

## Sredstva za koagulaciju proizvedena fermentacijom i njihovo korištenje u proizvodnji sira\*

C. Repelius

Stručni rad - Professional paper

UDK: 637.352/4

### Sažetak

*Vrlo važan korak u proizvodnji sira je koagulacija mlijeka. Proces koagulacije započinje dodatkom koagulanata u mlijeko za proizvodnju sira. Vodeća svjetska firma u proizvodnji fermentacijom dobivenih koagulanata nudi široku paletu sredstava za koagulaciju: teleće sirilo (Delvoren®), mikrobnno sirilo (Fromase®) i 100%-tni himozin proizvod koji nosi trgovačko ime Maxiren®.*

*Zbog stalnog rasta svjetske proizvodnje sira potrebna količina telećeg sirila postala je nedostatna, te se potreba za alternativnim sredstvima za koagulaciju nametnula početkom 60-ih godina. Od toga vremena predložena su mnoga alternativna sirila, ali su samo neka ocijenjena povoljnima u proizvodnji kvalitetnih sireva. Mikrobnna sirila, kao što je Fromase®, enzimi su slični kimozinu i pripadaju istoj grupi proteaza (kisele proteinaze ili aspartat proteinaze); čak su i sekvence aminokiselina, kao i tercijarna struktura, vrlo slični onima kod kimozina. Usprkos sličnostima u strukturi, mikrobnna sirila pokazuju prilično različita svojstva ukoliko se upotrijebe za pripremu sira, što je posljedica stupnja proteolitičke aktivnosti u proizvodu. U ovom slučaju je važno da mikrobnno sirilo posjeduje nisku nespecifičnu proteolitičku aktivnost. Proizvodi dobiveni iz *Rhizomucor miehei* (Fromase®) imaju svojstva vrlo slična kvalitetnom animalnom sirilu, zbog čega su više traženi na tržištu u usporedbi s drugim mikrobnim sirilima.*

*Zahvaljujući poboljšanjima u tehnologiji fermentacije uklonjeni su nekad prisutni nedostaci mikrobnih koagulanata. Visokokvalitetno teleće sirilo (80-90% kimozina) predstavlja kontrolni proizvod prema kojemu se uspoređuju alternativni koagulantni. Današnja biotehnološka dostignuća otvorila su nove puteve u proizvodnji čistog kimozina procesom fermentacije. Kloniranjem, kimozin gena u organizam *Kluyveromyces lactis*, može proizvesti enzim u neograničenim količinama. Taj 100% kimozin, poznat pod zaštićenim imenom Maxiren®, pokazao se kao optimalni koagulant sa sljedećim prednostima:*

- *optimalno stvaranje arome u sirevima sa zrenjem*
- *poboljšanje čvrstoće gruš*
- *manja osjetljivost na pH vrijednosti mlijeka za proizvodnju sira*

\* Rad je izložen na 33. hrvatskom simpoziju mljekarskih stručnjaka, Lovran, 11.-13. studenoga, 1998.

- manja količina dodatka sirila
- moguća neograničena opskrba Maxirenom.

*Ključne riječi: kimozin, Kluyveromyces lactis, ementalac, Maxiren.*

### Uvod

Uspješna koagulacija mlijeka važan je dio procesa proizvodnje sira. Proces koagulacije započinje dodavanjem sredstva za koagulaciju mlijeku pripremljenom za proizvodnju sira. Teleće sirilo, koje se tradicionalno koristi za koagulaciju, ekstrakt je telećeg želuca teladi koja sisa, a najvažnija aktivna tvar telećeg sirila je specifična proteaza - kimozin.

Kimozin cijepa vezu u kapa-kazeinu između 105-te i 106-te aminokiseline (fenilalaninmetionin). Zbog cijepanja te veze kazein gubi svoje svojstvo zaštite stabilnosti kazeinskog kompleksa s obzirom na djelovanje Ca-iona. Posljedica toga je koagulacija-precipitacija.

Kako svjetska proizvodnja sira raste, nedostatna je potrebna količina telećeg sirila pa je već u ranim 60-tim godinama očita potreba alternativnih sredstava za koagulaciju.

