

- proizvoda. Ref., IV Jugosl. stočarska konferencija Mostar — 76. **Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu**, 24, (27) 693—697. **Mljekarstvo** 26 (8), 172—175, sl. 1, tab. 1, lit. 8.
11. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1976): Kvaliteta mlijeka i mlječnih proizvoda u 1976. god. **Mljekarstvo** 26 (12) 268—279, sl. 1, tab 3, lit 10.
 12. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1978): Kvaliteta sireva ocijenjenih »na Vrhnikij '77«. Ref., XVI Seminar za mljekarsku industriju, Tehnološki fakultet, Zagreb, str. 1—5.
 13. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1978): Kvaliteta naših sireva u godini 1977. Ref., XVI Seminar za mljekarsku industriju, Zagreb, Tehnološki fakultet, str. 1—7, 36 dijakolora.
 14. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1978): Kvaliteta i asortiman topljenih sireva Jugoslavije. Ref., XVI Seminar za mljekarsku industriju, Zagreb, str. 1—7, 25 dijakolora.
 15. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1978): Kvaliteta mlijeka i proizvoda od mlijeka u SFRJ 1977. godine. **Mljekarstvo** 27 (3), 50—66, sl. 3, lit. 14.
 16. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1978): Kvaliteta proizvoda jugoslavenske mljekarske industrije NS '78. **Mljekarstvo** 28 (11) 242—253, sl. 1, tab. 4, lit. 1—16.

ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE HIMOZINA I PEPSINA IZ RAZLIČITIH PREPARATA SIRILA*

Prof. dr Jovan ĐORĐEVIĆ, Ognjen MAČEJ, dipl. inž., prof. dr Radoslav STEFANOVIĆ, mr. Dušica PETROVIĆ, dr Dragoslava MIŠIĆ, Poljoprivredni fakultet Zemun

U svetu je uobičajeno da se preparati sirila deklariraju prvenstveno prema njihovoj aktivnosti u pogledu zgrušavanja mleka. U praksi se često podrazumeva pod jačinom sirila aktivnost himozina, a gubi iz vida pepsin, koji je takođe prisutan u svim preparatima sirila. Poznato je da ekstrakt četvrtog dela želuca teladi sadrži velike količine himozina i neznatno pepsina. Međutim, pri klanju teladi veće starosti u ekstraktu se smanjuje sadržaj himozina, a znatno povećava pepsin. Klanjem teladi starijih od pet meseci u ekstraktu sirišta uglavnom prevladava pepsin. Posljednjih godina u svetu se oseća sve veća nestašica sirila. Pomanjkanje sirišnog fermenta posledica je na jednoj strani sve većeg ograničenja klanja teladi usled slabe ekonomičnosti, dok je na drugoj strani nestašica uslovljena stalnim porastom proizvoda sireva. Povezano sa ovim, na tržištu se nalaze komercijalni preparati sirila vrlo neujednačene jačine u kojima verovatno kvantitativni odnosi himozina i pepsina variraju u veoma širokim granicama.

Premda su proteolitički fermenti, himozin i pepsin se prema svojim biohemijskim osobinama i po svome delovanju na mleko dosta razlikuju. Prema podacima iz literature (2,7) pepsin ispoljava najveću aktivnost između pH 1,2 i 2,3 dok himozin zahteva manje kiselu sredinu i najstabilniji je pri pH 5,5—6,2. Otuda pepsin sporo zgrušava sveže mleko, dok je pri nešto većoj kiselosti mleka zgrušavanje pepsinom mnogo brže (11). Uporednim ispitivanjem fermentata ustanovljeno je da pepsin ispoljava mnogo jače proteolitičko dejstvo od himozina (8). S druge strane pepsin mnogo slabije zgrušava mleko nego što to čini himozin (8). Ispitivanja elektronskim mikroskopom pokazuju da gruš proizveden pomoću sirila ima kompaktniju i organizovaniju strukturu od gruša proizvedenog pepsinom (4). Ustanovljeno je da se primarna akcija oba fermenta u toku podsirivanja odvija na kapakazeinu (6,9). Prema najnovijim rezultatima istraživanja (9) u primarnoj akciji himozin raskida fenilalanin — metioninsku

