

Literatura

1. Alais Ch.: Science du lait. Principes des techniques laitieres, Sep, Paris, 1974.
2. Cantin Ch.: Guide pratiques des fromages Solar, Paris, 1976.
3. Davis J. G.: Cheese, Vol III, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 1976.
4. Devendra C.: **J. Dairy Res.** 39, 351, 1972.
5. Dozet N.: **Mljekarstvo** 23 (1) 1973.
6. Dozet N., Stanišić M., Bijeljac S.: **Polj. znanstvena smotra XXXI**, Zagreb, 1974.
7. French M. H.: Observations on the goat, FAO Agricultural studies, no. 80, Rome, 1970.
8. Imam A., Shazly A. E., Abdou S.: **Milchwissenschaft** 10, 1974.
9. Mahieu H., Jaouen J. C., Luquet F. M., Mauillet L.: **Le lait** 568, 1977.
10. Parkach S., Jenness R.: **Dairy Sci. Abstr.** 30 (2) 67—87, 1968.
11. Randoïn L., Jourdan C.: **Le lait** 319—320, 1952.
12. Veisseyre R.: Technologie du lait, La maison rustique — Paris, 1975.

ELEKTROFORETSKO ISPITIVANJE RAZGRADNJE PROTEINA MLEKA TOKOM ZRENJA NOVOSADSKOG SIRA PROIZVEDENOG PRIMENOM RENILAZE*

Dr Marijana CARIC, Dragoljub GAVARIC, dipl. ing., Spasenija MARIĆ, dipl. ing. Gizela VIC, dipl. ing. Tehnološki fakultet, Novi Sad

1. Uvod

U procesu proizvodnje sira, kao što je poznato, za koagulaciju kazeina koriste se himozin, proteolitički enzim koji je zbog svog porekla veoma skup, na tržištu se nalazi u ograničenim količinama i često je lošeg kvaliteta. Posljednjih godina u svetu se, u cilju eliminisanja ovih nedostataka, razvija proizvodnja proteolitičkih preparata mikrobiološkog porekla kao zamena himozinu. Do sada je utvrđeno oko 40 mikroorganizama čiji enzimi samostalno ili kombinovani, mogu da se koriste u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Imajući u vidu sledeće zahteve kojima mora da odgovara neki preparat da bi mogao da zameni himozin:

- ne sme biti opasan za ljudsko zdravlje
 - ne sme zahtevati bitne promene u tehnološkom procesu proizvodnje sira
 - ne sme dovesti do manjeg iskorišćenja polazne sirovine
 - kvalitet sira ne sme da bude slabiji nego kod tradicionalnog postupka
- utvrđeno je da renilaza, enzim izolovan iz plesni *Mucor miehei*, daje najbolje rezultate.

Komercijalni preparat renilaze proizvodi se kao bistra, mrka tečnost ili kao žučkast prah u vodi lako rastvorljiv. Aktivnost tečnog preparata se izražava u Rennet — Units (RU) po ml ili po gramu kod praha.

Delovanje renilaze na kazein (1, 3, 4, 7, 15) odvija se u tri faze: u prvoj fazi dolazi do visoko specifične proteolize κ -kazeina, čime je narušeno stabilizujuće dejstvo ove frakcije na micelu kazeina. U drugoj fazi se od κ -kazeina odvaja glikomakropeptid, a u trećoj fazi dolazi do nespecifične proteolize koja teče paralelno sa prvom i drugom fazom, a nastavlja se u toku zrenja sira.

Vanderpoorten i Weckx (17) su analizirali delovanje raznih proteolitičkih enzima na kazein metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu i ustanovili

* Referat održan na XVI Seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb 1978.

da se prva faza razgradnje kazeina delovanjem renilaze i animalnih proteolitičkih enzima odvija na potpuno isti način. U toku dalje proteolize α_s frakcija se brže razgrađuje kod uzoraka koaguliranih animalnim enzimima, ali je razgradnja ukupnih belančevina intenzivnija kod uzoraka koaguliranih renilazom, tako da randman ostaje isti.