Predložena su mnoga alternativna sirila, ali samo su neka povoljna za proizvodnju kvalitetnog sira. Od predloženih alternativnih sirila najvažnija su mikroba sirila proizvedena iz *Rhizomucor miehei* (FROMASE) i sirilo iz *Mucor pusillus* te *Endothia parasitica* (SUPAREN). To su "chymosin like" enzimi koji pripadaju istoj skupini proteaza (kisele proteinaze) ili (aspartat proteaze) koje su vrlo slične kimozinu.

### Svojstva mikrobnih proteaza

Iako su enzimi dobiveni iz mikroorganizama po svojoj strukturi vrlo slični, pokazuju različita svojstva u proizvodnji sira. Te se razlike očituju u nespecifičnosti proteolitičke aktivnosti u proizvodu - siru.

Primarna ili specifična aktivnost sredstva za koagulaciju je njegova aktivnost na vezi između 105-te i 106-te aminokiseline u kapa-kazeinu. Nespecifična proteolitička aktivnost uglavnom je općenita proteolitička aktivnost na kazein.

Međutim, znatna nespecifična proteolitička aktivnost može uzrokovati gorak okus kao i manji randman sira. Zbog toga je važno da je nespecifična aktivnost mikrobnog sirila što niža ili da je enzim termolabilan, jer se djelomice ili potpuno uništi tijekom procesa proizvodnje sira.

Tako je npr. proteaza iz *Endothia parasitica* (SUPAREN) vrlo jaki proteolit, ali je istovremeno i vrlo termostabilna. Taj se enzim stoga može koristiti za proizvodnju sireva pri visokim temperaturama, kao što je to pri proizvodnji ementalca. U procesu proizvodnje ementalca enzim se uništava tijekom dogrijavanja pa ne može biti uzrok gorčine sira, kao što je to moguće u proizvodnji

goude ili edamskog sira. U proizvodnji goude ili edamskog sira, nakon obrade gruša zaostane previše aktivnog enzima koji je uzrok gorčine sira.

Proizvodi (enzimi) dobiveni iz porodice *Rhizomucor* imaju znatno nižu proteolitičku aktivnost, iako i enzim proizveden iz *Rhizomucor pusillus* pokazuje previsoku aktivnost u tom pogledu.

Noviji proizvodi dobiveni iz *Rhizomucor miehei* (FROMASE) imaju svojstva slična svojstvima kvalitetnog animalnog sirila, zbog čega su osvojili daleko veće tržište u odnosu na druga mikrobnna sirila. Nepoželjna svojstva mikrobnih sirila uklonjena su neprekidnim radom na poboljšanju proizvoda tijekom godina. Najvažnija promjena je smanjenje njihove termostabilnosti. Enzimi, proizvedeni prije poboljšanja njihove kvalitete, bili su vrlo termostabilni, pa nije bilo moguće inaktivirati enzime u sirutci jednostavnom pasterizacijom.

Međutim, stupanj termostabilnosti moguće je precizno odrediti tijekom proizvodnog procesa enzima. Tako se, koristeći novu tehnologiju, FROMASE može proizvesti u više različitih stupnjeva termostabilnosti (L, TL, XL).

Tip L (FROMASE) nije termolabilan pa se predlaže za proizvodnju sireva koji imaju kratko vrijeme zrenja i u procesu proizvodnje nema daljnje obrade sirutke. FROMASE TL je proizvod koji se preporuča za sve vrste sira kod kojih se sirutka koristi za daljnju preradu.

FROMASE XL preporuča se za sireve dugog zrenja, kod kojih se sirutka koristi za daljnju preradu pa treba biti zadane kvalitete.

Aktivnost FROMASE TL moguće je u sirutki inaktivirati pasterizacijom, a FROMASE XL je termolabilnija od telećeg sirila, pa se zbog toga djelomično i inaktivira tijekom procesa proizvodnje sira.

Međutim, moderna je tehnologija otkrila nove mogućnosti proizvodnje čistog kimozina - primjenom procesa fermentacije. Tehnologija obuhvaća genetsku obradu mikroorganizma koji zatim proizvodi enzim u neograničenim količinama.

### ***Razvojni put do proizvoda - kimozina***

Mnogo je mogućih organizama-domaćina koji se koriste u proizvodnji kimozina fermentacijom. Iako svaki organizam ima prednosti i nedostatke. Za proizvodnju Maxirena, Gist-brocades je odabrao za organizam-domaćina kvasac, koji se vrlo često koristi u mljekarskoj proizvodnji, *Kluyveromyces* (*Saccharomyces*) *lactis*, a proizvod koji se dobije je B-varijanta kimozina.