* Referat održan na XVII Seminaru za mljekarsku industriju, 1979. Zagreb

vezu na kapakazeinu izemđu 105. i 106. aminokiselinskog ostatka polipeptidnog lanca. Za pepsin se još uvek tačno ne zna na kojim vezama kapakazeina vrši proteolizu. Verovatno su veze raskidanja brojnije s obzirom na njegovu veću proteolitičku aktivnost i poznavanje osetljivih veza prema pepsinu u drugim substratima proteina (2). U toku zrenja sireva zapaženo je da pepsin dovodi do nastajanja većeg sadržaja polipeptida od kojih neki mogu biti uzrok gorkog ukusa sira (1,5). Ovo je jedan od glavnih prigovora koji se stavlja pepsinu zbog koga se on samostalno slabo koristi u proizvodnji sireva.

U deklaracijama o sastavu sirila ne navode se podaci o kvantitativnim odnosima himozina i pepsina premda bi ovakve informacije bile veoma korisne za usmeravanje tehnoloških procesa izrade sireva. Imajući u vidu značaj ovih pitanja u radu je vršeno elektroforetsko razdvajanje himozina i pepsina iz različitih preparata sirila s ciljem da se u njima identifikuju ova dva fermenta i ustanove njihovi kvantitativni odnosi. Za ova ispitivanja je primenjena poliakrilamidna disk elektroforeza u 5M urei pri pH 8,5 jer dosadašnji radovi ukazuju da se pomoću alkalne elektroforeze postiže dobro razdvajanje oba fermenta i u ovim uslovima dobijaju najhomogeniji pikovi.

Materijal i metode rada

Ispitivanjem su obuhvaćeni tečni preparati sirila domaće proizvodnje i dansko sirilo u prahu firme Hanzen. Sirila domaće proizvodnje bila su jačine 1:5.000 i 1:10.000, a dansko sirilo u prahu imalo je aktivnost 1:80.000. Pored sirila nabavljen je i medicinski preparat pepsina koji je služio kao pomoćni standard za identifikovanje fermentata u elektroforetskim preparatima sirila.

Za elektroforetsko nanošenje preparati sirila su prethodno pripremljeni postupkom dijalize da bi se iz njih odstranile niskomolekularne primese nekolidne prirode i kuhinjska sol, koje bi inače mogle da ometaju normalan tok elektroforeze. Kao sredstvo za dijalizu korišćena je dijalizna polupropustljiva membrana, a proces dijalize obavljen je u dejonizovanoj vodi temperature 2-4°C u toku 48 časova. Za elektroforetsko nanošenje pepsin je samo rastvoren u dejonizovanoj vodi.

U radu je primenjena poliakrilamidna disk elektroforeza po metodi Schmidt-a (3). Gel za kolone (za 8 staklenih cevčica) je pripreman od 7,5% akrilamida u 5M urei, pošto je ustanovljeno da ovakva poroznost gela omogućava najuspešnije razdvajanje fermentata. Prethodno su ustanovljene i optimalne koncentracije uzoraka, pa je na kolonu gela nanošeno tečno sirilo u količini od 0,1 — 0,12 ml., odnosno 0,01 — 0,03 ml 1% rastvora sirila u prahu ili pepsina. Za razdvajanje fermentata korišćen je tris-glicin pufer na pH 8,5. Elektroforeza je izdvojena na sobnoj temperaturi pri naponu struje između elektroda od 200-300 V i trajala je 45 minuta do jednog časa. Dobijeni elektroforetski gelovi bojeni su pomoću 1% amido-crnog u 7% sirćetnoj kiselini u toku 10 minuta. Obezbojavanje gelova u 7% sirćetnoj koselini trajalo je oko tri dana.

Elektroforetski preparati su snimljeni i zatim čitani na denzitometru firme Beckman. Izračunavanjem površine pikova razdvojenih fermentata dobijeno je procentualno učešće himozina i pepsina u ispitivanim preparatima sirila.

