

Metode za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka

Sonja Damjanović, Dubravka Samaržija, Jasmina Havranek

Pregledni rad - Review

UDK: 637.071

Sažetak

U odnosu na kravlje, manji broj mliječnih proizvoda u svijetu proizvodi se od kozjeg, ovčjeg, bivoljeg i drugih vrsta mlijeka. Kravljeg mlijeka količinski ima najviše, te se često koristi za patvorenje ostalih vrsta mlijeka i sira. Patvorenjem se mijenjaju svojstva i zdravstvena sigurnost izvornog proizvoda. Metode koje se koriste u dokazivanju takve vrste patvorenja temelje se na utvrđivanju različitosti između proteina, profila triacilglicerola i omjera masnih kiselina, te specifičnih segmenata DNK (deoksiribonukleinska kiselina) epitelnih stanica u različitim vrstama mlijeka. U radu su opisane prednosti i ograničenja metoda elektroforeze, izoelektričnog fokusiranja, ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay), kapilarne elektroforeze, kromatografskih metoda, masene spektrometrije te metoda lančane reakcije polimerazom, u dokazivanju patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka.

Ključne riječi: patvorenje, mlijeko, sir, metode za dokazivanje patvorenja

Uvod

U proizvodnji različitih mliječnih proizvoda koristi se uglavnom kravlje mlijeko. Prema podacima (IDF, 2002.), od ukupne svjetske proizvodnje mlijeka, kozje i ovčje mlijeko zastupljeno je s približno 3,5 %. Kozje i ovčje mlijeko uglavnom se koristi za proizvodnju sireva. Kvalitetom se posebno ističu francuski meki kozji sirevi: Crottin de Chavignol, Sainte-Maure i Levrou, te ovčji sirevi: Pecorino Romano (Italija), Manchego (Španjolska), Roquefort (Francuska) i Feta (Grčka). U Hrvatskoj, Paški, Creski, Rapski i Brački pripadaju skupini najpoznatijih tvrdih ovčjih sireva (Scott, 1998.; Harbut, 2000.; Lukač Havranek, 1995.)

Kako je kravlje mlijeko, u odnosu na ostale vrste mlijeka, jeftinije i dostupnije na tržištu, neki proizvođači kravlje miješaju s ovčjim i kozjim mlijekom. Miješanje različitih vrsta mlijeka zakonski je dopušteno, a ponekad radi svojstava proizvoda i poželjno. Međutim, problem nastaje kada konačni

proizvod nije deklariran kao proizvod sastavljen od više vrsta mlijeka. Takav se proizvod smatra patvorenim i Zakonom je zabranjen (NN., 117/03.) jer se mijenja kvaliteta i zdravstvena sigurnost proizvoda. Naime, određeni postotak ljudi u prehrani tolerira kozje, a iskazuje alergijske reakcije na kravlje i/ili ovčje mlijeko, a posebno na β -laktoglobulin kravljeg mlijeka (Creamer i Sawyer, 2003.).

Proteine kravljeg, ovčjeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka čine kazeini i proteini sirutke koji se međusobno razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi i stabilnosti tijekom tehnološke obrade. Proteini sirutke su termolabilni, pa njihova denaturacija započinje već na temperaturama višim od 60°C. Kazeini su - u odnosu na sirutkine proteine - termostabilni, ali podložni proteolitičkim reakcijama tijekom zrenja sira (Tratnik, 1998.).

Većina metoda koje se koriste za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka temelje se na detekciji proteina mlijeka. Najčešće korištene metode su elektroforetske, imunološke, kromatografske i metode masene spektrometrije. Metode koje se temelje na analizi omjera masnih kiselina ili profila triacilglicerola različitih vrsta mlijeka, i metoda lančane reakcije polimerazom temeljena na analizi DNK epitelnih stanica izoliranih iz mlijeka, rjeđe se koriste.

