

Primena proteolitičkih enzima u cilju ubrzanja zrenja Gruyèrea (Usage of Proteolytics Enzymes for Accelerated Gruyère Ripening)

Dr. Marijana CARIĆ, dr. Dragoljub GAVARIĆ, mr. Spasenija MILANOVIĆ,
dip. ing. Ljiljana KULIĆ, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mr. Živanko
RADOVANČEV, RO »Mlekoprodukt«, Zrenjanin

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 1. 3. 1989.

UDK: 637.336.6

Sažetak

Izvršena je proizvodnja sira tipa Gruyère s dodatkom komercijalnog preparata proteolitičkog enzima Novozym 257 u količini od 10 i 20 g/1000 l mleka pre koagulacije u cilju ubrzanja procesa zrenja. Eksperimentalni sirevi kao i kontrolni uzorak (bez dodatka proteolitičkog enzima) proizvedeni su u industrijskim uslovima po uobičajenom tehnološkom postupku. Tokom 60 dana zrenja praćene su promene fizičko-hemijskog sastava sireva.

Summary

In the aim of acceleration of Gruyère cheese ripening, a commercial preparation of proteolytic enzyme (Novozym 257) was added in the amount of 10 and 20 g per 1000 l milk before renneting. Experimental and control (without proteolytic enzyme) cheeses were produced in industrial scale according to procedure. Physico-chemical changes of obtained samples during 60 days of ripening were investigated.

Uvod

Razvojem tehnologije izolovanja i prečišćavanja pojedinih vrsta enzima animalnog, vegetabilnog i mikrobiološkog porekla raste i interes za njihovu aplikaciju u prehrambenoj industriji. Tri su osnovne prednosti njihove primene u ovoj industrijskoj grani: specifičnost enzima u odnosu na supstrat, mala koncentracija potrebna za kataliziranje određene reakcije i delovanje u relativno blagim uslovima (temperatura, pritisak, pH itd.).

Uvođenje mehanizovanih i automatizovanih linija u tehnološki proces proizvodnje sira prouzrokovalo je nagli porast obima proizvodnje, investicionog i obrtnog kapitala s visokim troškovima proizvodnje i ostvarene zarade (Law, Wigmore, 1982). Stoga su i najmanje uštede tokom pojedinih operacija u procesu poželjne, jer u znatnoj meri doprinose povećanju ekonomičnosti proizvodnje.

Zrenje sira predstavlja jednu od vremenski najdužih operacija tokom proizvodnje sira, čije trajanje, u zavisnosti od vrste proizvoda, može da bude do dve godine. Obzirom na angažovana sredstva, skraćenje perioda zrenja sira, bez

negativnog utjecaja na kvalitet finalnog proizvoda, predstavlja osetno povećanje produktivnosti rada i rentabilnosti proizvodnje.

Za ubrzanje procesa zrenja različitih vrsta sireva mogu da se koriste komercijalni preparati enzima mikrobiološkog porekla, kisele i neutralne proteaze, lipaze i dekarboksilaze, sami ili u kombinaciji, koji se dodaju u mleko ili grušu tokom tehnološkog procesa proizvodnje sira (L a w, 1980.).

Stepen i priroda promena tokom procesa zrenja sira, kao i priroda i količina razgradnih produkata zavisi od vrste prisutnih enzima, vrste sira koji se proizvodi kao i unutrašnjih uslova u prostoriji za zrenje (F o x, 1981.).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitivanje mogućnosti ubrzanja procesa zrenja sira Gruyère dodatkom različitih koncentracija proteolitičkog enzima u mleko pre koagulacije.

Materijal i metode rada

Sir tipa Gruyère proizveden je u industrijskim uslovima u RO »Mleko-produkt«, Zrenjanin po uobičajenom tehnološkom postupku prikazanom na slici 1.

Za ubrzanje procesa zrenja korišćen je komercijalni preparat proteolitičkog enzima izolovan iz *Bacillus subtilisa*, Novozym 257, Novo Industry, Copenhagen, Danska, koji je dodat mleku u količini od 10g/1000 l mleka (uzorak 1) i 20g/1000 l mleka (uzorak 2). Kontrolni uzorak (uzorak 3) proizveden je bez dodatka enzimskog preparata.

