

## EGZOGENE PROTEINAZE U MLJEKARSKOJ TEHNOLOGIJI

P. F. Fox, Irska

Na Internacionalnom simpoziju u Portorožu od 29. 9. do 3. 10. 1980. održao je P. F. Fox iz Irske referat pod naslovom »Exogenous proteinases in dairy technology«. Zbog interesantnosti preveli smo ovaj rad i iznosimo ga u nešto skraćenom obliku.

### Sažetak

Glavna primjena proteinaza u mljekarskoj tehnologiji je u proizvodnji sira. Prikazana je prva enzimska te druga ne-enzimska faza koagulacije mlijeka sirilom. Ukratko su prodiskutirane mogućnosti zamjene telećeg siri-la, a u detalje razvoj imobilizirajućih sirila. Razmatrana je također mogućnost ubrzanja zrenja sira dodavanjem proteinaza.

Dat je pregled sporedne upotrebe proteinaza uključujući proizvodnju proteinskih hidrolizata, modifikaciju proteina i proizvodnju dječje hrane.

### Bjelančevine mlijeka

Kravlje mlijeko sadrži oko 3,5% belančevina od kojih je 80% kazein. Kazein je heterogena grupa od četiri glavnih fosfoproteina i fosfoglikoproteina:  $\alpha_{s1}$  oko 40%;  $\alpha_{s2}$  oko 10%;  $\beta$  oko 40%;  $\kappa$  oko 10%, koji imaju dosta visoku toplinsku stabilnost, ali su netopivi u njihovom izoelektričnom području (oko pH 4,6). Još postoje male količine  $\gamma$ -kazeina, proteoze — peptona i  $\lambda$ -kazeina koji dolazi od  $\alpha_{s1}$  — i  $\beta$ -kazeina proteolizom pomoću prirodnih proteinaza mlijeka nakon sekrecije. Ostalih 20% bjelančevina mlijeka je sirutkin protein ili nekazeinska dušična frakcija koja je toplinski labilna. Sastoji se od četiri glavna proteina:  $\beta$ -laktoglobulina oko 50%;  $\alpha$ -laktalbumina oko 20%; albumina krvnog seruma oko 10% i laktoglobulina oko 10% uz neke ostale proteine u manjim količinama.

Uz razlike između kazeina i sirutkinog proteina u stabilnosti kod pH 4,6 najznačajnija je razlika u zgrušavanju sirilom i njihovoj prirodnoj koloidalnoj formi.

Sirutkini proteini nalaze se u obliku monomera ili nižih oligomera dok kazein postoji kao micelle prosječne molekularne težine oko  $10^6$ , prosječnog promjera oko 100 nm i sadrži 500 do 1000 monomera. U miceli monomeri su povezani u prvom redu preko vodikovih i/ili hidrofилnih vezova. Tako oblikuju submicelle prosječne molekularne težine oko  $2 \times 10^6$  i prosječnog promjera 10—15 nm. Submicelle skupljaju se oblikujući micelle koje se drže skupa uglavnom ionima ili molekulama kalcija i fosfata preko gore spomenutih vezova. Ovaj koloidni kalcijev fosfat (KKF) predstavlja oko 6% suhe tvari micelle. Micelle su vrlo topive (oko 2 g  $H_2O/g$  bjelančevina) i termodinamički vrlo stabilne. Glavni stabilizirajući faktor je KKF i  $\kappa$ -kazein. Zakiseljavanjem odstranjuje se KKF i time se raspada micela i smanjuje stabilnost  $Ca^{2+}$ .

Iako je  $\kappa$ -kazein zastupljen u malom postotku on je glavni stabilizator micela.  $\kappa$ -kazein je amfolitskih svojstava i krajnja amino grupa je hidrofobna, a krajnji C segment, bogat ugljikohidratima i polarnim aminokiselinama, je jako hidrofilan. Vjerojatno je  $\kappa$ -kazein koncentriran na površini micela i sa svojim hidrofilnim dijelom izložen je okolnoj vodenoj sredini što osigurava stabilnost. Mnoge proteinaze odcjepljuju predio C-terminala  $\kappa$ -kazeina što ostatak micela čini nestabilnom i koagulira je u prisustvu  $\text{Ca}^{2+}$  na temperaturi iznad 20°C. Ovo je prva karakteristična faza u proizvodnji većine vrste sireva o čemu ćemo kasnije detaljnije govoriti.

Glavni pregledi i tekstovi o bjelančevinama mlijeka uključuju autore: McKenzie (1971), Lyster (1972), Swaisgood (1973), Farrall i Thompson (1974), Whitney i dr. (1976), Schmidt i Payens (1976), Slattery (1976), Davies i Holt (1979).

### Proteinaze u mljekarskoj tehnologiji

Bjelančevine u mlijeku, njihovo fizikalno stanje i opći uvjeti uvjetuju da proteinaze više nego bilo koja grupa enzima, možda izuzev lipaza, imaju glavnu ulogu u mljekarskoj tehnologiji. Proteinaze u mlijeku i mlječnim proizvodima dolaze iz tri potpuno različita izvora.

Prirodne proteinaze su sastojci tek pomuženog mlijeka što je posljedica modifikacije mlječnih proteina, a možda i postupaka nakon mužnje.

Endogene proteinaze su izlučene od mikroorganizama poslije sekrecije mlijeka ili pak u mlječnim proizvodima. Najvažnije su one izlučene od psihrotrofnih bakterija koje prouzrokuju kvarenje mlijeka i mlječnih proizvoda.

Zatim ovdje dolaze proteinaze izlučene od startera i drugih mikroorganizama kod zrenja sira, a koje su glavni faktor stvaranja manjih peptida, aminokiselina i preteče okusa.

Egzogene proteinaze su vanjskih izvora, a dodaju se mlijeku ili mlječnim proizvodima kako bi se proizvele specifične promjene. Ovaj prikaz se odnosi isključivo na korištenje egzogenih proteinaza u mljekarskoj tehnologiji.

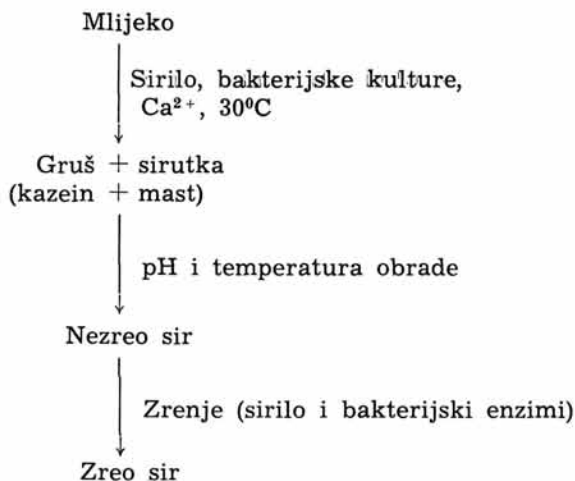
### Egzogene proteinaze

U mljekarskoj tehnologiji od egzogenih proteinaza glavnu upotrebu ima sirilo koje je ekonomski najvažnija grupa enzima koji se koriste u industriji hrane (Skinner, 1975). Treba dodati da su u toku neke manje primjene, a neke još veće mogućnosti su još u istraživačkom i razvojnom stadiju.

Sirilo bi se moglo definirati kao »sirov preparat bilo koje proteinaze prikladan za proizvodnju sira«.

Tradicionalno sirilo se uglavnom priprema ekstrakcijom želuca sisajuće teladi kuhinjskom soli. Janjeće ili jareće sirilo se također upotrebljava za zgrušavanje u nekim zemljama, ali ga nema u prodaji (Anifantakis i Green, 1980). Himozin je glavna proteinaza sirila dobivenog od vrlo mladih životinja, a udio pepsina raste kako životinje sazrijevaju.

Promjene u sistemu klanja mlade teladi i porast svjetske proizvodnje sira doveli su do manjka telećih sirišta i pokrenule aktivnost u traženju zamjene.