Zbog velike različitosti u načinu proizvodnje, u prvom redu sira, i činjenice da se oni mogu proizvoditi od sirovog i toplinski obrađenog mlijeka, utvrđivanje patvorenja drugim vrstama mlijeka nije uvijek jednostavno i pouzdano.

Svrha ovog rada je opisati prednosti i nedostatke metoda koje se koriste u dokazivanju patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka.

Metode za dokazivanje proteina drugih vrsta mlijeka

Proteini mlijeka

Proteini mlijeka sastoje se od dvije potpuno različite skupine proteina, kazeina i proteina sirutke (tablica 1).

U dokazivanju patvorenja mlijeka i mliječnih proizvoda drugim vrstama mlijeka utvrđuje se prisutnost jedne ili druge skupine proteina. Međutim, proteini sirutke zbog svojstva termolabilnosti ne mogu se koristiti za dokazivanje patvorenja toplinski obrađenog mlijeka. Premda, treba istaknuti da postoje razlike u termostabilnosti između proteina sirutke pojedinih vrsta

Tablica 1: Proteini mlijeka (Tratnik, 1998.)

Table 1: Milk proteins (Tratnik, 1998)

Ukupni protein Total proteins	
Kazeini Caseins	Proteini sirutke Whey proteins
α_{S1} -kazein α_{S1} -casein	α -laktalbumin α -lactalbumin
α_{S2} -kazein α_{S2} -casein	β -laktoglobulin β -lactoglobulin
β -kazein β -casein	Albumin krvnog seruma Serum albumin
γ -kazein γ -casein	Imunoglobulini Immunoglobulins
κ -kazein κ -casein	Proteaze-peptoni (i drugi) Protease-peptones (etc.)

Tablica 2: Sastav kazeinskih frakcija u sirovom kravljem, ovčjem, kozjem i bivoljem mlijeku utvrđen tekućinskom kromatografijom (Bramanti i sur., 2003.)

Table 2: Casein fraction composition in raw bovine, ewe, goat and buffalo milk determined by liquid chromatography (Bramanti i sur., 2003)

Vrsta mlijeka Milk type	Ukupni sadržaj proteina (mg/mL) Total protein content (mg/mL)	Udio kazeina u ukupnom sadržaju proteina (%) Casein content in total protein content (%)	α_{S1} -kazein (%) α_{S1} -casein (%)	α_{S2} -kazein (%) α_{S2} -casein (%)	β -kazein (%) β -casein (%)	γ -kazein (%) γ -casein (%)	κ -kazein (%) κ -casein (%)
Kravlje Bovine	27.8±2.2	83±10	37±7	7±1	42±8	6±2	9±4
Ovčje Ewe	59.4±3.3	93±10	33±8	14±2	30±5	9±1	14±2
Kozje Goat	33.4±1.6	99±12	10±6	--	63±11	18±4	8±2
Bivolje Buffalo	49.2±1.9	90±5	31±2	13±1	28±2	22±1	7±1

mlijeka. Tako su, primjerice, proteini sirutke bivoljeg mlijeka, u odnosu na kravlje mlijeko, stabilniji na toplinsku denaturaciju (Jainudeen, 2003.). Usprkos toj činjenici, analiza temeljena na prisutnosti proteina sirutke u siru koji je patvoren drugim vrstama mlijeka, koristi se samo za sireve proizvedene od sirovog mlijeka. Prednost te metode, u odnosu na dokazivanje kazeina, je manja osjetljivost proteina sirutke na proteolitičke reakcije tijekom zrenja sira i činjenica da je sastav kazeinskih frakcija u različitim vrstama mlijeka različit (tablica 2).