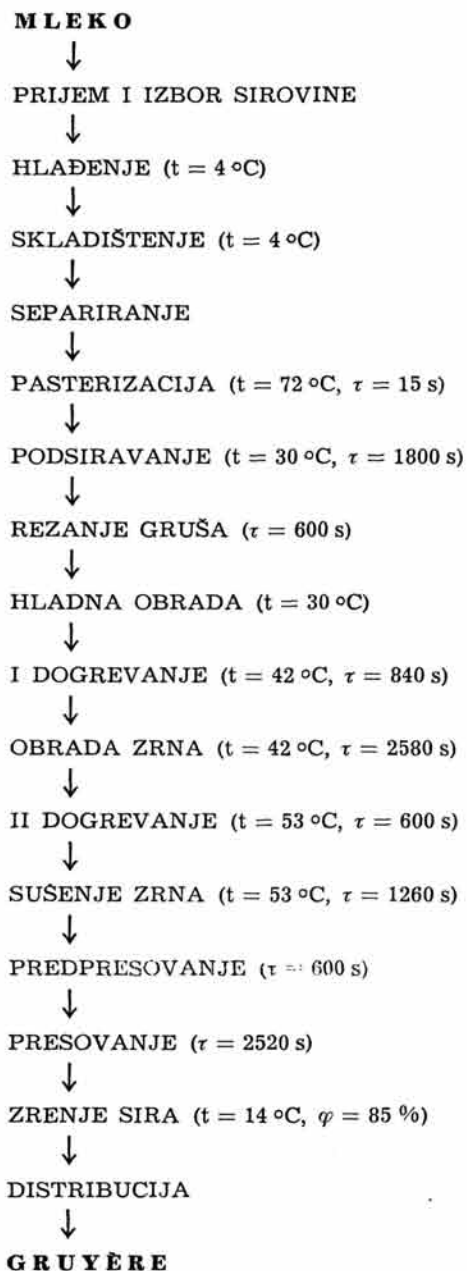
U svaki uzorak mleka pre koagulacije dodata je ista količina sirila (35 g/1000 l), CaCl₂ (20 g/100 l), KNO₃ (12 g/100 l) i tehničke kulture (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus helveticus* u odnosu 1 : 1).

Fizičko-hemijski sastav mleka pre podsiravanja, promene pH vrednosti gruša tokom koagulacije i presovanja, kao i promene pH vrednosti dobijene surutke određene su standardnim metodama (Pejić, Đorđević, 1973.).

Tokom 60 dana zrenja praćene su promene fizičko-hemijskog sastava proizvedenih sireva sledećim metodama:

- voda sušenjem na $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Pejić, Đorđević, 1973.),
- mlečna mast po van Guliku (Pejić, Đorđević, 1973.),
- pH vrednost elektrohemijski na pH-metru Iskra MA 57, Kranj, Jugoslavija,
- slobodne masne kiseline (Godinho, 1981.),
- isparljive masne kiseline (Smiley i sar., 1946.),
- ukupni proteini (Pejić, Đorđević, 1973.),
- neproteinski azot (Pejić, Đorđević, 1973.),
- rastvorljivi azot spektrofotometrijski (Vakaleris, 1959.),
- NaCl po Volhardu (Marjanović, Janković, 1983.).

Proizvedeni sirevi su organoleptički ocenjeni nakon 60 dana zrenja po metodologiji i Pravilniku za ocenjivanje kvalitete mleka i mlečnih proizvoda na Međunarodnom poljoprivrednom sajmu u Novom Sadu.