**Slika 1** Sažet prikaz suštine proizvodnje sira

Danas su četiri zamjene za klasično sirilo (goveđi pepsin, svinjski pepsin, kisele proteinaze od *Mucor meihei* i *M. pusillus*) u upotrebi s prihvatljivim rezultatima u određenim uvjetima (Welson, 1975; Green, 1977).

Svi enzimi koji se obično upotrebljavaju za zgrušavanja mlijeka pripadaju grupi kiselih proteinaza (Foltmann, 1978), te posjeduju u osnovi isti katalitički centar sa dva bitna aspartatska ostatka. U terciarnoj strukturi ova dva ostatka su skrivena u rascjepu koji može služiti kao mjesto vezanja peptida koji sadrže najmanje šest amino kiselina. Kemizam, struktura i funkcija kiselih proteinaza je vrlo dobro proučena i opisana (na pr. Hofmann, 1974, Tang, 1977). Literatura o himozinu prikazana je od Foltmanna (1966, 1971) o pepsinu (svinjskom) od Frutona (1971), a općenito o enzimima koji koaguliraju mlijeko pisali su Ernstom (1974) i Green (1977).

Napravljen je znatan napredak poznavanju primarne strukture glavnih enzima za koagulaciju mlijeka. Ustanovljen je potpun redosljed svinjskog pepsina (Harboe i Foltmann, 1975). Poznat je redosljed od prvih 65 ostataka goveđeg pepsina (Harboe i Foltmann, 1975) kao i neki dodatni kraći segmenti (Foltmann, 1978).

Ustanovljen je redosljed bitnih segmenata kiselih proteinaza *M. meihei* (Foltmann, 1978) što nije slučaj sa *M. pusillus*. Također je redosljed penicilin pepsina, koji se ne koristi za zgrušavanje mlijeka, riješen (Hsu i dr., 1977). Redosljedi ovih kiselih proteinaza pokazuju veliki stupanj homolognosti (Foltmann i Pedersen, 1977). Predložena je terciarna (prostorni položaj svih atoma) struktura svinjskog pepsina, telećeg himozina i proteinaze od *Endothia parasitica* (Tang, 1977).

#### Enzimatska koagulacija mlijeka

Koagulacija mlijeka sirilom odvija se u dvije različite faze: primarne enzimatske faze u kojoj se zaštitni  $\kappa$ -kazein hidrolizira gubeći kod toga svoju stabilizirajuću sposobnost i druge ne-enzimatske faze tokom koje se enzimom iz-

mijenjene micelle grupiraju i prelaze u gel stanje uz odgovarajuće uvjete. Treća faza mogla bi se smatrati onom kod koje se odvija glavna spora proteoliza kazeina tokom zrenja sira. Glavni pregled o tome uključuje radove Lindqwista (1963), Garniera i dr. (1968), Mackinlaya i Wake-a (1971) i Ernstroma (1974).

### Enzimatska faza

Linderstrom—Lang su prepostavili 1929. da koagulacija mlijeka sirilom sadrži enzimatsku hidrolizu zaštitnog koloida. Ovo je potkrijepljeno kada su Waugh i von Hippel (1956) pokazali da je  $\kappa$ -kazein primarni cilj djelovanja himozina što je potvrdio i Wake (1959). Zahvaljujući heterogenosti  $\kappa$ -kazeina u odnosu na ugljikohidrate (Mackinlay i Wake, 1965) heterogena smjesa peptida mlijeka ili  $\kappa$ -kazeina se cijepa (Alais, 1956, 1963).

Nakon mnogo neuspješnih pokušaja identificiranja je peptidna veza  $\kappa$ -kazeina hidroliziranog tokom enzimatske faze (Delfour i dr., 1965) i to između ostatka 105—106 fenilalanina i metionina. Ovo su potvrdili Alais i Jolles (1968). Ovaj period proučavanja koagulacije sirilom prikazan je od Mackinlaya i Wake-a (1971). Ostale kisele proteinaze koje se upotrebljavaju kao sirilo vjerovatno također cijepaju ovu vezu (Ernstrom, 1974; Green, 1977).

Hidroliza  $\kappa$ -kazeina između 105—106 ostatka stvara hidrofobni N-terminal peptid koji se smatra kao para- $\kappa$ -kazein, a predstavlja oko 2/3 molekule te hidrofилни »makropeptid« sa C-terminal dijelom koji sadrži najveći dio ugljikohidrata  $\kappa$ -kazeina. Reakcija može biti uobičajena s stvaranjem 2 ili 12% TCA — otopljenog dušika (Nitschmann i Bohren, 1955) ili što je specifičnije, otpuštanjem TCA — otopljene N-acetilneuraminske kiseline (Nitschmann, Wissmann i Henzi, 1957; de Koning, Jenness i Wijnand, 1963). Najosjetljiviji indikator djelovanja sirila na  $\kappa$ -kazein je njihov gubitak topivosti kod pH 5,2 i 5°C (Bingham, 1975). TCA je trikloroctena kiselina.

Optimum pH za enzimatsku fazu koagulacije sirilom je od 5,1 do 5,5 što ovisi o uvjetima reakcije (Humme, 1972). Enzimatska hidroliza  $\kappa$ -kazeina, iako na niskom stepenu, ide i do 0°C (Berridge, 1942). Optimalna temperatura hidrolize malih peptida nije određena, ali je to obično 30 ili 35°C.

Primarna faza djelovanja sirila na  $\kappa$ -kazein potaknuta je  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ , EDTA i ortofosfatima (Kato i sur., 1970), a inhibirana  $\alpha_s$  i  $\beta$ -kazeinom (Mikawa i sur., 1973). Zagrijavanje mlijeka produljuje primarnu i sekundarnu fazu koagulacije sirilom (Kannan i Jenness 1961; Morrissey, 1969), te ako je tehnička obrada intenzivnija spriječava se koagulacija.

Inhibicija prve faze povezana je interakcijom  $\kappa$ -kazeina i  $\beta$ -laktoglobulina (Sawyer, 1969; Shalabi i Wheelock, 1977) koja vjerovatno uzrokuje fizikalnu zaštitu osjetljive veze  $\kappa$ -kazeina denaturiranim  $\beta$ -laktoglobulinom.

Fenilalanin-metionin (phe-met) veza (105—106)  $\kappa$ -kazeina je nekoliko puta osjetljivija na proteolizu nego bilo koja druga veza u proteinskom sistemu mlijeka. Izgleda da je za osjetljivost ove veze važan susjedni serin i histidin, a zatim povećane duljine polipeptidnog lanca (Hill, 1968, 1969; Raymond i dr., 1972; Raymond i Brias, 1979). Hill (1968) smatra da su aktivna središta mnogih hidroliza seril i histidil ostaci pa su ovi, svojom katalitičkom ulogom, u  $\kappa$ -kazeinu smješteni u samom supstratu. Sirilo ima ulogu samo da izvrši takve promjene substrata koje su potrebne da aktiviraju ove ostatke.

Upotreba sintetskih peptida dala je ove praktične mogućnosti: (1) Definiciju jedinica himozina koja se normalno izražava mjernom aktivnošću zgrušavanja mlijeka. Radi različitosti supstrata poteškoće su u uspoređivanju aktivnosti sirila ne samo među laboratorijima nego i unutar jednog laboratorija. (2) Kvantitativno određivanje pojedinih enzima u komercijalnom sirilu, koje je obično smjesa proteinaza, bit će lakše ako se koriste sintetski peptidi.