Organizam - domaćin je vrlo pažljivo odabran:

Organizam domaćin *Kluyveromyces lactis*

- nije patogen
- nije toksičan
- ima ga u hrani
- ima GRAS status

- dostupan kao industrijski soj koji sadržava laktazu
- patentiran je
- osnovna r-DNA tehnički je dostupna.

Izbor organizma - domaćina bio je samo jedan od zadataka koji su se trebali izvršiti tijekom razvojnog puta MAXIRENA.

Iako je teleće sirilo dugo poznato, tek nedavno su otkrivene njegove prednosti u praktičnoj primjeni čistog kimozina, t.j. najvažnijeg enzima u animalnom sirilu.

Na 14-tom Inter. Dairy Congr. u Rimu 1956. Berridge je opisao eksperimente s kristalnim "versus" neobrađenim sirilom u proizvodnji sira. Sirilo je bilo pripremljeno iz neprerađenog ekstrakta telećeg želuca. Na žalost, zaključci istraživanja nisu bili naročito zapaženi, jer su i kontrolni sirevi bili loše kvalitete. Od toga vremena nisu objavljivana istraživanja o korištenju čistog kimozina u proizvodnji sira, sve do pojave tehnologije s r-DNA. 1985. godine firma Gist-brocades (prije početka vrlo skupog programa za istraživanje mogućnosti proizvodnje čistog kimozina) željela je biti sigurna da će primjenom čistog kimozina u proizvodnji sira dobiti podjednako kvalitetan sir kao i korištenjem tradicionalnog telećeg sirila dobre kvalitete.

Holandski mljekarski institut NIZO dobio je zadatak da istraži proizvodnju Goude korištenjem čistog kimozina proizvedenog iz telećeg želuca, a također i korištenjem komercijalnog telećeg sirila.

Istraživanja su rađena u velikom broju ponavljanja proizvodnje i zrenja sira preko godinu dana (Berg i Koning, 1990.).

Svaki dio procesa proizvodnje sira i svaki dio procesa zrenja uključujući i vrlo detaljno istraživanje razlaganja proteina, te organoleptička procjenjivanja sira, bili su obuhvaćeni.

*Zaključak istraživanja:* korištenjem čistog (kristalnog) kimozina može se proizvesti gouda iste kvalitete kao i korištenjem tradicionalnog telećeg sirila dobre kvalitete.

Oslanjajući se na dobivene rezultate Gist-brocades je pripremio vrlo ambiciozan program za razvoj proizvodnje kvalitetnog 100% kimozina pomoću fermentacije.

Pošto su prvi uzorci kimozina proizvedeni, započeli su mnogobrojni eksperimenti proizvodnje različitih vrsta sireva u poznatim mljekarskim institutima i sveučilištima svijeta.

U sljedećoj tablici dat je pregled svih istraživača koji su publicirali rezultate istraživanja korištenja MAXIRENA u proizvodnji sira. Neki istraživači nisu još publicirali svoje radove.

Tablica 1: Istraživanja primjene Maxirena i telećeg sirila  
 Table 1: Application of Maxiren and calfrennet

Zemlja Country	Institut Institute	Vrsta sira Type of chees	Reference Reference
Francuska	Institute Technique du Gruyere La Roche sur Foron	Ementaler	(2)
Njemačka	Milchforschungs- institut Kiel	Edamac Tilsit	(3)
Irska	University of Cork Cork	Čedar	(4)
Italija	Instituto Sperimentale Lattiero-Caseario Lodi	Mozzarella Crescenza Italico	(5)
Italija	Instituto Lattiero-Caseario e di Biotecnologie Agroal- imentari di Thiene Thiene	Montasio	(6)
Italija	Instituto di Mikrobiologica Universita Cattolica del Sacro Cuore Piacenza	Parmezan Reggiano Grana Padano	(7)
Holandija	NIZO Ede	Gouda	(8)
Engleska	AFRC Institute of Food Research Reading	Čedar	(9)
Amerika	University of Minnesota Minneapolis	Čedar	(10)
Španija	INIA Madrid	Burgos Hispaniko	(11)

Istraživanja su pokazala da se primjenom čistog kimozina dobije ista kvaliteta sira kao i primjenom tradicionalnog telećeg sirila. Rezultati su također potvrdili ranija istraživanja NIZO-a, t.j. da pepsin nije bitni sastojak sirila. Utvrđeno je da, u usporedbi sa sirilom koje sadržava pepsin, Maxiren ima brojne prednosti.