Elektroforetska ispitivanja u model sistemima (6) su pokazala da enzimi himozin, pepsin i renilaza deluju isključivo na κ -kazein i dobijeni razgradni produkti su po elektroforetskoj pokretljivosti i koncentraciji približno isti kao koagulacije kazeina svim ispitivanim enzimima.

Delovanje renilaze u toku podsiravanja, kao i kvalitet gotovog proizvoda, zavise od temperature mleka, pH-vrednosti, količine dodatoga CaCl_2 , vrste dodate kulture i drugih faktora.

U intervalu od 25 — 30 °C uticaj temperature na vreme koagulacije mleka je identičan za renilazu i animalne enzime, dok je pri temperaturama iznad 35 °C nađena veća koagulišuća moć renilaze (10).

Smanjenjem pH-vrednosti mleka do 6,4 koagulišuća moć renilaze i animalnih enzima se povećava u istoj meri, dok je nađeno da aktivnost renilaze sporije raste smanjenjem pH-vrednosti ispod 6,3, jer je koagulišuća moć renilaze osetljiva na promene pH-vrednosti (11).

Koagulišuća moć renilaze se povećava dodatkom CaCl_2 u mleko analogno povećanju koagulišuće moći himozina. (11, 18).

Uz primenu renilaze može se u većini slučajeva koristiti ista kultura, neophodna za proces zrenja sira, kao i uz primenu himozina. Novija istraživanja potvrđuju gledište da određena kultura u određenoj mlekari može da izazove varijante gorkog ukusa u zrelom siru, bilo da je proizveden upotrebom renilaze ili himozina, dok ista ta kultura u nekoj drugoj mlekari može dati dobre rezultate. Uzrok tome su razlike u sastavu mleka i razlike u tehnološkom procesu proizvodnje. (10).

Na osnovu komparativnih ispitivanja koagulacije kazeina u model sistemima himozinom, renilazom i pepsinom iste aktivnosti (5) na temperaturi 30 °C u vremenu od 30 min. ustanovljeno je da je količina vezanog kalcijuma približno ista, a količina azota u serumu posle koagulacije pepsinom iznosi 0,45%, renilazom 0,053% i himozinom 0,068% što kazuje da bi se upotrebom renilaze dobio znatno veći randman sira.

U literaturi se mogu naći podaci o primeni renilaze u procesu proizvodnje ementalera, (9), edamskog sira (4), trapista, kačkavalja, belog sira (14) i tilzit-skog sira (15) koji je po svojim osobinama najbliži novosadskom.

Cilj našeg rada je bio da se ispita mogućnost proizvodnje novosadskog sira uz primenu renilaze, odnosno uticaj koji ova izmena u tehnološkom procesu proizvodnje ima na tok zrenja, posebno razgradnju proteina i na kvalitet gotovog proizvoda.

2. Metoda istraživanja

Ispitivanja su vršena na novosadskom siru proizvedenom uz primenu renilaze, i uz primenu himozina kao kontrolnog uzorka, po uobičajenom tehnološkom postupku. Ovaj industrijski ogled je urađen u pogonu »Ljubljanske mlekare« — OOUR Mlekara Novi Sad, pri čemu je izvršeno snimanje tehnološkog procesa proizvodnje sira i evidentiranje osnovnih parametara. Uzorci sireva za hemijska i elektroforetska ispitivanja su uzimani nakon 0, 10, 20, 30 i 40 dana zrenja, a izvršena je i analiza mleka od kojeg su proizvedeni uzorci.

Izvršene su fizičko-kemijske analize mleka:

- procent masti po Gerber-u (12)
- kalcijum, kompleksometrijskom titracijom sa EDTA (2)
- kazein po Kjeldahl-u (12)
- specifična težina laktodenzimetrom (12).

