

Količina kolesterola u maslacu sa zagrebačkog tržišta

Željka Cvrtila, B. Njari, D. Bažulić, M. Hadžiosmanović,

B. Mioković, Lidija Kozačinski, Darinka Pranjić

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.2.04

Sažetak

U ovom radu određivana je količina kolesterola u maslacu, mliječnom proizvodu poznatom po velikoj količini mliječne masti. Rezultati istraživanja su pokazali da je prosječna količina mliječne masti u uzorcima maslaca podrijetlom iz seoskih domaćinstava (n = 17) iznosila 83,9 %, a onog iz industrijske proizvodnje (n = 5) 85,2 %. Prosječne količine kolesterola u spomenutim uzorcima bile su 227 mg/100 g odnosno 220 mg kolesterola u 100 g uzorka. Rezultati istraživanja pokazuju da s povećanjem količine mliječne masti ne dolazi nužno do povećanja količine kolesterola u pojedinom uzorku maslaca.

Ključne riječi: kolesterol, maslac

Uvod

Razina kolesterola u krvi ovisi o više čimbenika, a najviše o dobi, spolu, prehrani i genetičkim karakteristikama (Connor i Connor, 1986.). Povišena razina kolesterola u krvi može dovesti do zdravstvenih problema (žučni kamenci, ateroskleroza; Guyton, 1990.).

Za zdravlje ljudi nije beznačajna količina kolesterola i njegovih produkata u namirnicama. Računa se da na 100 g mlijeka ima 13 mg kolesterola, što odgovara koncentraciji u mliječnoj masti oko 3 mg/g. Prehranom se dnevno unosi 10600 kJ (2500 kcal), a kolesterol je jedan od 37 faktora rizika koronarnih oboljenja (Renner, 1983.).

Iz istraživanja koja su proveli Aii i sur. (1989.) očito je da utvrđena količina kolesterola u pojedinom uzorku mlijeka ne ovisi o količini mliječne masti, a ni o razini kolesterola u krvnom serumu životinje u laktaciji.

Iako je kolesterol esencijalni metabolit, nije neophodan u prehrani ljudi. Dapače, zbog činjenice da povišena razina kolesterola doprinosi razvoju nekih bolesti, potrebno je kontrolirati dnevni unos kolesterola u organizam. Organizam ga može sintetizirati dovoljno brzo i u količinama dostatnim za održavanje metabolizma. (Kaić-Rak i Antić-Degač, 1998.). Nacionalni obrazovni program za kolesterol u SAD, u okviru Nacionalnog instituta za srce, pluća i krv preporuča ograničen unos kolesterola, najviše do 300 mg na dan (Recommended daily allowances; RDA).

Zbog toga je 1985. godine u Codex Alimentariusu donesen propis koji od proizvođača hrane u svijetu zahtijeva da na etiketama svojih proizvoda istaknu vrijednosti količine kolesterola kako bi potrošač imao uvid koliko se, konzumiranjem određene količine namirnica, približio prihvatljivom dnevnom unosu. Tu su preporuku Codex Alimentariusu prihvatile zemlje Europske unije 1990. godine, a SAD 1994. godine (Berner i Lofgren, 1991.; Bažulić i sur., 1998.).

Svrha ovog rada bila je odrediti količinu kolesterola i mliječne masti u uzorcima maslaca iz različitih seoskih domaćinstava i iz industrijske proizvodnje, te utvrditi postoje li razlike u količini kolesterola u maslacu s obzirom na njegovo podrijetlo i odnos sadržaja masti u maslacu na količinu kolesterola.

Materijal i metode

Određivanje količine mliječne masti i kolesterola provedeno je na uzorcima maslaca podrijetlom iz seoskih domaćinstava (n = 17) i maslaca proizvedenog na industrijski način (n = 5), te kontrolnom uzorku ulja deklariranom kao "ulje bez kolesterola" (n = 1).

Količinu mliječne masti odredili smo standardnim postupkom za maslac s Gerberovim butirometrima (Sabadoš, 1996.), a količina kolesterola određivana je pomoću enzimskospektrofotometrijske metode korištenjem testova tvrtke Boehringer iz Mannheima zgotovljenim za određivanje količine kolesterola u različitim namirnicama životinjskog podrijetla (Grossmann i sur., 1976.).

Rezultati

Rezultati određivanja količine mliječne masti uzoraka maslaca iz seoskih domaćinstava ("domaći maslac"; n = 17) i maslaca industrijske proizvodnje (n = 5) prikazani su u 1. i 2. tablici. Klasiranje uzoraka maslaca podrijetlom iz industrijske proizvodnje učinjeno je prema Pravilniku o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura (Sl. list 51/82; NN RH 53/91). Na istim uzorcima maslaca određivana je količina kolesterola, a ti su rezultati prikazani u 3. i 4. tablici.

Tablica 1: Rezultati određivanja količine mliječne masti u uzorcima maslaca podrijetlom iz seoskih domaćinstava

Table 1: Results of determination of the milk fat for the butter samples from domestic production
n = 17

Broj uzorka Sample number	Količina mliječne masti [%] Milk fat content [%]
1.	84,9
2.	84,0
3.	86,7
4.	86,1
5.	85,1
6.	85,6
7.	82,6
8.	84,4
9.	85,1
10.	82,6
11.	84,4
12.	84,6
13.	84,3
14.	80,3
15.	81,9
16.	82,0
17.	81,9
– x	83,9

Iz rezultata utvrđenih postupkom određivanja količine mliječne masti vidno je da su svi istraženi uzorci maslaca ujednačene kakvoće u odnosu na sadržaj mliječne masti i udovoljavaju odredbama Pravilnika o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura (Sl. list 51/82; NN RH 53/91).

Tablica 2: Rezultati određivanja količine mliječne masti u uzorcima maslaca industrijske proizvodnje

Table 2: Results of determination of the milk fat for the butter samples from industrial production *n = 5*

Broj uzorka Sample number	Količina mliječne masti [%] Milk fat content [%]	Klasa Class
1.	88,7	I
2.	84,3	I
3.	84,4	I
4.	84,3	I
5.	84,1	I
– x	85,2	

Količina kolesterola u maslacu (tablice 3. i 4.) nije ujednačena. Značajne razlike rezultata dobivenih postupkom određivanja količine kolesterola (29 – 383 mg/100 g) između pojedinih uzoraka “domaćeg maslaca” mogu se objasniti činjenicom da svaki od istraženih uzoraka maslaca potječe iz zasebnog seoskog domaćinstva unutar kojega su muzna goveda bila pod sasvim specifičnim uvjetima držanja i prehrane (Vujičić i sur., 1992.). U kontrolnom uzorku ulja deklariranom kao “ulje bez kolesterola” analizom je utvrđena količina kolesterola od 44 mg/100 g. Pri analizi dobivenog rezultata treba imati na umu da enzimskospektrofotometrijska metoda, s obzirom na svoju selektivnost, po kolesterolu određuje i druge sterole (Bažulić i sur., 1998.).

Na razini značajnosti od $P < 0,05$ dokazano je da su razlike kolesterola u odnosu na mliječnu mast slučajne. Slična istraživanja provedena su i na uzorcima mlijeka, pa je također utvrđeno da količina kolesterola ne ovisi o količini mliječne masti (Aii i sur., 1989.).

Prema podacima iz literature ovi rezultati upućuju na činjenicu da je maslac, doista, namirnica s povećanom količinom kolesterola u odnosu na druge mliječne proizvode. Međutim, ako se unos maslaca u organizam ograniči na 5 - 10 g dnevno (oko 22 mg kolesterola; 7 % RDA) ne utječe na razinu kolesterola u krvi, pogotovo ako se istodobno u organizam unosi i dovoljna količina namirnica biljnog podrijetla. Na taj se način maslac može isključiti iz skupine rizičnih namirnica, te se mogu iskoristiti sve druge nutritivne vrijednosti ovoga traženoga mliječnog proizvoda.

Tablica 3: Rezultati određivanja količine kolesterola u uzorcima maslaca podrijetlom iz seoskih domaćinstava

Table 3: Results of determination of cholesterol quantity for the butter samples from domestic production $n = 17$

Broj uzorka Sample number	Količina uzorka Sample amount [g]	ΔA	Koncentracija kolesterola Cholesterol concentration [mg/ml]	Količina kolesterola u uzorku maslaca Cholesterol quantity in butter [mg/100g]
1.	1,015	0,168	0,01817	227
2.	1,022	0,188	0,02033	248
3.	1,184	0,269	0,02909	306
4.	0,993	0,490	0,05298	266
5.	0,987	0,256	0,02768	350
6.	1,169	0,173	0,01871	199
7.	0,979	0,236	0,02552	327
8.	1,021	0,521	0,05633	276
9.	0,975	0,183	0,01979	254
10.	0,956	0,021	0,00227	29
11.	1,106	0,218	0,02357	277
12.	1,126	0,319	0,03449	383
13.	1,096	0,158	0,01708	194
14.	1,121	0,133	0,01438	160
15.	0,996	0,036	0,00389	49
16.	1,059	0,045	0,00486	57
17.	1,075	0,213	0,02303	268
18.*	1,268	0,041	0,00443	44
— x				227

* kontrolni uzorak ulja deklariranog kao "ulje bez kolesterola"

Tablica 4: Rezultati određivanja količine kolesterola u uzorcima maslaca industrijske proizvodnje

Table 4: Results of determination of cholesterol quantity for the butter samples from industrial production *n = 5*

Broj uzorka Sample number	Količina uzorka Sample amount [g]	ΔA	Koncentracija kolesterola Cholesterol concentration [mg/ml]	Količina kolesterola u uzorku maslaca Cholesterol quantity in butter [mg/100g]
1.	1,058	0,441	0,04768	225
2.	1,085	0,450	0,04866	224
3.	0,998	0,176	0,01903	238
4.	1,010	0,168	0,01815	227
5.	1,190	0,163	0,01762	185
6.*	1,268	0,041	0,00443	44
— x				220

* kontrolni uzorak ulja deklariranog kao "ulje bez kolesterola"

Zaključak

Sadržaj mliječne masti u uzorcima domaćeg maslaca iznosio je 83,9 %, a maslaca industrijske proizvodnje 85,2 %. Svi analizirani uzorci udovoljavali su odredbama Pravilnika o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura (Sl. list 51/82; NN RH 53/91).

Količina kolesterola u maslacu iz seoskih domaćinstava iznosila je 227 mg/100 g, a u uzorcima maslaca industrijske proizvodnje prosječna količina kolesterola iznosila je 220 mg/100 g.

QUANTITY OF CHOLESTEROL IN BUTTER FROM ZAGREB MARKET

Summary

In this article the quantity of cholesterol in butter - a representative of dairy products with known high quantity of milk fat, is determined. The results show that the quantity of milk fats for the butter samples from domestic production ($n=17$) was 83.9 %, and from the industrial production ($n=5$) 85.2 %. Average cholesterol quantities, in before mentioned samples, were 227 mg/100g or 22 mg of cholesterol per 100 g of sample. The results show that the increase of milk fats does not strictly influence cholesterol increase in the individual butter sample.

Key words: cholesterol, butter

Literatura

- AII, T., TAKANASHI, S., KURIHARA, M., KUME, S. (1989.): The effect of offered roughage on cholesterol levels in the milk fat of cows. *Japanese J. Zoot. Sci.* 60 (7), 671-678.
- BAŽULIĆ, D., J. SAPUNAR-POSTRUŽNIK, M. NAJDEK (1998.): Upotrebljivost enzimsko-spektrofotometrijske metode za određivanje kolesterola. Znanstveno-stručno savjetovanje s međunarodnim sudjelovanjem: "Veterinarski dani '98". Zbornik radova, 63-68.
- BERNER, L.A., LOFGREN, P.A. (1991.): Nutritional contribution of dairy foods: Accentuating the positive and managing perceived negatives. *J. Dairy Sci.* 74 (3), 1124-1130.
- CONNOR, S.L. AND COONOR, W. (1989.): The New American Diet, 19-26, Simon&Schuster Inc., New York.
- GROSSMANN, A., H. TIMMEN AND H. KLOSTERRMEYER (1976.): Die enzymatische Bestimmung von Cholesterin in MilCHFETT - eine Alternative zu den bisher gebräulichen Methoden. *Milchwissenschaft* 31, 721-724.
- GUYTON, A.C. (1990.): Medicinska fiziologija. Medicinska knjiga, Zagreb. Zagreb.
- KAIĆ-RAK, A., ANTONIĆ DEGAČ, K. (1998.): Prehrambena vrijednost i sastav jaja peradi. Jaja i meso peradi u prehrani i dijetetici. Ured.: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. Zagreb.
- Pravilnik o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura (Sl. list 51/82; NN RH 53/91)

RENNER, E. (1983.): Milk and dairy products in human nutrition, W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen.

VUJIČIĆ, I.F., VULIĆ, M., KÖNYVES, T. (1992.): Mlječni proizvodi sa smanjenom količinom holesterola. *Mljekarstvo* 42(1), 61-68.

SABADOŠ, D. (1996.): Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu. II. dopunjeno izdanje pripremili: J.Lukač-Havranek, S. Kirin. Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb. Zagreb.

Author's addresses - Adrese autora:

Mr. sc. Željka Cvrtila
Prof. dr. sc. Bela Njari
Prof. dr. sc. Mirza Hadžiosmanović
Prof. dr. sc. Branimir Mioković
Dr. sc. Lidija Kozačinski
Dr. sc. Darinka Pranjić
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Davorin Bažulić
Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Received - Prispjelo:

15. 11. 2000.

Accepted - Prihvaćeno:

07. 12. 2000.

Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review

Dubravka Samaržija, Neven Antunac, Jasmina Lukač Havranek

Review - Revijalni prikaz

UCD: 637.146.35

Summary

Lactococcus lactis species is one of the most important groups of lactic acid bacteria that are used in the dairy industry. The major functions of this species in dairy fermentation are the production of lactic acid from lactose, hydrolysis of casein and citric acid fermentation. Thus their metabolic end products and enzymes directly or indirectly have significant influence in determining the texture and flavour of the final products. In recent years, genetics and physiological properties of lactococci have considerably changed. Therefore, both for basic research and for application purposes in this paper the general view of the new taxonomic classification of *Lactococcus lactis*, the role of their plasmids and the physiology and nutritional requirements during growth are discussed.

Key words: Lc. lactis, taxonomy, physiology and growth

Introduction

Strains belonging to the species *Lactococcus lactis*, are the most important organisms in the manufacture of fermented dairy products such as sour milk, cream, butter, fresh cheeses and many varieties of semi-hard cheeses. Research on the genetic and physiological properties of these bacteria has expanded rapidly in the last decade. Therefore, for the better understanding of *Lactococcus lactis* species this paper discusses some of their most important characteristics.

Lactococcus lactis

The majority of the microorganisms from the Lancefield group of N streptococci have been transferred to the *Lactococcus* genus. The mobile

group of N streptococci has been integrated into the *Vagococcus* genus. The genus includes five species: *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* and *Lc. lactis*. But, among species of this genus only *Lc. lactis* is used in dairy technology.

This species have two subspecies and a biovar: *Lc. lactis* subsp. *lactis*; *Lc. lactis* subsp. *cremoris*; *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* (Schleifer et al., 1985; Stiles and Holzappel, 1997.). The literature, according to Salama et al., (1995.), on the basis of evidence gathered, identifies green plants as the natural habitat for lactococci, particularly for *Lc. lactis* subsp. *lactis*, and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. The natural source of the *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, has still not been confirmed and is the subject of numerous controversies.

Due to the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system (PEP-PTS), which ensure their efficient uptake and fermentation of lactose, some of these organisms have been adapted well to growth in milk and today the most recognised habitat for lactococci are dairy products (Axelsson, 1998.).

Lactococci are homofermentative microaerophilic Gram-positive bacteria which grow at a temperature of 10 °C, but not at 45 °C, and produce L(+) lactic acid from glucose. They are characterised by ovoid cells which appear individually, in pairs, or in chains. It often happens that cells of lactococci themselves extend into a chain, which makes them difficult to differentiate from lactobacilli. The group consisting of *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Leuconostoc* also forms cocci that occur as chains or pairs, so it is difficult to distinguish these genera from *Lactococcus* genera on a morphological basis. (Wijtzes et al., 1997.). Among the lactococci, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* differs from *Lc.lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* in their ability to utilise citrate with production of diacetyl. These strains possess citrate permease that enables them, without modification, to transport citrate into a cell (Kempler and McKay, 1981). However, as citrate utilisation is plasmid mediated it is an unstable characteristic of these bacteria, which resulting in them being classified as a variety of *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Stiles and Holzappel, 1997.). *Lactococcus lactis* do not possess flagella and do not create endospores, while some of its strains are capable of excreting extracellular polysaccharide substances (Marshall and Tamime, 1997.).

Lc.lactis is also characterised by numerous phenotype variations, and it is sometimes difficult to recognize the differences among them. Thus, according

to Bergeys' Manual (1994.), *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* produces ammonia from arginine. Collins (1977.), on the other hand, lists strains that do not possess that property, but are the *diacetyllactis* strains nevertheless. *Lc. lactis* subsp. *lactis* is usually differentiated from the subspecies *cremoris* on the basis of the maximum growth temperature and inability to produce ammonium from arginine (Pettersson, 1988.). Davey and Heap (1993.), however, established the existence of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* strains that manifest the arginine metabolism. Although research on genetic of lactic acid bacteria including genus *Lactococcus* began in the early 1970s there are still discrepancy in their fully characterization, especially between phenotypic and genotypic characteristics (Godon, et al. 1992; Salama et al. 1995).

Plasmids

One of the characteristics of the *Lc. lactis* strains is that their most industrially important traits are plasmid encoded. This means that plasmids carry genes for properties such as lactose catabolism and proteinase production as well as bacteriophage resistance (Gasson, 1993). The other important metabolic plasmid and their functions in lactococcal strains have also been described. Thus, we today know the plasmid genes controlling the metabolism of sucrose, galactose, mannose, xylose, glucose, citrate utilization, phage resistance and DNA restriction and modification, cell aggregation, production of bacteriocines, mucoidness and resistance to inorganic ions (McKay et al., 1976; McKay and Baldwin 1978; Larsen and McKay, 1978; Kempler and McKay, 1979a; Kempler and McKay, 1979b; Walsh and McKay, 1981; Crow et al., 1983; Davey, 1984; Thompson and Collins, 1989; Smith et al., 1992; von Wright and Sibakov, 1998; Miklič-Anderlič et. al. 2000.). In addition, lactococci usually contain many apparently cryptic plasmides (Thompson and Collins, 1989.) ranging in size from 1 to > 100 kilobase pairs (kbp). Bearing in mind that a plasmid DNA is replicated independently of the chromosome (Cords et al., 1974.), any mutation or rearrangements could cause the loss of plasmid in daughter cells. As they are not necessary for cell survival, the bacterial cell may have lost one or more plasmids spontaneously, by protoplast regeneration, transduction, conjugation and transformation, as a consequence of the function encoded by this plasmid (Kempler and McKay, 1981; Davies and Gasson, 1981; Chopin, 1993.). It was also found that

frequently repeated cultivations in milk or changed culture conditions lead to the loss of plasmid (McKay et al., 1976; Gasson and Davies, 1984; Foucaud et al., 1990; Davidson and Hillier, 1995.).

The plasmids size for the technologically useful traits varies from 17 to more than 50 kbp for lactose fermentation and proteinase activity and is relatively large (Otto et al., 1982; Thompson and Collins, 1989; Foucaud et al., 1990.). The average size of very important citrat plasmid which encoded production of diacetyl is 8,7 kbp (Thompson and Collins, 1989; Bandell et al., 1998.). Plasmids-encoded bacteriocines are also large and their size is from 81-133 kbp (von Wright and Sibakov, 1998). Strains of *Lc. lactis* usually possess from 2 to 11 DNA plasmids, while the most common are between 4 and 7 (McKay, 1983.).

Physiology and Growth of Lactococci

Protein metabolism

Like all other lactic acid bacteria, lactococci are highly fastidious with regard to the medium in which they grow. Their growth requires proteins, peptides, specific amino acids, derivatives of nucleic acids and vitamins, all of which serve as building units in the synthesis of their own cell compounds. In milk, the concentration of isoleucine, leucine, valine, histidine and methionine, which are essential to the majority of lactococci, is less than 1 mg/L. This content of free amino acids, that is initially present in milk, provides sufficient nitrogen for only 2% of the final cell density (Juillard et al., 1996.). Thus, for their optimal growth in milk, lactococci depends on their own proteolytic system to obtain the amino acids needed for growth to high cell densities. Casein, which composes 80% of all proteins present in milk, becomes the primary nitrogen source after nonprotein nitrogen is depleted (Steele, 1998.). The enzymes that form proteolytic system of lactococci and that are active in hydrolysis of casein are a cell wall-associated proteinase, an extracellular peptidase (s), amino acid transport system, peptide transport system and intracellular peptidases (Smid et al., 1991; Tjwan Tan et al., 1993; Juillard et al. 1998). But the key enzyme in proteolysis is a cell-wall associated proteinase (PI- or PIII- type proteinase [PrtP]) which cleavage more than 40% of the peptide bonds into more than 100 different oligopeptides (Juillard et al. 1995.). Then, for the uptake of nitrogenous compounds by

the cell, lactococci utilise three distinct transport systems di- and tripeptide and an oligopeptide transport system. The intracellular located peptidases then hydrolyse peptides into amino acids required for growth (Poolman et al., 1995; Meijer and Hugenholtz, 1997; Wang et al., 1998.). It is worth emphasising that both proteinase and the oligopeptide transport systems play a crucial role in amino acids, peptides and casein utilisation by lactococci when they grow in milk.

However, it has been established that the enzymatic system present within the *Lc. lactis* strains varies both biochemical and genetically (Exterkate et al., 1991; 1993; Bruinenberg and Limsowtin, 1995.). Thus, the activity level of cell proteinase and lysilaminopeptidase in the *Lc. lactis* subsp. *cremoris* strains, with a faster milk coagulation effect, has been found to be twice as high as *Lc.lactis* subsp. *lactis* with a faster milk curdling ratio. Although both strains, those with a faster coagulation effect and those with a slower coagulation effect, have significant level of caseolytic activity (Crow et al., 1994.). Electrophoretic study of proteolytic enzymes has established that significant differences also exist between the proteolytic, lactococci and lactobacilli systems (Sasaki et al., 1995.).

Recently, it was estimated that wild strains of lactococci required only between 1 and 4 amino acids for growth. So, in comparison with strains used in dairy industry these strains probably possess more active amino acid convertase (Ayad et al., 1999.). Since, several aminotransferases have been detected this may be suggested that lactococi have also enzymatic potential required for degradations of aromatic and branched-chain amino acids into volatile aroma compounds (Roudot-Algaron and Yvon, 1998.).

Lactose metabolism

The lactose metabolism of the *Lactococcus lactis* species differs from the lactose metabolism of other lactic acid bacteria. The difference is in the simultaneous catabolism of glucose and galactose. The gene responsible for lactose breakdown is carried by plasmid (Lac plasmid), and encodes the enzymes that transport lactose to a cell (McKay et al., 1976; McKay and Baldwin, 1978; Crow et al., 1983.).

Lactose is phosphorylated by phosphoenolpyruvate (PEP) during translocation by PEP-dependant phosphotransferase system (PEP: PTS). The intracellular lactose phosphate is subsequently hydrolysed to glucose and

galactose by different enzyme β -D-phosphogalactosidase. The galactose is then catabolized via the Tagatose pathway at the same time as the glucose is catabolised via Embden-Mayerhof-Parnas pathway (Marshall and Tamime, 1997.). In both pathways, an aldolase cleaves a diphosphate intermediate compound to produce the triose phosphate-dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde phosphate. These triose pathways are converted to pyruvate and then to lactate by enzyme L-lactate dehydrogenase (Steele, 1998.). The function of that pathways for the lactococci is to generate energy and lactic acid is by product. On the other hand thus organism eliminate pyruvate that is toxic for a cell, particularly when the medium pH is low (Tsau et al., 1992.). The utilisation of pyruvate in a cell is fourfold: reductive (lactate dehydrogenase), oxidative (by means of the pyruvate dehydrogenase complex), non-oxidative transfer (pyruvate formatelyase) and through α -acetolactate synthesis (Verhue and Tjan, 1991; Starrenburg and Hugenholtz, 1991; Hugenholtz and Starrenburg, 1992.).

Citrate metabolism

Among lactococci only *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* has the ability to metabolise the citrate present in milk. The metabolic end products of citrate metabolism are diacetyl, acetoin, 2,3 butanediol, acetic acid and carbon dioxide (Harvey and Collins, 1961; Cogan, 1995; Steele, 1998.) which contribute to the flavour development in fermented dairy products. Citrate is transported without modification into the cell. In *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* this reaction is catalysed by the citrat permease (CitP), which is encoded by the plasmid citP gene that is induced into the citQRP operon. The induction is not, however, conditioned by the presence of citrate in the medium, as was previously believed, but by the lactic acid produced through co-metabolism of glucose and citrate when the pH value of the medium is low (Garcia-Quintans et al., 1998; Bandell et al., 1998.).

The presence of CitP is essential for citrate utilization, since in its absence no citrate metabolism is observed although all enzymes involved in conversion of citrate are present inside the cells (Lopez et al., 1998.). During citrate metabolism three decarboxylation reactions occur: oxalacetate to pyruvate, pyruvate to acetaldehyde-thiaminopyrophosphate (TPP) and α -acetolactate to acetoin. Quantitatively, acetoin is the most important product of citrate metabolism and occurs as a mechanism of preventing accumulation of pyruvate. Diacetyl and CO₂ are produced in small quantities, but their

commercial value is significant since they are responsible for both the texture and flavour of fermented products (Cogan, 1995.). Diacetyl is produced by chemical decomposition of α -acetolacete (nonenzymatic) and this reaction occurs at the intracellular level. This reaction is favoured by aeration and low pH (Cogan, 1995; Axelsson, 1998; Rondags et al., 1998.).

The ability to metabolised citrate also has the strains of *Leuconostoc* spp. However, significant differences in enzyme activities exist in the production of acetoin and diacetyl, and the use of citrate, between them. *Leuconostoc* spp. produce little or no acetoin in the presence of citrate while the *Lc.* and *lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* produce large quantity of acetoin when citrate is present and a small quantity of acetoin when there is no citrate (Cogan, 1975; Drinan et al., 1976; Hugenholtz and Starrenburg, 1992.). *Leuconostoc* spp. from *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is also distinguished by the inducible nature of citrate lyase and α -acetolacetate synthase. While both these enzymes are constitutively present in citrate metabolism of *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in *Leuconostoc* spp enzymes are induced in the presence of citrate (Cogan, 1981; Hugenholtz and Starrenburg, 1992.). This explains the differences in the mechanism and regulation of citrate utilization and diacetyl production in these two species. However, the process of diacetyl formation by both species is still poorly understood and therefore difficult to control during the manufacture of dairy products. Recently much work has been done on citrate metabolism by lactococci and leuconostocs, but many questions remains to be answered that will enable better understanding of many interesting genetic phenomena which are specific for those bacteria. (Starrenberg and Hugenholtz, 1991; Hugenholtz and Starrenberg, 1992; Hugenholtz et al., 1993; Bassit et al., 1995.).

