

ENCIMI MIKROBIOLOŠKOG IZVORA KAO ADITIVI U MLJEKARSKOJ INDUSTRIJI*

Aleksa Cimerman, Kemijski institut »BORIS KIDRIČ«, Ljubljana**
Vladimira Kopitar, Ljubljanske mlekarne, Ljubljana***

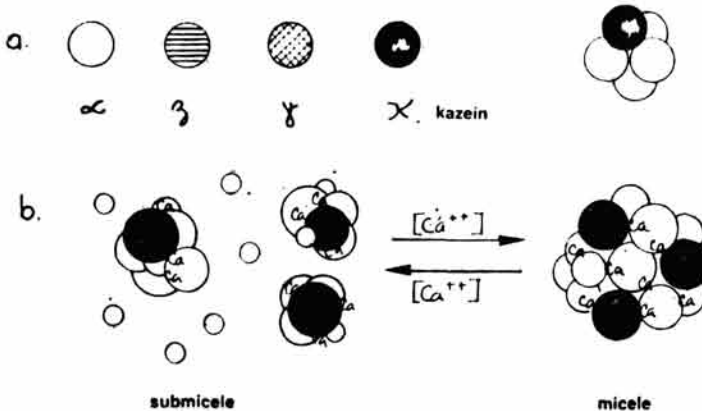
Sažetak

Autori iznose nova saznanja o biokemijskim procesima na području proizvodnje sira kao i prikaz encimatskih procesa koji se odigravaju prilikom razgrađivanja mlječne bjelančevine. Predloženi su rezultati rada i vođenju tehnoloških postupaka kod kojih je upotrebljavano sirilo mikrobiološkog izvora, u dva sirarska pogona Ljubljanskih mlekarne. Referat obuhvaća i kratak pregled historijskog razvoja dobivanja proteolitičnih enzima mikrobiološkog izvora u svijetu.

Prikazani su rezultati rada s područja mikrobiološkog izvora na Kemijskom institutu »BORIS KIDRIČ« u Ljubljani.

Mlječna bjelančevina

Mlječni proteini sadrže 19 različitih aminokiselina, od kojih svaka ima svoje specifične karakteristike. Međusobno (aminokiseline) su povezane peptidnom vezom u polipeptide. Različita struktura polipeptidnih lanaca je uzrokovana rasporedom pojedinih aminokiselina, kao i brojnošću i vrstom prisutnih aminokiselina. Na osnovu toga razlikujemo α -, β - i κ -kazein. Kazeinski kompleks je izgrađen iz aglomerata frakcija α -, β -, δ - i κ -kazeina u odnosu (po Kirchmeier-u) 9 : 4 : 1 : 3. Više kazeinskih kompleksa se međusobno povezuju pomoću Ca-iona i Ca-fosfata u submicele i veće micle u obliku



Slika 1: Povezivanje kazeinskih frakcija u aglomerate
Figure 1: Binding of casein fractions into agglomerates

* Referat je bio u skraćenom obliku objavljen na XXII seminaru za mljekarsku industriju u Zagrebu, 8. 2. 1984.

** Prilikom eksperimentalnog rada sudjelovali su: Mr dipl. ing. Jožica Friedrich i dipl. biol. Nina Gunde-Cimerman

*** Rezultate iz proizvodnje su pribavili: dipl. ing. Vera Štefanec, Silvo Korošec i Marijan Knežič

loptice. Loptica kazeinskog micela broji 7.000 do 10.000 polipeptidnih lanaca i pri tome je 10 puta manja od loptica (kapljica) mlječne masti. Veličina loptice se kreće između 10 i 16 nm (1 nm = 1/1.000.000 mm). (Sl. 1)

Frakcije kazeina se jako razlikuju po topivosti i osjetljivosti prema kalciju. (Tab. 1)

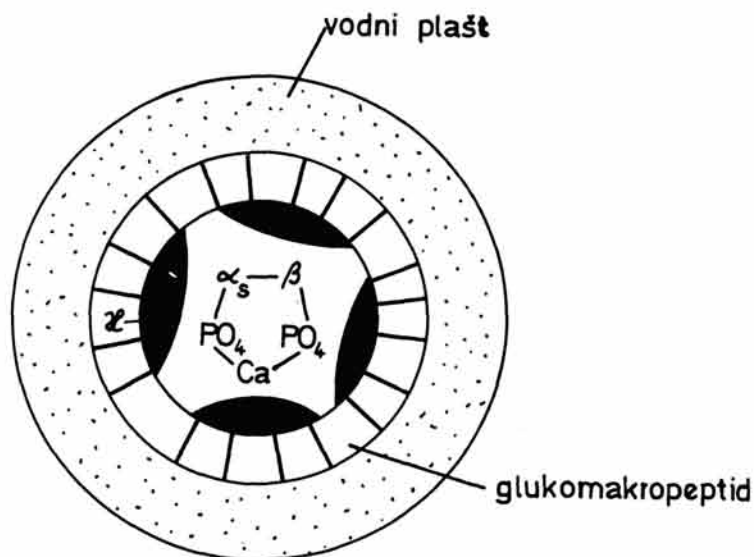
Tablica 1: Karakteristike kazeinskih frakcija

Table 1: Characteristics of casein fractions

— α_s — kazein je iz 199 aminokiselina	45—55%	— osjetljiv na prisutnost kalcija, zgrušava se u prisutnosti Ca-iona, k-kazein ga stabilizuje
— k — kazein je iz 170 aminokiselina	8—15%	— za Ca neosjetljiv, djeluje kao zaštitni koloid cijelog kazeinskog kompleksa i održava koloidni rastvor; sirište ga cijepa
— β — kazein iz 209 aminokiselina	25—30%	— neosjetljiv za kalcij
— γ — kazein	3—7%	— manje komponente, fragmenti kazeina

Kazeinski miceli su građeni po određenom principu. K-kazein se, po modelu, nalazi uglavnom na površini micela. Negativno naelektrizirani hidrofilni dio tzv. glukomakro peptid, je usmjeren prema spoljnoj strani kazeinskog micela.