Uzorci sireva I serije koagulisanе renilazom i II serije koagulisanе himozinom, podvrgnuti su sledećim analizama:

- određivanje kiselosti titracijom po Thörner-u (12)
- određivanje sadržaja suve materije direktno na vagi ULRTRA-x i metodom sušenja na 105° C (12)
- određivanje sadržaja masti po van Gulik-u (12)
- određivanje sadržaja ukupnih proteina po Kjeldahl-u (12).

Frakcije kazeina kod uzorka mleka i uzorka sira tokom zrenja od 0—40 dana razdvajane su metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu po metodi Raymond-a (13).

Uzorci sireva I i II serije su organoleptički ocenjivani. U organoleptičkom ocenjivanju su pored saradnika na Tehnologiji mleka Tehnološkog fakulteta, učestvovali i predstavnici novosadske Mlekare.

3. Rezultati i diskusije

Tehnološki proces proizvodnje novosadskog sira prikazan je na Blok šemi.

Prosečne vrednosti rezultata ispitivanja sadržaja suve materije, ukupnih proteina, masti, soli i kiselosti tokom perioda zrenja sireva dobijenih uz primenu renilaze (I serija) i himozina (II serija), dati su u Tabeli 1.

Iz prikazanih rezultata se uočava da je sadržaj suve materije u stalnom porastu kod obe serije sireva: kod I serije početna vrednost za sadržaje suve materije iznosi 52,80% a posle 40 dana zrenja 56,20%, dok se kod II serije kreće od 51,80 do 55,00%. Veći sadržaj suve materije kod sireva I serije se može objasniti povećanim randmanom sira.

Rezultati o sadržaju proteina tokom perioda zrenja pokazuju da je porast ukupnih proteina najizrazitiji u prvih 10 dana zrenja kod obe serije sireva: 46,80% od ukupnog porasta kod I serije a 62,26 % kod II serije. Ako se sadržaj proteina izrazi u odnosu na suhu materiju primećuje se opadanje, što se objašnjava razgradnjom proteina i gubitkom jednog dela azota u obliku gasova (16).

Sadržaj masti je kod obe serije sireva u stalnom porastu usled povećanja sadržaja suve materije.

Iz navedenih rezultata (Tabela 1.) se vidi da je sadržaj soli 0,65% u sirevima I serije što je znatno manje u odnosu na sadržaj soli u II seriji sireva (0,92%). Na kraju ispitivanog perioda zrenja od 40 dana sadržaj soli se povećao na 1,31% (I serija) odnosno 1,51% (II serija).

Titraciona kiselost se tokom zrenja povećava kod obe serije sireva, da bi dostigla maksimalnu vrednost 203,60 °T posle 30 dana zrenja kod I serije odnosno 216,24 °T već posle 20 dana zrenja kod II serije.

Rezultati elektroforeze kazeina prikazani su na Slikama 1 i 2, njihovi odgovarajući elektroferogrami na Dijagramima 1, 1a, 2 i 2a i relativni udeli pojedinih frakcija kazeina dobijenih elektroforezom u Tabeli 2.