Bacteriocin production

Certain strains of the species *Lc. lactis* produce a multitude of different antagonistic compounds, including antimicrobial proteins or bacteriocins. These compounds occur as a final products of the metabolism process. The ability of some strains to produce bacteriocins is significant from technological scientific aspects (Klaenhammer, 1993; Rogelj and Bogovič- Matijašič, 1994; De Vuyst and Vandamme, 1994.).

Bacteriocins are proteins or protein complexes containing bacteriocidal properties. Lactococcal bacteriocins are small thermostable proteins that destroy closely related bacteria. The exception is the nisine molecule which activity is directed towards the wide range of gram-positive bacteria, including *Listeria monocytogenes* (Harris et al., 1991.). Nisine, which is produced by some strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis*, is the best-known bacteriocin and it is now well established that nisin production and immunity are coded by a transmissible chromosomal gene block (von Wright and Sibakov, 1998.). It consists of 34 amino acids, has a molecular mass of 3354 (De Vuyst, 1995; Kuipers et al., 1995.), belongs to the group of lantibiotics, and has a practical use in food preservation. It is successfully used in the production of cheeses, melted cheeses, milk desserts, fermented drinks and canned vegetables (Fowler and Gasson, 1991; Rodrigez et al., 1995.). In 1988 the US Food and Drug Administration (FDA) accepted it as a preservative for prevention of delayed clostridial bloating in cheeses.

In addition to *Lc. lactis* subsp. *lactis*, the certain strains of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* possess an ability to produce different bacteriocins with a range of inhibition. However, their possible value in the growth control of microorganisms causing decay, and of pathogenic microorganisms, remains to be investigated (Cogan et al. 1997.).

Conclusion

The metabolic properties of the strains within the *Lc. lactis* species have a direct or indirect influence on the organoleptic, nutritional and hygienic quality of fermented dairy products, which makes knowledge of their characteristics extremely important from an economic aspect. However, this is no easy task because, as this paper has shown, the bacteria in question possess quite unique morphological and phylogenetic properties. The three genes responsible for lactic acid synthesis and organised into a single transcription unit or operon, which have been established in the chromosome, have not been found in any other bacterium (Griffin and Gasson, 1993; Davidson and Hillier, 1995.). A number of genes important for their industrial use are carried on plasmids. While those genes have been characterised the study of chromosomal genes, which provide more than 95% of genetic information of the cell for lactococci is still limited (Chopin, 1993.). Considering that lactococci are more than just lactic acid producer, those bacteria will excite the

interest of both scientists and dairy experts, as well as presenting a challenge in numerous genetic, physiological and technological research projects.

TAKSONOMIJA, FIZIOLOGIJA I RAST SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS*

Sažetak

Sojevi *Lactococcus lactis* vrste pripadaju najznačajnijoj grupi organizama koji se koristi u mljekarskoj industriji. Važnost tih bakterija je u njihovoj sposobnosti hidrolize laktoze, kazeina i citrata iz mlijeka. Razgradni produkti i oslobođeni bakterijski enzimi direktno ili indirektno utječu na teksturu i okus finalnog proizvoda. Saznanja o genetičkim i fiziološkim svojstvima sojeva *Lactococcus lactis* vrste zadnjih godina znatno su se izmijenila. Na osnovi tih saznanja, koja nisu samo značajna za znanstvena istraživanja već imaju i praktičnu primjenu, u radu je prikazana nova taksonomska klasifikacija sojeva *Lactococcus lactis* vrste. Objasnjena je uloga plazmida za najvažnija svojstva u mliječnim fermentacijama, te fiziološki i nutritivni zahtjevi u vrijeme rasta sojeva *Lactococcus lactis* vrste u mlijeku.

Ključne riječi: *Lc.lactis*, taksonomija, fiziologija i rast.

References:

- AXELSSON, L. (1998.): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria, Ed. Salminen, S., von Wright, A. Marcel Dekker, INC., New York, sec.edition. 1-73
- AYAD, E. H.E., VERHUEL, A., DE JOUNG, C., WOUTERS, J.T. M., SMIT, G. (1999.): Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* 9: 725-735
- BANDELL, M., LHOTTE, M. E., MARTY-TEYSSET, C., VEYRAT, A., PREVOST, H., DARTOIS, V., DIVIES, C., KONINGS, W. N., LOKMENA, J.S. (1998.): Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1594-1600
- BASSIT, N., BOQUIEN, C-Y. PICQUE, D., CORRIEU, G. (1995.): Effect of temperature on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483. *J.Dairy Res.* 62: 123-129

- BERGEYS MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY 9TH EDITION. (1994.): Group 17 Gram-positive Cocci. Williams & Wilkins, Baltimore, 527-558
- BRUINENBERG, P. G., LIMSOWTIN, G.K.Y. (1995.): Diversity of proteolytic enzymes among lactococci. *Aust. J. Dairy Technol.* 50: 47-50
- CHOPIN, A. (1993.): Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 21-38
- COGAN, T. M. (1975.): Citrate utilisation in milk by *Leuconostoc cremoris* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Res.* 42: 139-146
- COGAN, T. M. (1981.): Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus* subsp. *diacetylactis*. *J. Dairy Res.* 48: 489-495
- COGAN, T. M. (1995.): Flavor production by dairy starter cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 79: 49S-64S.
- COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P.S., FERNANDEZ, I., GOMEZ, J., GOMEZ, R., KALANTZOPOULUS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M.C., RODRIGUEZ, E. (1997.): Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421
- COLLINS, E. B. (1977.): Influence of medium and temperature on products and growth. *J. Dairy Sci.* 60:799-804
- CORDS, B.R., MCKAY, L.L., GUERRY, P. (1974.): Extrachromosomal elements in group N streptococci. *J. Bacteriol.* 117:1149-1152
- CROW, V. L., DAVEY, G. P., PEARCE, L. E., THOMAS, T. D. (1983.): Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: effect on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.* 153: 76-83
- CROW, V. L., HOLLAND, R., PRITCHARD, G. G., COOLBEAR, T. (1994.): The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: 2. The levels and subcellular distributions of peptidase and esterase activities. *Int. Dairy J.* 4: 723-742
- DAVEY, G. P., (1984.): Plasmid associated with diplococci in *Streptococcus cremoris* 347. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 895-896
- DAVIDSON, B.E., HILLIER, A. J. (1995.): Developing new starters for fermented milk products. *Aust. J. Dairy Technol.* 50: 6-9
- DAVIES, F. L., GASSON, M. J. (1981.): Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 48: 363-376
- DE VUYST, L. (1995.): Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 28-33
- DE VUYST, L., VANDAMME, J. (1994.): Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria*. Bleckie Academic and Profesional, London
- DAVEY, G. P., HEAP, H. A. (1993.): Appearance of the arginine phenotype *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2204 following phage transduction. *Can. J. Microbiol.* 39: 754-758

- DRINAN, D. F. TOBIN, S., COGAN, T. M. (1976.): Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 481-486
- EXTERKATE, F. A., ALTING, A. C., SLANGEN, C. J. (1991.) Specificity of two genetically related cell-envelope proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* towards α_{s1} -casein (1-23)-fragment. *Biochem. J.* 279: 135-139
- EXTERKATE, F. A., ALTING, A. C., BRUINENBERG, P. G. (1993.): Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3640-3647
- FOUCAUD, C., FURLAN, S., WINTERS, D. A., HEMME, D. (1990.): Specific loss of the plasmid encoding for lactose metabolism by *Lactococcus lactis* CNRZ 125. *Milchwissenschaft* 45: 642-646
- FOWLER, G. G., GASSON, M.J. (1991.): Antibiotics-nisin. In: Food Preservatives, N.J. Russel, G.W. Gould, Blackie, London, 135-152
- GARCIA-QUINTANS, N., MAGNI, C., DE MENDOZA D., LOPEZ, P. (1998.): The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 850-857
- GASSON, M. J., DAVIES, F. L. (1984.): The genetic of dairy lactic-acid bacteria. In: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks, Ed. F.L. Davies, B.A. Law, Elsevier Applied Science Publishers, London, 99-126
- GASSON, M. J.(1993.):Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 12: 3-20
- GODON, J-J., DELORME, C., EHRLICH, S. D., RENAULT, P. (1992.): Divergence of genomic Sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 4045-4047
- GRIFFIN, H. G., GASSON, M. J. (1993.): The regulation of expression of the *Lactococcus lactis* lactose operon. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 92-96
- HARRIS, L. J., FLEMING, P., KLAENHAMMER, T. R. (1991.): Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* H ATCC 19115, Scott A, and UAL 500 to nisin. *J. Food Protect.* 54: 836-840
- HARVEY, R. J., COLLINS, E. B. (1961.): Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bact.* 86: 1301-1306
- HUGENHOLTZ, J., STARRENBURG, M. J. C. (1992.): Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 17-22
- HUGENHOLTZ, J., PERDON, L., ABEE, T. (1993.): Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4216-4222

- JUILLARD, V., LAAN, H., KUNJI, E.R.S., JERONIMUS- STRATINGH, C.M., BRUINS, A. P., KONINGS, W.N. (1995.): The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J.Bacteriol.* 177: 3472-3478
- JUILLARD, V., FURLAN, S., FOUCAUD, C., RICHARD, J. (1996.): Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *J. Dairy Sci.* 79: 964- 970
- JUILLARD, V., FOUCAUD, C., FLAMBARD, B., FURLAN, S., BELLENGER, P., RICHARD, J. (1998.): Role of nutritional factors in the interaction between mesophilic lactic acid bacteria during growth in milk. *Lait* 78: 91-97
- KEMPLER, G. M., MCKAY, L. L. (1979a.): Characterisation of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 316-323
- KEMPLER, G. M., MCKAY, L. L. (1979b.): Genetic evidence for plasmid-linked lactose in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1041-1043
- KEMPLER G. M., MCKAY, L. L. (1981.): Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 64: 1527-1539
- KLAENHAMMER, T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 39-85
- KUIPERS, O. P., ROLLEMA, H. S., BEERTHUYZEN, M. M., SIEZEN, R. J., DE VOS, W. M. (1995.): Protein engineering and biosynthesis of nisin and regulation of transcriptio of the structural nis A gene. *Int. Daity J.* 5:785-795
- LARSEN, L. D., MCKAY, L. L. (1978.): Isolation and characterization of plasmid DNA in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 944-952
- LOPEZ, P., DRIDER, D., GARCIA QUINTANS, N., ANGELES CORRALES, M., MAGNI, C., MARTIN, M., MENDOZA, D. DE. (1998.): Regulation of expression of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* citrate transport system. *Lait* 78:11-16
- MARSHALL, V. M. E., TAMIME, A. Y. (1997.): Physiology and biochemistry of fermented milks. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk 2nd ed.*, Ed. B.A. Law. Blackie Academic& Professional, London, 153-186, Marshall et al., 1995.
- MCKAY, L. L., BALDWIN, K. A., EFSTATHIOU, J. D. (1976.): Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 45-52
- MCKAY, L. L., BALDWIN, K. A. (1978.): Stabilization of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 360-367
- MCKAY, L. L. (1983.): Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 259-274

- MEIJER, W. C., HUGENHOLTZ, J. (1997.): Proteolytic enzyme activity in lactococci grown in different pretreated milk media. *J. Appl. Microbiol.* 83:139-146
- MIKLIČ-ANDERLIČ, ANDREJA, BOGOVIČ MATIJAŠIČ, BOJANA, ČANŽEK MAJHENIČ, ANDREJA, ROGELJ, IRENA (2000.): Plazmidni profil izoliranih sojeva *Lactococcus lactis*, Zbornik sažetaka, 34. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran 8-11 studeni 2000.
- OTTO, R., DE VOS, W.M., GAVRIELI, J. (1982.): Plazmid DNA iz *Streptococcus cremoris* Wg2: influence of pH on selection in chemostats of a variant lacking a protease plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1272-1277
- PETTERSON, H.E. (1988.): Starters for fermented milks. Sec.2: Mesophylic starter cultures. *IDF Bull.* 227:19-26
- POOLMAN, B., KUNJI, E.R.S., HAGTING, A., JUILLARD, V., KONING, W.N. (1995.): The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 79:65S-75S.
- RODRIGEZ, J.M., CINTAS, L. M., CASAUS, P., HORN, N., DODD, H. M., HERNANDEZ, P.E., GASSON, M. J. (1995.): Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 109-115
- ROGELJ, IRENA, BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, BOJANA (1994.): Bacteriocin of lactic acid bacteria-properties, range of inhibitory activity and methods of detection. *Preh.-tehnol. biotehnol. rev., spec. izd.* 32: 171-175
- RONDAGS, E., GERMAIN, P., MARC, I. (1998.): Kinetic studies of α -acetolactis acid extra and intracellular oxidative decarboxylation to diacetyl by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* SD 933. *Lait* 78:153-143
- ROUDOT-ALGARON, F., YVON, M. (1998.). Catabolism of aromatic and branched -cheim amino acids in *Lactococcus lactis*. *Lait* 78: 23-30
- SALAMA, M.S., MUSAFIJA-JEKNIC, T., SANDINE, W. E., GIOVANNONI, S.J. (1995.): An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 78: 1004-1017
- SASAKI, M., BOSMAN, B. W., TAN, P.S.T. (1995.): Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Res.* 62: 611-620
- SCHLEIFER, K-H., KRAUS, J., DVORAK, C., KLIPPER-BALZ, R., COLLINS, M.D., FISHER, W. (1985.): Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Sys. Appl. Microbiol.* 6: 183-195
- SMID, E. J., POOLMAN, B., KONINGS, W. N. (1991.): Casein utilization by lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2447-2452
- SMITH, M. R., HUGENHOLTZ, J., MIKOCZI, P., DE REE, E., BUNCH, A. W., DE BONT, J. A. M. (1992.): The stability of lactose and citrat plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96: 7-12