### Druga faza koagulacije sirilom

Koagulacija sirilom izmijenjenih micela je ne-enzimatski proces. Gubitak hidrofilnog C-terminal segmenta  $\alpha$ -kazeina reducira micelarni zeta potencijal (Green i Crutchfield, 1971; Green, 1973; Pearce, 1976) i stvaraju se preduvjeti koagulacije sa  $\text{Ca}^{2+}$ ; interakcija micela s polivalentnim kationima također predodređuje koagulaciju micela (Green i Marshall, 1977). Proces koagulacije je apsolutno ovisan o  $\text{Ca}^{2+}$  i koloidnog kalcijevog fosfata (Pyne, 1953; Pyne i McGann, 1962). Koagulacija ne nastupa ispod  $18^{\circ}\text{C}$ . Ova velika ovisnost o temperaturi omogućuje da se prva i druga faza izoliraju za zasebna proučavanja, a također stvaraju osnovu većini pokušaja da riješe kontinuiranu proizvodnju sirnog gruš (Berridge, 1976).

Pyne (1955) tvrdi da pH nema bitnog utjecaja na stadij koagulacije, a Kowalchuk i Olson (1977) ukazuju na obrnuti odnos pH uz napomenu da koagulacija ovisi više o hidrofobnoj i elektrostatskoj interakciji. Koristeći imobilizirana sirila, smatrajući ih bez topivih enzima, Cheryan i dr., (1975) iznose da pH uglavnom utječe na sekundarnu fazu koagulacije sirilom, a manje na primarnu, enzimatiku, fazu. Dalje će biti razmatrano dali se tu radi o imobiliziranom ili slobodnom enzimu.

Koagulacija sirilom izmijenjenih micela može se uobičajno mjeriti viskozimetrom (Scott i dr., 1961; Green i dr., 1978); lomom svjetla (Payens, 1976, 1978; Dalgleish, 1979); elektronskim mikroskopom (Green i dr., 1978) i oscilirajućom deformacijom (Kowalchuk i Olson 1978) te termobelastografom (Tarodo i dr., 1969). Viskozitet i turbiditet ispočetka pada, ali ispod kritične faze oba se parametra naglo povećavaju s početkom skupljanja i želiranja. Proces stvaranja gela, kako je zapaženo elektronskim mikroskopom, opisali su Green i dr. (1978).

Odavno se smatralo da koagulacija sirilom izmijenjenih micela ne počinje dok nije enzimatika faza potpuno završena (Foltmann, 1959; Castle i Whelock, 1972) iako povećanjem temperature i smanjenjem pH druga faza počinje prije završetka prve faze. Koagulacija ne započinje dok enzimatika faza nije 86–88% završena (Green i dr. 1978; Dalgleish, 1979) i jedna pojedinačna micela neće sudjelovati u skupljanju dok njegovih 97%  $\alpha$ -kazeina ne bude hidrolizirano (Dalgleish, 1979).

Koagulacija sirilom izmijenjenih micela, izgleda, vrši se mehanizmom tipa von Smoluchowski (Payens i dr. 1977; Payens, 1977, 1979) i prosječno vrijeme koagulacije mlijeka sirilom je tako određeno s 3 faktora (Dalgleish, 1979):

1. stepen proteolize  $\alpha$ -kazeina Michaelis-Menten mehanizmom,
2. mogućnost da se kod pojedinačne micelle njezin  $\alpha$ -kazein pokrene te omogući skupljanje (agregiranje),
3. stepen von Smoluchowskog sakupljanja.

Prosječno vrijeme zgrušavanja,  $t_c$ , jednako je zbroju enzimatske i faze skupljanja (Dalgleish, 1980):

$$t_c = t_{\text{prot}} + t_{\text{agr}}$$

$$\sim \frac{K_m}{V_{\text{maks}}} \ln \left( \frac{1}{-1 - \alpha_c} \right) + \frac{\alpha_c}{V_{\text{maks}}} \times S_0 + \frac{1}{2 k_s C_0} \left( \frac{M_{\text{krit}}}{M_0} - 1 \right)$$

Gdje su:

$K_m$  i  $V_{\text{maks}}$  Michaelis — Mentenovi parametri,

$\alpha_c$  stupanj hidrolize  $\kappa$ -kazeina,  $S_0$  početak koncentracije  $\kappa$ -kazeina,  $k_s$  konstanta brzine za agregaciju,  $C_0$  koncentracija agregirajućeg materijala,  $M_{\text{krit}}$  masa prosječne mol. težine kod  $t_c$  (oko 10 micelarnih jedinica),  $M_0$  masa prosječne mol. težine kod  $t = 0$ .

Payens (1979) tvrdi da promatrana lag faza koagulacije sirilom izmjenjenih micela nije uzrokovana energetskim ograničenjem tipa Deryagin, Landan, Verwey, Oberbeek nego »steričkim faktorom« koji proizlazi iz broja neuspjelih kolizija izmijenjenih micela.

Payens smatra da se ovdje micelle mogu sakupljati samo sa određenom stranom površine i tako se ugrađuju u matriks gela.

Priroda je ovih strana, koje uzajamno djeluju, nepoznata, ali se neke indikacije mogu izvesti iz prilično ograničenih rezultata ispitivanja djelovanja kemijskih modifikacija kazeina na njegovo zgrušavanje sirilom.

Tradicionalno se držalo da postanak gela sirilom izmijenjenih micela dolazi preko  $\text{Ca}^{2+}$  djelovanja na unakrsno vezane micelle pomoću grupa organskih fosfata (McFarlane, 1938). Ipak, kazein enzimatski defosforiliziran 70% koagulira sirilom uz povećani  $[\text{Ca}^{2+}]$  što nameće misao da su za koagulaciju uključeni i dodatni faktori (Hsu i dr. 1958).

Fotooksidacija, gdje histidin ima prvu ulogu, inhibira koagulaciju sirilom (Zittle, 1965). Hill i Laing (1965) potvrđuju da oksidacija histidina inhibira prvu i drugu fazu dok modifikacija triptofana, metionina i vjerojatno tirozina ne djeluje ni na jednu fazu. Drugu ali ne prvu fazu koagulacije sirilom inhibira modifikacija 2 — 3 ostatka lizina molekule  $\kappa$ -kazeina i to dansil kloridom (Hill i Craker 1968); modifikacija  $\alpha_s$  — ili  $\beta$ -kazeina ne djeluje na njihovu stabilizaciju  $\kappa$ -kazeinom ili koagulaciju  $\kappa - \alpha_s$  ili  $\kappa - \beta$ -kazein sistema. Dansilacija povećava čist negativni naboj proteina što više otežava interakciju micela. Modifikacije 1,5 ostatka arginina/mol  $\kappa$ -kazeina obradom glioksala također sprječava agregaciju micela (Hill, 1970). Smatra se (Hill, 1970) da histidin, lizin i arginin oblikuju pozitivno nabijene nakupine  $\kappa$ -kazeina blizu veza osjetljivih na sirilo; netaknut  $\kappa$ -kazein ove nakupine je zaštićen makropeptidom, ali je izložen djelovanju sirila koje slijedi, omogućujući elektrostatskoj interakciji negativno nabijenih dijelova susjednih proteina ili micela što vodi agregaciji.

Sirilom izmijenjen (para)  $\kappa$ -kazein skuplja se u odsutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (Wake, 1959), ali samo — skupljanje je jako inhibirano niskim nivoom  $\alpha_{s1}$  — i  $\beta$ -kaze-



inom (Lawrence i Creamer, 1969; Kato i dr., 1980) a stimulirano vrlo niskim koncentracijama  $\alpha_{s1}$  — i  $\beta$ -kazeina (Kato i dr. 1980).

Značaj ovih opažanja procesa koagulacije nije jasan, ali ta imaju vjerojatno važnost u oblikovanju gela. Kato i dr. (1980) pokazuju da glutaminska i asparaginska kiselina utječu na samo — sakupljanje para —  $\kappa$ -kazeina time potkrepljujući mišljenje Hilla (1970) o važnosti interakcije između pozitivnih i negativnih grupa u koagulaciji sirilom izmijenjenih micela kazeina.