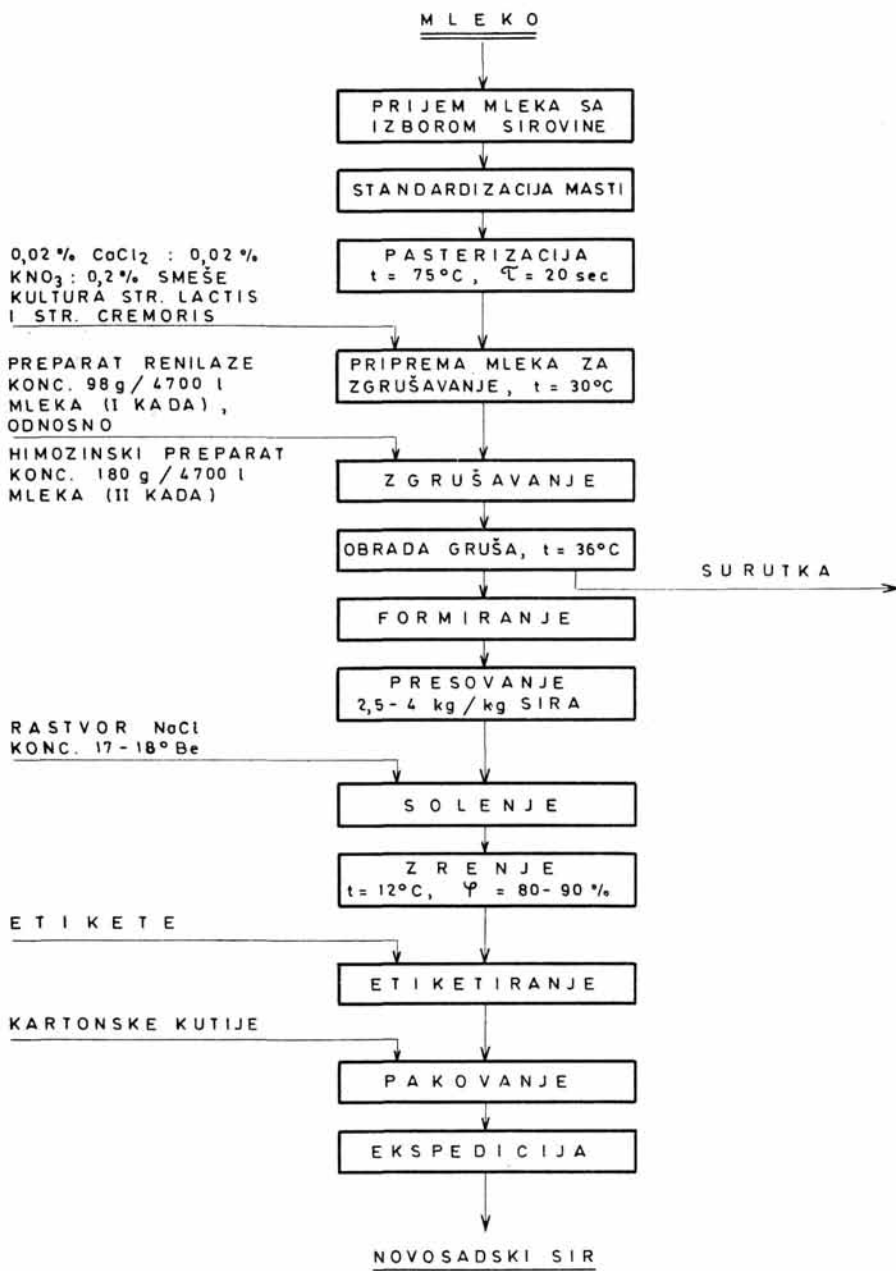
Elektroforezom mleka (Tabela 2) ustanovljeno je da se α_s frakcija kazeina sastoji iz dve komponente različite elektroforetske pokretljivosti čiji relativni udeli iznose 32,00% i 20,07%. Zbog slabog odvajanja α kazeina u ispitivanom slučaju dobijen je neočekivano veći udeo β kazeina (47,47%) i mali udeo α kazeina (0,37%).

Tabela 1. — Promena sadržaja suve materije, ukupnih proteina, masti, soli i kiselosti tokom perioda zrenja sireva od 0—40 dana; serija I koagulirana renilazom i serija II koagulirana himozinom

KOMPONENTA	PERIOD ZRENJA (DAN)									
	0		10		20		30		40	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Suva materija ‰	52,80	51,81	53,90	52,80	54,20	53,40	55,40	54,10	56,20	55,00
Ukupni proteini ‰	27,12	25,89	28,00	27,54	28,28	27,85	28,68	28,20	29,00	28,56
Mast ‰	19,90	19,95	20,50	20,50	20,80	21,05	21,30	21,20	21,70	21,30
So ‰	0,65	0,92	0,95	1,10	1,04	1,37	1,12	1,42	1,31	1,51
Kiselost °T	158,10	134,64	171,00	155,00	185,68	216,24	203,50	199,99	196,39	196,20