- STARRENBERG, M. J. C., HUGENHOLTZ, J. (1991.): citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3535-3540
- STEELE, J.L. (1998.): Genetics and metabolism of starter cultures. In: Applied Dairy Microbiology, Ed. E. H. Marth, J. L. Steele, Marcel Dekker, INC., New York. 173-193
- STILES, M. A., HOLZAPFEL, W. H. (1997.): Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29
- THOMPSON, J. K., COLLINS, M. A. (1989.): A comparison of the plasmid profiles of strains of lactic streptococci isolated from a commercial mixed strain starter culture with those from fermented milk. *Milchwissenschaft* 44: 65-69
- TJWAN TAN, P. S. T., POOLMAN, B., KONINGS, W. N. (1993.): Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60: 269-286
- TSAU, J. L., GUFFANTI, A. H., MONTVILLE, T. J. (1992.): Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: 891-894
- VERHUE, W. M., TJAN, F.S. B. (1991.): Study of citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of ¹³C nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3371-3377
- VON WRIGHT, A., SIBAKOV, M. (1998.): Genetic modification of Lactic Acid Bacteria. In Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects, 2nd, Ed. S. Salminen, A. von Wright, Marcel Dekker, INC., New York, 161-211
- WALSH, P., MCKAY, L. L. (1981.): Recombinant plasmid associated with cell aggregation and high-frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. *J. Bacteriol.* 146: 937-3-944
- WANG, H. YU, W., COOLBEAR, T., O'SULLIVAN, D., MCKAY, L. L. (1998.): A deficient in aspartate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. C2 causes slow milk coagulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1673-1679
- WIJTZES, T., BRUGGEMAN, M. R., NOUB, M. J.R., ZWIETERING, M. H. (1997.): A computerised system for identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microb.* 38: 65-70

Author's addresses - Adrese autora:

Doc. dr. sc. Dubravka Samaržija
Doc. dr. sc. Neven Antunac
Prof. dr. sc. Jasmina Lukač Havranek
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mljekarstvo
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Received - Prispjelo:

January 14, 2001

Accepted - Prihvaćeno:

March 15, 2001

Higijenska kakvoća sirovog mlijeka u svjetlu zakonskih propisa

Slavko Kirin

Stručni rad - Professional paper

UDK: 637.112

Sažetak

Higijenska kakvoća sirovog mlijeka temeljni je pokazatelj higijenskih uvjeta u proizvodnji i postupanju s mlijekom i odlučujući čimbenik njegove gospodarske valorizacije stočarskog proizvoda i sirovine za proizvodnju mliječnih proizvoda. Stoga je ona, izražena ukupnim brojem mikroorganizama u 1 ml sirovog mlijeka, uključena u suvremeno mljekarsko zakonodavstvo i sustave plaćanja mlijeka po kakvoći. Osim gospodarskih i tehnoloških razloga, higijenska kakvoća sirovog mlijeka važna je i zbog njegove zdravstvene pouzdanosti, osobito u uvjetima prodaje i prometa sirovog mlijeka.

U radu su prikazane norme kakvoće sirovog mlijeka u zakonskim propisima EU i Hrvatske. Navedene su i norme broja somatskih stanica u sirovom mlijeku koje se, kao pokazatelj kakvoće, uvijek navode uz ukupni broj mikroorganizama. Prikazani su i sustavi plaćanja sirovog mlijeka s obzirom na njegovu higijensku kakvoću, kao i naša postojeća zakonska regulativa u svjetlu novog Pravilnika o kakvoći sirovog mlijeka. Predloženi su i načini što bržeg usklađivanja i uključivanja u naprednu mljekarsku regulativu i mljekarsku praksu.

Ključne riječi: higijenska kakvoća, ukupni broj mikroorganizama, broj somatskih stanica, pravilnici

Uvod

Pored fizikalno-kemijskih svojstava i prisutnosti inhibitornih tvari, higijenska svojstva sirovog mlijeka temeljni su pokazatelj njegove kakvoće, prikladnosti za preradu i zdravstvene ispravnosti. Kao mjera higijenske kakvoće sirovog mlijeka, u mljekarskoj se praksi i u zakonskim propisima uzima ukupan broj mikroorganizama u 1 ml sirovog mlijeka. Higijenska kakvoća sirovog mlijeka i njezina valorizacija imaju višestruku važnost u

mljekarstvu. S gospodarskog gledišta, ona predstavlja ekonomski interes koji ostvaruje proizvođač i prerađivač mlijeka - mljekara. Proizvođač mlijeka to ostvaruje kroz cijenu mlijeka. Prerađivaču – mljekari, higijenska kakvoća sirovog mlijeka važna je zbog sigurnosti i troškova proizvodnje, iskoristivosti mlijeka (prinos proizvoda) i postignute kakvoće gotovih proizvoda. Tehnološka važnost higijenske kakvoće sirovog mlijeka proizlazi iz njegove prikladnosti za preradu. Broj i vrste mikroorganizama u sirovom mlijeku i proizvodi njihovog metabolizma imaju veliku ulogu u oblikovanju organoleptičkih svojstava i kakvoće gotovih proizvoda.

Higijenska kakvoća sirovog mlijeka određuje i njegov zdravstveni status i sigurnost, posebice u uvjetima upotrebe i konzumacije sirovog mlijeka i proizvoda dobivenih njegovom preradom. To je naročito važno u suvremenim trendovima zdrave prehrane jer sve educiraniji potrošači traže upravo sirovo mlijeko i njegove proizvode (“bio”, “eko” i sl.).

Zbog ove višestruke važnosti, higijenska kakvoća sirovog mlijeka uvrštena je kao norma u zakonske propise pojedinih zemalja. Zemlje članice EU obvezuju propisi iz Uredbe vijeća 92/46/EEZ od 16. VI 1992. g. Slijedeći europsko zakonodavstvo, novim Pravilnikom o kakvoći sirovog mlijeka i Hrvatska uvodi njegova higijenska svojstva kao kriterij kakvoće i razvrstavanja.

Uključenje higijenske kakvoće sirovog mlijeka u sustav plaćanja mlijeka predstavlja djelotvoran način unapređenja njegove kakvoće, a time i uvjeta proizvodnje koji tu kakvoću omogućuju i osiguravaju. Stoga ona ima svoju razvojnu i odgojnu ulogu u suvremenom mljekarstvu. Sustavi plaćanja mlijeka po kakvoći razlikuju se od zemlje do zemlje. U našim domaćim prilikama, mlijeko se još ne plaća po higijenskoj kakvoći. No, kao nužnost u uvjetima aktualnih integracijskih procesa, mora se računati i na uvođenje ovog elementa u sustav plaćanja sirovog mlijeka, bez obzira na poteškoće kojih će biti u praksi.

Higijenska kakvoća sirovog mlijeka i zakonski propisi

U zakonskoj regulativi higijenska kakvoća sirovog mlijeka propisana je pravilnicima koji se odnose na higijenske propise u proizvodnji i prometu sirovog mlijeka, toplinski obrađenog mlijeka i mliječnih proizvoda. Za zemlje članice EU temeljni takav dokumenat predstavlja Uredba Vijeća EU 92/46/EEZ prema kojoj su članice uskladile svoje nacionalne zakonske

propise. Norme kakvoće sirovog mlijeka propisane tom uredbom, prihvatila je većina zemalja te ih ugradila u svoje pravilnike. Hrvatska je to učinila 17. X. 2000. g. U nastavku je detaljnije prikazana spomenuta Uredba.

Uredba Vijeća EU 92/46/EEZ

Ovu uredbu Vijeće EU donijelo je 16. lipnja 1992. g., a odnosi se na higijenske propise u proizvodnji i prometu sirovog mlijeka, toplinski obrađenog mlijeka i proizvoda na bazi mlijeka. Cilj Uredbe je objedinjavanje i ujednačivanje zakonskih propisa iz ovog područja unutar zemalja članica EU koje su morale svoju nacionalnu zakonsku regulativu do 1. siječnja 1994. g. uskladiti s propisima Unije.

Krajnji pak cilj ove Uredbe je razvoj mljekarstva kao važne gospodarske grane i zaštita zdravlja građana. Mlijeko i mliječni proizvodi, koji se uvoze iz trećih zemalja, moraju udovoljavati važećim propisima EU.

Ovom Uredbom proširuju se higijenski propisi prijašnje Uredbe Vijeća 85/397/EEZ (1. siječnja 1994. g. prestala važiti), dok Uredba 89/362/EEZ o općim higijenskim propisima u proizvodnji mlijeka i dalje postoji. Prva promjena, odnosno dopuna Uredbe 92/46/EEZ donesena je 13. XII. 1994. godine Uredbom 94/71/EEZ. O zahtjevima higijenske kakvoće sirovog mlijeka, Uredba 92/46 govori u članku 3., stavku 1., točki b. Premda neizravno, i točke c, d, e ovog stavka propisivanjem zdravstvenih i higijenskih uvjeta za muzne životinje te proizvodnju i postupak s mlijekom, usko su vezane uz postizanje mikrobiološke kakvoće sirovog mlijeka. Točka b, stavka 1., članka 3 važeće Uredbe propisuje da se sirovo mlijeko smije koristiti kao tzv. "tvorničko mlijeko", ili za proizvodnju toplinski obrađenog mlijeka samo onda, ako pored članka 10., stavka 2. i članaka 14. i 15., udovoljava normama Priloga A, Poglavlja IV. Spomenuto IV. poglavlje Priloga A, u odjeljku A, točki 1. propisuje i norme broja mikroorganizama i broja somatskih stanica u 1 ml sirovog kravljeg mlijeka koje služi za proizvodnju toplinski obrađenog konzumnog mlijeka, fermentiranih mlijeka, modificiranih mlijeka i vrhnja. One glase:

Broj mikroorganizama/ml	≤ 100.000
Broj somatskih stanica	≤ 400.000

U točki 2. istog odjeljka propisane su vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih stanica koje smije sadržavati sirovo kravlje mlijeko namijenjeno proizvodnji ostalih mliječnih proizvoda. To su:

	od 1. I 1994.	od 1. I 1998.
Broj mikroorganizama/ml	≤ 400.000	≤ 100.000
Broj somatskih stanica/ml	≤ 500.000	≤ 400.000

Dakle, izjednačeni su zahtjevi za sirovo mlijeko namijenjeno proizvodnji svih mliječnih proizvoda, odnosno proizvoda na bazi mlijeka.

Pod brojem mikroorganizama u 1 ml sirovog mlijeka, podrazumijeva se geometrijska sredina njihovog broja u 2 uzastopna mjeseca, od najmanje 2 mjesečno uzeta uzorka mlijeka.

Broj somatskih stanica izražava geometrijsku sredinu njihovog broja u 3 uzastopna mjeseca, od najmanje jednom mjesečno uzetog uzorka mlijeka.

U odjeljku C, IV. poglavlja, propisan je ukupan broj mikroorganizama za sirovo ovčje i kozje mlijeko namijenjeno proizvodnji toplinski obrađenog konzumnog ovčjeg i kozjeg mlijeka, te proizvoda na bazi ovih mlijeka. Od 1. I 1994. g. on iznosi: ≤ 1.000.000 u 1 ml mlijeka. To je geometrijska sredina broja mikroorganizama u 2 uzastopna mjeseca, od najmanje 2 mjesečno uzeta uzorka.

Kravlje sirovo mlijeko koje se bez toplinske obrade prerađuje u mliječne proizvode, mora udovoljavati svim zahtjevima kao i kravlje sirovo mlijeko koje se toplinski obrađuje kako je propisano u IV. poglavlju, Priloga A, u točki 3., odjeljka A. Pored tih zahtjeva, takvo mlijeko mora udovoljavati sljedećoj normi glede prisutnosti bakterije *Staphylococcus aureus* u 1 ml mlijeka: $n = 5$, $m = 500$, $M = 2.000$, $c = 2$.

Ovčje i kozje mlijeko, koje bez toplinske obrade služi za proizvodnju mliječnih proizvoda prema točki 2., odjeljka C, IV. poglavlja Priloga A, ne smije sadržavati više od 500.000 mikroorganizama u 1 ml, a glede prisutnosti bakterije *Staphylococcus aureus* važi isti propis kao i za kravlje mlijeko.

Inače, Uredba 92/46 ne propisuje norme za sirovo mlijeko koje proizvođač izravno prodaje krajnjem korisniku ili iz njega proizvodi mliječne proizvode u vlastitom gospodarstvu. To je ostavljeno zakonskoj regulativi zemalja članica

EU. Tako se u važećem njemačkom Pravilniku o mlijeku (Milchverordnung) u članku 7. propisuju zahtjevi za konzumno mlijeko, koje se prodaje sirovo, pod nazivom "prednosno mlijeko". Što se tiče mikrobiološke kakvoće, ono mora udovoljavati zahtjevima Priloga 9, navedenim u točki 3., a prikazani su u tablici 1.