Kazeinski miceli su u početku okruženi hidrofilnom opnom (vodena opna) koja predstavlja ujedno zaštitnu opnu. Odgovorna je i za fini raspored kazeina u mlijeku. Hidratna opna nastaje zbog hidrofilnih osobina k-kazeina i naelek-



Slika 2: Shema kazeinskog micela

Figure 2: Scheme of a casein micelle

triziranosti na površini micela, kao i zbog dipolnog stanja molekula vode. Jačinu hidratne opne određuju pH kao i sastav soli u mlijeku — reguliraju sposobnost mlijeka da se usiri.

Biokemijski procesi, koji nastaju kod djelovanja sirišta na mlječnu bjelančevinu

Razlikujemo 3 faze za vrijeme djelovanja sirišta na mlječnu bjelančevinu:

- primarna — encimska faza,
- sekundarna — koagulacijska faza,
- tercijarna — skupljanje (sinereza).

PRIMARNA — encimska faza:

- odvajanje hidrofилnog dijela (glukomakropeptida od k-kazeina)
- odvajanje negativno naelektrizirane grupe,
- odvajanje hidratne opne.

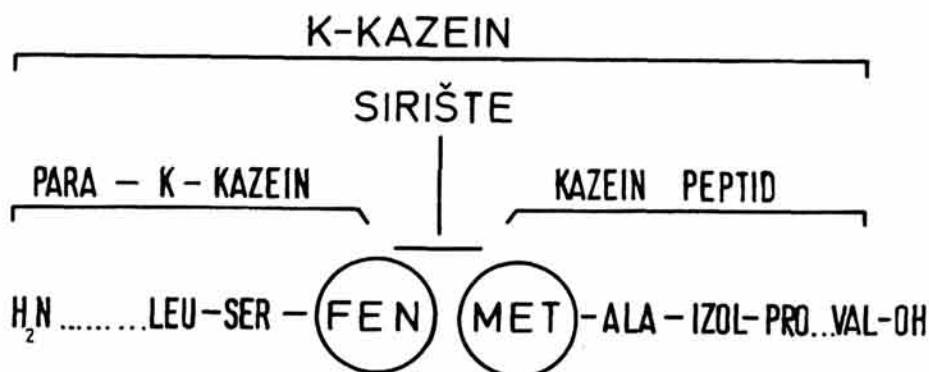
SEKUNDARNA — faza koagulacije

- međusobno povezivanje kazeinskih micela
- formiranje lanaca na osnovu elektrostatskog privlačenja
- povezivanje lanaca u trodimenzionalnu mrežastu strukturu
- stvaranje sirišne galerte.

TERCIJARNA faza (sinereza):

- kontrakcija kazeinskih vlakana (lanaca)
- spontano odvajanje sirutke.

Primarna faza započinje odmah nakon stavljanja sirišta u mlijeko. Odvajanje glukomakropeptida je u početku najbrže, kasnije se proces usporava. Priroda veze među para-k-kazeinom i makropeptidom NPN je bila predmet dugogodišnjih intenzivnih ispitivanja. Delfour i suradnici dokazuju, da je veza koja se hidrolizira odmah po djelovanju sirišta na k-kazein peptidna veza između aminokiselina fenilalanina i metionina (Phe-Met). (Slika 3).

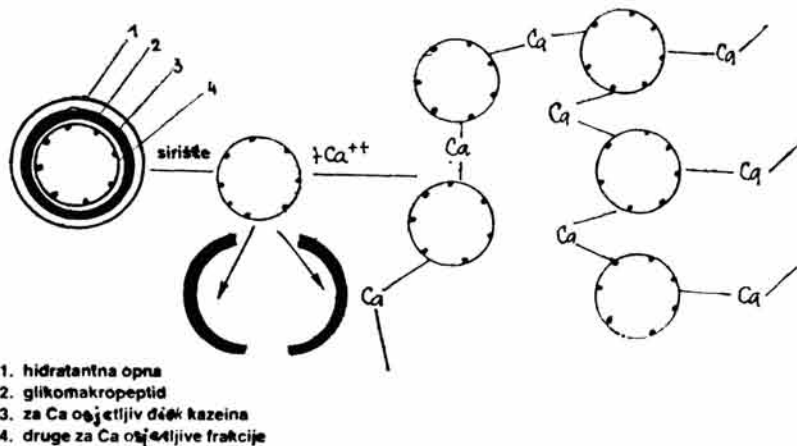


Slika 3: Hidroliza k-kazeina poslije djelovanja sirišta
 Figure 3: Hydrolyses of k-casein after rennet action

Peptidna veza između fenilalanina i metionina (Phe-Met) je mnogo osjetljivija za proteolitske encime od bilo koje druge veze u proteinskom sistemu mlijeka.

Dokazano je da i sam raspored, ikako sekvence tako i vrsta aminokiselina, jako utječu na cijepanje sirištem.