Tabela 2. — Relativni udeli pojedinih frakcija kazeina, dobijeni elektroforezom na poliakrilamidnom gelu; serija I koagulirana renilazom i serija II (kontrolna) koagulirana himozinom

PERIOD ZRENJA (DAN)	α_s — KAZEIN (‰)						β — KAZEIN (‰)				γ — KAZEIN (‰)							
	$\alpha_s I$		$\alpha_s II$		$\alpha_s III$		Ukupno		(‰)		A		B		C		UKUPNO	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	26,10	28,30	26,66	25,05			52,76	53,35	46,33	44,98	0,35	0,80	0,28	0,36	0,28	0,51	0,91	1,67
10	8,57	9,44	23,81	22,02	22,12	21,10	54,50	53,06	43,82	43,27	0,55	2,46	0,60	0,60	0,54	0,60	1,69	3,66
20	9,54	10,15	24,87	23,09	19,68	21,03	54,09	54,27	39,00	38,04	5,24	0,02	1,09	1,83	0,57	0,74	6,90	7,59
30	11,85	11,04	25,55	25,22	17,11	20,82	54,46	57,08	39,30	36,87	4,91	4,89	0,74	0,62	0,59	0,54	6,24	6,05
40	12,29	12,96	26,04	16,00	16,46	22,06	54,79	51,02	36,92	40,47	6,51	6,92	0,70	0,45	1,07	1,14	8,28	8,51



BLOK ŠEMA TEHNOLOŠKOG PROCESA PROIZVODNJE
NOVOSADSKOG SIRA



Slika 1. — Snimak gela sa frakcijama kazeina novosadskog sira posle 0 dana zrenja. Prve tri trake odnose se na seriju I koagulisanu renilazom, a druge tri na seriju II (kontrolnu), koagulisanu himozinom



Slika 2. — Snimak gela sa frakcijama kazeina novosadskog sira posle 40 dana zrenja. Prve tri trake odnose se na seriju I, koagulisanu renilazom, a druge tri na seriju II (kontrolnu), koagulisanu himozinom

Kao što se vidi sa Dijagrama 1 i 1a α_s frakcija kazeina se sastoji od dve frakcije α_{sI} i α_{sII} kod obe serije sireva posle 0 dana, dok se posle 10 dana zrenja javlja i treća frakcija kao rezultat proteolitičke razgradnje α_s frakcije kazeina. Relativni udeli ovih frakcija se tokom zrenja menjaju (Tabela 2.) kod obe serije, međutim ukupni relativni udeo α_s frakcije ostaje približno isti i iznosi posle 40 dana zrenja kod I serije 54,79%, a 51,02% kod II serije.

β -frakcija kazeina ostaje tokom zrenja homogena ali se njen relativni udeo stalno smanjuje kao rezultat boljeg odvajanja κ -kazeina. Kod sireva I serije udeo β -frakcije na početku zrenja iznosi 46,33%, a posle 40 dana zrenja 36,92%, dok kod sireva II serije na početku iznosi 44,96% a na kraju 40,47%.

κ -frakcija kazeina se sastoji kod obe serije od tri komponente čiji se relativni udeli menjaju tokom zrenja ali ukupni udeo ove frakcije se povećava.

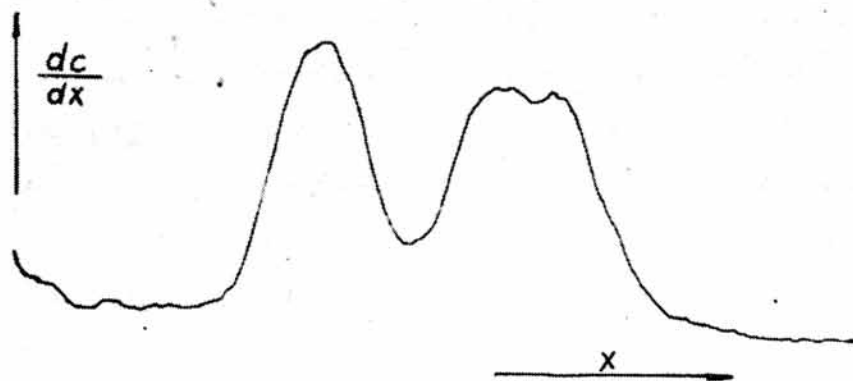


Diagram 1. — Elektroferogram frakcija kazeina probne serije, koagulisane renilazom, posle 0 dana zrenja