Tablica 1: Zahtjevi za "prednosno" mlijeko

Table 1: Legislations set down for the raw milk

	m	M	n	c
Broj mikroorganizama/ml	30.000	50.000	5	2
Koliformne bakterije	20	100	5	1
<i>Staphylococcus aureus/ml</i>	100	500	5	2
<i>Streptococcus agalactiae/0,1 ml</i>	0	10	5	2
Broj somatskih stanica/ml	300.000	400.000	5	2
<i>Salmonella/25 ml</i>	0	0	5	0
Patogeni mikroorganizmi ili njihovi toksini ne smiju biti u količinama koje mogu utjecati na zdravlje potrošača.				
Senzorna svojstva: bez odstupanja				
Nalaz fosfataze: pozitivan				

(Werner, G.(2000), Milchverordnung, Handbuch Milch, Behr's...Verlag, Hamburg)

Hrvatski zakonski propisi o higijenskoj kakvoći sirovog mlijeka

U današnjim važećim zakonskim propisima o mlijeku, ne nalazi se norma njegove higijenske kakvoće, niti je zakonski uređeno razvrstavanje i plaćanje mlijeka. Naime, do 21. VI. 1994. g. važila je odredba da sirovo mlijeko ne smije sadržavati više od 3.000.000 mikroorganizama u 1 ml (Pravilnik o uvjetima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju udovoljavati živežne namirnice u prometu, Sl. list SFRJ, br. 45/83, čl. 18). Od 21. VI. 1994. g. važi Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice (N. N. br. 46/94) koji ne propisuje normu za ukupan broj mikroorganizama u 1 ml sirovog mlijeka. Tako se u ovih posljednjih šest godina higijenska kakvoća sirovog mlijeka našla izvan bilo kakvih zakonskih propisa.

Novim Pravilnikom o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (N.N., br. 102/2000.), objavljenim 17. X. 2000. g., a počinje se primjenjivati od 1. I. 2001. g., utvrđene su norme ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih stanica u 1 ml sirovog kravljeg, te ovčjeg i kozjeg mlijeka. One iznose:

Vrsta mlijeka	Broj mikroorganizama/ml	Broj somatskih stanica/ml
Kravlje	≤ 100.000	≤ 400.000
Ovčje i kozje	≤ 1.500.000	-

Higijenska kakvoća, razvrstavanje i cijena sirovog mlijeka

Osim važnosti sa zdravstvenog stanovišta što je glavni smisao državnih propisa, higijenska kakvoća sirovog mlijeka važna je i u izračunu njegove cijene, a to se neposredno tiče proizvođača i prerađivača mlijeka(mljekara).

U pojedinim zemljama postoje različiti sustavi i modeli plaćanja mlijeka proizvođačima. Uzimaju se različiti parametri kakvoće za obračun cijene mlijeka. Ipak se u posljednje vrijeme, posebice u zemljama EU, nastoje ujednačiti zakonski propisi koji obuhvaćaju ovu važnu problematiku.

Svrha je svih sustava:

- kakvoća mlijeka
- pravednost
- motivacija proizvođača

U razvijenijim zemljama parametri za plaćanje mlijeka grupirani su u sljedeće pokazatelje kakvoće:

- sadržaj masti
- sadržaj bjelančevina
- ukupan broj mikroorganizama u 1 ml
- broj somatskih stanica u 1 ml
- prisustvo inhibitornih tvari
- točka ledišta

U nastavku su prikazani modeli obračuna otkupne cijene mlijeka prema mikrobiološkoj kakvoći i broju somatskih stanica u zemljama s kojima se najčešće uspoređujemo. To su Njemačka i Slovenija.

Njemačka

U Njemačkoj je na snazi Pravilnik o kakvoći mlijeka, donesen još 1980. g.. On je do danas doživio pet promjena. Posljednja je bila 1. I. 1998. g., a u skladu je s Uredbom 92/46/EEZ. U tablici 2. prikazan je razvoj razvrstavanja mlijeka u Njemačkoj prema broju mikroorganizama od 1980. g. do danas.

Tablica 2: Razredi mikrobiološke kakvoće sirovog mlijeka u Njemačkoj
Table 2: Classes of microbiological quality of raw milk in Germany

Razred Class	Razdoblje – Broj mikroorganizama (u tisućama) Period - Number of microorganisms (thousands)			
	do 31. XII. 1992.	1. I. 1993. – 31. XII. 1993.	1. I. 1994. – 31. XII. 1997.	od 1. I. 1998.
S			≤ 75	≤ 50
I	≤ 300	≤100	≤ 100	≤ 100
II	>300 – 1.000	>100 – 300	>100 – 400	> 100
III	>1.000 – 3.000	>300 – 800	>400	
IV	> 3.000	> 800		

(Kirst, E.(1999.): Lebensmittelhygienische Untersuchungen, Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch, DMZ, 12/99, München)

Iz gornje tablice vidljiv je vremenski slijed pooštavanje kriterija o kakvoći mlijeka, a Pravilnik je usklađen s Uredbom 92/46/EEZ. Pod ukupnim brojem mikroorganizama podrazumijeva se geometrijska sredina najmanje 2 mjesečno analizirana uzorka mlijeka u posljednja 2 mjeseca. Iznimno se može uzeti geometrijska sredina 1 mjeseca, ako su u njemu analizirana najmanje 3 uzorka. Kriteriji broja somatskih stanica u navedenom Pravilniku, prikazani su u tablici 3.

Broj somatskih stanica predstavlja geometrijsku sredinu posljednja 3 mjeseca u kojima je mjesečno analiziran najmanje 1 uzorak mlijeka.

Njemački Pravilnik o kakvoći mlijeka propisuje, da se u slučaju II. razreda mikrobiološke kakvoće (>100.000 mikroorganizama/ml) obračunata cijena sirovog mlijeka umanjuje za 4 Pf/kg, dok se za postignuti S razred, uz ispunjene i druge uvjete, može dodati određena povišica.

Kod prekoračenja broja somatskih stanica preko 400.000/ml, prema ovom Pravilniku, obračunata cijena se umanjuje najmanje za 2 Pf/kg mlijeka.

Tablica 3: Njemačke norme za broj somatskih stanica u sirovom mlijeku

Table 3: Number of somatic cells in raw milk according to German's standard

Razred S Class S	Razdoblje – Broj somatskih stanica(u tisućama) Period - Number of microorganisms (thousands)	
	1. I. 1994.-31. XII. 1997.	od 1. I. 1998.
	≤ 350	≤ 300
Sirovo mlijeko za proizvodnju toplinski obrađenog konzumnog mlijeka, fermentiranih mlijeka i dr.	≤ 400	≤ 400
Sirovo mlijeko za ostale proizvode na bazi mlijeka	≤ 500	≤ 400

(Kirst, E. (1999): Lebensmittelhygienische Untersuchungen, Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch, DMZ, 12/99, München)

Slovenija

Otkupna cijena kravljeg mlijeka u Sloveniji od 1. VII. do 31. XII. 2000. g. izračunava se na temelju vladine Uredbe o utvrđivanju elemenata otkupne cijene kravljeg mlijeka (Ur. list R. S. br. 59/30. 6. 2000.). U formuli za obračun nalazi se i parametar higijenske kakvoće, odnosno razred kakvoće. U tablici 4 prikazano je razvrstavanje mlijeka u razrede kakvoće prema ukupnom broju mikroorganizama u 1 ml sirovog mlijeka.

Tablica 4: Razredi mikrobiološke kakvoće sirovog mlijeka u Sloveniji

Table 4: Classes of microbiological quality of raw milk in Slovenia

Razred Class	Broj mikroorganizama (u tisućama) Number of microorganisms (thousands)
E	≤ 50.000
I	50.001 - 100.000
II	100.001 - 400.000
III	400.001 - 800.000

(Uredbo o določitvi elementov odkupne cene kravjeg mleka, Uradni l. R.S., br. 59/2000)

S obzirom na postignuti razred kakvoće, osnovna cijena mlijeka povisi se ili smanji prema sljedećem modelu:

- E razred - povišenje za 5 %
- I. razred - bez povišenja ili smanjenja
- II. razred - smanjenje za 5 %
- III. razred - smanjenje za 15 %

Prema broju somatskih stanica u E i I razredu kakvoće sirovog mlijeka, osnovna se cijena povisi za 5 %, ako njihov broj ne prelazi 400.000 u 1 ml. Ako je broj somatskih stanica veći od 600.000 u 1 ml, takvo se mlijeko razvrstava i plaća kao II. razred kakvoće (- 15 %).

Hrvatska

Novi Pravilnik prema broju mikroorganizama razvrstava mlijeko i u razrede kakvoće. Pod brojem mikroorganizama podrazumijeva se geometrijska sredina 2 posljednja mjeseca, od najmanje jednog mjesečno analiziranog uzorka. Kod somatskih stanica uzima se geometrijska sredina 3 posljednja mjeseca, s jednom mjesečnom analizom mlijeka. Razredi higijenske kakvoće sirovog mlijeka prikazani su u tablici 5.

Tablica 5: Razredi mikrobiološke kakvoće sirovog mlijeka u Hrvatskoj

Table 5: Classes of microbiological quality of raw milk in Croatia

Razred Class	Broj mikroorganizama/ml Number of microorganisms / ml	
	Kravlje mlijeko Cow's milk	Ovčje i kozje mlijeko Sheep's and goat's milks
E	≤ 50.000	-
I	50.001 - 100.000	≤1.000.000
II	100.001 – 400.000	1.000.001 – 1.500.000
III	>400.000	> 1.500.000

(Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka, Narodne novine, br. 102/2000)

Za razliku od drugih istovjetnih pravilnika, naš Pravilnik ne propisuje način obračuna cijene sirovog mlijeka. Cijenu sirovog mlijeka naše mljekare određuju prema vlastitim modelima koji se najčešće temelje na sadržaju masti u mlijeku kao kriteriju kakvoće.

Zaključak

Higijenska kakvoća sirovog mlijeka važna je komponenta suvremenog mljekarstva. To se vidi iz činjenice da je ona ugrađena u zakonske propise svih mljekarski naprednih zemalja, a oni se stalno usavršavaju. Ako se naše mljekarstvo želi uključiti u suvremene trendove, najprije treba donijeti zakonske propise istovjetne onima koji važe u svijetu. Stoga će i ovaj novi Pravilnik, koji predstavlja napredak u našoj zakonskoj praznini, tijekom vremena doživjeti određene promjene i dopune. U prvom redu morat će se izdvojiti kao posebni pravilnik onaj dio koji govori o higijenskim zahtjevima u proizvodnji, preradi i prometu mlijeka i mliječnih proizvoda. Isto tako treba donijeti uredbu ili pravilnik o plaćanju mlijeka prema kakvoći. On treba propisivati kriterije za razvrstavanje mlijeka u razrede kakvoće kao i način utvrđivanja cijene sirovog mlijeka. Pravilnikom treba odrediti metode analiza mlijeka, i sve one elemente koje sadrže istovjetni europski pravilnici.

Kod izrade i donošenja novih propisa treba uvažavati našu aktualnu situaciju u mljekarstvu i dosadašnje nepostojanje bilo kakve regulative. Ovo upućuje na određeni oprez i potrebu postupnosti, kako to pokazuju i inozemna iskustva. Ta se postupnost može postići vremenskim uvjetovanjem ili blažim kriterijima vrednovanja parametara kakvoće mlijeka.

Prije donošenja zakonskih propisa o kakvoći i plaćanju mlijeka, potrebno je kvalitetno i promišljeno obaviti sve tehničke poslove koji će osigurati njihovu učinkovitu provedbu. Tu se misli prvenstveno na organizaciju i oblik ustanove za utvrđivanje kakvoće, način i sustav uzorkovanja, obradu i korištenje dobivenih rezultata te sve one poslove koje ta složena problematika iziskuje.

HYGIENIC QUALITY OF RAW MILK WITH REGARD TO LEGISLATION

Summary

Hygienic quality of raw milk is basic indicator of hygienic condition during processing and handling of milk as well as economical valorisation of animal product as a raw material in dairy products manufacture. Thus, total bacterial count in 1 mL of raw milk is used in modern legislation in milk pricing system. Apart from the economical and technological reasons hygienic quality of raw milk is also important from the health safety issue.

In this paper microbiological quality legislation, set down by the EU and Croatian directives, are presented.

Apart from the total microorganisms number the normative on the somatic cell number in row milk, as one of the quality indicators, are also presented.

Pricing system of raw milk with regard to hygienic quality, current legislation especially from the point of view of a new legislation on row milk quality as well as suggestions to faster association into progressive dairy legislation are listed.

Key words: hygienic quality, total microorganism number, somatic cell number, legislations

Literatura

COUNCIL DIRECTIVE 92/46/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 268/1992., Brussels

HEESCHE, W.H.(1996.): Bacteriological quality of raw milk: legal requirements and payment systems, Publication Data, IDF – ref. S.I. 9601, Brussels

KIRST, E. (1999.): Lebensmittelhygienische Untersuchungen, Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch, DMZ, 12/99, München

QUALITÄTSMILCH, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Ab. II A4 – Beratungswesen, Wien, 1996.

PRAVILNIK o uvjetima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju udovoljavati živežne namirnice u prometu, *Sl. list SFRJ, br. 45/1983.*

PRAVILNIK o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine, br. 46/1994.

PRAVILNIK o kakvoći svježeg sirovog mlijeka, *Narodne novine, br. 102/2000.*

UREDBO o določitvi elementov odkupne cene kravjeg mleka, *Uradni l. R.S., br. 59/2000.*

WERNER, G. (2000.): Milchverordnung, Handbuch Milch, Behr's...Verlag, Hamburg

WERNER, G. (2000.): Milch-Güteverordnung, Handbuch Milch, Behr's... Verlag, Hamburg

Adresa autora - Author address:

Mr. sc. Slavko Kirin

Lura d.d. Zagreb

Tvornica Bjelovar

Prispjelo - Received:

01. 12. 2000.

