

Proizvodnja i upotreba domaćeg enzima mikrobnog podrijetla* (Production and Use of Domestic Microbial Rennet)

Jožica FRIEDRICH, Nina GUNDE-CIMERMAN, Kemijski inštitut
»Boris Kidrič«, Ljubljana

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 20. 8. 1986.

UDK: 637.3

Sažetak

*U uvodu je ukratko prikazana problematika upotrebe enzima mikrobnog podrijetla u proizvodnji sireva. U suradnji sa tvornicom lijekova »KRKA« u Novom Mestu na Kemijskom inštitutu »Boris Kidrič« vrše se pokusi submerzne fermentativne proizvodnje enzima mikrobnog podrijetla uz pomoć gljive *Rhizomucor miehei*. Prikazane su promjene enzimatskih aktivnosti u fermentacijskoj komini u toku fermentacije u laboratorijskom fermentoru. Sirovi enzimski pripravak je okarakteriziran u usporedbi sa domaćim i uvoznim telećim sirilom i sa mikrobnim pripravkom renilaza danske firme »NOVO«. Domaći enzimski pripravak ima pogodne osobine za upotrebu u domaćoj sirarskoj industriji.*

Summary

*Briefly the problems of the use of microbial rennets in cheese manufacturing are presented. In collaboration with the pharmaceutical factory »KRKA« in Novo Mesto and the »Boris Kidrič« Chemical Institute in Ljubljana experiments of submerged production of *Rhizomucor miehei* rennet have been carried out. Changes of enzyme activities in the fermentation broth during fermentation in a laboratory fermenter are given. The raw enzyme is characterized in comparison with a Yugoslav and an Austrian calf rennet and the microbial enzyme Rennilase, »NOVO«, Denmark. The enzyme preparation has suitable properties and could be used in cheese production.*

Uvod

Već prije dvije godine, na XXII mljekarskom seminaru u Zagrebu, bili su prikazani rezultati naših pokusa proizvodnje enzima mikrobnog podrijetla. Poznato je da je standardni i najkvalitetniji enzim za koagulaciju mlijeka još uvijek teleće sirilo koje zbog nedostatka i visoke cijene sve češće zamjenjujemo proteolitičkim enzimima drugih izvora. Najvažnije svojstvo pogodne zamjene je visoka sposobnost koagulacije kazeina i istovremeno što niža nespecifična proteolitička aktivnost. Ona, naime, katalizira cijepljenje proteinskih molekula do peptida koji siru kvare organoleptička svojstva i istovremeno, zbog prejake hidrolize, smanjuju iskorištenje. Po tim svojstvima telećem sirilu su najbliže proteaze gljiva iz roda *Rhizomucor* (Arima, et al., 1967).

* Rad je djelomično prikazan kao predavanje na XXIV Seminaru za mljekarsku industriju, Opatija, 1986.

U našoj zemlji još nitko ne proizvodi sirilo mikrobnog podrijetla, iako se u nekim sirarskim pogonima već upotrebljavaju uvozni pripravci, npr. renilaza i fromaza. Na Kemijskom institutu »Boris Kidrič« u Ljubljani se, na poticaj kolega iz Ljubljanskih mljekara, počelo raditi na istraživanjima u dobivanju enzima za sirenje uz pomoć gljiva. Zanimanje za taj rad pokazala je i tvornica lijekova »KRKA« u Novom Mestu koja surađuje u proizvodnji enzima u industrijskom opsegu.

Od prvog izvještaja (Cimerman i Kopitar, 1984) naš je rad osjetno napredovao. Poslije testiranja mnogih sojeva različitih gljiva i različitih supstrata izabran je najefikasniji proizvođač — gljiva *Rhizomucor miehei* i optimalni supstrat za fermentaciju.

Eksperimentalni dio

U svim pokusima proizvodnje sirila mikrobnog podrijetla upotrijebljena je gljiva *Rhizomucor miehei* NRRL 5283 koja u Zbirci Kemijskog instituta »Boris Kidrič« nosi oznaku B 196. Gljiva raste na kosom krumpir-glukoznom agaru kod 35 °C, a čuva se kod 4 °C.

Inokulum za fermentaciju priprema se iz suspenzije spora ($5 \cdot 10^7$ spora/ml) : 2 ml suspenzije spora za inokulaciju 100 ml supstrata. Supstrat sadrži pšenične mekinje sa dodacima (Friedrich, et al., 1985). Fermentacije su izvedene u 5 l laboratorijskom fermentoru tvrtke Bioengineering, uz miješanje i zračenje.