SEKUNDARNA FAZA — mlijeko ne koagulira dok bar 86—88% encimske faze nije proteklo. Povezivanje micela počinje kada je čak 97% k-kazeina hidroliziranog. (Sl. 4)



Slika 4: Shema koagulacije mlijeka

Figure 4: Scheme of milk coagulation

TERCIJARNA FAZA — micelni lanci se isprepliću u mrežu koja u svojim šupljinama zadržava vodu, supstance rastopljene u vodi i kapljice masti. Svježe usireno mlijeko ima tendenciju skraćivanja veza između micela, povećanje broja veza i samim tim dolazi do veće stabilnosti kompleksa. Sirutka se istiskuje iz kazeinske mreže — **SINEREZA**. (Slika 5).



Slika 5: Slika trodimenzionalne mreže koaguluma

Figure 5: Scheme of tridimensional milk coagulum

Encimi koji koaguliraju mlijeko

Više od 6.000—5.000 godina pred novom erom, su lovci i nomadi iz Male Azije i Arabije upotrebljavali želuca svježe zaklanih životinja za sirenje mlijeka. Dakle, više od 7.000 godina dugu tradiciju ima sirarstvo, i što je najvažnije osnove sirarstva su ostale iste kao i potreban materijal: mlijeko, sirarske kul

ture, sirište. Razvojem prehrambene kulture raste i potreba za dobrima svih vrsta. Da bi se tim potrebama udovoljilo moralo se početi s organiziranom proizvodnjom prehrambenih dobara. Godine 1874. u Danskoj Kristian Hansen, započinje prvi industrijsku proizvodnju sirišta iz telećih želudaca. Takvo sirište dominira cijelih 90 godina u sirarstvu. Po drugoj strani, zadnjih 20 godina, mlječna industrija bilježi vrtoglav porast potražnje njenih proizvoda. Na žalost, mogućnost veće isporuke teladi i samim tim proizvodnja sirišta, je sve manja. Već 60-tih godina mogao se je naslutiti nedostatak sirišta, što je bio direktan povod za traženje novih rješenja. Tako su se npr., počela koristiti sirišta drugih životinja, sirila biljnog porijekla, ali i encimi mikrobiološkog izvora. Istraživanja, sa ciljem pronalaženja adekvatne zamjene za encim telećih želudaca su brojna i daju kako dobre, tako i loše rezultate.

Tablica 2. Pregled enzima koji koaguliraju mlijeko
Table 2. Milk clotting enzymes

P R O T E A Z E		
ZIVOTINJSKOG IZVORA	BILJNOG IZVORA	MIKROORGANIZAMA
teleće sirište goveđi pepsin svinjski pepsin kokošji pepsin tripsin himotripsin	papain ficin bromelein	gljive: <i>MUCOR PUSILLUS</i> <i>MUCOR MIEHEI</i> <i>ENDOTIA PARASITICA</i> BAKTERIJE: <i>BACILLUS CEREUS</i> <i>BACILLUS POLYMYXA</i>

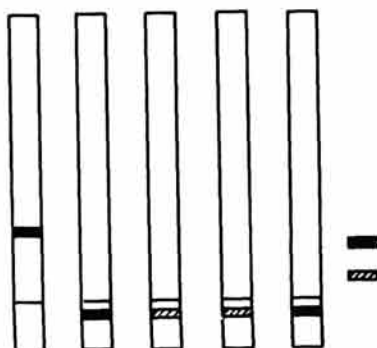
Među nabrojenim mogućim izvorima sirišnih enzima, mali je broj takvih, koji se mogu upotrebiti u sirarskoj industriji. Prijedlog tih enzima je dat u drugom dijelu ovog referata. Industrija ih je u početku držala u fazi eksperimentalne upotrebe, ali već 1976. godine, 25% količina sirila upotrebljenog u svijetu, pokriva sirilo mikrobiološkog izvora.

Danas se u SAD već upotrebljava više od 60% mikrobiološkog sirila. S druge strane, u Francuskoj, koja je do nedavno proizvodila viškove sirišta, koja gaji u neku ruku »KULT SIRIŠTA«, baca se anatema na sva druga sredstva za koagulaciju.

Još energičnije, na novi val sirila odgovara Nizozemska, gdje upotreba drugog sirila, osim iz telećih želudaca, nije dozvoljena. Upotrebu nekog drugog sirila može odobriti samo vlada.

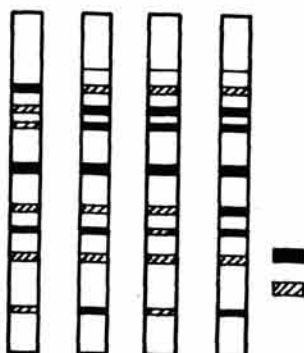
Odmah sa pojavom zamjena za klasično sirište, moralo se pristupiti izradi metoda za dokazivanje tih zamjena u proizvodima (siru). Komisija koja bi morala izgraditi te metode za identifikaciju upotrebljenog sirila, formirala se je već 1960. prilikom susreta na međunarodnom mljekarskom udruženju u Moskvi. Zadatak je povjeren komisiji B (Commission for technology and engineering), koju je vodio P. J. de Koning (NIZO).

Sušтина zadataka te komisije je bila uvesti analitičke metode za kvantitativno i kvalitativno dokazivanje prisutnosti jedne ili više zamjena za encim: identifikacija tipa sirila u siru; razvoj brze kemijske metode za obrađivanje tipa sirila; praktična primjena sirišnih zamjena u sirarstvu.