Elektroforeza

Obzirom na jednostavnost i relativno kratko vrijeme analize, elektroforeza na urea-poliakrilamidnom gelu (urea-PAGE) i natrij dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), često se koristi za dokaz patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka. Za dokazivanje udjela kravljeg mlijeka u ovčjim, kozjim i bivoljim sirevima, na temelju detekcije proteina sirutke i kazeina moguće je dokazati udio kravljeg mlijeka od 10% i više (Amigo i sur., 1992.; El-Ghannam, 1994.). Za dokazivanje proteina sirutke drugih vrsta mlijeka u siru, najčešće se utvrđuje razlika između α -laktalbumina i β -laktoglobulina (Amigo i sur., 1991.). Analiza na urea-PAGE gelu, temeljena na dokazivanju kazeina različitih vrsta mlijeka, omogućuje razlikovanje prema različitoj migraciji α_{S1} -kazeina (Veloso i sur., 2002.). Prednost elektroforetske analize je mogućnost istodobne analize većeg broja uzoraka na istom gelu, pod jednakim uvjetima, što povećava ponovljivost i usporedivost dobivenih rezultata (Krsnik-Rasol i sur., 2004.). Glavni nedostatak metode je relativno slaba osjetljivost.

Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje [eng. Isoelectric focusing (IEF)] je metoda visoke razine razlučivanja u kojoj se proteini razdvajaju u prisutnosti kontinuiranog pH gradijenta (Krsnik-Rasol i sur., 2004.). Europska komisija usvojila je 1992. godine metodu izoelektričnog fokusiranja kao referentnu metodu za dokazivanje kravljih kazeina u ovčjim, kozjim i bivoljim sirevima (Council Regulation EEC, 1996.). Metoda se temelji na odvajanju kazeinske frakcije iz mlijeka i sira nakon cijepanja kazeina plazminom pod određenim uvjetima. Analizom proteinskog hidrolizata izoelektričnim fokusiranjem mogu se odvojiti kravlji γ_2 - i γ_3 -kazeini od ovčjih kazeina. Test je pozitivan na patvorenje ukoliko je dokazano barem 1 %

ukupnih kravljih γ_2 - i γ_3 -kazeina. Da bi se izbjegli lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati, potrebno je detektirati obje (γ_2 i γ_3) frakcije kazeina. Za točniji rezultat ove metode treba istovremeno analizirati 2 referentna uzorka ovčjeg sira: jedan referentni uzorak ne sadrži kravlje mlijeko, dok drugi sadrži 1 % kravljeg mlijeka. Količina prisutnog kravljeg mlijeka (od 1 % na više) može se izračunati usporedbom intenziteta kravljeg γ_2 - ili γ_3 -kazeina s referentnim uzorkom koji sadrži 1 % kravljeg mlijeka (Council Regulation EEC, 1996.; Mayer i sur., 1997.). Nedostatak ove metode je nemogućnost dokazivanja patvorenja ovčjih sireva kozjim mlijekom. Naime, položaji ovčjih i kozjih γ -kazeinskih frakcija su jednaki - preklapaju se (Council Regulation EEC, 1996.). Također, IEF metoda može se koristiti za razlikovanje ovčjeg i kozjeg mlijeka u siru, kada se analiza temelji na dokazivanju para- κ -kazeina, ali je tada granica detekcije viša (Mayer i sur., 1997.; Mayer, 2005.; Addeo i sur., 1990.).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka najčešće korištena imunološka metoda je ELISA [eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay]. U praksi se koriste različite tehnike ELISA-e (indirektna, kompetitivna, sendvič, uz korištenje monoklonskih i poliklonskih antitijela) s granicom detekcije patvorenja nižim od 1% (Haza i sur., 1999.; Garcia i sur., 1993.; Haza i sur., 1997.; Rodriguez i sur., 1990.; Hurley i sur., 2004.). Iako je granica detekcije ELISA metode niska, kao nedostatak te metode navodi se određen postotak lažno negativnih rezultata patvorenja u slučajevima prethodne toplinske obrade mlijeka. Dobar primjer je patvorenje ovčjeg sira pasteriziranim kravljim mlijekom. Analiza sirutkinih proteina ELISA metodom pokazala je lažno negativan rezultat. Istovremeno, ELISA metodom - koja se temeljila na dokazivanju kazeina istog uzorka sira - utvrđeno je patvorenje ovčjeg sira kravljim mlijekom. (Mayer, 2005.).