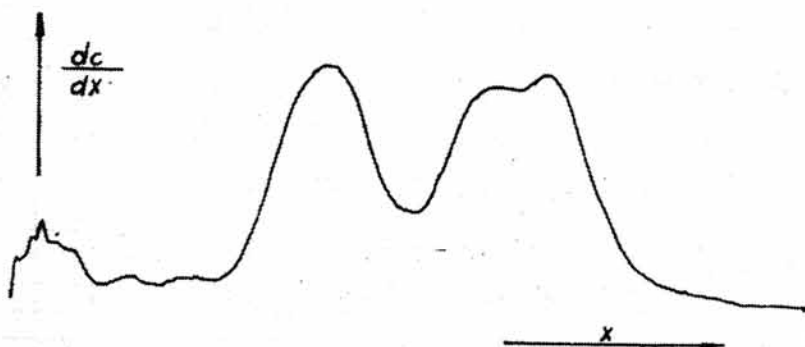


Diagram 1 a) — Elektroferogram frakcija kazeina sira kontrole serije koagulisane himozinom, posle 0 dana zrenja

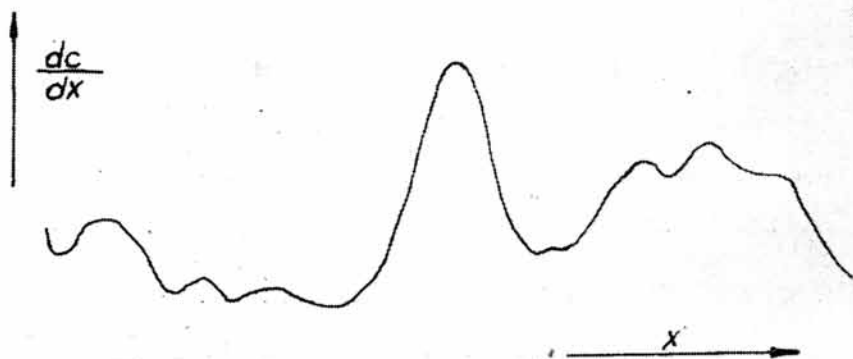


Diagram 2. — Elektroferogram frakcija kazeina sira probne serije koagulisane renilazom posle 40 dana zrenja

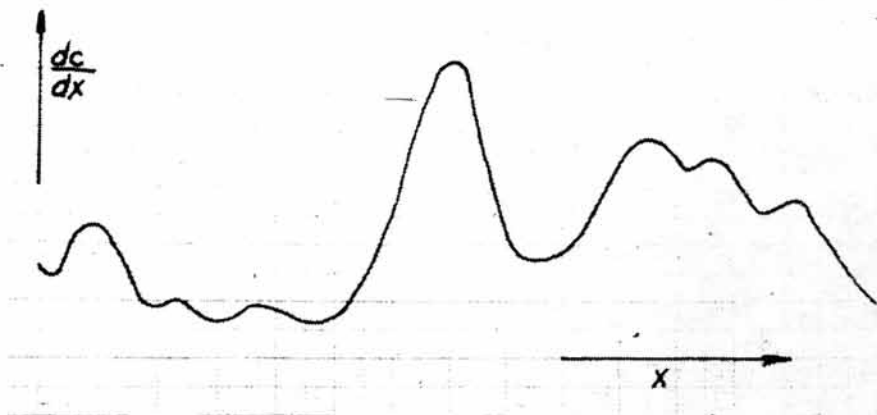


Diagram 2a) — Elektroferogram frakcija kazeina sira kontrolne serije, koagulisane himozinom, posle 40 dana zrenja

Na početku zrenja kod I serije ukupni udeo κ -kazeina iznosi 0,91% a posle 40 dana 8,28%, dok kod II serije 1,67% na početku a 8,51% na kraju perioda zrenja.

