, E. (1998b): Butter Manufacture U knjizi *Milk and Dairy Product Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 203-241.
- SPREER, E. (1998c): Cheese Manufacture. U knjizi *Milk and Dairy Products Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 243-334.
- STEAD, D. (1986): Microbial lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* 53, 481-505.
- STEPANIAK, L. (2002): Psychrotrophic Bacteria, Bacteria Other than *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., 2345-2351.
- SUHREN, G. (1989): Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food. U knjizi *Producer Microorganisms*. Edited by McKellar, R.C, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 4-34.
- SVENSON, B., MONTHAN, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, A.M., SALKINOJA-SALONEN, M., CHRISTIANSSON, A. (2005): Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain, *International Dairy Journal* 16, 740-749.
- SVENSSON, B., EKELUND, K., OGURA, H., CHRISTIANSSON, A. (2004): Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14, 17-27.
- TAMIME, A.Y., ROBINSON, R.K. (2007): Quality control in yoghurt manufacture. U knjizi *Yoghurt Science and Technology*, third edition, edited by Tamime, A.Y., Robinson, R.K., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 685-753..

- TeGIFTEL, M.C., BEUMER, R.R., GRANUM, P.E., ROMBOUTS, F.M. (1997): Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherland. *International Journal of Food Microbiology* 34, 307-318.
- URBACH, G. (1997): The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds, *International Journal of Dairy Technology* 50, 79-86.
- VAN DEN TEMPEL, T., NIELSEN, M.S. (2000): Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeast related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology* 57 193-199.
- VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P. (1996a): Cream and cream-based products. U knjizi *Milk and milk Products Technology*, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, London, Marcel Dekker, Inc., New York, 183-216.
- VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P. (1996b): Butter, margarine and spreads. U knjizi *Milk and milk Products Technology*, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, London, Marcel Dekker, Inc., New York, 224-268.
- VILJOEN, B.C., KHOURY, A., HATTING, A. (2003): Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses, *Food Research International* 36, 275-283.
- VILJOEN, B.C., LOURENS-HATTINGH, A., IKALAFENG, B., PETER, G. (2003): Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Research International* 36, 193-197.
- WALKER, S.J. (1988): Major Spoilage Microorganisms in Milk and Dairy Products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 41, 91-92.
- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M.A.J. S. (1999): Microbiology of Milk. U knjizi *Dairy Technology*, Principles of Milk Properties and Processes, edited by Marcel Dekker, Inc, New York, 149-170.
- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M.A.J.S. (1999a): Microbial Defects U knjizi *Dairy Technology*, Principles of Milk Properties and Processes, edited by Marcel Dekker, Inc, New York, 639-649.
- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M.A.J.S. (1999b): Cheese Varieties U knjizi *Dairy Technology*, Principles of Milk Properties and Processes, Marcel Dekker, Inc, New York, 651-708.
- WESTALL, S., FILTENBORG, O. (1998): Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology* 15, 243-249.
- WHITE, C.H. (1998): Testing Milk and Milk Products. U knjizi *Applied Dairy Microbiology*, edited by Marth, E.H., Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc., New York, 431-460.
- WILBEY, R.A. (2002): Microbiology of cream and butter. U knjizi *Dairy Microbiology Handbook*, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 123-170.

YI-CHENG, S., INGHAM, S.C. (2000): Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology* 54, 147-154.

Adrese autora – Author's addresses:

Prof. dr. sc. Dubravka Samaržija¹

Marijana Podoreški, dipl. ing.³

Prof. dr. sc. Sanja Sikora²

Mr. sc. Andrea Skelin²

Tomislav Pogačić, dipl. ing.¹

¹Zavod za mljekarstvo

²Zavod za mikrobiologiju

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Svetošimunska 25, Zagreb

³Strahinje 55, Krapina

Prispjelo - Received: 28.11.2007.

Prihvaćeno - Accepted: 12.12.2007.