### Djelovanje sirila u siru

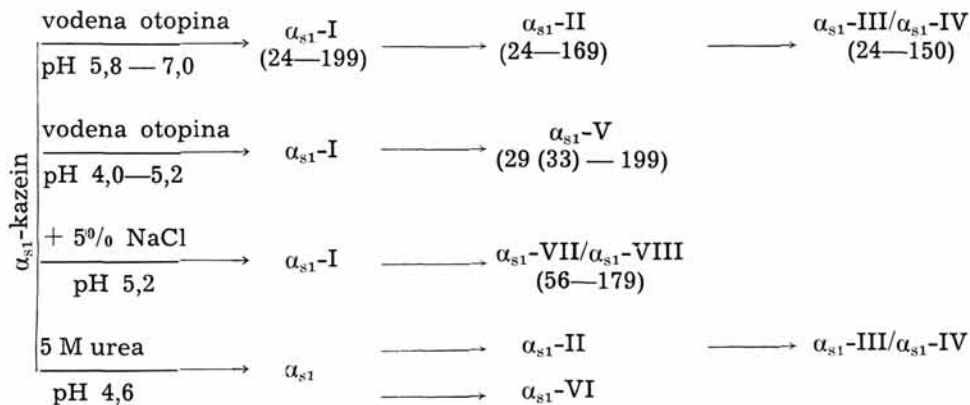
Najvećim djelom (oko 90%) sirila dodanog mlijeku za proizvodnju sira izgubljen je u sirutki i ocjeđivanju; stvarna količina sirila, naročito himozina, zadržanog u grušu je jako ovisna od pH gruša kod ocjeđivanja (Holmes, Durersch i Ernststrom, 1977). Sirilo zadržano od gruša je bitno za zrenje sira jer o njemu ovisi u prvom redu stvaranje velikih peptida (O'Keefe, Fox i Daly, 1976, 1978; Visser, 1977 a, b). Proteoliza je bitna za stvaranje karakteristične teksture sira (de Jong, 1976). Mali peptidi i amnokiseline sudjeluju u okusu sira (Mabbitt, 1961) ali pretjerana ili nepravilna proteoliza dovodi do stvaranja lošeg okusa naročito gorčine (Lowrie i Lawrence, 1972).

Himozin pokazuje veliki stupanj specifičnosti za obližnje peptidne vezeve, najradije između para hidrofobnih ostataka. Himozin redom hidrolizira veze 189 — 190, 163 — 164 i 139 — 140  $\beta$ -kazeina u otopini te proizvodi tako  $\beta$ -I, B-II i  $\beta$ -III (Creamer, Mills i Richards, 1971; Pelissier, Mercier i Ribadeau — Dumas, 1974; Creamer, 1976; Visser i Slangen, 1977). Susjedne veze ovih mjesta (192 — 193, 165 — 166, 167 — 168) mogu također biti hidrolizirane i dati peptide koji se ne razlikuju od  $\beta$  — I i  $\beta$  — 2 i to gel elektroforezom. Kod niskog pH (2 — 3) veza 127 — 128 hidrolizira i daje  $\beta$ -IV (Visser i Slangen, 1977; Mulvihill i Fox, 1978).

$\alpha_{s1}$ -kazein ima najmanje 25 mjesta za djelovanje himozina (Pelissier i dr. 1974) ali većina se hidroliziraju sporo. Najosjetljivija veza je phe 23 — phe 24 (Hill i dr. 1974) ili phe 24 — val 25 (Creamer Richardson, 1974) koje hidrolizom daju  $\alpha_{s1}$  — I. Specifičnost himozina je značajno ovisna o eksperimentalnim uvjetima (slika 2). Segmenti  $\alpha_{s1}$ -kazeina predstavljeni nekim od ovih peptida prikazani su u zgradama.

Para —  $\kappa$ -kazein se himozinom vrlo sporo hidrolizira i osjetljive veze nisu ustanovljene.  $\alpha_{s1}$ -kazein je također vrlo otporan na proteolizu (Guiney, 1972) te produkti hidrolize nisu bili opisani. Hidroliza  $\gamma$ -kazeina i proteoza — peptona nisu istraženi.

Goveđi i svinjski pepsini proteoliziraju više nego teleći himozin i to na izoliranom goveđem  $\beta$ -kazeinu, uz slične specifičnosti (Mulvihill i Fox, 1979 b). Oba pepsina brzo hidroliziraju  $\alpha_{s1}$ -kazein u  $\alpha_{s1}$ -I koji je otporan na daljnju proteolizu, a peptidi koji su tako nastali imaju drugačiju elektroforetsku pokretljivost odgovarajućih peptida himozina (Mulvihill, 1978). Moguće djelovanje pH i NaCl na specifičnost pepsina nije provjereno, ali aktivnost pepsina djelovanjem soli je slična onoj himozina.



**Slika 2**

**Redoslijed proteolize  $\alpha_{s1}$ -kazeina himozinom u različitim uvjetima**

Proteolitička aktivnost mikrobnih sirila je veća nego od himozina, ali njihova specifičnost prema kazeinu nije još ustanovljena. Ipak elektroforetska usporedba peptida nastalih iz kazeina animalnim ili mikrobnim sirilima pokazuje znatne razlike u specifičnosti (Edward i Kosikowski, 1969; Vanderpoorten i Weckx, 1972; El-Shibiny i Abd El-Salam, 1976, 1977).

Osjetljivost kazeina na proteolizu pomoću himozina i pepsina je jako ovisna od stepena agregacije; mala proteoliza se odvija u netaknutim micelima, ali razbijanje micela odstranjivanjem koloidnog kalcijevog fosfata daju komponentama kazeina osjetljivost na proteolizu (Fox, 1970; O'Keeffe i dr. 1975). Osjetljivost  $\beta$ -kazeina na proteolizu u odnosu na onu  $\alpha_{s1}$ -kazeina je veća kod nižih nego kod viših temperatura (Fox, 1969) što se vjerojatno može pripisati od temperature zavisne agregacije  $\beta$ -kazeina (Payens i van Markwijk, 1963; Garnier, 1966).

Osjetljivost  $\beta$ -kazeina na proteolizu himozinom ili pepsinom je u velike ovisna o aktivnosti vode ( $A_w$ ), inhibirana je niskom (5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) koncentracijom NaCl (Fox i Walley, 1971) i visokom koncentracijom saharoze (Creamer, 1971) dok je  $\alpha_{s1}$ -kazein optimalno hidroliziran kod oko 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> NaCl. Himozin ili pepsin ne hidroliziraju  $\beta$ -kazein u siru (Ledford i dr. 1966) vjerojatno radi niske aktivnosti vode uzrokovane djelomično sadržajem NaCl (Phelan i dr. 1973).  $\beta$ -kazein se ipak polako hidrolizira prirodnim proteinazama mlijeka (Creamer, 1975).  $\alpha_{s2}$ -kazein i para- $\gamma$ -kazein nisu u siru hidrolizirani.  $\alpha_{s1}$ -kazein u siru je potpuno degradiran, najprije na  $\alpha_{s1}$ -I, a kasnije na  $\alpha_{s1}$ -V i  $\alpha_{s1}$ -VII s manjim količinama  $\alpha_{s1}$ -II (Mulvihill i Fox, 1980). Manji peptidi nastali djelovanjem sredstava za zgrušavanje izgleda da su dalje degradirani mikrobnim proteinazama i peptidazama (O'Keeffe i dr. 1976, 1978), ali proizvodi još nisu opisani.