Slika 6: Elektroforezogrami na poliakrilamidnom gelu (kapa — kazein)
Figure 6: Electrophoretic patterns on polyacrylamide gel (k — casein)

Sedam godina kasnije, P. J. de Koning već opisuje metode i rezultate rada svoje komisije. Sirište vrlo dobro dokazuju amilaznim testom, kojim je dobro vidljiva razlika između sirišta životinjskog i sirila mikrobiološkog izvora. Razlika se može ustanoviti pomoću elektroanalize. (Slike 6 i 7)

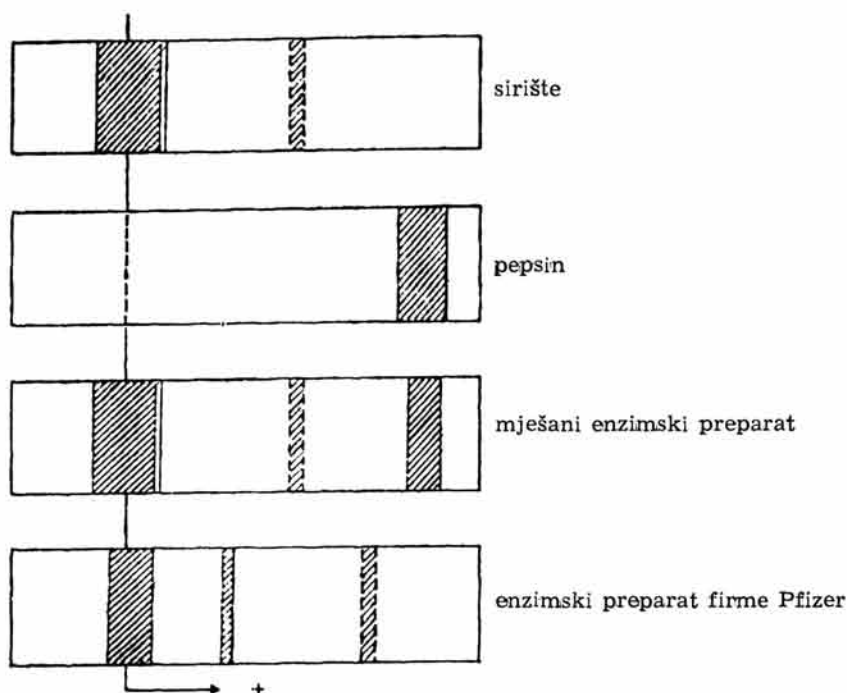


Slika 7: Elektroforezogrami 4 tjedna starog sira Gauda
Figure 7: Electrophoretic patterns of 4 Week old Gauda cheese

Radom komisije je odmah na samom početku uvođenja zamjena za encim omogućen pregled nad upotrebom tih zamjena u sirarstvu, čime je isključena mogućnost bilo kakvih malverzacija.

Kako je sa tim u Jugoslaviji

Proces uvođenja zamjene za sirište nas se je i te kako ticao, jer smo među prvima osjetili nedostatak teladi i s tim prijetnju da nećemo imati dovoljno sirišta iz telećih želudaca. Prof. Šipka i saradnici objavljuju rezultate zapažanja prilikom upotrebe »RENILAZE« u proizvodnji trapista, kačkavalja i belog sira u kriškama. Ogledi su vršeni 1971. i 1972. godine, a rezultati objavljeni u »MLJEKARSTVU« januara 1973.



Slika 8: Elektroforezogram (na papiru) enzima, koji koaguliraju mlijeko
Figure 8: Paper electrophoretic test of milk clotting enzymes

Ljubljanske mlekarnice su god. 1972. započele pokusnu proizvodnju sira, za čije sirenje je upotrebljeno sirilo mikrobiološkog izvora. Proizvodnja je tekla tako, da je u dva kotla dato isto mlijeko, s tim da je mlijeko u jednom kotlu sireno sirištem iz telećih želudaca, a u drugom sirilom mikrobiološkog izvora. Dodato sirište smo tako dozirali, da je vrijeme usirenja bilo jednako — oko 30 minuta. Koagulum je u kotlu s dodatkom mikrobiološkog sirila bio mekši i kod obrade koagulumata stvarao se sirni prah. Nakon mjesec dana ocijenili smo sireve i senzorično.

Sirevi — usireni sirištem iz telećih želudaca, imali su tipičan izgled na presjeku kao i tipične senzorične osobine.

Sirevi — usireni sirilom mikrobiološkog izvora, nemaju na presjeku lijepe rupice, rupice su gušće (broj rupica je veći), male su, nepravilno raspoređene, tijesto je bilo mazive konzistencije, okus netipičan i pomalo kiseo.

Naša zapažanja smo prenijeli proizvođaču mikrobiološkog sirila i moramo priznati da su nam poslali korisna uputstva za sirenje njihovim sirištem:

- lagano (sporo) rezanje koagulumata,
- usporavanje cijele faze predsirenja.

Pridržavajući se tih uputstava, dobili smo sireve istog kvaliteta kao što su sirevi rađeni klasičnim sirištem. Opisana probna proizvodnja je tekla u sirari Kočevje (pogon Ljubljanskih mlekarni), gdje je proizveden sir gauda. Istovremeno smo proizvodili i tvrdi sir tipa grojer, ali u drugom pogonu Lju-

bljanskih mlekarni, u sirari Velike Lašče. I ovdje nam je sinilo mikrobiološkog izvora dale lijepe rezultate nakon pridržavanja već gore opisanih uputstava: upola manja doza sirila mikrobiološkog izvora, kao i usporena obrada koaguluma te produžavanje faze predsirenja. Takav sir je bio istog kvaliteta kao i sir izrađen sirištem iz telećih želudaca.