Rezultati istraživanja

U radu je korišćena poliakrilamidna elektroforeza. Ova elektroforeza se odlikuje velikom sposobnošću razdvajanja proteina koje je rezultat dve grupe efekata. Prvu grupu efekata uslovljava dejstvo električnog polja u kome proteini teže da se raspodele prema razlikama u električnom naboju. Dejstvo električnog polja je svojstveno i ostalim tehnikama elektroforeze. Druga gru-

pa efekata proističe iz upotrebe poliakrilamidnog gela koji uslovljava gelfiltraciju koja se istovremeno odvija u toku elektroforetskog procesa. Kroz pore gela najbrže se kreću oni proteini čiji molekuli pri migraciji pokazuju najmanje trenje o strukturu gela što je pretežno slučaj sa proteinima male molekularne težine.

S obzirom da su fermenti substance proteinske prirode poliakrilamidna elektroforeza je kao jedna od najsavremenijih metoda elektroforeze našla široku primjenu u oblasti proučavanja fermentata.

Dobijeni elektroforetski preparati tečnog sirila i sirila u prahu su vrlo sličnog izgleda prema broju i rasporedu izdvojenih frakcija. Snimci elektroforetskih gelova oba sirila prikazani su na slici 1.

U elektroforetskim preparatima vidljivo su izdvojene dve markantne trake na različitim pozicijama, što pokazuje da je postignuto dobro razdvajanje fermentata iz oba sirila. Na snimcima se uočava da je traka fermenta manje elektroforetske pokretljivosti slabijeg intenziteta od fermenta koji je prešao duži put u toku elektroforetskog procesa. Polazeći od toga da preparati sirila normalno sadrže više himozina od pepsina, pretpostavljalo se da frakcija veće elektroforetske pokretljivosti zbog jačeg intenziteta pripada himozinu, a druga, slabijeg intenziteta, pepsinu.

Da bi se proverio identitet izdvojenih fermentata vršena su usporedna elektroforetska ispitivanja u kojima je korišćen čist pepsin. On je služio kao standard pomoću koga je utvrđen položaj pepsina u elektroforetskim preparatima sirila, a naporedo s tim i položaj himozina. Ova ispitivanja su potvrdila naše pretpostavke. Snimci elektroforetskih preparata prikazani su na slici 2.

Iz elektroforetskog snimka pepsina se vidi da se ovaj ferment veoma homogeno izdvaja u uslovima alkalne elektroforeze na pH 8,5. Proučavajući elektroforetsko ponašanje pepsina Hoch (2) je, saglasno našim rezultatima, ustanovio homogenost pepsina na pH 8, dok je pri produženim elektroforezama na pH 3,5 i 5,5 našao da pepsin migrira u više frakcija i pokazuje vidljivu heterogenost.

Upoređujući elektroforetske snimke čistog pepsina i sirila očigledno je da se položaj čistog pepsina podudara s položajem frakcije manje pokretljivosti iz sirila. Da se na ovom položaju u preparatima sirila sigurno nalazi pepsin služi kao dokaz i to što se u gelu smešanog uzorka na istom mestu pojavljuje traka jačeg intenziteta nego u sirilu, kao rezultat većeg sadržaja pepsina usled davanja pepsina sirilu.

Potvrđujući na ovaj način identitet pepsina postaje sasvim izvesno da u preparatima sirila frakcija veće elektroforetske pokretljivosti i jačeg intenziteta predstavlja himozin. Pri razmatranju elektroforetske pokretljivosti treba razmotriti i molekulske težine fermentata, jer su one pored naelektriziranja značajan činilac za razdvajanje proteina u poliakrilamidnoj elektroforezi. Za molekulsku težinu pepsina navodi se više vrijednosti: 37.600, 34.500, 35.000... itd. (2). Edelhoeh je primetio vidljivi porast molekulske težine pepsina između pH 6 i 7, do granične vrednosti 37.000. Od brojnih podataka koji se odnose na himozin Foltmann (7) uzima kao najmeritorniju vrednost za molekulsku težinu oko 31.000, koja je dobijena na osnovu aminokiselinskog sastava fermentata. Upoređivanjem podataka proizlazi da je molekulska težina pepsina veća od himozina za oko 3.000 odnosno 5.000.