**Nadomjesci sirila**

Kako je ranije navedeno, povećana proizvodnja sira u svijetu i smanjenje klanja teladi dovelo je do manjka telećeg sirila te do traženja njegove zamjene. Skoro sve proteinaze mogu koagulirati mlijeko ali za razliku od sirila (1) prejak su proteolitičke ili je usmjerenje krivo te proizvode greške okusa i tekstu-



re uz smanjeni prinos; (2) optimalni pH je drugačiji od mlijeka i (3) termički su toliko stabilne da ostaju u proizvedenoj sirutki što stvara probleme hrane u kojoj ima sirutke (Hyslop i dr. 1979; Thunell i dr. 1979, 1980). Danas se komercijalno upotrebljavaju kod sireva s duljim zrenjem svinjski i goveđi pepsini te proteinaze od *M. pusillus* i *M. meihei* te *Endothia parasitica*. Prema Nelsonu (1975) u SAD se sirilom goveđeg porijekla proizvede oko 15% sira, svinjskog 40%, a enzima porijeklom od *Mucora* daljnjih 40%. Izgleda da je upotreba nadomjestaka za sirilo, naročito onih mikrobnog porijekla, u Evropi mnogo manja.

Mnogo autora se bavi nadomjescima za sirilo (Nelson, 1975; Green, 1977; Martens i Naudts, 1978) te ovdje o tome nećemo dalje raspravljati. Bilo bi vrijedno zapaziti da postoji dosta veliko zanimanje za mogućnost prelaza genetskih informacija za biosintezu himozina od stanica teladi na mikroorganizme. Kad bi to uspjelo to bi imalo velike posljedice kako za mljekarstvo tako i za industriju enzima. Kako razna sirila nisu jednako prihvatljiva ili se ne cijene od proizvođača sira to su se razvile neke metode identifikacije i kvantifikacije za tipove enzima (Green, 1977; Martens, i Naudts, 1978; de Koning, 1979).

### Imobilizirana sirila

Nije začuđujuće da vlada znatan interes za razvoj i korištenje imobiliziranih sirila i to radi jednog od ovih razloga: (1) tehnika odjeljivanja prve i druge faze koagulacije sirilom kako bi se one bolje pojedinačno ispitala; (2) tehnika identifikiranja micelarne lokacije  $\alpha$ -kazeina; (3) tehnika proizvodnje sira bez sredstava za koagulaciju za ispitivanje uloge proteinaza startera i drugih proteinaza u zrenju sira; (4) tehnika uštede enzima u proizvodnji sira i (5) kao komponenta sistema za kontinuiranu proizvodnju sirnog gruša. Pregled o imobiliziranim sirilima uključuje radove Olsona i Richardsona (1975, 1979), Teylora i dr. (1976) i Cheryana (1978).

Prvi pokušaj imobiliziranja sirila izgleda da je bio 1969 (Green i Crutchfield) i to s ohrabrujućim rezultatima i to s himozin-agrosom. Međutim izlučivanje otopljenog enzima iz kompleksa je bilo znatno i koagulacija mlijeka je u cijelosti pripisana topivom enzimu. Brown i Swaisgood (1975) oskudno izvještavaju uspješnu imobilizaciju himozina na poroznom staklu.

Jansen i Olson (1969) iznose da papain netopiv tretiranjem glutraldehidom može koagulirati mlijeko, ali o tome daju malo podataka. Superpolimeriziran papain je korišten za ispitivanje strukture micela kazeina (Ashoor i dr. 1971).

Svinjski pepsin imobiliziran na poroznom staklu može katalizirati enzimatsku fazu koagulacije mlijeka; pokusi su pokazali da kataliza nije uzrokovana topivim enzimom. Mlijeko pH 5,6 ili 5,9 kod 15°C propušteno je kroz kolonu i zagrijano na 30°C da se dobije tipičan gruš. Glavni problem je bio u začepljenjima kolone uzrokovane adsorpcijom proteina i gubitkom enzimatske aktivnosti (Ferrier i dr. 1972).

Enzimatska faza koagulacije u reaktivnoj koloni i dalje je proučavana (Cheryan i dr. 1975a) te je utvrđeno da ne dolazi do topivosti enzima iako tu ima i nejasnih stvari. Na primjer, podaci pokazuju da zgrušano mlijeko imobiliziranim pepsinom pomiješano sa 2,5 istog volumena sirovog mlijeka koagulira sporo što se može tumačiti kao indicirajuće da treba  $\alpha$ -kazeina samo u

proporciji prisutnih micela da se hidroliziraju za postizavanje želiranja. Nije prikazano da su netaknuti miceli prisutni u gelu ili da se enzimatska hidroliza  $\kappa$ -kazeina ne događa u smjesi, te bi koagulacija bila uzrokovana prisutnošću malih količina otopljenog koagulirajućeg sredstva. Angelo i Shahani (1979) su ipak dobili slične rezultate sa sirilo-sefaroza — 4B.

U suprotnosti s iskustvima s otopljenim sirilom otpuštanje neproteinskog dušika (NPN) imobiliziranim pepsinom nije u skladu s vremenom (Hicks i dr. 1975) i dok je trajanje koagulacije sirilom u obrnutoj relaciji s visinom NPN otpuštenog pepsin-staklom, koagulacija se događa u širem rasponu vrijednosti NPN. Nažalost kontinuirano otpuštanje NPN nakon izlaska mlijeka iz kolone nije mjereno. Supernatant ultracentrifugiranog obranog mlijeka koje je prošlo kroz pepsin-staklenu kolonu uspio je zgrušati netretirano obrano mlijeko ili iznova dispergirane kazeinske micelle dok simulirani ultrafiltrat mlijeka tretiran na isti način nije to mogao učiniti. Ovaj rezultat je tumačen kao podrška modelu kazeinskog micela predloženog od Parry i Carrola (1969) u kojem se koagulacija mlijeka sirilom smatra izazvana para- $\kappa$ -kazeinom koji je nastao iz seruma  $\kappa$ -kazeina. Neuspjeh sa enzimatskim tretiranjem simuliranog ultrafiltrata mlijeka izgleda da spriječava otopljeni enzim kao odgovoran ali izgleda moguće da proteini supernatanta ultracentrifugiranog obranog mlijeka (proteini sirutke i male micelle) mogu otpustiti enzime iz pepsin-staklene kolone dok slobodni protein simuliranog ultrafiltriranog mlijeka to ne može učiniti. Većina ovih podataka potvrdili su Lee i dr. (1977).

Porozan staklo-pepsin puno se bolje ponaša u fluidiziranom sloju nego u reaktoru sa zatvorenim slojem zahvaljujući uglavnom nemogućnošću začep-ljenja (Cheryan i dr. 1975 b). Ipak, gubitak enzimatske aktivnosti ostaje; brzo početno opadanje je uzrokovano adsorpcijom  $\kappa$ -kazeina ili makropeptida na koloni, ali uzrok kasnijem i sporijem opadanju nije ustanovljen.

Djelomična regeneracija kolone može se izvesti tretiranjem s 2M uree kod pH 3,5 ali regenerirane kolone gube vrlo brzo aktivnost kod ponovne upotrebe.

Stabilnost pepsin-stakla se poboljšala slojem cirkonija na staklu ili prevlačenjem stakla proteinom te i drugim načinima (Cheryan i dr. 1976). Iako se nije uspio riješiti gubitak aktivacije najbolji se pokazao sistem adsorpcije stakla aluminijem kod niskog pH (Paquot i dr. 1976).

Himozin imobiliziran na poroznom staklu koristio je Dagleish (1979) za proučavanje agregacije micela tretiranih himozinom. Hidroliza  $\kappa$ -kazeina praćena je mjerenjem vrijednosti para- $\kappa$ -kazeina :  $\alpha_{s1}$ -kazein u elektroforetogramu. Smatralo se da je glavni uzrok hidrolizi imobilizirani enzim iako se pojavilo nešto otopljenog himozina. Za razliku od Hicks-a i dr. (1975) hidroliza  $\kappa$ -kazeina se u biti pojavila prije nego su se micelle mogle agregirati.

Iako su  $\alpha$ -himotripsin, himozin i Suparen imobilizirani na staklu mogli hidrolizirati kompletan kazein ili izolirane kazeine, oni nisu mogli koagulirati mlijeko čak i nakon produljenog vremena (Beeby, 1979).