Slika 1. Blok šema tehnološkog procesa proizvodnje sira Gruyère
 Fig. 1. Flow Sheet of Gruyère Manufacture

Rezultati i diskusija

U tablici 1 prikazana su najvažnija svojstva mleka iz kojeg su proizvedeni sirevi. Vrednosti za suhu materiju bez masti bile su istovetne za sve uzorke i nešto niže od onih propisanih Pravilnikom o kvalitetu mleka i proizvoda od mleka (Sl. list SFRJ, 51/82). Najveće razlike su se javile kod sadržaja mlečne masti: kod uzorka 1 i 2 ova vrednost je 2,90‰, a kod kontrolnog 3,10‰ što predstavlja razliku od apsolutnih 0,20‰. U pogledu kiselosti odnosno pH vrednosti nisu postojale bitne razlike, iako su vrednosti na gornjoj granici prihvatljivosti.

Tablica 1. Fizičko-hemijske karakteristike mleka
Table 1. Physico-Chemical Characteristics of Milk

Karakteristika Characteristic	pH vrednost pH Value		
	1	2	3
Suva materija bez masti (%) Dry Matter Without Fat	8,43	8,43	8,43
Mlečna mast (%) Milk Fat	2,90	2,90	3,10
Kiselost (°SH) Acidity	8,40	8,40	—
pH	6,30	6,40	6,30

Promene pH vrednosti gruša i surutke dobijene nakon podsiravanja prikazane su u tablici 2. Uprkos šaržnom načinu proizvodnje dobijene vrednosti

Tablica 2. Promene pH vrednosti gruša i surutke tokom proizvodnje sira Gruyère s dodatkom različitih koncentracija proteolitičkog enzima za ubrzanje zrenja
Table 2. pH Value of Curd and Whey During Gruyère Manufacture with Usage of Proteolytic Enzymes for Accelerated Ripening

	pH vrednost pH Value		
	Uzorak Sample		
	1	2	3
Temperatura podsiravanja (°C) Renneting Temperature °C	30	30	31
Gruš pre rezanja Curd Before Cutting	6,4	6,3	6,3
Surutka posle rezanja Whey After Cutting	6,4	6,3	6,3
Surutka nakon hladne obrade Whey After Cold Processing	6,3	6,2	6,2
Surutka nakon dogrevanja I Whey After I Heating	6,2	6,1	6,1
Surutka nakon dogrevanja II Whey After II Heating	6,1	6,0	6,0
Surutka na kraju obrade gruša Whey at the end of Curd Processing	6,0	5,9	5,9

ne pokazuje značajnije razlike. pH vrednost gruša pre rezanja bila je najviša kod uzorka 1 i iznosila je 6,4, dok su pH vrednosti gruša uzorka 2 i 3 identične (pH = 6,3). Sledstveno tome, identične vrednosti su dobijene i kod surutke nakon rezanja gruša. Posle hladne obrade pH surutke se snizio za 0,1 pH jedinicu. Ove vrednosti su se zadržale i nakon I dogrevanja. Nakon II dogrevanja pH surutke se snizio za dalju 0,1 jedinicu da bi na kraju obrade gruša pH uzorka 1 iznosio 6,0, a kod uzoraka 2 i 3 pH = 5,9. Intenzivniji pad pH vrednosti surutke, odnosno gruša, odvijao se tokom perioda presovanja. Tokom sedmočasovnog presovanja pH vrednost izdvojene surutke je pravilno opadala za 0,1 pH jedinicu/h.

Tablica 3. Promene komponentata tokom 60 dana zrenja sira Gruyère s dodatkom različitih koncentracija proteolitičkog enzima za ubrzanje zrenja

Table 3. Changes of Components During 60 Days Gruyère Ripening with Usage of Proteolytic Enzymes for Accelerated Ripening