### *Prednosti Maxirena*

#### **1. Manja osjetljivost na pH vrijednosti mlijeka za proizvodnju**

Što je veća količina pepsina u sirilu to je sirilo osjetljivije na promjene pH. Goveđi se pepsin inaktivira pri pH vrijednostima mlijeka iznad 6,7 a pepsin

proizveden iz svinjskih želudaca pri pH 6,6. Jačina sirila mjeri se pri pH 6,5 (IDF REMCAT - metoda 157: 1992.).

To znači, ako se mlijeko siri pri toj vrijednosti pH, neće biti velikih razlika u potrebnoj količini sirila s različitim sadržajem pepsina jer sva sirila imaju deklariranu jačinu. Međutim, ako je pH vrijednost mlijeka za sirenje viša, kao što je u slučaju kada se za proizvodnju koristi sirovo mlijeko, jačina sirila opada mnogo brže što je sadržaj pepsina viši, pa će biti potrebno dodati veću količinu sirila.

## 2. Optimalno stvaranje arome u sirevima sa zrenjem

Čisti Maxiren vrlo učinkovito cijepa  $\alpha$ 1+2 i  $\beta$  frakciju kazeina, koje su vrlo važne kasnije, u procesu zrenja sira, jer služe kao substrat za proteinaze mljekarskih kultura koje se koriste u procesu proizvodnje. Korištene kulture mogu razlagati visokomolekularne peptide do topljivih peptida i aminokiselina. Razvoj arome u siru vrlo je složeni proces, a topljivi peptidi i aminokiseline imaju vrlo važnu ulogu u tome procesu, pa se stoga količina topljivih peptida i aminokiselina vrlo često mjere, a prati se njihova količina tijekom ukupnog procesa proizvodnje sira. Istraživanja, koja su napravljena u proizvodnji sira korištenjem sirila s visokim sadržajem kimozina u usporedbi sa pepsinom, pokazala su da je količina topljivog N u % u odnosu na ukupni N u zreлом siru manja ako je kao sredstvo za koagulaciju korišten pepsin. Količina aminokiselinskog N u % od ukupnog N također je niža (Raadsveld, 1964., Boudier, 1974.), što se vidi u sljedećoj tablici:

Tablica 2: Proteoliza proteina sira tijekom zrenja

Table 2: Proteolysis of chees proteins during ripening

	Topljivi N (u % od ukupnog N) Soluble N (in % of total N)				Amino N (u % od ukupnog N) Amino N (in % of total N)			
	6	12	18	29	6	12	18	29
Starost sira u tjednima/Chees maturity in weeks								
Teleće sirilo Calfrennet	269	332	354	400	43	50	65	96
Pepsin I	229	291	299	330	40	50	62	85
Teleće sirilo Calfrennet	237	301	341	387	39	45	70	87
Pepsin II	211	247	296	334	37	42	60	84
Pepsin III	187	250	298	328	35	44	65	85

Iz ovog razloga moguće je korištenje čistog kimozina promatrati kao optimalni dodatak u stvaranju arome sira.

### 3. Poboljšanje čvrstoće gruša

Uz navedene rezultate pokusa, koji su prethodno opisani, mnoga su istraživanja potvrdila da čisti kimozin (MAXIREN) ima sposobnost stvaranja čvršćeg koaguluma u usporedbi s koagulom koji se dobiva korištenjem telećeg sirila i/ili goveđeg pepsina.

Što je veća količina pepsina u sirilu to je i čvrstoća koaguluma manja. Koagulum dobiven korištenjem goveđeg pepsina znatno je mekši. Mc Mahon i Brown (1985.) publicirali su podatke o poboljšanju očvršćivanja i dobivanju zadovoljavajuće čvrstoće koaguluma korištenjem čistog kimozina. Razlog zbog kojega se dobiva mekaniji gruš korištenjem sirila koje sadržava pepsin, je u izraženijoj proteolitičkoj aktivnosti pepsina u odnosu na kimozin.

### 4. Optimalno iskorištenje

Zbog gubitka topljivih peptida, gubitka masti u sirutku i zbog gubitaka sitnih čestica gruša, manje je iskorištenje sira.