Imobilizacija svinjskog pepsina na hitozanu s akroleinom kao vezajućim sredstvom bila je uspješna, ali aktivnost koagulacije mlijeka nije ustanovljena (Hirano i Miura, 1979). Imobilizacija pepsina parafinskim voskom opisana je od Savangikar i dr. (1978). Otopljenom smjesom voska i enzima mogu se presvući razne površine; film zadržava mogućnost da koagulira mlijeko dulje vrijeme. Ova tehnika je jeftina i vrlo interesantna jer se tako mogu presvući razni dijelovi opreme ili skladišni tankovi s kojima mlijeko dolazi u dodir.

Adsorpciju sira hidroksilapatitom ili uklapanjem u kalcijev alginat ispitivali su Glogowski i Rand (1978) kao način da povećaju zadržavanje koagulirajućeg sredstva u sirnom grušu kako bi se smanjili gubici u sirutki.

Tako je mnogo enzima za zgrušavanje mlijeka uspješno imobilizirano raznim tehnikama i s raznim nosačima. Svinjski pepsin se za to prikazao najprikladnijim. Porozno staklo je najraširenije, ali su rezultati bolji sa titanom i aluminijem. Sva imobilizirana sirila su slabe stabilnosti, te iako se mogu djelomično regenerirati, brzo gube aktivnost. Iako se smatra da bi bile brojne prednosti upotrebom aktivnog, stabilnog i imobiliziranog sredstva za zgrušavanje Taylor i dr. (1976) zaključuju da to danas još nema ekonomske vrijednosti odnosno dok nema još značajnijeg razvoja bilo tehnološkog ili ekonomskog. Iako većina objavljenih radova pokazuje neznačajnim otapanje enzima, opisane karakteristike koagulacije mlijeka tretiranim imobiliziranim sirilima su tako različite u mnogočemu s onima opaženim s topivim enzimima da to navodi autora da bude rezerviran na potpuno odsustvo topivih enzima. Podaci Beeby-a (1979) podržavaju ovu rezerviranost.

Čak kad bi se pojavili stabilni i ekonomični imobilizirani enzimi, trebalo bi još mnoge probleme riješiti:

1.) Dok bi se enzimom modificirano mlijeko koaguliralo kad je temperatura iznad 20°C postoji znatan rizik koagulacije u reaktoru u slučaju mehaničkih grešaka. Kad bi se to dogodilo bilo bi vrlo teško obnoviti enzim.

2.) Mnogi sirarski pogoni prerađuju 10<sup>6</sup> l/dnevno mlijeka; količina i koštanje imobiliziranog enzima bi bila vrlo velika.

3.) Mnogi pogoni rade 20 sati/dnevno što otežava održavanje sanitarnih uvjeta reaktora iako bi se kolone čistile otopinom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

4.) Iako je sugerirano da će odsustvo sredstva za koaguliranje u grušu olakšati kontroliranje zrenja mekih sireva, ovom autoru izgleda da bi bilo potrebno dodavati proteinaze grušu, barem tvrdim sirevima, dok ostaci koagulirajućeg sredstva u grušu uobičajenim metodama proizvodnje igraju glavnu ulogu u zrenju sira. Ovo bi se vjerojatno učinilo infuzijom ili dodavanjem enzima u kapsulama u mlijeko za sirenje.

### Ubrzano zrenje sira

Zrenje sira je kompleksan proces koji obuhvaća proteolizu, glikozu, lipolizu i razne sekundarne promjene katalizirane, uglavnom, sredstvom za zgrušavanje, bakterijama startera i njihovim enzimima, prirodnim enzimima mlijeka, te u nekim tipovima sira, egzogenim lipazama.

Zrenje je spor proces koji traje i do 2 godine za neke vrste; uglavnom za niži sadržaj vode u siru dulje je potrebno vrijeme zrenja. U modernoj mljekarskoj tehnologiji, većina sireva sazrijeva pod kontroliranim uvjetima temperature i vlage. Tako je zrenje sira skup proces jer su potrebne mogućnosti prevoza i zrenja velikih količina sira.

Prema Law (1980) za zrenje tone čedar sira u Britaniji treba 45 funti što je 3,6% od troškova za mlijeko i preradu. Dalje zrenje je u neku ruku nekontroliran proces te se pojavljuju znatne razlike u kvaliteti gotovog proizvoda. Radi navedenih razloga povećan je interes za ubrzanje zrenja sira.

Mogu se koristiti razni načini (Law, 1978) za ubrzanje zrenja sira koji su većinom u pokusnoj fazi:

1.) Više temperature zrenja ubrzavaju razvoj okusa i pogrešaka okusa te se zato ne preporučuju iako bi to bio najlakši i najjeftiniji način.

2.) Povećanje aktivnosti mikrobnih populacija; ako starter igra glavnu ulogu u zrenju, onda bi zrenje trebalo biti ubrzano povećanjem broja mikroorganizama startera; ipak razvijanje lošeg okusa može također biti ubrzano. Tehnika povećanja broja stanica startera uključuje: dodatak modificiranih startera (tretiranih lisozimom, naglo izloženih toplini, pripremljenih starenjem) ili modifikaciju tehnike prerade (prethodna hidroliza laktoze, veće količine startera pripremljenih na višim temperaturama).

3.) Upotreba startera sa selekcionarnim mutantima sa karakteristikama za brzo zrenje.

4.) Sistem zrenja dodatom smjesom (Kristoffersen i dr. 1967; Sutherland, 1975).

5.) Dodavanje egzogenih enzima:

a) dodavanje sirne smjese u sirni gruš,

b) ekstrakt kulture startera bez stanica dodavan sirnom grušu,

c) izolirani enzimi.

Za razliku od Kristoffersena po kojemu se smjesa dodaje čitavom siru, Dulley (1976) dodaje sirnu smjesu grušu čedara kao izvor mikroorganizama i enzima. Smjese se pripremaju miješanjem 2 dijela svježeg gruša s jednim dijelom 5% salamure sa 0,3% kalijevog sorbata. Nakon zrenja 1 sedmice na 30°C, dodaje se 600 g takve smjese na 10 kg gruša čedara poslije soljenja. Gruš se vadi, tješti i normalno zrije. Postignuto je smanjenje zrenja do 6 sedmica u odnosu na uobičajeno vrijeme da se postigne zrelost. Možda je iznenađujuće da nema razlike u 12% TCA — otopljenog N između pokusnih sireva što navodi na misao o odsutnosti proteinaza i peptidaza iz smjese a također da proteoliza nije granični faktor zrenja.

Normalni okus i proteoliza sira ne uspijevaju kod kemijskog zakiseljenja, bez startera i zato postoji mogućnost ubrzanja zrenja dodatkom ekstrakta startera bez stanica. Dodavanje ovakvog ekstrakta aseptičkom sirnom grušu proizvodi normalnu proteolizu (Gripon i dr. 1977); razvoj okusa nije ocijenjen. Law (1980) procjenjuje da su stanice 200 litara kulture konstantnog pH potrebne da udvostruče populaciju startera 1 tone sira; ili bi bila potrebna ekvivalentna količina ekstrakta bez stanica. Dok se značajnije ne razvije proizvodnja i priprema kultura, visoke cijene sprječavaju ovaj pristup.

Metoda s najboljim izgledima neposrednog uspjeha bi bila korištenje komercijalno pristupačnih, jeftinih enzima. Chaudhari i Richardson (1971) pokazuju da ekstrakt želučanog tkiva janjeta koji sadrži želučane lipaze i proteinaze (ne himozin) ubrzava lipolizu i proteolizu kod raznih vrsta sireva te poboljšava okus. Ubrzanje proteolize sira postignuto je dodavanjem proteinaze *Aspergillus-a* u gruš sira (Nakanishi i Itoh, 1973, 1974).