Komponenta Component	Uzorak Sample	Period zrenja (dan) Ripening Period (Day)				
		1	15	30	45	60
Voda (%) Water	1	39,6	39,0	38,6	38,1	37,8
	2	40,0	40,0	39,4	38,6	38,3
	3	40,5	40,1	39,0	38,5	38,2
Mlečna mast (%) Milk Fat	1	30,5	30,5	30,5	31,0	31,0
	2	31,0	31,0	31,0	31,5	31,5
	3	30,5	30,5	31,0	31,5	31,5
Mlečna mast/suva materija (MM/SM) (%) Milk Fat/Dry Matter (MF/DM)	1	50,49	50,00	49,67	50,08	49,84
	2	51,66	51,66	51,15	51,30	51,05
	3	51,26	50,92	50,82	51,22	50,97
Isparljive masne kiseline (ml N/10 NaOH) Evaporating Fat Acids (ml N/10 NaOH)	1	12,0	23,2	22,0	53,0	91,0
	2	10,0	50,2	—	—	—
	3	7,0	28,2	57,0	51,2	45,5
Slobodne masne kiseline (ml 0,05 N KOH/1 g sira) Free Fat Acids (ml 0,05 N KOH/1 g of Cheese)	1	0,40	0,45	0,64	0,69	0,73
	2	0,38	0,76	0,53	—	0,53
	3	0,35	0,37	0,40	0,35	0,64
Ukupni proteini (%) Total Proteins	1	26,18	27,37	27,68	27,77	27,91
	2	24,55	26,79	27,99	28,22	28,58
	3	25,49	25,64	27,77	28,31	27,67
Neproteinski azot (%) Non-Protein Nitrogen	1	0,053	—	0,261	0,229	0,300
	2	0,068	—	0,290	0,264	0,340
	3	0,064	—	0,304	0,231	0,290
Rastvorljivi azot (%) Dissolving Nitrogen	1	0,215	0,258	0,340	—	0,342
	2	0,204	0,284	0,330	0,391	0,404
	3	0,207	0,219	0,284	0,350	0,386
NaCl (%)	1	0,63	1,98	1,52	1,79	2,05
	2	0,50	2,04	1,69	1,97	2,21
	3	0,33	2,16	1,48	1,66	2,10
pH	1	5,43	5,33	5,24	5,24	5,30
	2	5,52	5,49	5,44	5,32	5,36
	3	5,44	5,35	5,32	5,39	5,42

Najviši sadržaj vode prvog dana po proizvodnji sireva bio je kod kontrolnog uzorka (40,5%), a najniži kod uzorka 3 (39,6%), dok je uzorak 2 sadržao 40,0% vode (tablica 3). Tokom procesa zrenja sadržaj vode se kod svih uzoraka smanjivao i taj intenzitet je bio najizrazitiji između 15. i 45. dana zrenja. Kod uzorka 1, čiji je početni sadržaj vode bio najniži, intenzitet smanjenja sadržaja vode je i najslabiji (0,4%). Šezdesetog dana po proizvodnji sadržaj vode je kod uzorka 1 iznosio 37,8%, dok se kod uzorka 2 i 3 zanemarljivo razlikovao (38,3 i 38,2%).

Najviša pH vrednost prvog dana nakon proizvodnje sireva konstatovana je kod uzorka 2 (pH = 5,52), a pH vrednost uzorka 1 je bliska pH vrednosti kontrolnog uzorka i iznosi 5,43 odnosno 5,44. Tokom perioda zrenja dolazi do daljeg opadanja kiselosti sira kao posledica fermentacije laktoze, naročito u prvim danima zrenja, a potom i razgradnje proteina (Kosikowski, 1975) i takva tendencija je održavana sve do 45. dana zrenja. Pri tome je došlo do izrazitijeg povećanja kiselosti kod uzorka 1 i 2, kojima su dodati proteolitički enzimi, u odnosu na kontrolni uzorak. Usled dalje razgradnje polipeptida i peptida, do koje dolazi u kasnom periodu zrenja, nastaju bazni amonijačni produkti razgradnje koji povećavaju pH vrednosti sira, što je evidentno iz podataka navedenih u tabeli 3 za 60. dan zrenja.

Kao posledica sadržaja mlečne masti u mleku za podsiravanje, pojavile su se i razlike u sadržaju mlečne masti proizvedenih sireva, kao i u sadržaju ove komponente u suvoj materiji sira (tablica 3). Prvog dana po proizvodnji sadržaj mlečne masti uzorka 1 i kontrolnog uzorka je isti (30,5%), dok je uzorak 2 sadržavao za 0,5% više mlečne masti. Daljim zrenjem, kao posledica isušivanja proizvoda dolazi do povećanja apsolutnog udela mlečne masti kod svih uzoraka. Sadržaj mlečne masti u suvoj materiji pokazuje konstantni pad u odnosu na početni period zrenja i izrazitiji je kod eksperimentalnih uzoraka 1 i 2 (0,65 i 0,61%) nego kod kontrolnog uzorka (0,29%).