#### *Otapanje kazeina*

Enzimi koji imaju vrlo izraženu općenitu proteolitičku aktivnost uzrokuju gubitak topljivih peptida u sirutku. To je svojstveno enzimima proizvedenim iz bilja, a u manjoj mjeri i nekim mikrobnim enzimima, ali i pepsinu. Čisti kimozin je vrlo specifičan u djelovanju na kapa-kazein u kazeinskom kompleksu što sasvim umanjuje opasnost da se kazein otapa već u samom početku procesa proizvodnje sira.

#### *Gubitak masti i sitnih dijelova gruša*

Enzimi za koagulaciju razlikuju se po svom djelovanju u procesu formiranja gruša i u sinerezi. Proces formiranja gruša je dobar kada je oblikovanje trodimenzionalne strukture gruša optimalno, pa se u strukturu gruša mogu u potpunosti zatvoriti kapljice mliječne masti i pri siječenju gruša nema odvajanja sitnih djelića gruša (sirna prašina). Na gubitke masti i gruša utječe i način mehaničke obrade gruša (rezanje i miješanje), tip i način održavanja uređaja (oblik i dimenzija noževa). Oblikovanjem kvalitetnog gruša izostaju navedeni gubici. Mjerenje promjena iskorištenja pri korištenju različitih vrsta sirila nije jednostavno ni lagano. Emmons i Binns (1990.) i Barbano i Rasmussen (1992.) utvrdili su osnovnu razliku iskorištenja između različitih enzima za koagulaciju. Obje studije ukazale su na veće iskorištenje pri korištenju kimozina.

### 5. Manja količina dodanog sirila

Svojstva kimozina: manja osjetljivost na pH vrijednosti mlijeka i svojstvo da oblikuje čvršći koagulum, može smanjiti količinu dodatka sirila (kimozina). Industrijski pokusi su pokazali da se dodatak sirila može dosta umanjiti. Prosječno se količina dodatka može sniziti za 10-15%, a u nekim je slučajevima dodatak sirila smanjen i za 25%. To značajno utječe na sniženje cijene proizvodnje.

### 5a. Kosher status, Halal status i dozvola za korištenje u vegetarijanskoj prehrani

Kako MAXIREN nije suproizvod animalnog podrijetla može se smatrati Kosher i Parve proizvodom. Također mu pripada i Halal status, a dozvoljeno je koristiti ga i u vegetarijanskoj prehrani. To je vrlo važno zbog izvoza u zemlje koje imaju Kosher status, te za potrošače koji su se opredijelili za vegetarijanski način prehrane, a njihov broj je u stalnom porastu.

### 6. Mogućnost neograničene opskrbe MAXIRENOM

Maxiren se proizvodi u procesu fermentacije. Tijekom procesa fermentacije prokimozin se proizvodi razvojem mliječnog kvasca *Kluyveromyces lactis*. Ekstrakt telećeg želuca također sadržava prokimozin. Od toga mjesta proizvodnje t.j. od prokimozina, tijekom proizvodnje MAXIRENA i telećeg sirila potpuno su isti. Ekstrakt ili fermentirana tekućina obrađuju se kiselinom zbog aktiviranja prijelaza prokimozina u kimozin. Nakon toga tekućina se filtrira, dodaje se Na - benzoat i standardizira.

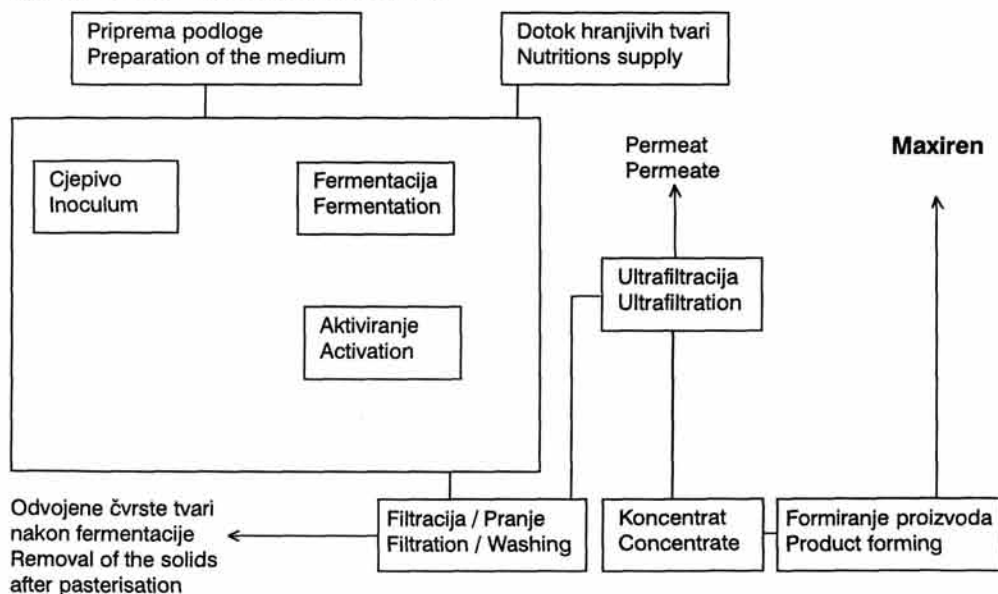
Proizvodnja Maxirena ne ovisi, dakle, o dostupnosti i količini telećih želudaca (iako njihova dostava može biti i osigurana) i o njihovoj visokoj cijeni.