Kapilarna elektroforeza

Za utvrđivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka koristi se i tehnika kapilarne zonske elektroforeze uz detekciju UV detektorom [engl. Ultraviolet detector (UV)]. Najčešće se dokazivanje udjela drugih vrsta mlijeka u siru temelji na proteinima sirutke, a granica detekcije kapilarne zonske elektroforeze je približno 2% (Cartoni i sur., 1999.; Martinez i

sur., 2000.). Prednost te metode je kraće vrijeme analiza u odnosu na kromatografske metode.

Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija

Za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka često se primjenjuje i tekućinska kromatografija visokog razlučivanja [eng. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)] i to particijska kromatografija obrnutih faza. Jednako kao i kod kapilarne elektroforeze, dokazivanje patvorenja najčešće se temelji na dokazivanju proteina sirutke, a granice detekcije su 2% i niže (de Noni i sur., 1996.; Romero i sur., 1996.; Ferreira i sur., 2003.). Kromatografija uz detekciju UV detektorom pokazala se vrlo dobrom kvantitativnom metodom u analizi proteina mlijeka. Međutim, u novije vrijeme, radi dobivanja što točnijih i pouzdanijih rezultata, kromatografija se sve više koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Tako se primjerice tekućinskom kromatografijom visokog razlučivanja, uz ionizaciju elektroraspršenjem, te detekcijom masenim detektorom [eng. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS)], na temelju analize β -laktoglobulina može detektirati 5% kravljeg mlijeka u kozjem mlijeku (Chen i sur., 2004.). Korištenje metode matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom uz analizator masa s vremenom proleta [eng. Matrix Assisted Laser Desorption - Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)] pokazalo se uspješno u analizi «otiska prsta» [eng. fingerprint] proteina mlijeka. Iako je ova tehnika vrlo osjetljiva i reproducibilna, uz dobro razlučivanje masa, za uspješnost masenih spektara dobivenih MALDI metodom jako su važni eksperimentalni uvjeti. Naime, tretiranje uzorka, odabir matrice i ko-kristalizacija uzorak-matrica ključni su elementi za osjetljivost same metode. Na temelju α -laktalbumina i β -laktoglobulina masenih spektara dobivenih MALDI metodom moguće je dokazati 2% ovčjeg mlijeka u bivoljem, dok je limit detekcija za dokazivanje kravljeg mlijeka u bivoljem 5% (Cozzolino i sur., 2002.).

Dokazivanje profila triacilglicerola i omjera masnih kiselina

Mliječna mast

Mliječna mast kozjeg i kravljeg mlijeka razlikuje se po zasićenosti i duljini lanca masnih kiselina. Kozje mlijeko sadrži veći udio srednjolančanih zasićenih masnih kiselina (C6-C14) u odnosu na kravlje. Najzastupljenije srednjolančane masne kiseline u kozjem mlijeku su kapronska (C6:0), kaprilna (C8:0) i kaprinska (C10:0) kiselina. One čine oko 20% ukupnih masnih

kiselina u kozjem mlijeku, dok su u kravljem mlijeku zastupljene sa svega 6% (Hellin i sur., 1998.; Jandal, 1996., Božanić i sur., 2002.). Najzastupljenije masne kiseline u ovčjem mlijeku su C14, C16 i C18:1, u kombinaciji sa C4 i C6 masnim kiselinama. Postotak kratkolančanih triacilglicerola (C26-C36) u ovčjem mlijeku je 18% u odnosu na 11% u kravljem mlijeku. Ovčje mlijeko sadrži i više srednjolančanih triacilglicerola (C38-C44) u odnosu na kravlje mlijeko (33% u ovčjem mlijeku u odnosu na 25% u kravljem). Udio nezasićenih triacilglicerola u ovčjem mlijeku nešto je niži u odnosu na kravlje, 51 % u ovčjem mlijeku u odnosu na 55 % u kravljem (Ramos i Juarez, 2003.).