Sa stanovišta gelfiltracije, himozin bi zbog manje molekulske težine imao više uslova za bržu elektroforetsku pokretljivost od pepsina, što je saglasno

rezultatima koji su dobijeni u ovome radu. Na osnovu dužine pređenog puta proizlazi da himozin na pH 8,5 ima jače naelektrisanje od pepsina, što predstavlja bitan činilac za njegovu veću elektroforetsku pokretljivost.

Elektroforetske pokretljivosti pepsina i himozina iznete su u tabeli 1. Za osnovu elektroforetske pokretljivosti uzeta je dužina pređenog puta u toku elektroforeze. S obzirom da dužina puta pri istim uslovima elektroforeze može da varira zbog uticaja više faktora (svežina pufera, jačina struje i dr.) izračunate su i relativne pokretljivosti fermentata (R_m -vrednosti) koje se uzimaju kao pouzdaniji pokazatelj mobilnosti proteina. Ove vrednosti su izvedene iz odnosa pređenog puta bromfenol-plavog (koji kao jonska boja putuje ispred proteina) i dužine puta razdvojenog fermenta.

Tabela 1

Elektroforetske pokretljivosti pepsina i himozina

| Broj uzorka | Pređeni put pepsina u mm | Pređeni put himozina u mm | Pređeni put bromfenolplavog u mm | Relativna pokretljivost pepsina (R_m) | Relativna pokretljivost himozina (R_m) |
|------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|--|
| 1 | 8 | 44 | 95 | 0,083 | 0,46 |
| 2 | 7 | 36,5 | 83 | 0,081 | 0,44 |
| 3 | 7 | 40 | 92 | 0,082 | 0,43 |
| 4 | 7 | 37 | 86 | 0,081 | 0,43 |
| 5 | 7 | 39 | 83 | 0,084 | 0,45 |
| 6 | 10 | 40 | 89 | 0,084 | 0,45 |
| 7 | 7,5 | 40 | 92 | 0,082 | 0,43 |
| 8 | 10 | 39 | 89 | 0,084 | 0,44 |
| 9 | 7 | 37 | 83 | 0,081 | 0,45 |
| 10 | 7 | 38 | 86 | 0,081 | 0,44 |
| 11 | 10 | 40 | 89 | 0,084 | 0,45 |
| Srednja vrednost | 7,95 | 39,13 | 86,1 | 0,082 | 0,44 |

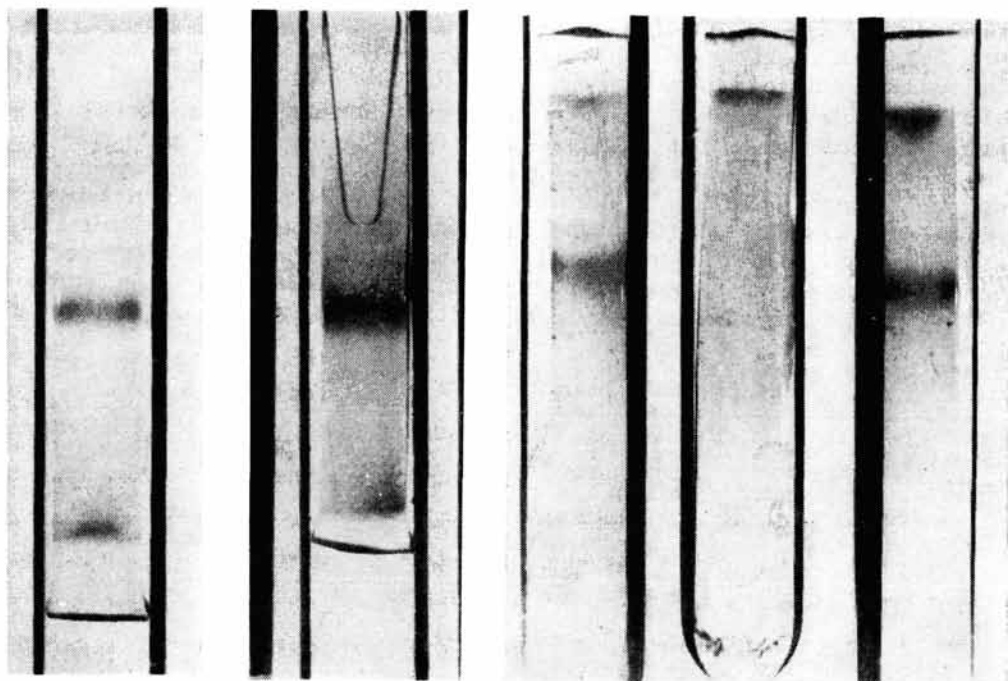
U koloni gela čija dužina (cevičice) iznosi 100 mm. pepsin je za vreme elektroforeze obavio put od prosečno 7,95 mm., dok je himozin putovao 4,29 puta brže, odnosno prelazio put dužine 39,13 mm. Pri tome se zapaža da je dužina puta oba fermenta pojedinačno varirala u elektroforezama. Shodno tome varirala je i dužina puta celokupne elektroforeze (označena bromfenol-plavim) od 83 do 95 mm., a prosečno iznosila 86,1 mm.