### Proizvodnja MAXIRENA

Proces proizvodnje MAXIRENA prikazan je na sljedećoj slici

Slika 1: Proces proizvodnje Maxirena

Fig 1: Process of Maxiren production



Gist - brocades bv \_\_\_\_\_



Proces proizvodnje MAXIRENA slijedi upute Good Manufacturing Practices (GMP), a industrijski tijek fermentacije u suglasju je s GILSP-propisom OECD-a. Kimozin se proizvodi u posudama od nehrđajućeg čelika koje se steriliziraju parom, a za fermentaciju se koriste transformirani *K. lactis* soj. Podloga za fermentaciju sadržava sirovine koje po svojim karakteristikama pripadaju grupi proizvoda dozvoljenih za prehranu, dakle prehrambenim proizvodima. Mikrobna kontaminacija tijekom procesa fermentacije sprečava se korištenjem velikih količina inokuluma, pažljivom kontrolom uzgojnih uvjeta, pretlakom u fermentoru, kontrolom pjenjenja i pomoću steriliziranog zraka. Kada se postigne optimalna aktivnost kimozina, fermentacija se zaustavlja. Proizvod dobiven tijekom ovoga procesa je prekursor za proizvodnju finalnog proizvoda kimozina, a naziva se prokimozin. Nakon fermentacije prokimozin treba (isto kao i kod telećeg sirila) aktivirati u kimozin što se postiže dodatkom kiseline. Na kraju procesa proizvodnje potrebno je proizvod standardizirati i zaštititi. Zaštita proizvoda postiže se dodatkom soli i Na - benzoata.

### **Zaključak**

Rezultati primjene MAXIRENA u proizvodnji sira pokazali su da je MAXIREN bolji kao sirilo i od najkvalitetnijeg telećeg sirila. Može se proizvoditi u neograničenim količinama koristeći vrlo siguran i pouzdan proces fermentacije. Cijena proizvoda vrlo je povoljna i proizvod se može koristiti u više različitih jačina i oblika (tekuće, prah, tablete). Proizvod može zadovoljiti svaki od zahtjeva kvalitetnog sredstva za koagulaciju mlijeka u sirarstvu.

## **COAGULANTS PRODUCTION BY FERMENTATION AND THEIRS APPLICATION IN CHEESEMAKING PROCESS**

### **Summary**

*An important step in cheesemaking is the coagulation of the milk. This coagulation process is initiated by adding a coagulant to the cheesemilk. Gist Brocades, world leading company in fermentation derived coagulants, offers a broad range of coagulants: calffrennet (Delvoren®), microbial rennet (Fromase®) and the 100% chymosin product called Maxiren®.*

*Due to an increasing cheese production world-wide, calffrennet has become scarce and the need for alternative coagulants became already evident in the early sixties. Ever since, many alternative rennets have been proposed, but only a few were found to be suitable for the production of high quality cheese. The so called microbial rennets like Fromase® are the "chymosin-like" enzymes, which belong to the same class of proteases (acid proteinases or aspartate proteinases) and even the amino-acid sequence and tertiary structure have many similarities with chymosin.*

Despite these similarities in structure, these microbial rennets exhibit quite different properties when used in actual cheesemaking. These differences are due to the level of non-specific proteolytic activity in the product. It is therefore important that microbial rennet has a low non-specific proteolytic activity. The products from *Rhizomucor miehei* (Fromase®) are however very close to the properties of a good quality animal rennet and have therefore obtained by far the biggest marketshare of the microbial rennet products. It is because of the improvements in fermentation technology that earlier reported disadvantages of microbial coagulants have now been overcome.