Prihvaćeno - Accepted:

07. 12. 2000.

Prikazi iz stručne literature

Pripremio: Mr. sc. Samir Kalit

Mikrobiološke karakteristike Parmigiano Reggiano sira tijekom proizvodnje i prvih mjeseci zrenja - Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., Grazia, L. (2000.): Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and first months of the ripening. *Lait*, 80: 479-490.

Cilj je ovog rada bio pružiti logičan pregled mikrobioloških karakteristika mlijeka, prirodne čiste kulture sirutke i sira tijekom prvih mjeseci zrenja Parmigiano Reggiano sira. Značajno prisustvo inicijalnog broja različitih grupa mikroorganizama u sirovom mlijeku brzo se zamijenilo s različitim bakterijama mliječne kiseline. Sirutka sadrži veliki broj termofilnih mliječno-kiselinskih bakterija (*Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* ss. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) i nekih fakultativno heterofermentativnih mliječno-kiselinskih bakterija u koje spada i *L. rhamnosus*. Termofilne mliječno-kiselinske bakterije nestaju nakon 30 dana. Štapićasti mezofili i fakultativno heterofermentativna mliječno-kiselinska mikroflora, koja se sastoji od *L. casei*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*, *L. rhamnosus* i pediococca se progresivno povećavala do šestog mjeseca zrenja. Rezultati su pokazali da termofilni laktobacili potječu iz sirutke, a *Streptococcus thermophilus* potječe iz sirovog mlijeka. Druge prirodne čiste kulture sirutke bile su izvorom *L. rhamnosus* koji je prisutan sve vrijeme zrenja sira. Izdvojeni su i drugi sastojci nestarterske mliječno-kiselinske mikroflora iz sirovog mlijeka.

Koagulacija obranog mlijeka sirilom i sušenje sirnog zrna: utjecaj pH, koncentracije kazeina, ionske jakosti i termičke obrade - Daviau, C., Famelart, M. H., Pierre, A., Goudedranche, H., Maubois, J. L. (2000): Rennet coagulation of skim milk and cur drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait*, XXX.

Istražen je utjecaj pH obranog mlijeka (6,4 do 6,0), sadržaj kazeina (27 do 36 g/kg) i smanjenje ionske snage (na 0,6) nepromjenjenog mlijeka, te utjecaj termičke obrade na koagulaciju sirilom, sinerezu i sušenje. Koagulacija je mjerena formagrafom i visokoelastimetrom, dok je sinereza ispitana primjenom testa centrifugiranja. Sušenje je izvedeno u uvjetima sličnim u proizvodnji sira, koristeći bilo mezofilni ili termofilni postupak. Utjecaj pH i koncentracije kazeina na koagulaciju sirilom, sinerezu i sušenje je bio u skladu sa literaturnim podacima. Smanjenje u ionskoj jakosti dovodi do skraćivanja trajanja koagulacije i vremena za postizanje čvrstoće gruša. To također uvjetuje povećanje čvrstoće gruša, sinereze, omjera sušenja, konačne količine izlučene sirutke, sadržaja suhe tvari i čvrstoće osušenog gruša. Čini se da ionska snaga ima interakcijski učinak s pH na koagulaciju, a koncentracijom kazeina i na sinerezu i sušenje. Utjecaj smanjenja ionske snage je objašnjen.

Utjecaj tretiranja mlijeka i uvjeta zrenja na kakvoću Raclette sira - Klantschitsch, T., Bechmann, H. P., Puhan, Z. (2000): Influence of milk treatment and ripening conditions on quality of Raclette cheese. *Lait*, 80: 51-67.

Istražen je utjecaj različitih temperatura (11, 14, 17, 20 °C) i trajanja (60, 90 dana) zrenja na senzorske karakteristike i kakvoću topljenja Raclette sireva proizvedenih iz sirovog, pasteriziranog i mikrofiltriranog mlijeka primjenom experimentalog dizajna "specijalne kubične metode". Postignuto je ubrzanje zrenja sireva s povećanjem temperature zrenja. Više temperature zrenja dovele su do povećanja broja propionskih bakterija u siru proizvedenom iz sirovog mlijeka, do povećanja koncentracije slobodnih kratkolančanih masnih kiselina neovisno o tretiranju mlijeka, povećanja proteolize, izraženije arome, smanjenja sadržaja vode i povećanja čvrstoća. Raclette iz sirovog mlijeka morao bi zrijeti na ≤ 11 °C kroz 90 dana, dok Raclette iz pasteriziranog može zrijeti na ≤ 14 kroz 90 dana, a Raclette iz mikrofiltriranog mlijeka na 17 °C kroz 60 dana kako bi postigli podjednake senzorske karakteristike i kakvoću topljenja.

Koagulacija sirilom zagrijanog koncentrata mlijeka - Schreiber, R., Hinrichs, J. (2000): Rennet coagulation of heated milk concentrates. *Lait*, 80: 33-42.

Visoko dogrijavanje mlijeka za sirenje je korisna metoda za sprečavanje kasne fermentacije tijekom zrenja sireva ukoliko karakteristike sirenja ostaju nepromjenjene. Cilj je istraživanja bio utvrditi uvjete dogrijavanja koji osiguravaju inaktivaciju klostridijalnih spora, ali još uvijek omogućuju koagulaciju sirilom zagrijanog koncentrata mlijeka. Čvrstoća gela sirnog gruša se povećava s povećanjem sadržaja kazeina. Prirodni proteini sirutke nisu utjecali na čvrstoću gela. Nasuprot tome denaturirani proteini sirutke priječe koagulaciju sirilom, a gel postaje mekši. Gornja granica količine denaturiranih sirutkinih proteina ovisi o koncentraciji kazeina kojeg je u retentatu bilo potrebno odrediti kako bi postigli zadovoljavajuću čvrstoću gruša pasteriziranog mlijeka. Gotovo "od sirutkinih proteina slobodna" otopina kazeina (3,8%) je dobivena diafiltracijom. Uvjeti zagrijavanja od 100 °C/280 s i 110 °C/24 s su bili dovoljni da unište spore *Clostridium tyrobutyricum* za 4 log jedinice, dok se koagulacija sirilom neznatno promijenila.

Otapanje kazeinskih micela i fraktalna struktura agregata mlijeka i gela
- Vetier, N., Banon, S., Ramet, J. P., Hardi, J. (2000): Casein micelle solvation and fractal structure of milk aggregates and gels. *Lait*, 80: 237-246.

Koagulacija mlijeka kombiniranim djelovanjem zakiseljavanja i sirila je prvi korak u proizvodnji sira. Utjecaj pH na koagulaciju mlijeka istražen je u prirodnom mlijeku, pH 6,58 (početni pH) do pH 5,60. Primjenjena metodologija u istraživanju strukture agregata i gelova je bazirana na fraktalnoj teoriji. Utvrđena je povezanost između hidratacije kazeinskih čestica, strukture agregata mlijeka i gela, te reoloških karakteristika gela.

Utjecaj izvora krmiva na određivanje masti i proteina u mlijeku pomoću blizu - infracrvene spektroskopije - Purnomoadi, A., Batajoo, K. K., Ueda, K., Terada, F. (1999): Influence of feed source on determination of fat and protein in milk by near – infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 9: 447-452.

Uzorci mlijeka iz dva izvora (n=506) su analizirani mjerenjem blizu - infracrvenog spektra (NIR) kako bi ispitali utjecaj različitih obroka na sastav masti i proteina mlijeka. Uzorci mlijeka iz prvog pokusa (N=300) iskorišteni su za razvijanje kalibracijske jednadžbe i utvrđivanja njene prikladnosti. Kalibracijska jednadžba razvijena u prvom pokusu je zatim korištena u

drugom pokusu kako bi se istražila primjena NIR mjerenja. U svim je pokusnim grupama korišten isti osnovni obrok, a koji se sastojao od kukuruzne silaže, Talijanskog ljujla, Alfalfa sijena, kukuruza i komercijalnog koncentrata. Prvi je pokus obuhvaćao tri obroka: (1) osnovni obrok, (2) osnovni obrok s dodatkom soje (48% ukupnog sirovog proteina (CP)) i (3) osnovni obrok s dodatkom soje (19% ukupnog CP) i riblje brašno (25% ukupnog CP). Drugi je pokus uključio pet mogućih dodataka u obrok: (1) bez dodatka (NS), (2) kukuruzni gluten (CGM, 26% ukupnog CP), (3) riblje brašno (FM, 26% ukupnog CP), (4) obezmašćena soja (SBM, 28% ukupnog CP) i (5) pržena soja (RSBM, 26% ukupnog CP). Hranidbeni režim u oba je pokusa postavljen kako bi zadovoljio uzdržne i proizvodne potrebe. Istraživanja su pokazala da primjena NIR mjerenja na sadržaj mliječne masti u predviđanju količine mliječne masti nije bio pod utjecajem hranidbe životinja, dok se točnost predviđanja proizvodnje proteina signifikantno mijenjala s različitim vrstama obroka. Tako je široki raspon uzoraka mlijeka krava kod kojih je poznat režim hranidbe nužan kako bi se razvila zadovoljavajuća kalibracija NIR sistema.

Utjecaj vremena, temperature i metode ekstrakcije na dušik iz sira topivog u trikloroacetoj kiselini - Polychroniadou, A., Michaelidou, A., Paschaloudis, N. (1999): Effect of time, temperature and extraction method on the trichloroacetic acid-soluble nitrogen of cheese. *International Dairy Journal*, 9: 559-568.

Istražen je utjecaj vremena, temperature i metode ekstrakcije sira na nivo spojeva topivih u 12% trikloroacetoj kiselini (TCA-SN). Analiza varijance je pokazala signifikantnu razliku ($P < 0,05$) pod utjecajem glavnih efekata, ali utvrđene razlike usljed različitih temperatura i vremena bile su male i bez praktičkog značaja. Nasuprot tome metoda ekstrakcije bitno utječe na TCA-SN. Sastav i količina sirnog ekstrakta signifikantno se mijenja; omjer sir : voda, pH ekstrakta, priroda ekstrakta (voda ili pufer citrata pH 7,0), i sadržaj NaCl utjecao je, ne samo na količinu ekstrakta, već i na vrstu ekstrahiranih peptida, što je pokazano reverzno faznom visoko rezolutnom tekućom kromatografijom. Međutim, peptidi otopljeni u više od 30%-tnom acetonitrilu nisu imali utjecaja na nivo TCA-SN. Utvrđena je važnost specifikacije metode ekstrakcije sira kad se iznose podaci o TCA-SN.

Istraživanje utjecaja temperature, pH i NaCl na aktivnost peptidaza bakterije nestarterske mliječno-kiselinske mikroflore (NSLAB) kvadratnom metodom površinske reakcije - Gobbetti, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M. R., Massini, R., Fox, P. F. (1999): Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *International Dairy Journal*, 9: 865-875.

Istražen je pojedinačni i interakcijski učinak temperature, pH i NaCl na aktivnost aminopeptidaze tipa N i A, te prolin iminopeptidaze nekoliko sojeva nestarterskih mliječno-kiselinskih bakterija (NSLAB) primjenom kvadratne metode površinske reakcije. Enzimska aktivnost je ovisila o interakciji između neovisnih varijabli, vrsti, soju unutar vrste i tipu aktivnosti. Uz nekoliko iznimka, aktivnost aminopeptidaze N i A i prolin iminopeptidaze *Lactobacillus casei ssp. pseudoplantarum* i *Lb. curvatus* je značajno inhibirana uvjetima sličnim onim u siru, dok su peptidaza *Lb. casei ssp. casei* i naročito *Lb. plantarum* tolerantne i nisu pod utjecajem varijacija pH vrijednosti, te pokazuju najmanju osjetljivost na NaCl, ili čak zahtjevaju NaCl za optimalnu aktivnost. Sojevi koji su zadržali relativno visoku aktivnost u uvjetima sličnim u siru su selektirani unutar vrste. Prolin iminopeptidaza *Lb. casei ssp. casei* 2107 kao i *Lb. plantarum* 2788 i 2789 najviše su tolerirale na interakcije između neovisnih varijabli. Pri 10 °C i kod 3,75% NaCl, te neovisno o pH vrijednosti, PepN aktivnost *Lb. plantarum* 2788 i 2789 bila je najmanje 33% maksimalno utvrđene aktivnosti kod pH 7,5 i 35 °C. Aktivnost prolin iminopeptidaze je bila najosjetljivija na pojedine varijacije i njihove interakcije temperature, pH i NaCl. S druge strane aktivnost aminopeptidaze tipa A čini se da je najmanje osjetljiva na uvjete slične onima u siru.

Promjene zbog zagrijavanja na osjetljivost kazeina na kalcij - O'Connell, J. E., Fox, P. F. (1999): Heat-induced changes in the calcium sensitivity of caseins. *International Dairy Journal*, 9:839-847.