Aktivnost koagulacije i proteolitička aktivnost mjereni su prema Arimi i suradnicima (1967, 1968), lipolitička aktivnost po metodi Somkutija i suradnika (1969).

»Specifična aktivnost« je razmjer između koagulacijske i proteolitičke aktivnosti.

Pri karakterizaciji enzima mjerena je utjecaj temperature, pH i Ca klorida na aktivnost koagulacije (prospekti firme »NOVO«).

Uz domaći enzimski pripravak (DEP) upotrijebljeni su slijedeći enzimi:

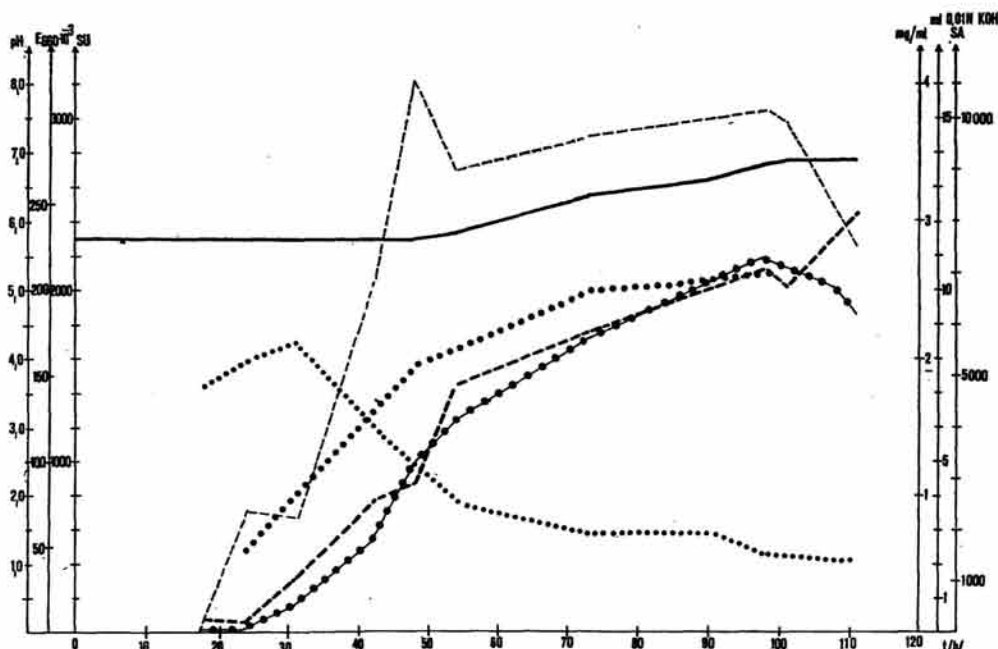
- Astra — teleće sirilo
- austrijsko teleće sirilo (Jozef Hundsbichler Reines Naturlab),
- renilaza (Rennilase, Novo, Denmark).

DEP je upotrijebljen kao nekoncentrirani sirovi enzimski preparat (filtrat) i kao ultrafiltracijom koncentrirani pripravak.

Rezultati

Pregled rezultata fermentacija u laboratorijskom fermentoru

Praćene su promjene u komini za fermentaciju tijekom fermentacije u 5 l laboratorijskom fermentoru. Rezultat jednog od pokusa prikazan je na grafikonu 1.



Grafikon 1. Parametri submerzne fermentacije kod proizvodnje mikrobnog sirila
Figure 1. Parameters of Submerged Fermentation During the Production of Microbial Rennet

Legenda:

Legends:

- Aktivnost koagulacije (SU)
Milk Clotting Activity (SU)
- Proteolitička aktivnost (E₆₆₀)
Proteolytic Activity (E₆₆₀)
- Specifična aktivnost
Specific Activity
- pH
- Topljive bjelančevine (mg/ml)
Soluble Proteins (mg/ml)
- Lipolitička aktivnost (ml 0,01 M KOH)
Lipolytic Activity

Iz grafikona 1 vidi se da je proizvodnja enzima (krivulja za jakost sirila) počela po prvom danu fermentacije rasti i rasla je sve do kraja 4. dana. Krivulja koja prikazuje nespecifičnu proteolitičku aktivnost ima slični smjer, samo što na kraju fermentacije još raste. Omjer između koagulacijske i proteolitičke aktivnosti (tj. specifična aktivnost) mora biti što veći. Taj je razmjer bio najveći poslije 48 sati fermentacije, ali je koagulacijska aktivnost bila još uvijek niska.