Intenzitet lipolitičkih promena tokom zrenja zavisi od sadržaja masti i vrste i količine enzima u siru. Lipolitička razgradnja mlečne masti ne ide nikada do kraja, jer oslobođene masne kiseline deluju inhibitorno na dalji proces razgradnje (Moore, 1978.). Na osnovu rezultata prikazanih u tablici 3 nakon proizvodnje Gruyèrea najmanji sadržaj isparljivih masnih kiselina je u kontrolnom uzorku (7 ml N/10 NaOH/100 g sira), dok uzorak 1 sadrži 12,0, a uzorak 2-10,0 ml N/10 NaOH/100 g sira. Tokom 60 dana zrenja kod svih uzoraka dolazi do variranja sadržaja isparljivih masnih kiselina s nepravilnostima u trendu rasta od početne vrednosti.

Analogno promenama sadržaja isparljivih masnih kiselina tokom zrenja dolazi i do variranja sadržaja slobodnih masnih kiselina. Dobijeni rezultati (tabela 3) su u skladu s istraživanjima Jolly, Kosikowskog (1975), Satoa i sar. (1966.) i King, Clegga (1977.), koji su takođe konstatovali nepravilnosti u sadržaju slobodnih masnih kiselina tokom zrenja Blue sira, kao i postojanje jednog maksimuma koncentracije slobodnih masnih kiselina nakon kojeg verovatno dolazi do oksidacije u metil ketone i opadanja njihovog sadržaja u siru. Generalno posmatrajući rezultate za sadržaj slobodnih masnih kiselina prikazane u tablici 3, može se zaključiti da tokom zrenja Gruyèrea

dolazi do povećanja sadržaja u svim uzorcima, ali da je ono različito između uzoraka kao i u okviru samih uzoraka.

Sadržaj ukupnih proteina 1 dan nakon proizvodnje sireva iznosio je 26,18, 24,55 i 25,49% u uzorcima 1, 2 i 3, respektivno (tablica 3). Tokom zrenja sadržaj proteina se povećavao pri čemu je najveća promena zabeležena nakon prvih 15 dana zrenja, da bi taj porast u kasnijem periodu bio usporen. To je s jedne strane posledica većeg isušivanja sira na početku zrenja, a s druge izrazitije proteolize u kasnijem periodu zrenja i oslobađanja stvorenog amonijaka (K o s i k o w s k i, 1975.). Tu konstataciju potvrđuju i podaci za sadržaj neproteinskog azota (tablica 3) koji s napredovanjem procesa zrenja naglo raste. Nagli skok neproteinskog azota zabeležen je 30 dana nakon proizvodnje, a ista tendencija je zadržana do 45. dana zrenja, da bi 60 dana po proizvodnji sadržaj NPN kod uzoraka 1 i 2 iznosio 0,30 odnosno 0,34%, a kod kontrolnog 0,29%.

Kod svih ispitivanih uzoraka uočljiv je pravilan porast sadržaja rastvorljivog azota tokom ukupnog perioda zrenja. Najveći skok sadržaja rastvorljivog azota zabeležen je u prvih 30 dana zrenja, i to kod svih uzoraka, da bi kasnije taj porast bio znatno usporen. Kontrolni uzorak je u odnosu na ostale uzorke sadržao najmanje rastvorljivog azota, i to u svakom ispitivanom periodu.