Nakon što je izašao novi pravilnik godine 1983. u kojem se dozvoljava upotreba sirila mikrobiološkog izvora, počeli smo to sirilo uvoditi u redovnu proizvodnju sira. Najviše ga upotrebljavamo kad nemamo problema sa kvalitetom mlijeka.

Upotrebljavamo trenutno dvije vrste sirila mikrobiološkog izvora. U radu kao i kvaliteti sira nije vidljive razlike među tim sirilima. U proizvodnji tvrdog sira »LAŠČAN« u Velikim Laščama, gdje smo zadnjih mjeseci sistematski vodili tehnološke postupke po najstrožijim normama, dolazimo do slijedećih rezultata:

- nešto manje doziranje sirila mikrobiološkog izvora u odnosu na klasično sirište;
- potrebno je tehnološki postupak prilagoditi, jer je faza usirenja mikrobiološkim sirilom brža; potrebno je produžiti fazu učvršćivanja grude od usirenja do rezanja, odnosno usitnjavanja grude. Predsirenje traje dakle malo više vremena;
- obzirom na to, važno je doziranje kultura, da postignemo odgovarajući pH;
- time sprečavamo stvaranje praha, zadržavanje sirutke i teškoće kod zrenja sira;
- za vrijeme zrenja, s tako prilagođenom tehnologijom, nismo opazili nikakvih promjena u odnosu na sireve proizvedene sirištem iz telećih želudaca. Kvalitet sira je bio u istim fazama isti, kao i kvalitet sira paralelno usirenog klasičnim sirištem;
- nikakve neprijatne niti tuđe okuse nismo mogli utvrditi kod sireva proizvedenih sirilom mikrobiološkog izvora;
- prevelike doze sirila prouzrokuju velike greške, za vrijeme usirenja (cijedenje sirutke pred rezanjem grude, stvaranje praha za vrijeme rezanja), teškoće kod oblikovanja i stiskanja sira kao i nepravilan izgled zrelog sira, gusta i rastrgnuta rupičavost, mazivo tijesto; okus sira je nekarakterističan i jako gorak.

Danas naši sirari radije upotrebljavaju sirilo mikrobiološkog izvora nego sirište iz telećih želudaca. Vide prednost u izvanrednoj čistoći tog sirila, u upola manje upotrebljenoj količini, kao i u nižoj cijeni. Prebrodili smo i predrasude o posljedicama produženog proteolitičkog učinka kod proizvodnje tvrdih sireva s dužom fazom zrenja i to baš zadnjim proizvodnim koracima u proizvodnji sira »LAŠČAN« u sirari Velike Lašče. Nikakve razlike nismo opazili niti na presjeku niti na konzistenciji i okusu sireva proizvedenih sirilom mikrobiološkog izvora.

Navedimo još jedan podatak, za bolju orijentaciju u prostoru i vremenu, u odnosu na upotrebu sirišta u Sloveniji: prema podacima iz »PROGRAMA RAZVOJA MLJEKARSKE INDUSTRIJE U SLOVENIJI OD 1976.—1985.«. biti će prerađeno 80.000.000 litara mlijeka u sir godišnje. Ako računamo po 3 dkg sirišta na 1.000 litara mlijeka, dobiti ćemo godišnju upotrebu od 2.400 kg sirišta.

Odlučimo li se za upotrebu mikrobiološkog sirišta, postavlja se pitanje da li je bolje uvoziti srazmjerno skupe encimske preparate, ili tražiti puteve za domaću proizvodnju sirila mikrobiološkog izvora.

Razvoj ideje o upotrebi proteolitičnih enzima mikrobiološkog izvora kao zamjene za sirište iz telećih želudaca

U vrijeme, kada se počelo intenzivno razmišljati o zamjenama za sirište iz telećih želudaca, proizvodnja antibiotika je već usmjerila razvoj moderne biotehnologije, to jest industrijske proizvodnje određenog proizvoda, pomoću mikroorganizama. Zato je razumljivo, da su se naučnici u svom traženju zamjena za klasično sirište, osvrnuli i na mikroorganizme za koje je već tada bilo znano, da su nepresušan izvor najrazličitijih proizvoda: kiselina, encima itd. Nije slučajno ni to, da su među prvima započeli istraživanja na tom području baš Japanci, kada se zna da su imali u razvoju tehnoloških postupaka sa gljivicama, već dugu tradiciju i iskustvo. Prvi, industrijski proizvedeni i praktično upotrebljen encim »takadiastaza« produkt gljive *ASPERGILLUS ORYZAE* pojavila se na zapadnom tržištu već 1896. godine (10). Šezdesetih godina japanski mikrobiolog *Arima* sa svojim suradnicima istražuje 381 vrstu bakterija i 540 vrsta gljivica sa ciljem proizvodnje adekvatne zamjene za sirište iz telećih želudaca (11). Od svih testiranih mikroorganizama, proteolitični encim gljive *MUCOR PUSILLUS* je najbliži po svojim osobinama sirištu iz telećih želudaca. Zanimljivo je da je Danska firma »NOVO«, koja je danas najveći proizvođač enzima za industrijsku upotrebu i koja proizvodi sirilo mikrobiološkog izvora, prošle godine ustanovila tzv. biotehnološku nagradu u visini 150.000 danskih kruna. Ta nagrada bi se svake treće godine dodijelila za izvanredne zasluge na području biotehnologije. Prvu nagradu je dobio baš prof. *Arima* zbog svojih velikih uspjeha na području mikrobiologije i industrijske encimologije (12).