Kromatografija

Analiza profila triacilglicerola i omjera masnih kiselina radi dokazivanja patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka provodi se kromatografskim tehnikama. Tekućinska kromatografija triacilglicerola najčešće se izvodi na koloni s polarnom stacionarnom fazom uz detekciju UV detektorom, detektorom raspršenja svjetla u uparenom uzorku [engl. Evaporative Light Scattering detector (ELSD)] i detektorom indeksa loma [engl. refractive index detector (RI)]. Triacilgliceroli se mogu analizirati i plinskom kromatografijom uz detekciju plameno-ionizacijskim detektorom [eng. Flame ionization detector (FID)]. Kapilarna plinska kromatografija pokazala je najbolju razlučivost u analizi diacilglicerola, dok se tekućinska kromatografija pokazala najboljom u razlučivanju polinezasićenih triacilglicerola (Lipp, 1995.). Prema profilu masnih kiselina u siru, odnosno omjeru laurinske [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$] i kaprinske kiseline [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{H}$], može se dokazati patvorenje ovčjeg ili kozjeg sira kravljim mlijekom. Za ovu metodu potrebno je mliječnu mast prevesti u butilne estere masnih kiselina prije analize plinskom kromatografijom (Iverson i Sheppard, 1989.). Metilni esteri masnih kiselina [eng. Fatty Acid Methyl Ester (FAME)] služe kao «otisak prsta» u identifikaciji životinjskih masti, pa se i oni koriste u dokazivanju patvorenja mlijeka i mliječnih proizvoda (Lipp, 1995.).

Dokazivanje specifičnih segmenata DNK

Patvorenje mlijeka i sira različitim vrstama mlijeka na razini nižoj od 0,5% moguće je dokazati metodom lančane reakcije polimerazom [eng. Polymerase Chain Reaction (PCR)]. Metoda se temelji na izolaciji deoksiribonukleinske kiseline (DNK) iz prirodno prisutnih epitelnih stanica u

sastavu somatskih stanica mlijeka i sira (Lipkin i sur., 1993.; Plath i sur., 1997., Maudet i Taberlet, 2001., Kalantzopoulos i sur., 2004.). U odnosu na ELISA, prednost PCR metode je mogućnosti dokazivanja patvorenja mlijeka i sira i u toplinski obrađenom mlijeku. Međutim, za relevantnost rezultata PCR analize mlijeko treba sadržavati više od 17×10^6 somatskih stanica za ekstrakciju 11 do 1100 μg DNK. Budući da broj somatskih stanica u higijenski ispravnom mlijeku izrazito ovisi o pasmini, te stadiju i broju laktacija (Kalantzopoulos i sur., 2004.), nedostatak te metode je i standardizacija protokola izvođenja same analize (Lipkin i sur., 1993.).

Zaključak

Pouzdanost rezultata analiza za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka ponajprije ovisi o izboru metode i poznavanju osobina i načina izrade proizvoda. Analitičke metode koje se temelje na analizi proteina sirutke pouzdane su i točne za analizu mlijeka i sira koji nije toplinski obrađen. Suprotno, za toplinski obrađeno mlijeko i sir, treba izabrati metode koje se temelje na analizi kazeina. Dokazivanje patvorenja mlijeka i sira temeljeno na dokazivanju masnih kiselina moguće je samo ako mlijeko nije obrano. Nedostatak metode temeljene na dokazivanju specifičnih segmenata DNK epitelnih stanica mlijeka je nemogućnost standardiziranja protokola izvođenja analiza.