Kao što se vidi iz rezultata elektroforeze između I serije koagulisane renilazom i II serije koagulisane himozinom, nema bitnih razlika. Kod obe serije sireva se i u toku koagulacije i u toku zrenja kazein razdvojio na isti broj komponenata, čiji se relativni udeli donekle razlikuju, ali je tendencija njihovog kretanja tokom zrenja identična kod obe serije.

U cilju utvrđivanja eventualnih razlika u kvalitetu sireva dobijenih primenom renilaze i himozina izvršena je organoleptička ocena proizvoda. Ocena za kvalitet sireva I serije, koagulisane renilazom bila je veća od ocene za sireve II serije, koagulisane himozinom.

4. Zaključak

Rezultati uporednih ispitivanja sireva dobijenih koagulacijom renilazom i himozinom pokazuju da nema bitnih razlika u sadržaju i promenama kojima podležu komponente sira. Evidentirane razlike u organoleptičkoj oceni idu u prilog serije koagulisane renilazom. Tehnološki postupak proizvodnje novosadskog sira uz primenu renilaze ne zahteva bitne promene u odnosu na tradicionalni postupak proizvodnje uz primenu himozina. Obzirom na ove podatke kao i ranije napomenute višestruke prednosti renilaze u odnosu na himozin, industrijska primena mikrobiološkog enzima renilaze u tehnološkom procesu proizvodnje novosadskog sira je u potpunosti opravdana i sa tehnološkog i ekonomskog aspekta.

Literatura

1. AARNES, G. ST. Paulin and Jarlsber (1971): Cheese made with Rennilase, Report No. 158 from the Dairy Research Institute of the Agricultural University of Norway.
2. Anleitung zum Praktikum für Molkereitechniker. (1966): I Teil, Milchtechnisches Institut, Edig. Technische Hochschule, Zürich, 34 — 36.
3. ANTILA, V., AAPOLA, M. (1971): Testing of Rennilase. Eripainos Karjantuotteesta, 54, 411 — 413.
4. BEHNKE, U., SIEWERT, R. (1969): Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Mucor miehei — Lab bei der Herstellung von Camembert, Limburger, Edamer und Tollenser. Fachbericht Milchwirtschaft Milchstandard, 11, 66 — 72.
5. BRANKOVAN, N. (1977): Neobjavljeni podaci.
6. CARIC, M., MARIC, S., GAVARIC, D. (1977): Ispitivanje produkata razgradnje kazeina raznim proteolitičkim enzimima elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. I sastanak prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista SRH, Zagreb, **Milchwissenschaft** 1978 (u štampi).
7. HEINRICH, C. (1972): Untersuchungen zur Feststellung der Verwendbarkeit von Rennilase für die Käseherstellung. Bericht von der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Ahlem, Hannover.
8. KOTTERER, R., MÜNCH, S. (1972): Untersuchungs Verfahren für das Milch-wirtschaftliche Laboratorium, Allgäu, 70 — 71.
9. MAYR, A. (1971): Versuchen zur Herstellung von Emmentalerkäse unter Verwendung von mikrobiellem Lab »Rennilase«. **Dts. Molk. Zeitung** 92, 13, 544 — 546.
10. Novo Enzyme für die Käseherstellung (1973): Rennilase, Novo Industri A/S, Kopenhagen.
11. Novo Enzyme in der Molkereiindustrie (1975): Rennilase, Novo Industri A/S, Kopenhagen.
12. PEJIĆ, O., DORĐEVIĆ, J. (1973): Mlekarski praktikum, Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd.
13. RAYMOND, S., NAKAMICHI, M. (1962): Electrophoresis in Synthetic Gels. Relation of the Structure to Resolution, **Anal. Biochem.** 23, 3.
14. ŠIPKA, M. i dr. (1973); Upotreba mikrobnog sirila »Renilaza« u proizvodnji Trapist, Kačakavalja i belog sira u kriškama, **Mljekarstvo**, 23, 1, 3 — 11.
15. THOMASOW, J., MROWETZ, G., SCHMANKE E. (1971): Untersuchungen zur Verwendung von Lab aus Mucor miehei zur Käseherstellung. **Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsberichte**, 23, 57—68.
16. TODORIC, R. (1976): Uticaj plastičnog premaza na promene belančevina novosadskog sira u toku zrenja. Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
17. VANDERPOORTEN, R., WECKX, M. (1972): Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes **Neth. Milk Dairy J.** 26, 47—59.
18. WEISS, G. (1975): Erfahrungen mit mikrobiellem Lab aus Mucor miehei. **Deutsche Milchwissenschaft** 49, Mainz.