S obzirom na to, najpogodnije vrijeme u datim uvjetima bilo je oko 100 sati (približno 4 dana).

Poslije 48 sati pH vrijednosti su počele rasti i poslije 4 dana dostigle su vrijednosti ispod 7. Zanimljiva je i krivulja koja prikazuje lipolitičku aktivnost. Lipolitička aktivnost je nepoželjna jer uzrokuje užežen okus sira. Pojavi se prije proteolitičke aktivnosti, i njezin se rast prije završi. Lipolitička aktivnost je, u odnosu na koagulacijsku aktivnost, niža na kraju fermentacije nego na početku. Iz vremenske krivulje za pojedinačne aktivnosti vidi se da je bitno pravovremeno završiti fermentaciju.

Važnija svojstva domaćeg enzimskog pripravka

Iz fermentacijske komine filtriranjem je bio pripremljen sirovi enzimski pripravak. Taj smo pripravak uspoređivali sa enzimima koji se upotrebljavaju u našim sirarskim pogonima (domaće teleće sirilo, austrijsko teleće sirilo i danski mikrobnii pripravak renilaza). Svojstva smo prikazali uz pomoć tri parametra: utjecaj temperature, pH i koncentracije Ca^{2+} iona u mlijeku na aktivnost enzima.

U tablici 1. prikazana je ovisnost vremena koagulacije o temperaturi mlijeka u procesu sirenja.

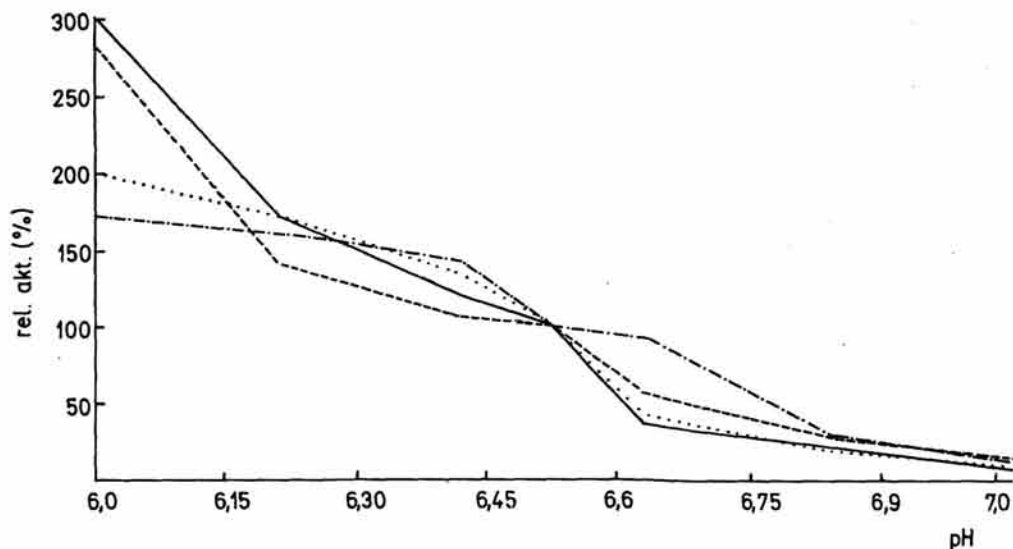
Tablica 1. Vrijeme koagulacije (s) u ovisnosti o temperaturi mlijeka (°C)

Table 1. Coagulation time (s) in relation to the temperature of milk (°C)

Temperatura Temperature	Vrijeme koagulacije Coagulation Time			
	DEP (nekoncentriran) Laboratory Enzyme Preparation (Unconcentrated)	Astra (1:100) Astra	Teleće sirilo (1:100) Calf Rennet	Renilaza (1:200) Rennilase
25	57	72	70	35
30	31	45	41	24
35	19	32	31	12
40	10	25	26	9,5
45	6	18	20	7,6
50	5	11	10	4,6
55	4,9	10,5	8	4
60	3,9	7,5	7,5	2,4
65	3,3	5,5	5	0,8
70		4	5	0,6

Uz dodatak svih enzima, mlijeko se brže usiri kod povećane temperature. Ako pogledamo promjene u vremenu koagulacije, vidimo da su kod obično upotrijebljenih temperatura od 30 ° do 35 °C najveće razlike kod renilaze (skraćenje za oko 50%) i kod našeg enzimskog pripravka (skraćenje za oko 40%). Najmanja razlika je kod austrijskog pripravka (24%). To znači da s povećanjem temperature najviše možemo utjecati na aktivnost mikrobnog sirila.