Na kalcij osjetljivi Na kazeinat je pripremljen iz otopine kazeinskih micela oslobođenih od serumskih proteina u sintetskom ultrafiltriranom mlijeku, koje je sadržavalo 4,8% w/v, laktoze i 5 mmol/l uree, te je zagrijano na 130 °C kroz od 0 na 25 min povećanja tijekom zagrijavanja. Pretpostavlja se da je povećanje u neto negativnom naboju kazeina, kao posljedica

razgradnje lizina i arginina zagrijavanjem odgovorno za ubrzanje stabilnosti na kalcij zagrijanog kazeina. Milardova reakcija i protein-urea reakcije čini se da igraju važnu ulogu u povećanoj stabilnosti zagrijanog kazeinata prema kalciju. Istražen je utjecaj promjena na proteinu s obzirom na stabilnost prema zagrijavanju proteinskog sistema mlijeka (Na kazeinat 2,5%, w/v, proteina u ultrafiltriranom mlijeku) na 140 °C kemijskim modifikacijama kazeinata prije procjene termičke stabilnosti. Povećala se termička stabilnost s modifikacijama lizina, arginina i ostataka karboksila. Povećana termička stabilnost Na kazeinata s modificiranim lizinom i argininom može biti kao posljedica povećanja neto negativnog naboja na kazeinatu, dok je povećana stabilnost kazeinata s modificiranim karboksilnim ostacima vjerojatno povezano s redukcijom izazvanom višim temperaturama pri čemu dolazi do poprečnih veza u proteinu.

Nova metoda za određivanje ostatka aktivnosti sirila u siru - Hurley, M. J., O'Driscoll, B. M., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H. (1999): Novel assay for the determination of residual coagulat activity in cheese. *International Dairy Journal*, 9: 553-558.

Razvijena je nova metoda određivanja ostataka aktivnosti sirila u siru. Uzorak sira je otopljen u 0,1 M trinatrijevog citrata. U tim je uvjetima kimozin stabilan barem 5 sati. Inkubacijom takve otopine sa sintetskim substratom heptapeptida (Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu) na 37 °C i pH 3,2, nastaje jednostavan peptid ([NO₂-Phe]-Arg-Leu) iz substrata djelovanjem sirila iz sira. Spoj se kvantificirao primjenom reverzno fazne HPLC s određivanjem kod 300 nm. Ovaj se peptid producirao u konstantom omjeru. Koncentracija je ovog enzima bila proporcionalna količini prisutnog enzima, a metoda je pogodna za mjerenje aktivnosti kimozina u puferu kako slijedi $3,66 \times 10^{-4}$ jedinica sirila (RU)/ml. Metoda ima visoku ponovljivost s koeficijentom varijacije od 4,3%, te je primjenjena na veći broj komercijalnih sireva kod kojih je utvrđena aktivnost ostataka sirila unutar raspona od 11,1 do 20,1 RU/kg. Razvijena metoda u ovom istraživanju je jednostavna, brza, osjetljiva i ponovljiva za određivanje ostataka aktivnosti sirila u siru i drugim mliječnim proizvodima.

Pripremila: Dr. sc. Rajka Božanić

Proteolitički profil jogurta i probiotičkih bakterija - A. S h i h a t a, N. P. S h a h (2000): Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria (nagendra.shah@vu.edu.au School of Life Sciences and Technology, Victoria University of Technology, PO Box 14428, Melbourne City Mail Centre, Victoria 8001, Australia) *International Dairy Journal* 10, 401-408.

Devet sojeva *Streptococcus thermophilus*, 6 sojeva *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 14 sojeva *Lactobacillus acidophilus* i 13 sojeva *Bifidobacterium* spp. su testirani na proteolitičku, amino-, di-, tri- i endopeptidaznu aktivnost pomoću spektrofotometrijske metode. Kod sojeva koji su pokazali najveću i najmanju proteolitičku aktivnost dalje je proučavana peptidazna aktivnost na ekstracelularnom i intracelularnom nivou. Količina slobodnih amino grupa kod sojeva *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, i *L. acidophilus* bila je veća nego kod soja *Bifidobacterium*. Aminopeptidazna aktivnost je detektirana za sve bakterijske sojeve i na ekstracelularnom i na intracelularnom nivou. Specifična aktivnost 6 studiranih substrata bila je viša na intracelularnom nivou za sve sojeve. Visoka depeptidazna aktivnost je demonstrirana kod svih bakterijskih sojeva za *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L.* i *Bifidobacterium* dok *S. thermophilus* ima veću dipeptidaznu aktivnost na ekstracelularnom nivou. Sve testirane bakterijske kulture bile su sposobne hidrolizirati velike biološki aktivne peptide, bradikinin, Ala-Ala-Ala-Ala-Ala i tripeptid substrat Gly-Ala-Tyr na oba, ekstracelularnom i intracelularnom nivou. Sa substratima koji završavaju s C-treminalnim fenilalaninom, hidroliza se samo pojavljuje na intracelularnom nivou.

Optimiranje proizvodnje i kakvoće zrnatog svježeg mekog sira - Lj. Tratnik, R. B o ž a n i ć, G. M i o k o v i ć, D. Š u b a r i ć (2000): Optimisation of Manufacture and Quality of Cottage Cheese (ljtrat@pbf.hr) Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, p.p. 625, HR-10001 Zagreb, Hrvatska) *Food Technology and Biotechnology* 39 (1), 43-48.

“Cottage cheese” je izvorni naziv za tip svježeg mekog sira zrnate konzistencije. Istražena je proizvodnja sira od: (A) kontrolnog obranog mlijeka s 0,05 % masti; (B) obranog mlijeka obogaćenog s 1,5 % (m/v) obranog mlijeka u prahu; (C) ultrafiltriranog obranog mlijeka s prosječno 5,3% proteina; (D) ultrafiltriranog obranog mlijeka s prosječno 7,4 % proteina te (E) rekonstituiranog obranog mlijeka s otprilike 11 % suhe tvari. Fermentacija 2L upotrijebljenih uzoraka mlijeka provedena je pri 22 °C s 0,5% (v/v) mezofilne tehničke kulture tipa “O”, bez dodatka sirila. Promjena sastava obranog mlijeka bitno je utjecala na trajanje fermentacije (16,5-20,5 h), na pH-vrijednost sirnog gruša u trenutku rezanja (pH=4,45-4,82) te na veliku promjenjivost prinosa sira (14,6-34,3 %; w/v). Kontrolni zrnati svježi sir (A) dobiven od kontrolnog obranog mlijeka (oko 8,5% suhe tvari), sadržavao je veći udjel vode od predviđene (maks. 80 %) međunarodnim standardom za taj tip sira. Zbog povećanog udjela suhe tvari i proteina u ostalim uzorcima mlijeka, povećao se i udjel proteina i pepela u uzorcima sira, pa je stoga manji i udjel vode. Sirni gruš, dobiven od ultrafiltriranog obranog mlijeka (C i D), bio je u usporedbi s gruševima A, B i E nešto veći i čvršći, ujednačenije veličine, te porculanskog sjaja. Umak za pripravu slatkih ili slanah uzoraka kremastog zrnatog sira (creamed cottage cheese) načinjen je od komercijalnog kiselog vrhnja (12 % masti) uz dodatak soli (3 %) ili šećera (25 %). Sirni gruš pomješan u slanom umaku (omjer 1:1) ubrzo je postao mekši, a pomješan u slatkom umaku (omjer 3:2) sve čvršći tijekom čuvanja pri temperaturi hladnjaka od 8 °C. Najbolje senzorske osobine, tijekom ukupnog vremena čuvanja (14 dana), imao je kremasti zrnati sir (C) pripremljen od ultrafiltriranog obranog mlijeka.

Utjecaj imobilizacije Lactobacillus acidophilus i Bifidobacterium lactis u alginat na njihovu toleranciju gastrointestinalnih sekreta - C. S. Favaro T r i n d a d e, C. R . F. G r o s s o (2000): The effect of the immobilisation of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions (Faculty of Food Engineering, State University of Campinas-UNICAMP, Brazil) *Milchwissenschaft* 55 (9), 496-499.

Cilj rada bio je istražiti “in vitro” toleranciju sojeva *Bifidobacterium lactis* i *Lactobacillus acidophilus*, oba u slobodnom obliku te imobilizirana u kalcij alginatu, na niske pH-vrijednosti te nivo žučnih soli sličnih onima u ljudskom želucu i probavnom traktu. Slobodne i imobilizirane bakterijske kulture su

inokulirane u količini 10 % u otopinu HCl-a s pH vrijednostima 1 i 2, te inkubirane anaerobno pri 37 °C. Koncentracija žučnih soli bila je 0, 2 i 4 %. Broj živih stanica određivan je metodom nacjepljivanja, korištenjem MRS bujona, nakon 0 i 12 sati anaerobne inkubacije. Morfološka istraživanja imobiliziranih stanica u alginatnom gelu su napravljena korištenjem elektronskog mikroskopa. Stanice bakterijskih kultura imobiliziranih u alginatu predhodno su otopljene u 2% natrij citratu koristeći Stomacher homogenizator. Pri pH-vrijednosti 2 broj živih mikroorganizama neznatno je opao. Dok je pH-vrijednost 1 bilo vrlo smrtna za oba bakterijska soja, *B. lactis* i *L. acidophilus*. Jednako djelovanje bilo je i kod stanica imobiliziranih u alginatu. Inokulacija u otopinu žučnih soli nije utjecala na sabilnost *B. lactis* i *L. acidophilus*. Osim toga *B. lactis* i *L. acidophilus* pokazali su netoleranciju na pH 1, a imobilizacija u alginat nije djelotvorno zaštitila njihove stanice.

Rast bifidobakterija u sojinom mlijeku i njihovo preživljavanje u fermentiranom napitku od sojinog mlijeka tijekom čuvanja - C. C. C h o u, J. W . H o u (2000): Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage (Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University 59, Lane 144, Keelung Rd., Sec. 4, Taipei, Taiwan) *International Journal of Food Microbiology* 56, 113-121.

U ovom radu je istraživao rast *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 i *B. longum* B6 u sojinom mlijeku. Pokazalo se da sojino mlijeko može podržati rast oba testirana mikroorganizma. *B. infantis* je u sojinom mlijeku rastao bolje nego *B. longum*. Suplementacija bifitozom (izomaltooligosaharid), glukozom, laktozom ili galaktozom sojinog mlijeka poticala je rast *B. infantis* i *B. longum* što je određeno nakon 48 sati fermentacije. S druge strane, dodatak kvašćevog ekstrakta, peptona, triptona, kasitona ili N-Z-Case plus u sojino mlijeko onemogućilo je *B. infantis* da dostigne maksimum populacije u kratkom vremenu kultivacije od 24 sata. Proizvodnja kiseline od *B. longum* i *B. infantis* u sojinom mlijeku uglavnom nije vezana uz bakterijski rast. Populacija soja *B. longum* jače je reducirana u odnosu na soj *B. infantis* pri proizvodnji fermentiranog sojinog mlijeka te tijekom perioda čuvanja. Živa populacija oba testirana mikroorganizma manje je reducirana u fermentiranom napitku čuvanom pri 5 °C nego pri 25 °C. Nakon 10 dana čuvanja pri 5 °C, broj živih stanica *B. infantis* i *B. longum* reduciran je za 0,44 i 3,18 log CFU / ml u fermentiranom napitku. Dodatak saharoze u fermentirano mlijeko rezultirao je

povećanjem redukcije živih bakterija tijekom perioda čuvanja. Taj fenomen je bio istaknut s *B. infantis* u fermentiranom napitku čuvanom pri 25 °C.

Antimikrobna osjetljivost bifidobakterija - A. M. Y a z i d, A. M. A l i, M. S h u h a I m i, V. K a l a i v a a n i, M. Y. R o k i a h, A. R e e z a l (2000): Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria (Departments of Food Technology, Biotechnology, Nutrition and Community Health and Food Science, University Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia) *Letters in Applied Microbiology* 31 57-62.

Osjetljivost na antimikrobne agense je testirana kod osamnaest sojeva *Bifidobacterium*. Svi testirani sojevi, uključivši i referentnu kulturu *Lactobacillus acidophilus* CH2, bili su osjetljivi na nekoliko grupa antimikrobnih agenasa, i to su cefalosporin (cefamandol, cefazolin, cefaperazon, cefoksitin), polipeptide (bacitracin), makrolide (eritromicin), penicilin (amoksicilin), fenikol (kloramfenikol) i β-laktam (imipenem). Četrnaest sojeva je bilo rezistentno na više od 10 antibiotika. Referentna kultura je bila rezistentna na samo tri antibiotika. Rezultati pokazuju da su bifidobakterije rezistentne na širok spektar antimikrobnih agenasa.

Aspekti kvalitete Feta sira proizvedenog iz mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka - S. P i t s o, B. H. B e s t e r (2000): Quality aspects of Feta cheese manufactured from mixtures of cow's and goat's milk (Departement of Food Science, University of Pretoria, Pretoria, 0002, South Africa) *Milchwissenschaft* 55 (8) 454-458.

Sir tipa Feta je proizveden iz 100 % kravljeg mlijeka (postupak 1), 65 % kravljeg + 35 % kozjeg mlijeka (postupak 2), 35 % kravljeg + 65 % kozjeg mlijeka (postupak 3) i 100 % kozjeg mlijeka (postupak 4). Sirevi iz postupaka proizvodnje 3 i 4 imali su veći broj mikroorganizama, slobodnih masnih kiselina te vodotopivog dušika nego sirevi proizvedeni postupcima 1 i 2. Vrijednosti su rasle u poredku 1<2<3<4. Suprotno, srednja pH vrijednost sistematski je opadala od postupka 1 do 4. Srednji sadržaj masti sireva tipa Feta rastao je u direktnoj proporciji s postotkom kravljeg mlijeka, ali prosječan sadržaj ukupnih proteina slijedio je obrnuti put. Svi sirevi tipa Feta su imali jednaku senzorsku ocjenu. Statistička analiza je pokazala da se sirevi tipa Feta proizvedeni postupkom 4 značajno razlikuju ($p<0,05$) u sadržaju masti, suhe tvari, ukupnog broja živih mikroorganizama, teksturi, pH-vrijednosti, te

sadržaju proteina i slobodnih masnih kiselina. Dok kod sadržaja topivih proteina, NaCl-a te senzorske ocjene nije zamijećena značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka sireva.