Utjecaj raznih kombinacija lipaza, proteinaza i dekarboksilaza na razvoj okusa čedar sira i sirne mase proučavali su Kosikowski i Iwasaki (1975). Manje enzima daje ukusni sir za 4 sedmice na 20°C; više enzima, naročito kod viših temperatura, vodi pogreškama okusa i teksture. Enzimi se dodaju sa soli kako bi se smanjili gubici enzima. Zaključeno je da upotreba mikrobnih lipaza i proteinaza pruža mogućnost ubrzanja zrenja sira. Tehnika je poboljšana (Sood i Kosikowski, 1979) jer enzimatski tretiran sir na 4,5°C nije pokazao značajnije ubrzanje zrenja pa se predložilo zrenje na 10°C, a zatim stabilizacija hlađenjem na 4,5°C.

Jednolična raspodjela dodanog enzima bitna je za uspjeh ove tehnike; sličan problem bi trebalo riješiti kod imobiliziranih sirila da bi se postigao us-

pjeh. Jednolično dodavanje enzima mlijeku može se osigurati, ali najveći dio enzima gubi se sirutkom što, osim koštanja, utječe na stvaranju problema kod sirutke kada se koristi u proizvodnji hrane. Sol koja se čedar siru normalno dodaje može biti donosilac enzima (Nakanishi i Itoh, 1973; Kosikowski i Iwasaki, 1975; Sood i Kosikowski, 1979). Difuzija velikih molekula enzima u sirni gruš je spora i može utjecati na nejednolično zrenje; dalje, ova tehnika ne bi bila prikladna za neke vrste mekih sireva gdje se gruš ne ispire prije vađenja. Tehnika koja još nije dovoljno ocijenjena ali obećava uključuje mikroinkapsulaciju enzima u mlječnu mast (Magee i Olson, 1978; Magee i dr. 1979) i injektiranje pod visokim tlakom (Lee i dr. 1978).

### Proteinski hidrolizati

Proteinski hidrolizati su dobro uvedeni proizvodi za iskorištenje proteinom bogatog otpada i neuobičajenih na pr. biljnih proteina i od ribolova. Ekstenzivno hidrolizirani proteini imaju tradicionalnu primjenu u juhama, namazima, aromama i dijetetskoj hrani. Zadnje vrijeme se ograničena hidroliza upotrebljava kao sredstvo modificiranja funkcionalnih osobina proteina.

### Ekstenzivni hidrolizati

Ekstenzivni proteinski hidrolizati se uglavnom pripremaju iz soje, glutena, proteina mlijeka, otpadaka mesa i ribljih proteina i to kiselom hidrolizom. Neutralizacija kiselih hidrolizata dovodi do visokih postotaka soli 30 do 50% suhe tvar. Za neke primjene (juhe, začini) ne smeta veći sadržaj soli, ali to nije prihvatljivo za dijetetsku hranu i prehrabene nadomjestke. Dalje, kisela hidroliza prouzrokuje potpuno ili djelomično uništenje nekih amino kiselina.

Enzimatska hidroliza je jedna od moguće alternative za kiselu hidrolizu (Adler — Nissen, 1976, 1977). Ipak, proteoliza ima neke ozbiljne nedostatke što kombinacija nekih proteinaza s nekim supstratima daje gorke peptide. Gorčina se uglavnom smatra uzrokom visoke hidrofobnosti (Ney, 1971) naročito kad je C-terminal ostatak hidrofoban (Sullivan i Jago, 1972). Važno je u prvoj fazi izabrati prave enzim — supstrat kombinacije za proizvodnju proteinskih hidrolizata. Međutim moguće je također odstraniti gorki okus, ili ga barem smanjiti na prihvatljivi stupanj, obradom s aktivnim ugljenom (Murray i Baker, 1952), karboksipeptidazom A (Arai i dr. 1970), leucin amino peptidazom (Clegg i McKillan, 1974) ili ultrafiltracijom (Roozen i Pilnik, 1973).

Mlječni proteini nisu rašireni kao supstrat za ekstenzivnu proteolizu, jer kazein je poznat po svojoj sklonosti da daje vrlo gorke hidrolizate. Gorčina se pojavljuje već kod relativno niskog stepena proteolize u čedar i gouda siru ako je pojačana ili neizbalansirana aktivnost proteinaza (Lowrie i Lawrence, 1972; Sullivan i dr. 1973; Stadhouders, 1978).

$\beta$ -kazein se smatra glavnim izvorom gorkih peptida u čedar siru (Fox i Walley, 1971; Sullivan i Jago, 1972), a Clegg i dr. (1974) su identificirali peptide koji sadrže 53—79 ostatke  $\beta$ -kazeina kao glavne uzroke gorkog okusa papain rastvora kazeina. Ipak Pelissier i Manchon (1976) iznose da je s većinom proteinaza  $\alpha_{s1}$ -kazein skloniji gorčini nego  $\beta$ -kazein.

Clegg i McMillan (1974) su pronašli način da odstrane gorčinu ficin/pepsin ili papain hidrolizata bjelanjka jaja ili kazeina i to amino peptidazom leucin svinjskih bubrega. Proces ponovljen u većim razmjerima (Clegg i dr. 1974) pokazao je da se biološka vrijednost hidrolizata može usporediti nerastvorenim kazeinom što se smatra prikladnim za bolesnike s probavnim smetnjama.



Proizvod s okusom ekstrakta goveda dobio se fermentacijom rekonstituiranog mlječnog praha s *Pseudomonas fluorescens* (Claydon i dr. 1968), a mogao bi se koristiti u raznim juhama. Nije se pokušalo izolirati enzim, ali preparat enzima ovog mikroorganizma može dati zadovoljavajući proizvod.

### Ograničena proteoliza

Glavni cilj ograničene proteolize je modificiranje i popravljavanje funkcionalnih osobina kao topivosti, pjenjenja, kapaciteta emulgiranja, viskoziteta itd. (Kinsella, 1976). Proizvodnja sira je možda najistaknutiji primjer korištenja ograničene proteolize u tehnologiji hrane, a ovdje ćemo se ograničiti na modifikaciju »izoliranih«, funkcionalnih proteina. Upotreba ovih proteina sve više raste (Wolnak, 1974). Soja proteini, kazeinati i obrano mlijeko u prahu su glavni funkcionalni proteini danas a znatno zanimanje pokazuje se za proteine ribe i raznih sjemenki. Krv je izvanredan izvor proteina s velikom biološkom vrijednosti i izvrsnim funkcionalnim osobinama, ali nije mnogo korišten radi estetskih razloga.

Enzimatske modifikacije funkcionalnih osobina mnogo se više primjenjuju kod ribljih proteinskih koncentrata vjerojatno zbog mnogostranih vrijednosti i male sklonosti na gorki okus (Hale, 1969; Cheftal i dr. 1971; Spinelli i dr. 1972, 1975; Hewa i dr. 1976; Yanez i dr. 1976; Ballester i dr. 1977).

Mlijeko je izvor 3 tipa funkcionalnih proteina s različitim osobinama: kazein, kazeinati i kazein-sirutkin protein koprecipitati, laktoalbumin (termički denaturiran iz sirutke) i koncentri proteina sirutke (nedenaturirani dobiveni ultrafiltracijom). Kazein kao i soja protein, netopiv je u svom izoelektričnom području, osobina koja mu ograničava upotrebu u kiseloj hrani. Metode proizvodnje kiselo-topivog kazeina, bez gorkog okusa uz kontroliranu proteolizu opisao je Haggett (1974). Laktoalbumin u stvari netopiv, ima zato ograničene funkcionalne osobine. Djelomična hidroliza (8—12%  $\alpha$ —amino N) laktoalbumina, naročito tripsinom, daje proizvod skoro potpuno topiv kod pH 6 i 7, 65% kod pH 4,5 i samo je malo gorak (Jost i Monti, 1977, 1978) i ima izgleda da se koristi kao sastojak hrane. Proteoliza sirutkinog proteina smanjuje emulgirajući kapacitet, povećava specifičan volumen pjene za oko 25%, ali uvelike smanjuje stabilnost pjene (Kuehler i Stine, 1974).