Na grafikonu 2 prikazan je utjecaj pH vrijednosti mlijeka (u rasponu od 6 do 7) na relativnu aktivnost sirila. Relativnu aktivnost izračunali smo s obzirom na aktivnost kod $\text{pH} = 6,5$, koja je uobičajena kod analiza, i uzeli smo je kao 100%. Sva mjerenja obavljena su pri temperaturi od 35°C .



Grafikon 2. Utjecaj pH vrijednosti mlijeka na aktivnost koagulacije

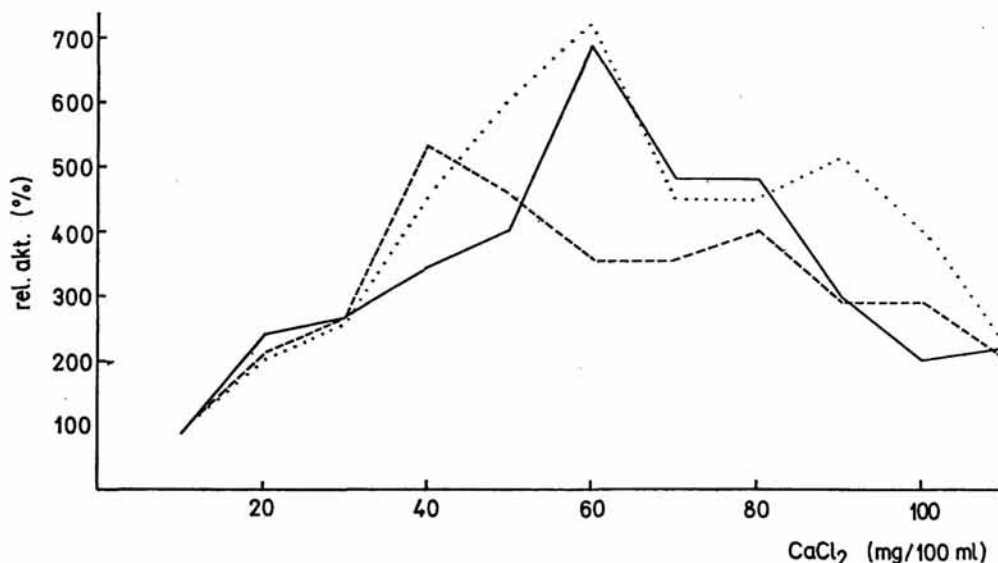
Figure 2. Effect of the pH Values of the Milk on Milk Clotting Activities

Legenda:
Legends:

- Domaći enzimski pripravak (DEP)
- Laboratory Enzyme Preparation (DEP)
- Astra-teleći enzim
- Astra-Calf Enzyme
- Austrijski teleći enzim
- Austrian Calf Enzyme
- Rennilase, Novo
- Rennilase, Novo

Iz grafikona 2 vidi se da je aktivnost sirila veća što je niža pH vrijednost mlijeka i obrnuto. Utjecaj pH je kod našeg pripravka vrlo izrazit, krivulja je slična krivulji za uvozno teleće sirilo, ali se aktivnost renilaze sa pH varijacijama u mlijeku najmanje mijenja.

Utjecaj koncentracije dodatog Ca-klorida na aktivnost mlijeka prikazan je na grafikonu 3. Mlijeku je dodano od 0 do 110 mg $\text{CaCl}_2/100$ ml mlijeka. Od svih primjera, vrijeme koagulacije je bitno duže kod mlijeka bez dodatka CaCl_2 . Ako se uzmu u obzir samo početne i konačne vrijednosti, možemo reći da smo dodatkom kalcijeva klorida najviše skratili vrijeme usirenja kod oba mikroba pripravka. Dodatak CaCl_2 je najmanje utjecao na aktivnost telećeg sirila.



Grafikon 3. Utjecaj CaCl_2 u mlijeku na aktivnost koagulacije
 Figure 3. Effect of CaCl_2 of the Milk on Milk Clotting Activities

Legenda:
Legends:

- Domaći enzimski pripravak (DEP)
 Laboratory Enzyme Preparation (DEP)
- Astra-teleći enzim
 Astra-Calf Enzyme
- Austrijanski teleći enzim
 Austrian Calf Enzyme

Svi prikazani rezultati slažu se sa podacima iz literature o svojstvima mikrobnog sirila. Potvrdili smo ih i pokusima sirenja u industrijskim pogonima.

Upotreba domaćeg enzimskog pripravka u sirarskim pogonima

Uvjeti kod upotrebe domaćeg enzimskog pripravka u sirarskim pogonima sabrani su u tablici 2.