U primenjenom tipu elektroforeze relativna pokretljivost pepsina iznosi prosečno 0,082, što je za 5,36 puta manje od relativne pokretljivosti himozina.

Čitanjem elektroforetskih preparata na denzitometru dobijeni su elektroforetografi na papiru koji zbog osjetljivosti aparature i uveličavanja potpunije osvetljavaju sliku elektroforetskog razdvajanja fermentata. Elektroforetografi pepsina i preparata tečnog sirila i sirila u prahu prikazani su na grafikonima 1, 2 i 3.

Legenda elektroforetografa:

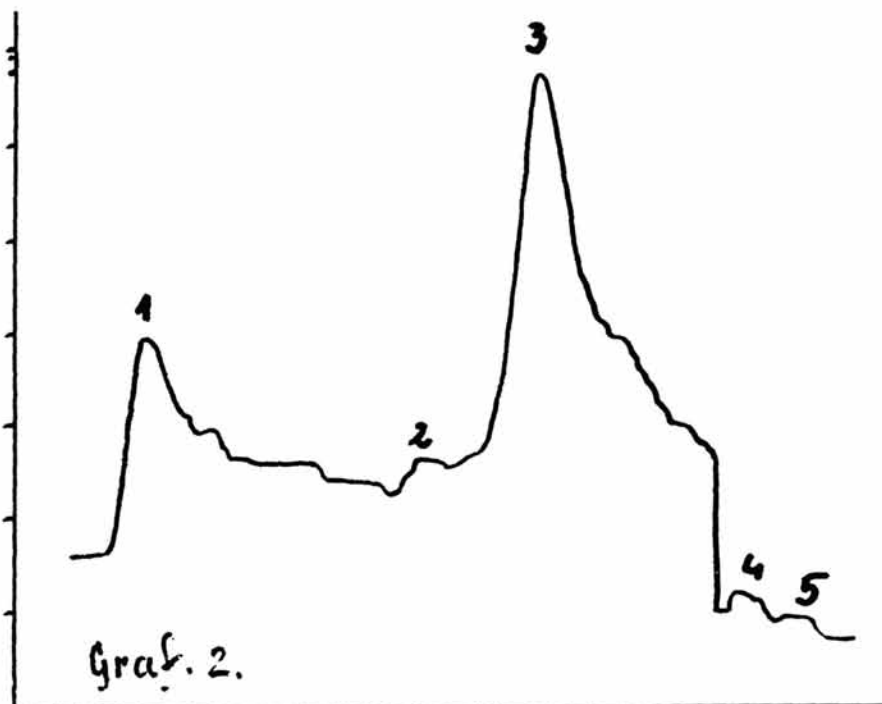
1. pepsin
2. frakcija himozina
3. frakcija himozina
4. frakcija himozina
5. frakcija himozina



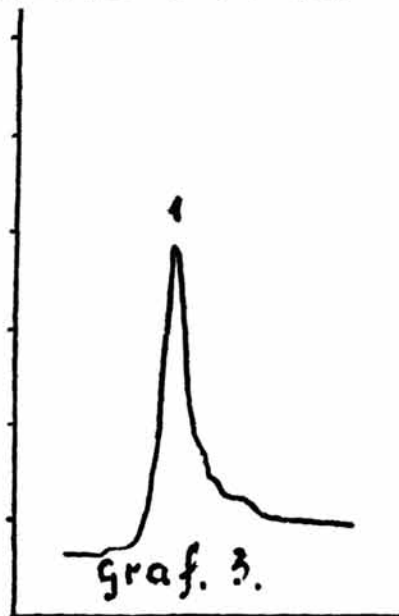
Slika 1
 Elektroforetski preparati tečnog sirila i si-
 rila u prahu (levo — tečno sirilo, desno —
 sirilo u prahu)