METHODS FOR DETERMINATION OF MILK AND CHEESE ADULTERATION BY OTHER MILK TYPES

Summary

In the world milk production, the contribution of goat, ovine, buffalo and other types of milk is small, compared to the cows' milk. Because of great availability, cows' milk is often used for adulteration of other milk types and dairy products. Due to adulteration, food characteristics are changed. Several analytical techniques were reported in the literature for the detection of milk and dairy products adulteration. Most of them are based on detection of milk protein fractions. Methods based on milk fat composition, such as profiles of triglycerides and ratios of distinct fatty acids, as well as polymerase chain reaction for detection of specific DNA sequences of species are also used.

In this paper advantages and disadvantages of different methods (electrophoresis, isoelectric focusing, ELISA method, capillary electrophoresis, chromatography, mass spectrometry, PCR) which are used for the species detection of milk and cheese are described.

Key words: adulteration, milk, cheese, methods for detection of adulteration.

Literatura

ADDEO, F., MOIO, L., CHIANESE, L., STINGO, C., DI LUCCIA, A. (1990): Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para-k-casein. *Milchwissenschaft*, 45 (4), 221-224.

AMIGO, L., RAMOS, M., ALVAREZ, P. J. M. (1991): Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *Journal of Dairy Science*. 74 (5), 1482-1490.

AMIGO, L., RAMOS, M., CALHAU, L., BARBAROSA, M. (1992): Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing and immunodiffusion in determinations of cow's and goat's milk in Serra da Estrella cheeses. *Lait*, 72, 95 - 101.

BOŽANIĆ, R., TRATNIK, LJ., DRGALIĆ, I. (2002.): Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* 52 (3), 207-237, 2002.

BRAMANTI, E., SORTINO, C. H., ONOR, M., BENI, F., RASPI, G. (2003): Separation and determination of denatured α [s1]-, α [s2]-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of chromatography A*, 994 (1-2), 59-74.

CARTONI, G., COCCIOLI, F., JASIONOWSKA, R., MASCI, M. (1999): Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal of Chromatography A*, 846, 135-141.

CHEN, R. K., CHANG, L. W., CHUNG, Y. Y., LEE, M. H., LING, Y. C. (2004): Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (10), 1167-1171.

COUNCIL REGULATION (EEC) No 1081/96 (1996): Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses made from ewes' milk, goats' milk or buffalos' milk or mixtures of ewes', goats' and buffalos' milk. *Official Journal of the European Communities*, No. L142, 15-25.

COZZOLINO, R., PASSALACQUA, S., SALEMI, S., GAROZZO, D. (2002): Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 37, 985-991.

CREAMER, L. K., SAWYER, L. (2003): Beta lactoglobulin. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 3., urednici: H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox, Academic Press, Boston, USA, 1932-1939.

DE NONI, I., TIRELLI, A., MASOTTI, F. (1996): Determinazione del latte di vacca nei formaggi di specie minori mediante HPLC delle sieroproteine: applicazione ai formaggi di capra. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 47, 7-17.

EL-GHANNAM, M. S. (1994): Detection of mixtures of buffaloes', cows' and goats' milk using polyacrylamide gel electrophoresis. *Alexandria Journal of Agriculture research*, 39 (3), 171-182.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O., CACOTE, H. (2003): Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1015, 111-118.

GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., MORALES, P., HERNANDEZ, P. E., SANZ, B. (1993): Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 48, 563-566.

HARBUTT, J. (2000): Svjetska enciklopedija sira. Naklada Fran, Zagreb

HAZA, A. I., MORALES, P., MARTIN, R., GARCIA, T., GONZALO, A., SANZ, B., HERNANDEZ, P. E. (1999): Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 1043-1047.

HAZA, A. I., MORALES, P., MARTIN, R., GARCIA, T., ANGUIA, G., GONZALEZ, I., SANZ, B., HERNANDEZ, P. E. (1997.): Use of a monoclonal antibody and two enzyme-linked immunosorbent assay formats for detection and quantification of the substitution of caprine milk for ovine milk. *Journal of Food Protection* 60, 973-977.

HELLIN P., LOPEZ M.-B., JORDAN M. J., LAENCINA J. (1998): Fatty acids in Murciano-Granadina goat's milk. *Lait*, 78, 363-369.

HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E., WILLIAMS, J. H. H. (2004). Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration. *Journal of Dairy Science*, 87, 543-549.

IDF (2002): World Dairy Situation. Bulletin of the IDF. N° 378/2002.

IVERSON, J. V., SHEPPARD, A. J. (1989): Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. *Journal of Dairy Science*, 72, 1707-1712.

JAINUDEEN, M. R. (2003): Buffalo Husbandry. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 1., urednici: H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox, Academic Press, Boston, USA, 186-193.

JANDAL, J. M. (1996): Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22, 177-185.

KALANTZOPOULOS, G., DUBEUF, J.P., VALLERAND, F., PIRISI, A., CASALTA, E., LAURET, A., TRUJILLO, T. (2004): Characteristics of sheep and goat milks: quality and hygienic factors for the sheep and goat dairy sectors. *IDF Bulletin*, 390, 17-28.

KRSNIK-RASOL, M., BALEN, B., MAČEK, B., PAVOKOVIĆ, D. (2004.): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, PMF, Biološki odsjek, Skripta za internu uporabu 2004/2005., 2-12.

LIPKIN, E., SHALOM, A., KHATIB, H., SOLLER, M., FRIEDMANN, A. (1993): Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 76, 2025-2032.

LIPP, M. (1995): Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: application for studies of milk quality and adulteration. *Food Chemistry*, 54 (2), 213-221.

LUKAČ HAVRANEK, J. (1995.): Autohtoni sirevi Hrvatske. *Mljekarstvo*, 45 (1), 19-37.

MARTINEZ, J. M. H., ALFONSO, E. F. S., RAMOS, G. R., GELFI, C., RIGHETTI, P. G. (2000): Determination of cow's milk in non-bovine and mixed cheeses by capillary electrophoresis of whey protein in acidic isoelectric buffers. *Journal of Chromatography A*, 878, 261-271.

MATTER, L., SCHENKER, D., HUSMANN, H., SCHOMBURG, G. (1989): Characterization of animal fats via the gas chromatography pattern of FAME mixtures obtained by transesterification of the triglycerides. *Chromatographia*, 27, 31-36.

MAUDET, C., TABERLET, P. (2001): Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229-235.

MAYER, H. K. HEIDLER, D. ROCKENBAUER, C. (1997): Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of gamma- and para-kappa-caseins. *International dairy journal*, 7(10), 619-628.

MAYER, H. K. (2005): Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International dairy journal*, 15, 595-604.

PLATH, A., KRAUSE, I., EINSPANIER, R. A. (1997): Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology*, 205, 437-441.

RAMOS, M., JUAREZ, M. (2003): Sheep milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4., urednici: H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox, Academic Press, Boston, USA, 2539-2545.

RODRIGUEZ, E., MARTIN, R., GARCIA, T., HERNANDEZ, P. E., SANZ, B. (1990): Detection of cows milk in ewes milk and cheese by an indirect enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Dairy Research*, 57, 197-205.

ROMERO, C., PÉREZ-ANDÚJAR, O., OLMEDO, A., JIMÉNEZ, S. (1996): Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*, 42, 181-184.

SCOTT, R., ROBINSON, R. K., WILBEY, R. A. (1998): *Cheesemaking Practice* (3rd Ed). Applied Science Publication Ltd., London.

TRATNIK, L.J. (1998.): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

VELOSO, A. C. A., TEIXEIRA, N., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. (2002): Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967 (2), 209-218.

ZAKON O HRANI (2003.): N.N., 117/03.

Adrese autora - Author's addresses:

Sonja Damjanović, dipl. ing.

Prof. dr. sc. Dubravka Samaržija

Prof. dr. sc. Jasmina Havranek

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za mljekarstvo

Svetošimunska 25, Zagreb

Prispjelo - Received: 25.09.2006.

Prihvaćeno - Accepted: 04.10.2006.