Drugi naučenjaci su u približno isto vrijeme, ispitivali druge vrste gljivica. Među njima su, zbog osobina enzima koje proizvode, dobile praktičnu primjenu samo tri. Pored već navedene gljivice *MUCOR PUSILLUS*, još *ENDOTHIA PARASITICA* i *MUCOR MIEHEI*.

Gljivicu *ENDOTHIA PARASITICA* su istraživali najviše Amerikanci tako da ju je firma *PFIZER* patentirala već 1967. godine za komercijalnu proizvodnju sirila mikrobiološkog izvora (13).

Zadnji se pojavio na tržištu sirišni encim iz gljivice *MUCOR MIEHEI*, iako su Danci već 1965. počeli testiranje termofilnih mikroorganizama, koji razgrađuju kompost, da bi našli odgovarajuće mikroorganizme za proizvodnju *z a m j e n a* za sirište iz telećih želudaca (14).

Napomenuti moramo, da je u to vrijeme bilo napravljeno dosta pokusa i sa bakterijskim proteolitičnim encimima. O bakterijskom encimu, koji ima slične osobine sa telećim sirištem, mogu se naći podaci koji datiraju s početka ovoga vijeka. Ma da, moramo naglasiti, tada još nisu mislili na upotrebu tih enzima u sirarstvu.

Englezi su u toku rata (1944.) patentirali postupak za proizvodnju sira pomoću sirišnih preparata iz različitih vrsta roda *BACILLUS-a*. Kasnije su neke bakterijske encime ispitivali i u sirarstvu. Ispitivali su, najviše, encime

dobivene bakterijama *BACILLUS CEREUS*, *B. MESENTERICUS*, *B. POLYMYXA* i *B. SUBTILIS*. Ali do danas niti jedan od tih enzima nije ispunio očekivanja kao zamjena za teleće sirište. Još uvijek su u toku istraživanja bakterijskih enzima, ali izgleda da su ti encimi proteolitički prejaki, kao i da tehnike njihovog dobivanja nisu do kraja usavršene.

Ako se još jednom vratimo na tri glavne skupine enzima iz gore navedenih gljivica, koje se danas upotrebljavaju u sirarstvu, treba reći da su encimi bjelančevine manje ili više znane strukture i sastava, za koje važe svi fizikalni i kemijski zakoni kao i za ostale bjelančevine u prirodi.

Encim iz gljive *ENDOTHIA PARASITICA* je bio izoliran u kristalnom obliku odmah poslije otkrića (13). To je termolabilna kisela proteaza koja je manje osjetljiva na pH substrat od telećeg sirišta i manje osjetljiva na koncentraciju Ca iona u mlijeku.

Skoro istovremeno sa dobivanjem *ENDOTHIA* enzima, izolirali su u kristalnom obliku i encim iz plijesni *M. PUSILLUS* (16). Ovaj encim je isto kisela proteaza, ali nešto termostabilniji od telećih sirišta. Prisutnost Ca iona u mlijeku izrazitije utječe na ovaj encim nego na teleće sirište.

Kisela proteaza je i encim iz gljive *M. MIEHEI*, ali po kemijskom sastavu-glukoprotein (17). Neke osobine sirila dobivenih iz gljivica, prikazane su u tablici 3.

Tablica 3.: Neke osobine glavnih tipova sirila dobivenih iz gljivica (15)

Table 3.: Some characteristics of the main types of fungal rennets

Gljivica:	pH	izoel. točka:	molska masa
<i>ENDOTHIA PARASITICA</i>	4,0—5,5	4,6	34.000—39.000
<i>MUCOR PUSILLUS</i>	4,0—6,0	3,5—3,8	29.000—30.600
<i>MUCOR MIEHEI</i>	4,5	4,2	38.000—41.800

Za sve encimske preparate mikrobiološkog izvora, napravljen je veliki broj biokemijskih testova, poznat je i raspored i aminokiselina u njima, a opisani su i brojni ogledi upotrebljivosti tih enzima za industrijsku proizvodnju najrazličitijih tipova sira. Razumljivo je, da je prvi uslov za upotrebljivost enzima mikrobiološkog izvora potvrda, da gljivica ne proizvodi toksine ili druge po zdravlje opasne supstance.

Biotehnološki postupci za proizvodnju enzima mikrobiološkog izvora

U svjetskoj literaturi nalazimo srazmjerno malo podataka o proizvodnji enzima mikrobiološkog izvora za potrebe sirarstva. U pojedinim člancima dati su tek širi podaci, iz kojih je moguće samo posredno ući u pojedinosti problema.

Postupak za proizvodnju enzima mikrobiološkog izvora označujemo kao biotehnološki. To znači, da gajimo određeni mikroorganizam na odgovarajućem supstratu pod povoljnim uslovima. To gajenje može biti na površini supstrata (površinsko) ili u samom supstratu (submerzno). Submerzno gajimo mikroorganizme u tekućem supstratu u posebnim bioreaktorima ili fermentorima, uz stalno miješanje i provjetranje. Po završenom postupku potrebno je mikroorganizam odvojiti od supstrata i iz njega, različitim metodama izolacije.

dobiti encim. U biotehnološkoj proizvodnji encima za sirarstvo, upotrebljavaju se kao supstrati pretežno škrobne sirovine (pšenične mekinje, kukuruzni škrob, kukuruzno ili sojino brašno) sa dodatkom određenih soli, ili sirutka. Temperatura je skoro uvijek relativno visoka (do 35°C). U početku fermentacije je pH oko 5, a vrijeme fermentacije je do 5 dana (18, 19). Neki podaci sakupljeni su u tabeli 2.