Slika 2
 Elektroforetski preparati tečnog sirila, pep-
 sina i smešanog uzorka popsina i sirila (s
 leva na desno)





SIRILO U PRAHU



PEPSIN

Iz grafičkog prikaza pepsina, na osnovu izgleda pika se vidi da je ovaj ferment u čistom obliku elektroforetski veoma homogen.

Elektroforetograf tečnog sirila pokazuje da se i u ovom slučaju pepsin homogeno razdvaja. Međutim, u oblasti himozina uočava se pored glavnog pika još jedna frakcija slabog intenziteta i manje pokretljivosti koja je inače okom slabo vidljiva na snimku elektroforetskog preparata tečnog sirila (slika broj 1 i 2).

U elektroforetografu sirila u prahu pepsin je slično razdvojen kao prethodno. Pik himozina je manje pravilnog oblika nego tečnog sirila. U njegovoj blizini pored već uočene frakcije vide se još dva mala pika veće elektroforetske pokretljivosti, što ukazuje da se himozin, za razliku od pepsina, na pH 8,5 heterogeno razdvaja. Tome u prilog idu i literaturni izvori koji svedoče da himozin ima odlike heterogenog fermenta. Vršeći hromatografski prečišćavanje Jirgenson i sar. (7) su zapazili da kristalni oblik himozina može da se razdvoji u dve ili više raznih komponenata. Razdvajanjem pomoću DEAE celulozne kolone Foltmann (7) je dobio himozin u tri frakcije koje je označio sa A, B i C. Autor je ustanovio da frakcije pokazuju specifično različitu aktivnost u pogledu zgrušavanja mleka.

Elektroforetski pikovi koji su dobijeni elektroforezom sirila, a nalaze se u oblasti himozina, pokazuju vizuelno veliku sličnost s hromatografskim profilom himozina koji je dobio Foltmann (7). Ovo sa svoje strane potvrđuje da manje frakcije u blizini himozina, 2, 4 i 5 pripadaju himozinu.

Izračunavanjem površine koju obuhvataju pikovi dobijeno je relativno učešće pepsina i himozina u preparatima sirila. Na osnovu većeg broja ispitivanja ustanovljene su srednje vrednosti relativnog učešća koje su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2

Relativno učešće himozina i pepsina u preparatima sirila

| Uzorak | Relativno učešće himozina u % | Relativno učešće pepsina u % |
|----------------|-------------------------------|------------------------------|
| Tečno sirilo | 60,20 | 38,80 |
| Sirilo u prahu | 72,30 | 27,70 |

Iz podataka u tabeli 2 se vidi da se u preparatima sirila himozin i pepsin nalaze u različitim kvantitativnim odnosima. U tečnom sirilu himozin je bio zastupljen sa relativnim učešćem od 61,20%, a pepsin sa 38,80%. Kod sirila u prahu himozina je više za 11,10%, odnosno njegovo relativno učešće iznosi 72,30%, dok ostalih 27,70% otpada na pepsin.

Vršeći merenja na osnovu imunoloških i hromatografskih ispitivanja Rothe i sar. (10) su ustanovili velike varijabilnosti u pogledu količina i međusobnog odnosa himozina i pepsina u različitim komercijalnim preparatima sirila. Autori su našli da je u sirilu dobijenom iz sirišnog ekstrakta teladi relativno učešće himozina iznosilo 82,60%, a pepsina 17,40%. U goveđem sirilu odnos je bio gotovo obrnut, procentuelno učešće himozina je iznosilo samo 20,62%, a pepsina povećano na 79,38%.