Otpuštanje β -galaktozidaze iz laktobacila – M o n t a n a r i, G.; Z a m b o n e l l i, C.; G r a z i a, L.; B e n e v e l l i, M.; C h i a v a r i, V. (2000): Release of β -galactosidase from Lactobacilli (c.zambonelli@stpa.unibo.it; Dipartimento do Proteozine e Valorizzazione Agroalimentare (DIPROVAL) Universita di Bologna, Villa Levi, Via F.lli Rosselli, 107, 42100 Reggio Emilia, Italy) *Food Technology and Biotechnology* 38 (2), 129-133.

Stanice *Lactobacillus brevis* na kraju rasta otpuštaju intracelularnu β -galaktozidazu u podlogu. Otpuštanje enzima započinje neposredno nakon završetka staničnog razmnožavanja, a povezano je s autolizom stanica i oštećenjem staničnog zida. Stanice *Lactobacillus plantarum* nisu otpuštale β -galaktozidazu jer se autoliza drukčije provodila. Na početku su se stanice urušile ne pokazujući znakove oštećenja staničnog zida, što se vidjelo tek nakon 30 i više dana od završetka rasta.

Mogućnosti tehnološke primjene funkcionalnih starter kultura – D e V u y s t, L. (2000): Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures (lduvuyst@vub.ac.be; Research Group of Industrial Microbiology, Fermentation Technology and Downstream Processing Departement of Applied Biological Sciences, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Brussels, Belgium) *Food Technology and Biotechnology* 38 (2), 105-112.

U cijelom je svijetu sve rasprostranjenije tržište prebiotika i probiotika u napitcima od fermentiranog mlijeka. Sve je više potrošača zainteresirano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi unapređivanja zdravlja. Stoga proizvođači hrane trebaju prilagoditi proizvodne procese i tehnologije ako žele koristiti probiotike u raznim namirnicama. Na život probiotičkih bakterija bitno utječu osnovni sastav namirnica, interakcija sastojaka i stabilnost kulture, razina inokuluma, uvjeti tehnološkog procesa itd. U radu su razmatrani neki problemi vezani uz primjenu probiotika u mljekarstvu.

U području prehrane nadalje je tendencija da budu obuhvaćeni što prirodniji proizvodi, što zahtjevaju ne samo potrošači nego i ovlaštene

ustanove. U radu su iznesena dva primjera: uporaba prirodnih sredstava protiv kvarenja hrane (antimikrobni proteini i bakteriocini) i primjena prirodnih sredstava za poboljšanje konzistencije (mikrobni egzopolisaharidi), oboje primjenom funkcionalnih starter kultura bakterija mliječne kiseline. Također treba uzeti u obzir utjecaj nekih sastojaka iz namirnica i primijenjenog tehnološkog procesa na funkcionalnost upotrijebljenih sojeva.

Lactobacillus K7 – Novi kandidat za probiotički soj – B o g o v i č – M a t i j a š i ć, B.; R o g e l j, I., (2000): *Lactobacillus K7 – A New Candidate for a Probiotic Strain* (bojana.bogovic@bfro.uni-lj.si; University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department, Institute for Dairying, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija) *Food Technology and Biotechnology* 38 (2), 113-119.

Lactobacillus K7 izolat je fecesa jednotjednog dojenčeta za kojega je predhodno utvrđena aktivnost slična bakteriocinu prema raznim sojevima mliječnokiselih bakterija u *Clostridium sp.* U radu je djelomično identificiran soj K7 te su ispitana neka probiotička svojstva kao što su otpornost na niski pH, žuč i proizvodnja bakteriocina. Ujedno je ispitan i utjecaj bakteriocina iz soja K7 na vegetativne stanice *C. perfringens* i *C. difficile* te na vegetativne stanice i spore *C. tyrobutyricum*. Na osnovi morfoloških osobina API 50 CHL (BioMeireux) tijekom fermentacije i analize S-soja, soj K7 utvrđen je kao član *L. acidophilus* DNA homologne skupine B. Tri sata preživljavanja 43% stanica soja K7 u prisutnosti 0,3 % žuči. Broj živih stanica tijekom troosatne inkubacije pri pH=3 smanjuje se na 51 %. Bakteriocini se proizvode najviše tijekom eksponencijalne faze rasta. Maksimalna aktivnost u supernatantu MRS-uzgoja (32.000 AU/mL) utvrđena je 8 sati nakon uzgoja. Minimalna je inhibitoriska koncentracija bakteriocina iz soja K7 za vegetativne stanice *C. tyrobutyricum* iznosila 640-2560 AU/mL, ovisno o ispitivanom soju, te 12280 AU/ml za sve sojeve *C. difficile* i *C. perfringens*. Osjetljivost spora *C. tyrobutyricum* bila je veća nego kod vegetativnih stanica, a mijenjala se i minimalna koncentracija između bakterijskih sojeva (1280->5120 AU/mL).

UPUTE AUTORIMA

Mole se autori da pažljivo pročitaju slijedeća uputstva prilikom pripreme radova za objavljivanje u časopisu **MLJEKARSTVO**.

Što se objavljuje?

U **MLJEKARSTVU** se objavljuju: izvorni znanstveni radovi, prethodna priopćenja, znanstvene bilješke, stručni radovi, autorski pregledi, te izlaganja sa znanstvenih skupova, na hrvatskom i engleskom jeziku.

Navedene kategorije radova podliježu recenziji.

Razlučivanje znanstvenog i stručnog rada je u originalnosti rezultata istraživanja i zaključaka, te prikazanih znanstvenih metoda rada. Stručni rad može biti korisniji u primjeni, ali time nije i novi doprinos znanstvenim spoznajama.

Izvorni znanstveni radovi sadrže neobjavljene rezultate izvornih istraživanja. Eksperimentalni podaci moraju biti tako izneseni da se mogu reproducirati i da se može provjeriti točnost analiza i dedukcija na kojima se temelje zaključci. Rad treba biti podijeljen na slijedeća poglavlja: Sažetak (na hrvatskom i engleskom); Uvod; Materijal i metode rada: Rezultati i rasprava; Zaključci; Literatura.

Prethodna priopćenja sadrže kraće obavijesti o novim znanstvenim spoznajama, čiji karakter zahtijeva hitno objavljivanje. Rad se objavljuje samo uz obvezu autora da nakon završetka istraživanja objavi izvorni znanstveni rad.

Znanstvene bilješke (kratke obavijesti) su kraći, završeni izvorni znanstveni radovi ili opisi originalnih laboratorijskih tehnika (metoda, aparatura itd.).

Stručni radovi predstavljaju nove mogućnosti razvoja struke na području mljekarstva. Naglasak je na primjeni poznatih metoda i činjenica, na širenju znanja u pojedinom području. U radu se koriste već stečena znanja primjenjena na objekt ispitivanja.

Autorski pregledi su cjeloviti pregled nekog problema ili područja na kojem je autor objavio određen broj znanstvenih radova.

Izlaganja sa znanstvenih i stručnih skupova, iznesena na kongresima i simpozijima, bit će tiskana samo onda ako nisu već objavljena u zbornicima.

Sadržaj i opseg rukopisa

Naslov rada treba biti nešto kraći. Ispod naslova navode se imena i prezimena autora. Titule autora i adrese navode se na posebnom listu papira.

Sažetak treba sadržavati jezgrovit prikaz, metodiku, rezultate i zaključak. Sažetak ne treba biti dulji od jedne strojem pisane stranice sa dvostrukim proredom. U sažetku se ne smiju pojavljivati skraćenice, niti literatura. Neposredno ispod sažetka autori trebaju navesti tri do pet ključnih riječi. Sažetak je potrebno pisati na hrvatskom i engleskom jeziku.

Uvod mora ukratko sadržavati rezultate ranijih istraživanja i svrhu vlastitih istraživanja.

Materijale i metode treba kratko izložiti, a opširnije samo ako odstupaju od već objavljenih u literaturi. Za poznate metode i tehniku istraživanja navodi se samo autor i literatura.

Rezultati i rasprava - U rezultatima i raspravi ne ponavljaju se podaci izneseni u tablicama i slikama nego se ističu najbitniji rezultati.

Zaključci trebaju kratko i jasno sadržavati značaj rezultata istraživanja.

Literatura mora biti selektivna, a ne opširna (osim u iznimno preglednim člancima). Ako originalna navedena literatura nije dostupna, autor mora navesti izvor koji je koristio. Autori odabrane (selektivne) literature navedeni u tekstu moraju biti na popisu literature. Autorima citiranim u tekstu navodi se prezime i godina objavljivanja (u zagradama). Ako je navedeni rad napisalo više od tri autora, navodi se prezime prvog autora uz oznaku i sur., i godina objavljivanja. U popisu literature autori se navode abecednim redom: prezime i inicijali imena autora, naslov djela, naziv izdavača, mjesto i godina izdavanja, te stranice (od - do).

Tablice i dijagrami moraju biti razumljivi i bez čitanja teksta. Isti podaci ne mogu biti u tablicama i dijagramima. Legenda slika, opis koordinata i tablica moraju biti pisani na hrvatskom i engleskom jeziku. Fotografije (crno-bijele) moraju biti besprijekorno izrađene. Na poleđini fotografije treba navesti prezimena autora i redni broj slike.

Original rada (10-15 strojem pisanih stranica) treba imati sve slike, crteže i dijagrame. Rad se podnosi uredništvu u tri primjerka (original i dvije kopije), a šalje se na adresu: Uredništvo časopisa MLJEKARSTVO, Ilica 31/III, HR-10000 Zagreb.

Separati

Prvom autoru rada dostavit će se 5 primjeraka časopisa MLJEKARSTVO. Na zahtjev autora dostavit će se i veći broj primjeraka.

Predaja rukopisa na disketama:

Rukopis s priložima (tablice, dijagrami) mogu se Uredništvu dostaviti i na disketi. Preporuča se pisanje rada u Word (Word for Windows) programu. Disketi također treba priložiti i jedan otisnuti primjerak rada.

Uredništvo

AUTHOR INSTRUCTIONS

Authors are kindly asked to read following instructions while preparing the manuscript for publishing in **DAIRY** journal.

DAIRY journal publishes papers not being published elsewhere.

The acceptance of the paper obliges the authors not to publish same material elsewhere.

What is to be published?

DAIRY publishes: original scientific papers, preliminary communications, scientific notes, professional papers, author reviews, and conference papers, all written in both Croatian and English. All contributing manuscripts will be subjected to critical review by the referee's.

Difference between scientific and professional papers is in their original results and conclusions as well as method used. Although professional paper may be more useful for the application it is not considered as a new scientific contribution.

Original scientific papers report results of original research. It should be presented in a way that enables reproduction and verification of analysis and deductions on which the conclusions are based. The paper should be divided into the following sections: Summary (in Croatian and English); Introduction; Materials and methods; Results and discussion; Conclusions; References.

Preliminary communications are brief accounts of work still undergoing evaluation and development which require immediate publication. Publication of this paper obliges author for submitting an original scientific paper after the research is completed.

Scientific notes (short communications) include reports on shorter but completed research or descriptions of an original laboratory technique (methods, apparatus etc.).

Professional papers present new possibilities of development within areas of dairy science. The emphasis is on the application of known methods and facts as well as on broadening the knowledge in the particular area. The acquired knowledge is applied to the object of research.

Author reviews provide an up-to-date survey of particular problem or an area in which, preferably, the author himself is active.

Conference papers previously reported at a congress, symposium etc. will be published only if they have not previously been published in proceedings.

Manuscript preparation

The Title of the paper must be concise. The names of the authors should follow the title. Titles and addresses of the authors are to be submitted on the separate sheet of paper.

Summary must state the objective of the study, give a concise description of experiments, results and conclusions. Summary should not be longer than one double-spaced typewritten page. No abbreviations or references should be included. Below

the summary, authors should provide three to five key words. Summary should be written in both Croatian and English.

Introduction should contain review pertinent previous work and the purpose of the investigations.

Materials and Methods should indicate apparatus, instruments etc., giving sufficient details only if newly methods are used. For the well-known methods and techniques an adequate reference(s) citation will be sufficient.

Results and Discussion - It is not important not to present the same information given in tables and figures. The most important results should be emphasised.

Conclusions should point out the significance of the findings.

References should be selective rather than extensive (with the exception of review articles). If the original literature cited has not been available, the authors should quote the source used. Complete citations should appear at the end of the text under the headings References. Literature citations in the text should be referred by author's name and year, in brackets. If there are more than two authors, mention the first author and add et al., followed by the year: A list of References should be arranged alphabetically: author(s) surname and name initial(s), title, editor place and year of publishing as well as pages (from - to).

Tables and Figures should be constructed so as to be completely intelligible without reference to the text. The same data should not be reproduced in both tables and figures.

Figure legends, co-ordinate axis and table headings should be written in both Croatian and English.

Photographs submitted as clear black-and-white prints will only be accepted. Each photograph must be clearly numbered and name(s) of the author(s) written on the reverse side.

The original (10-15 double-spaced typewritten pages) should contain all tables, figures and illustrations.

The manuscript is to be submitted in triplicate (original and two copies) to the following address: DAIRY journal, Editorial Board, Ilica 31/III, HR-10000 Zagreb, Croatia

Reprints

First author will receive 5 copies of DAIRY journal. Additional copies will be sent on request.

Electronic manuscripts:

The recommended word processing software package is Word for Windows. One print out of the paper (including tables and figures) should be enclosed together with the diskette.

Editorial Board