Tabela 4: Nekoliko podataka o proizvodnji glavnih tipova sirila mikrobiološkog izvora
Table 4: Some production data of main types of microbial rennets

Gljiva:	Način gajenja:	Substrat:	AUTOR:
<i>M. PUSILLUS</i>	površinski	pšenične mekinje	Arima et al., 1967 (11)
<i>M. PUSILLUS</i>	submerzno	pšenične mekinje	Somkući et al., 1967 (18)
<i>E. PARASITICA</i> ?		?	Sardina, 1969 (13)
<i>M. MIEHEI</i>	submerzno	kukuruzni škrob, sojino brašno, amilaza	Charles et al., 1970 (21)
<i>M. RENNINUS</i>	submerzno	kukuruzni škrob, kazein, soli	Belyauskaite et al., 1980 (21)

Po završenom fermentacijskom postupku gljivicu ofiltriraju i iz filtrata izoliraju encim taloženjem ili ekstrakcijom. Ogledi pokazuju, da je količina dobivenog encima, kao i njegova aktivnost, veća kod submerznog uzgoja nego kod površinskog (19).

Opisanim metodama talože se različiti encimi od kojih neki, pored sposobnosti sirenja mlijeka, imaju i proteolitičnu, lipolitičnu, ili neku drugu encimsku aktivnost, koja negativno utječe pri proizvodnji ili zrenju sira. Naročito negativno na kvalitet sireva utječe proteolitična i lipolitična sposobnost encimskog preparata.

Što se tiče mogućnosti pojave toksičnosti sirila mikrobiološkog izvora, koji se upotrebljavaju u sirarstvu, sakupljeni su u tablici 5.

Tabela 5: Nekoliko encimskih preparata mikrobiološkog izvora koji se upotrebljavaju u sirarstvu

Table 5: Some microbial enzyme preparations used in cheese production

Trgovačko ime:	Proizvođač:	Izvor:
MEITO	Meito Sagyo, Japan	<i>MUCOR PUSILLUS</i>
NOUSY RENNENT	Meito Sagyo, Japan	<i>M. PUSILLUS</i>
EMPORASE	Dairyland Food Lab., U.S.A.	<i>M. PUSILLUS</i>
SURE CURD	Pfizer Ltd., U.S.A.	<i>ENDOTHIA PARASITICA</i>
SUPAREN	Pfizer Ltd., U.S.A.	<i>E. PARASITICA</i>
FROMASE	Wallerstein Co., U.S.A. (Rapidase, France)	<i>MUCOR MIEHEI</i>
MARZYME	Miles Lab., U.S.A.	<i>M. MIEHEI</i>
RENNILASE	Novo Ind., Denmark	<i>M. MIEHEI</i>

Postojanje velikog broja encimskih preparata mikrobiološkog izvora, koji zamjenjuju sirište iz telećih želudaca, nikako ne znači da je dalji razvoj znana na tom području nepotreban. Naprotiv, u toku su brojna istraživanja, kako na području proizvodnje raznih vrsta sireva encimima mikrobiološkog izvora, tako i na području biotehnološke proizvodnje tih enzima. Na tom području su moguća dva razvojna smjera: biokemijske modifikacije enzima uz upotrebu kemijskih i fizikalnih sredstava, ili, druga mogućnost, genetske promjene sojeva za proizvodnju, odnosno fiziološke manipulacije u toku same fermentacije.

Na prijedlog naše mljekarske industrije Kemijski institut »BORIS KIDRIČ« u Ljubljani je započeo sa ispitivanjima biotehnološke proizvodnje enzima mikrobiološkog izvora za sirarstvo.

Rezultati uvodnih laboratorijskih istraživanja proizvodnje sirila mikrobiološkog izvora na kemijskom institutu »Boris Kidrič«

Istraživanja sa područja biotehnologije započinju traženjem odgovarajućih mikrobnih sojeva i testiranjem tih sojeva za dobivanje određenih produkata. Za naša istraživanja izolirali smo i nabavili različite gljivice iz roda *MUCOR*. Sojevi sa oznakom institutske kolekcije (B 153, B 154, B 155, B 156, B 157, B 160, B 162) su izolirani iz različitih izvora (mlijeko, jogurt, rajčica itd.), tri soja smo nabavili. Nabavili smo *MUCOR PUSILLUS* (B 162) i *MUCER MEIHEI Rhizomucor MEIHEI* — B 163) u Vsesovjetskoj mikrobiološkoj kolekciji u Moskvi, a *MUCOR PUSILLUS* (B 168) u Americi (iz zbirke NRRL, Peoria).

Sve navedene sojeve smo ispitali u fermentacijskom testu.

Gljivice smo gajili u submerznoj kulturi na tresilici i na temperaturi od 35°C. Supstrat je bio sastavljen iz mlijeka i glukoze (pH = 5). U toku fermentacije pratili smo rast gljivica pod mikroskopom, promjene pH, težinu suhog micelija i vrijeme koagulacije mlijeka (22). Na osnovu dobivenih rezultata, izabrali smo 4 gljivice i to B 155, B 162, B 163 i B 168. Te gljivice smo ponovo ispitali na supstratu iz pšeničnih mekinja, glukoze i obranog mlijeka. Ostali su uslovi bili isti kao i kod prvog oglada.