Za sirarsku proizvodnju je od velikog značaja da se imaju precizni podaci o aktivnosti sirila. Kako zgrušavanje mleka rezultira iz združenog delovanja himozina i pepsina bilo bi takođe vrlo značajno imati uvid u raspodelu ovih fermentata u komercijalnim preparatima sirila. Ovo pogotovo iz razloga što

kvantitativni odnosi fermentata u preparatima sirila imaju velik uticaj na osobine i kvalitet sireva. Međutim, sastav komercijalnih preparata sirila sa stanovišta raspodjele fermentata malo se do sada ispituje.

Zaključak

U radu je vršeno elektroforetsko razdvajanje himozina i pepsina iz različitih preparata sirila da bi se u njima ustanovio identitet i međusobni kvantitativni odnos fermentata. Za ovu svrhu korišćena je poliakrilamidna disk elektroforeza sa 7,5% akrilamidom u 5M urei uz upotrebu tris-glicin pufera na pH 8,5. Dobijeni elektroforetski preparati su čitani na denzitometru. Na osnovu ovih ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Poliakrilamidnom disk elektroforezom postiže se uspešno razdvajanje himozina i pepsina iz komercijalnih preparata sirila. Pri navedenim uslovima, pepsin je elektroforetski homogen, dok se himozin razdvaja u više frakcija (četiri) od kojih jedna predstavlja najveći deo himozina. U navedenom tipu elektroforeze pepsin ima malu relativnu pokretljivost od 0,082, dok je pokretljivost himozina za 5,36 puta veća, i iznosi 0,44.
- Sastav komercijalnih preparata sirila prema raspodeli fermentata se dosta razlikuje. U tečnim preparatima sirila relativno učešće himozina iznosi 61,20% i pepsina 38,80%. U preparatu sirila u prahu himozin je više zastupljen, ima relativno učešće 72,30%, a učešće pepsina iznosi 27,70%.
- Sa stanovišta koagulacije mleka, proizvodnje sireva i njihovog kvaliteta, pored obaveznog poznavanja aktivnosti sirila, važno je imati uvid i u raspodelu fermentata, radi uspešnijeg usmeravanja tehnološkog procesa izrade sireva i njihovog zrenja.

Literatura

1. AMMONS D. B., PETRASOVITS A., GILLAN R. A., BAIN J. M.: Cheddar Cheese made with Rennet and Pepsin. VIII Int. Dairy Cong, 18:294 Canada (1970).
2. BOYER D. P., LARDY A., MYREBECH K.: Enzymes (1960).
3. Chandon analytical polyacrylamide electrophoresis Operating instructions, Chandon Press Ltd London.
4. EINO Mf., BIGGS D. A., IRVINE D. M. and STANLEY D. W.: A Comparison of Microstructures of Cheddar Cheese Curd manufactured with Calf Rennet, Bovine Pepsin and Porcine Pepsin. **J. Dairy Res.** 43, 113 (1976).
5. EMMONE D. E., PETRASOVITS A., GILLAN R. H., BAIN I. M.: Cheddar Cheese Manufacture with Pepsin and Rennet. **Dairy Sci Abstr.** 33, 5463 (1971).
6. ITCH I. and THOMASOW I.: Action of Rennet and other Milk clotting Enzymes on Casein Fraction. **Milchwissenschaft** 26, 11. 671, (1971).
7. Mc KENZIE H. A.: Milk Proteins: New York, Academic press vol. 2. (1971).
8. POZNANSKI S., REPS A., SMJETANA L.: Preparation and Characteristics of Pepsin Extract and possible Use in Cheesmaking. **Dairy Sci. Abstr.** 32, 1004 — (1970).
9. ROSE D., BRUNNER J., KALAN E., LARSON B., MELNYCHYN P., SCHWEISGOOD H. and WAUNG D.: Nomenclature the Proteins of Cow's Milk, Third revision. **J. Dairy Sci.** 53. 1. (1970).
10. ROTHE G., AXELSEN N., JONK P. and FOLTMANN B.: Immunochemical, chromatographic and milk-clotting activity Measurements for quantification of milk-clotting Enzymes in bovine Rennet. **J. Dairy Res.** 43, 85 (1976).
11. WEBB H. B. and JOHNSON H. A.: Fundamentals of Dairy Chemistry (1965).