A high quality calf rennet (80-90% chymosin) has however remained the reference rennet against which alternative coagulants will always be compared. Modern biotechnology has now opened ways to produce pure chymosin by way of fermentation. The chymosin gene is cloned into an organism (the dairy yeast: *Kluyveromyces lactis*) which can then produce the enzyme in unlimited quantities. This 100% chymosin, under the Gb-brand name Maxiren®, has proved itself as the optimal coagulant with the advantages of:

- optimal flavour development in mature cheeses
- improved gel-firming rate
- optimal yield
- less sensitivity to the pH of the cheesemilk
- reduced dosage rate
- inexhaustible supply

Key words: chymosin, *Kluyveromyces lactis*, Emmental, Maxiren.

### Literatura

- Andr n A. and Von Reedt C. (1990): Effects of chromatographically pure bovine chymosin and pepsin A on cheese curd firmness. *Journal of Dairy Research* 57, 109-117.
- Barbano D. M. and Rasmussen R. R. (1992): Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants *J. Dairy Sci* 75, 1-12.
- Berridge N. J. (1956): Crystalline "versus" crude rennet in cheesemaking, XV<sup>th</sup> International Dairy Congress, Rome, Vol. II, Part II, 59-66.
- Bines V. E., Young P. and Law B. A. (1989): Comparison of Cheddar cheese made with recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. of Dairy Research* 56, 657-664.
- Boudier J. F. (1974): Pr sure et succ dane e de pr sure APRIA Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles (C.D.I.U.P.A.) Serie syntheses bibliographiques no. 3.
- Chamba, J. F., Metais et Marie-Pascale Veber T. (1989): Utilisation de chymosine obtenue   partir de *Kluyveromyces lactis* g n tiquement transform e en fabrication d'Emmental. Process, No. 1039.
- Corradini C., Bottazzi V., Resmini P., Hogenboom J. A., Pazzaglia C., Lodi R., Carini S., Rampilli M. (1990): Caseificazioni a formaggio Grana con Chimosina da *Kluyveromyces lactis* (Maxiren) Il Latte Vol. XV.
- Disegna L., Tealdo E., Loddo A., Sculco G., Antonello F., Giaccon D., Fellin A. (1991): Impiego di chimosina B da *Kluyveromyces lactis* nella tecnologia indicativa del Montasio. Il Latte,

486-490.

- Emmons D. B. and Binns M. (1990): Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes *J. Dairy Sci.* 73, 2028-2043.
- Mc Mahon D. J. and Brown R. J. (1985): Effects of enzyme type on milk-coagulation *J. Dairy Sci.* 68, 628 -632.
- Morris H. A. and Anderson K. (1991): A comparative study of Cheddar cheeses made with fermentation produced calf chymosin from *Kluyveromyces lactis* and with calf rennet. *Cultured Dairy Products Journal*, Vol. 26, No. 2, 13-20.
- O'Sullivan M. and Fox P. F. (1991): Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnology*, 5 (1), 19-32.
- Prokopek D., Meisel H., Frister H., Krusch U., Reuter H., Schlimme E. und Teuber M. (1988): Herstellung von Edamer und Tilsiter Käse mit gentechnologisch aus *Kluyveromyces lactis* gewonnenem Rinder - Chymosin Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, Band 40 - Heft 1, 43-52.
- Raadsveld C. W. (1964): Over stremsel en pepsine (English summary) NIZO Nieuws 10° Serie-I.
- Rampilli M., Carini S., Resmini P., Saracchi S., Hogenboom J. A., Lodi R., Todesco R., Corradini C. (1990): Studio preliminare sulle caratteristiche di impiego di una bio-chimosina nelle produzione di formaggio molli I1 Latte Vol. XV.
- Van den Berg G. and de Koning P. J. (1990): Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and microbially produced chymosin. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 44, 189-205.

**Adresa autora - Author address:**

Dr. sc. C. Repelius  
Gist-brocades B.V.  
Netherlands

**Primljeno - Received: 16. 11. 1998.**  
**Prihvaćeno - Accepted: 22. 12. 1998.**