Kod sirenja mlijeka sa nižom temperaturom i nižim stupnjem kiselosti i sa nižom koncentracijom Ca^{2+} iona u mlijeku, morali smo dodati veću količinu enzima nego u pogonima gdje usiruju mlijeko kod viših temperatura, veće kiselosti i sa većom koncentracijom Ca^{2+} iona.

Odnos između količine mlijeka i količine enzima kojima možemo usiriti mlijeko u velikoj mjeri ovisi o uvjetima sirenja. Organoleptička svojstva sireva proizvedenih sa našim pripravkom vrlo su pogodna u odnosu na proizvode uobičajene proizvodnje. Istraživanja nastavljamo u smjeru poboljšavanja jačine našeg enzima. Uvjereni smo da ćemo poboljšavanjem uvjeta uzgoja i postupaka za izolaciju i koncentriranje enzima dobiti još pogodniji enzimski

Tablica 2. Uvjeti kod upotrebe domaćeg enzimskog pripravka u sirarskim pogonima
 Table 2. Conditions for the Use of the Domestic Enzyme Preparation in Cheese Plants

Pogon	Plant	Broj pokusa	Number of Experiment	Temperatura mljeka (°C)	Milk Temperature (°C)	Kiselost mljeka (SH)	Milk Acidity (SH)	Vrijeme koagulacije standardni uslovi, 1:10 (s)	Vrijeme koagulacije pogonski uslovi 1:10 (s)	Vrijeme koagulacije do rezanja (min)	Coagulation Time till Cutting (min)	Jaćina sirtla	Strength of Rennet	Vrsta sirtla	Cheese Sorts
A		1		34		—	—	20*	60	3000	39	1: 410	1: 410	Tvrđi	Hard
B		1		34		7,8	7,8	12	20	3250	30	1: 590	1: 590	Polutvrđi	Semi hard
		2		34		—	—	12	18	3400	28	1:1215	1:1215	Polutvrđi	Semi hard
		3		34		7,9	7,9	13,5	23	5000	36	1:1040	1:1040	Polutvrđi	Semi hard
		4		33		8,0	8,0	5,0	7	5000	28	1:4165	1:4165	Polutvrđi	Semi hard
		5		32		8,4	8,4	5,0	6	5000	38	1:6250	1:6250	Polutvrđi	Semi hard
C		1		32		6,8	6,8	—	18	3500	35	1:1165	1:1165	Meki	Soft
		2		30		7,2	7,2	4,8	11	5000	45	1:5000	1:5000	Polutvrđi	Semi hard
		3		30		7,4	7,4	4,8	17	5000	36	1:4165	1:4165	Polutvrđi	Semi hard

* Početni pokusi bili su izvedeni sa nekonzentriranim filtratom, a kasnije smo radili sa ultrafiltracijom koncentriranim enzimom

pripravak. Radimo i na poboljšavanju proizvodnih sojeva uz pomoć modernih genetskih metoda.

Zaključak

Ukratko možemo reći da je domaće mikrobno sirilo po svojstvima vrlo slično uvoznom enzimskom pripravku »Rennilase« i drugim komercijalnim pripravcima i da su date sve mogućnosti da se pripravak može industrijski proizvoditi u najkraćem vremenu.

Zahvala

Zahvaljujemo se Tvornici lijekova »Krka«, osobito drugu inž. Branku Filipoviću za suradnju.

Literatura

- ARIMA, K., et al. (1967): *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 5, 540—545.
ARIMA, K., et al. (1968): *Appl. Microbiol.*, **16**, 1727—1733.
CIMERMAN, A., KOPITAR, V. (1984): *Mljekarstvo*, **34**, 6, 163—176.
FRIEDRICH, J., et al.: Patentna prijava, 914/85, 1985.
Novo — Rennilase, prospekti firme NOVO.
SOMKUTI, A., et al. (1969): *Appl. Microbiol.*, **17**, 606—610.

U znak priznanja za doprinos aktivnostima naučnika iz oblasti mikrostrukture hrane, prof. dr. M. Carić, Tehnološki fakultet, Novi Sad, je izabrana u Urednički odbor međunarodnog časopisa »Food Microstructure«. Izbor je izvršen na Međunarodnom godišnjem skupu u New Orleans-u, Louisiana, SAD.

U maju 1987. godine će se održati naučni skup o mikrostrukтури hrane, u Hamilton-u, Ontario, Canada.

Sve informacije o ovom skupu, kao i o časopisu, mogu se dobiti direktno od prof. dr. M. Carić.

Dr. Miloslav Kalab