Summary

The described investigations treated Novosadski cheese produced in industrial conditions, according the usual procedure, with *Mucor miehei* enzyme-rennilase, and chymosin as a control.

The examinations were carried out after 0, 10, 20, 30 and 40 days of ripening and included determinations: acidity, the content of DM, NaCl, fat, total N, the products of protein degradation by PAG electrophoresis and organoleptic quality.

The results of the comparative investigations of cheeses where milk clotting enzyme was rennilase or chymosin, showed that there is not a significant difference in content and changes of the components during cheese ripening. Some differences in organoleptic quality were on the behalf of the cheese group where milk was coagulated by rennilase.

VAŽNOST IZBORA SOJEVA I TEMPERATURE INKUBACIJE ZA PRIPREMU KULTURA U PROIZVODNJI JOGURTA

Mr Ljenka KRŠEV, Mljekarsko poduzeće »Dukat« — Zagreb

Uvod

Proizvodnja jogurta zauzima važno mjesto u svjetskoj mljekarskoj industriji.

Stvaranje gruš, tj. stvaranje određene količine mlječne kiseline, koja obara kazein, ovisi o razvoju dvaju termorezistentnih mikroorganizama *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus*. U toku svog razvoja u mlijeku ovi mikroorganizmi uzajamno pomažu rast jedan drugog, stvaraju mlječnu kiselinu i aromatske tvari. U praksi se obično održavaju, tj. precjep-ljuju u smjesi. Njihov odnos u smjesi je uobičajeno 1:1 i taj se odnos u toku propagiranja kulture, kao i u jogurtu nastoji zadržati.

U praksi se također traži, da kultura bude vrlo aktivna, da stvori u što je moguće kraće vrijeme željenu kiselost (36—40° SH u 2—2,5 sata) na temperaturi do 45°C. Stvoreni gruš, dovoljno kiseo i bez izdvojene sirutke hladi se i sprema u hladno, s tim da mu kiselost ne raste, i da je dovoljno aromatičan. Ovi zahtjevi se dosta teško mogu ispuniti.

U ovom dijelu rada ispitati smo kako utječe temperatura inkubacije na nekoliko mikroorganizama iz naše zbirke, a takođe i na smjese tih mikroorganizama tj. miješane kulture.

Eksperimentalne metode

1. Sojevi

Ispitali smo sojeve iz vlastite zbirke, te sojeve, koje smo izabrali iz miješanih kultura dobivenih iz Mljekarskog školskog centra Kranj, Poljo-privrednog fakulteta — Zagreb i Laboratorija za proizvodnju mljekarskih kultura Visby — Njemačka. U jednom dijelu pokusa ispitivali smo i soj *Lactobacillus helveticus* dobiven iz Laboratorija za mljekarske kulture Carlin — Marshal — Francuska.

Sojeve smo uzgajali na steriliziranom mlijeku i poslije 2—3 precjep-ljivanja (4—5 sati na 37°C) dobili smo kulturu, koju smo spremili na —20°C (0,5 ml kulture u 10 ml mlijeka — bez inkubacije). Pred upotrebu te su se