Utvdili smo, da pH u supstratu, kod većine testiranih sojeva prvo malo pada, a kasnije do kraja oglada raste. Sve testirane gljivice su u supstratu dobro rasle, a najbolje sojevi B 163 i B 168. Vrijeme potrebno za usirenje mlijeka je prikazano u tablici 6.

Tabela 6: Vrijeme sirenja mlijeka (u min.) u toku fermentacije različitim gljivicama
Table 6: Milk clotting times (in min.) during fermentation with different fungi

Gljivica	dani fermentacije			
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan
B 155	4	7	38	nad 40*
B 162	29	30	nad 40	28
B 163	4	2	2	1
B 168	28	19	25	5

* Vrijeme sirenja mlijeka smo mjerili svake minute prvih 40 minuta

Iz tablice 6 je vidljivo, da gljivice B 155 i B 163 imaju najkraća koagulacijska vremena; i to gljivica B 155 do četvrtog dana fermentacije, a kod gljivica B 163 su vremena koagulacije sve kraća do kraja oglada. Četvrtog i šestog

dana fermentacije, mjerili smo proteolitičnu (22), aminolitičnu (23), celulolitičnu (24) aktivnost filtrata i ustanovili da je aminolitična aktivnost niska. Proteolitičnu aktivnost smo mjerili samo šestog dana fermentacije i bila je relativno niska.

Fermentaciju smo ponovili i na nižoj temperaturi (30°C) i to sa gljivicom *M. Pusillus* soj B 162 i B 168, koja važi za mezofilnu. Pokazalo se, da gljivica B 162 daje bolje rezultate kod temperature 35°C, a B 168 daje slične rezultate i na 30°C.

Iz rezultata uvodnog istraživanja možemo zaključiti, da su izabrane gljivice za daljnji rad dovoljno aktivne. Ispitivanja se moraju nastaviti u cilju optimizacije uslova fermentacije, kako u tresenim kulturama, tako i u fermentatoru. Isto tako treba usavršiti metode za dokazivanje različitih encimskih aktivnosti, posebno lipolitične aktivnosti.

Summary

The aim of the present article is to present new knowledge of the biochemical processes during cheese manufacture as well as to give an insight into enzyme changes taking place during decomposition of milk proteins. Experimental results and variations of the technological procedure using microbial rennets in two cheese manufacturing plants of »Ljubljanske mlekarne« are shown.

A short review of the development of the microbial rennet production in the world is given. Briefly results of fermentation of microbial milk clotting enzymes in the laboratory of »Boris Kidrič« Institute of Chemistry are mentioned.

Literatura

- CHARLES ALAIS: »SCIENCE DU LAIT« principes des techniques laitières
O. FLÜELER: »LAB-UND SÄUEREGGERINNUNG DER MILCH« — **Deutsche Molkerie Zeitung** — 35/1982.
P. J. de KONING: »COAGULATING ENZYMES IN CHEESE MAKING« Dairy industries international— july 1978.
ŠIPKA i sur.: »UPOTREBA MIKROBNOG SIRILA — RENILAZA U PROIZVODNJI TRAPISTA, KAČKAVALJA I BELOG SIRA U KRIŠKAMA« »**Mljekarstvo**« 1/1973.
J. LENOIR: »PRINCIPES DE TECHNOLOGIE FROMAGÈRE«
J. LENOIR: »BIOCHIMIE ET PHYSICO — CHIMIE DU LAIT«
P. F. FOX: »EGZOGENE PROTEINAZE U MLJEKARSKOJ TEHNOLOGIJI« »**Mljekarstvo** 12/1980. — Članak priređen po D. Baković
TATJANA SLANOVEC: »SIRARSTVO«
NOVO — RENILASE: »ENZYME ZUR KÄSEHERSTELLUNG« prospekti firme NOVO
J. E. SMITH in J. A. PATEMAN: Genetics and Physiology of Aspergillus, Academic Press, London, 1977.
K. ARIMA et al.: Milk Clotting Enzyme from Microorganisms. Agr. Biol. Chem., 31, 5, 540, 1967.
Chemische Industrie, 35, 5, 241, 1983.
J. L. SARDINAS: New Sources of Rennet, Process Biochemistry 7, 13, 1969.
J. PRINS in T. K. NIELSEN: Microbial Rennet. Process Biochemistry, 5, 34, 1970.
J. L. SARDINAS: Calf Rennet Substitutes. Process Biochemistry 5, 10, 1976.
S. IWASAKI: Milk Clotting Enzyme from Microorganisms. Agr. Biol. Chem., 31, 5, 546, 1967.

- M. OTTESEN in W. RICKERT: *Methods in Enzymology*, Academic Press London, 1970.
- G. A. SOMKUTI in F. J. BABEL: Purification and Properties of *Mucor pusillus* Acid Protease. *Jour. Bacteriol.*, 95, 4, 1407, 1968.
- K. POSZAR-HAJNAL et al.: Investigation into the Production of Milk Clotting Enzyme Preparations. *Acta Alimentaria*, 3, 1, 83, 1974.
- R. L. CHARLES: Microbial Milk Clotting Enzyme. *Ger. Offen.* 1, 945, 447, 1970.
- I. P. BELYAUSKAITE et al.: Purification and some Properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 2, 1, 37, 1980.
- J YU et al.: Milk Clotting Enzymes from Microorganisms. *Biochem. et Biophys.*, 171, 138, 1969.
- M. LEISOLA et al.: Measurements of alfa amylase and glucoamylase activities produces during fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 121, 1980.
- Z. JURIĆ et al.: Optimalni parametri hidrolize karboskimetilceluloze pomoću celolitičkih enzima plijesni. *Mikrobiologija*.