Nepublicirani radovi autora pokazuju da viskozitet otopina kazeinata može biti znatno smanjen ograničenom proteolizom koja nebi kvarila njegov okus. Smanjen viskozitet olakšava sušenje raspršivanjem te ga čini prikladnijim za dodavanje napicima, ali smanjuje njegovu funkcionalnu vrijednost za druge primjene kao u mesnim proizvodima. Kapacitet emulgiranja masti i sposobnosti tučenja kazeinata proteolizom jako je smanjena.

### Tvorba plasteina

Izgleda da je već oko 100 godina poznato da proteinaze mogu sintetizirati peptidne veze kao što ih hidroliziraju. Izraz »plastein« se upotrebljava za polipeptide visoke molekularne težine sintetizirane takvim reakcijama. Mehaničkom tvorbom plasteina, koja se najbolje vrši u 30—40% otopinama malih peptida kod pH 5—7 (bez obzira na optimum hidrolize enzima) se uglavnom smatra da ide putem transpeptidizacije (Horowitz i Haurowitz, 1959; Hofsten i Lalasidis, 1976), hidrofobnim vezama koje imaju važnu sekundarnu ulogu.



Značaj plastein reakcije u nauci o prehrani nije shvaćen do 1970 kada je grupa iz Japana odstranila gorki okus enzimatskih hidrolizata proteina soje. Kasnije se pronašlo da se ova reakcija može koristiti za popravljavanje hranidbene vrijednosti biljnih proteina tako što se u plastein inkorporirao lizin i metionin a to je protein za bolesnike koji imaju fenilketonuriju. Također plastein reakcija omogućuje pročišćavanje novih proteina (Fujimaki i dr. 1971, 1977; Arai i dr. 1975; Eriksen i Fagerson, 1976).

Najviše radova o tvorbi plasteina je sa soja proteinima, a manje sa proteinima mlijeka, jednostaničnim proteinima, zeinima, ribljim proteinima i albuminom jajeta. Kazein nije dobar supstrat za tvorbu plasteina, jer je previše hidrofilan, a sirutkin protein je dobar (Arai i dr. 1975). Dok se ne dokaže vrijednost funkcionalnih osobina plasteina dotle se ne objavljuje. Dok proteini mlijeka imaju dobru biološku vrijednost, nemaju toksina ni lošu boju ili loš okus, dotle bi plastein reakcija jedinu značajnu privlačnost imala u mljekarskoj tehnologiji za popravljavanje već dobrih funkcionalnih osobina mlječnih proteina. Iz neobjavljenog rada autora uspjelo je alkalnom proteinazom, alkalazom, hidrolizom i resintezom dobiti oko 65% plasteina od kazeina, a samo 40% od laktalbumina. Tako veliki polipeptidi da se mogu ustanoviti gel elektroforezom nisu u oba plasteina pronađeni. Sposobnost tučenja kazein plasteina je manja, kapacitet emulgiranja masti nešto slabiji nego kod natrijevog kazeinata, ali njegova topivost u području izoelektrične točke je znatno poboljšana. Zaključeno je da s obzirom na korištenje i gubitak proteina nije vjerojatno da bi tvorba plasteina iz kazeina mogla biti ekonomična.

Topivost i druge funkcionalne osobine laktalbumin plasteina su poboljšane u odnosu na laktalbumin kojemu, da se podsjetimo, su vrlo loša i slabija od drugih funkcionalnih proteina. Tako plastein reakcija pruža mogućnost da se obnovi protein sirutke termičkom denaturacijom, centrifugiranjem, enzimatskom hidrolizom i tvorbom plasteina. S obzirom na velike količine neiskorištene sirutke izgleda da bi osnivanje pokusnog pogona za plastein reakcije, a za iskorištenje sirutke imao opravdanje. Dakako postoje mnoge prikladne metode za obnavljanjem nedenaturiranog sirutkinog proteina (Craig, 1979) i uspješnost primjene plastein reakcije ovisit će o ekonomskom opravdanju u odnosu na ove druge.

### Razne primjene

Obrada mlijeka tripsinom (Shipe i dr. 1975) je išla za popravljanjem njegove stabilizacije u odnosu na oksidativnu ranketljivost u prvom redu modifikacijom membrana mlječnih kuglica i poboljšanjem kapaciteta vezanja bakra tripsinom modificiranih proteina mlijeka.

Koncentrirana mlijeka sterilizirana UHT postupkom (oko  $150^{\circ}\text{C} \times 4-5$  sek.) su po boji i okusu bolja od onih dobivenih konvencionalnim postupkom (oko  $110^{\circ}\text{C} \times 20$  min.) Ipak niži viskozitet djeluje kod potrošača kao manje suha tvar i prouzrokuje osjetljivost na obiranje masti i sedimentaciju soli. Vrlo ograničena proteoliza pepsinom ili sirilom je prijedlog (Tarassuk i Nury, 1952) da se viskozitet poveća, a boja i okus ostanu isti. Gubitak stabilnosti koje prouzrokuje proteoliza može se spriječiti upotrebom ortofosfata. Prema autoru ova tehnika se komercijalno ne koristi vjerojatno što zahtijeva strogu kontrolu za sigurno dobivanje željenih rezultata. Dalje, UHT-koncentrati nisu još trgovački rašireni, jer se opaža tendencija želiranja tokom uskladištenja.

Majčino mlijeko proizvodi mnogo mekši gruš tretiranjem sirilom nego kravlje mlijeko što je uzrokovano, između ostalih faktora, i manjim sadržajem

jem i različitim karakteristikama kazeina (Bezkorovainy, 1977). Čvrst gruš koji nastaje od kravljeg mlijeka uvjetuje neprikladnost za hranu izvjesnih kategorija djece i odraslih sa određenim probavnim smetnjama. Velik je interes modificiranja ili »humaniziranja« kravljeg mlijeka za pripremu mlijeka za dojenčad. Raniji pokušaji proizvodnje mlijeka mekšeg gruš izgleda da su bili ograničeni na obradu mlijeka pankreatinom, a da se nisu pojavile druge popratne pojave u pogledu organoleptičke ili hranidbene kvalitete (Conquest i dr. 1976). Izvanredne kliničke rezultate dalo je enzimatski tretirano mlijeko (Storrs i Hull, 1956). Te prednosti nisu bile isključivo u smanjenju tenzije gruš, nego u tome da 1/3 dodatog enzima preživljuje pasterizaciju, kojim se proizvod obrađuje, a to se smatra da pridonosi »in vivo« probavu proteina. Majčino mlijeko sadrži mnogo više prirodnih proteinaza a pasterizirano, enzimatski tretirano mlijeko, ima približno isti nivo aktivnosti proteinaza kao i sirovo majčino mlijeko.

U modernoj tehnologiji dječje hrane kravlje mlijeko je »humanizirano« mijenjanjem odnosa kazein i sirutkin protein dodavanjem demineralizirane sirutke obranom mlijeku. Danas nije poznata kod ovog tipa proizvoda enzimatska obrada.

(Opširnu literaturu koju je naveo autor ne iznosimo, te se svaki zainteresirani može obratiti Uredništvu ovog časopisa).

#### Summary

*The principal applications of proteinases in dairy technology are in cheese manufacture. The enzymatic primary phase and non-enzymatic secondary phase of rennet coagulation of milk are reviewed. Aspects of veal rennet substitutes are briefly discussed and developments in immobilized rennets considered in detail. The possibility of accelerating cheese ripening via added proteinases is also considered.*

*Minor applications of proteinases including production of protein hydrolyzates, protein modification and baby food manufacture are reviewed.*

Priredio:  
D. Baković

---

**Svim svojim potrošačima, poslovnim prijateljima  
i građanima SFRJ**

**želimo**

**SRETNU I USPJEŠNU 1981. GODINU**



**PREHRAMBENA INDUSTRIJA  
SLAVONSKA POŽEGA**