Obzirom na svoje bakteriostatsko svojstvo, sadržaj NaCl u siru je jedan od presudnih faktora koji utiču na tok biohemijskih procesa u siru tokom perioda zrenja. Prvog dana nakon proizvodnje taj sadržaj je bio najmanji, sasvim logično, obzirom da još nije bila izvršena operacija soljenja sira (tablica 3). Sadržaj natrijum hlorida je posle soljenja povećan kod svih uzoraka u proseku za 15%. Obzirom na šaržni način proizvodnje najmanji sadržaj NaCl po završetku salamurenja bio je kod uzorka 1 (1,98%), a najveći kod kontrolnog uzorka (2,16%). Daljim tokom perioda zrenja, nakon 30 dana, zabeležen je nagli pad sadržaja kuhinjske soli u svim sirevima kao posledica sinerezisa i izdvajanja viška NaCl na površini sira. S nastavkom zrenja dolazi do ponovnog povećanja udela NaCl u suvoj materiji sira usled produženog isušivanja odnosno gubitka vode i povećanja suve materije sireva.

Na osnovu ocene organoleptičkog kvaliteta uzoraka 1—3 nakon 60 dana zrenja na temperaturi od 14 °C i relativnoj vlažnosti vazduha u komori za zrenje sira od 85%, može se konstatovati da se kvalitet proizvedenih sireva nalazi u intervalu ukupnog broja poena od 15,0 (uzorak 1) do 16,50 poena (kontrolni uzorak). Relativno mala razlika u ukupnom broju poena za ocenjeni kvalitet eksperimentalnih sireva i kontrolnog sira navodi na zaključak da je dodata količina enzima ispod optimalne koncentracije, da bi efekat njihovog delovanja na kvalitet bio jače izražen.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja mogućnosti ubrzanja procesa zrenja sira Gruyère dodatkom različitih koncentracija proteolitičkog enzima Novozym 257 može se zaključiti da tokom 60 dana zrenja dolazi do: opadanja pH vrednosti kao posledica fermentacije laktoze, nepravilnog povećanja isparljivih i slobodnih masnih kiselina, intenzivnog povećanja sadržaja ukupnih proteina u toku 15 dana zrenja zbog većeg gubitka vode, pravilnog rasta sadržaja rastvorljivog azota, a izrazitog povećanja neproteinskog azota 30. dana po proizvodnji.

Dobijeni rezultati ukazuju na prednost primene enzima za ubrzanje zrenja u tehnologiji sira. Efekat delovanja proteolitičkog enzima na kvalitet sira bio bi verovatno jače izražen dodatkom veće koncentracije enzima u gruše posle delimičnog ili potpunog odvajanja surutke.

Literatura

- GODIHO, M., FOX, P. F. (1981): *Milchwissenschaft*, **36**, 476—478.
- FOX, P. F. (1981): *Netherlands Miln. Dairy J.*, **355**, 233.
- JOLLY, R. C., KOSIKOWSKI, F. V. (1975): *Journal of Dairy Science*, **58**, 846.
- LAW, B. A., WIGMORE, A. (1982): *Journal of Dairy Research*, **49**, 137—146.
- LAW, B. A. (1980): *Dairy Industries International*, **45**, 15—22, 48.
- KING, R. D., CLEGG, G. H. (1977): *Journal of Science of Food Agriculture*, **30**, 197.
- KOSIKOWSKI, F. V. (1975): *Journal of Dairy Science*, **58**, 994—1000.
- MARJANOVIĆ, N., JANKOVITŠ, I.: Instrumentalne metode analize, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1983.
- MOORE, J. H.: XX Int. Dairy Congress, Paris, 1978.
- PEJIĆ, O., ĐORĐEVIĆ, J.: Mlekarski praktikum, Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd, 1973.
- Pravilnik o kvalitetu mleka, proizvoda od mleka, sirila i čistih kultura, Sl. list SFRJ, Br. 51, 1982.
- SATO, M., HONDA, T., YAMADA, Y., TAKUDA, A., KAWANAMI, T.: XVII Int. Dairy Congress, D-2, 1966.
- SMILEY, K. L., KOSIKOWSKI, F. V., DAHLBERG, A. C. (1946): **29**, 307—315.
- VAKALERIS, D. G., PRICE, W. V. (1959): *Journal of Dairy Science*, **42**, 264—279.