

Komparativne prednosti različitih vrsta sirila u sirarstvu

Jurić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:335862>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

Lucija Jurić
0058220913

Komparativne prednosti različitih vrsta sirila u sirarstvu

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mlijeko i mliječni proizvodi

Mentor: prof. dr. sc. Rajka Božanić

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Komparativne prednosti različitih vrsta sirila u sirarstvu

Lucija Jurić, 0058220913

Sažetak:

U proizvodnji sira za koaguliranje mlijeka se koristi pripravak enzima koji se naziva sirilo. Glavni enzim prisutan, a koji pripada skupini proteaza je kimozin, što znači da katalizira razgradnju proteina. Glavna uloga enzima u sirilu je koaguliranje mlijeka, a tijekom zrenja sira doprinose proteolizi. Izvorno sirilo je ekstrahirano iz želuca mladih teladi, ponekad janjadi i koza. Do 19. stoljeća za proizvodnju sira isključivo se koristilo sirilo ekstrahirano iz životinja. Zbog njegove povećane potražnje, sirilo se počelo industrijski proizvoditi iz teladi. Osim životinjskog sirila počele su se proizvoditi i njegove alternative kao što su FPC (fermentacijom proizveden kimozin), mikrobnog sirila i biljnog sirila. Cilj rada je opisati različite vrste sirila, navesti njihove prednosti i nedostatke i međusobno ih usporediti. Svaki od navedenih sirila ima svoje prednosti i mane. Kontinuirana istraživanja i razvoj biotehnologije pridonose njihovom poboljšanju, što posljedično ostavlja pozitivne rezultate za industriju i za potrošača.

Ključne riječi: sirilo, enzimi, kimozin, proteoliza, sir

Rad sadrži: 21 stranica, 15 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Rajka Božanić

Datum obrane: 16. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Comparison of the advantages of different types of rennet in cheese production

Lucija Jurić, 0058220913

Abstract:

In cheese production, an enzyme preparation called rennet is used to coagulate the milk. The most important enzyme, which belongs to the group of proteases, is chymosin, i.e. it catalyses the breakdown of proteins. The main task of the enzyme in rennet is to coagulate the milk, and during cheese ripening it contributes to proteolysis. Traditionally, rennet was extracted from the stomachs of young calves, sometimes also from lambs and goats. Until the 19th century, only rennet from animals was used in cheese production. Due to increased demand, rennet from calves began to be produced industrially. In addition to animal rennet, alternatives such as FPC (fermentatively produced chymosin), microbial rennet and vegetable rennet were also produced. The aim of this article is to describe the different types of rennet, explain their advantages and disadvantages and compare them with each other. Each of these types of rennet has its own advantages and disadvantages. Continuous research and development in biotechnology contribute to their improvement, which has a positive effect on both the industry and the consumer.

Keywords: rennet, enzymes, chymosin, proteolysis, cheese

Thesis contains: 21 pages, 15 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Rajka Božanić, Full Professor

Thesis defended: September 16, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ŽIVOTINJSKO SIRILO	2
2.1.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE	3
2.1.2. MIKROBIOLOŠKA KVALITETA	3
2.1.3. PROTEOLITIČKE KARAKTERISTIKE SIRILA	3
2.1.4. LIPOLITIČKE KARAKTERISTIKE SIRILA	6
2.1.5. PREDNOSTI I NEDOSTACI	7
2.2. FPC – FERMENTACIJOM PROIZVEDEN KIMOZIN	8
2.2.1. PROIZVODNJA FPC	9
2.2.2. PRINOS, SVOJSTVA SIRA I PROTEOLIZA	9
2.3. MIKROBNO SIRILO	10
2.3.1. KARAKTERISTIKE MIKROBNIH KOAGULANATA	10
2.3.2. NOVI NAČINI UNAPRJEĐENJA	11
2.3.3. KLASIFIKACIJA KOAGULANATA	12
2.3.4. PREDNOSTI I NEDOSTACI	12
2.4. BILJNO SIRILO	13
2.4.1. ENZIMI	13
2.4.2. ENZIMATSKA ULOGA BILJNIH PROTEINAZA	14
2.4.3. UTJECAJ BILJNIH SIRILA NA SENZORSKA SVOJSTVA SIRA	15
2.4.4. FICUS CARICA L.	17
2.4.5. PREDNOSTI I NEDOSTACI	17
3. ZAKLJUČCI	18
4. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Pretvorba mlijeka u sirni gruš najčešće se vrši enzimatskom koagulacijom. Pripravak enzima koji se koristi za koaguliranje mlijeka kod proizvodnje sira naziva se sirilo. Glavna uloga enzima u sirilu je koaguliranje mlijeka, ali oni također doprinose proteolizi tijekom zrenja sireva što utječe na teksturu i okus sira. (Mercola, 2024)

Glavni enzim u sirilu je kimozin, koji pripada skupini proteaza što znači da katalizira razgradnju proteina. Sirilo iz želuca životinja sadrži i druge enzime poput pepsina i lipaze, i svi ti enzimi u sirilu djeluju na kazein, glavni protein u mlijeku. Oni uzrokuju da se kazeinske molekule destabiliziraju i potom koaguliraju. Sirilo može biti u obliku tekućine, praha ili paste. Najčešće se koriste prva dva oblika. (Mercola, 2024)

Izorno sirilo je ekstrahirano iz želuca mladih teladi, ponekad janjadi i koza. Koristi se za proizvodnju raznih sireva, uključujući sireve zaštićene oznake izvornosti. Takvo sirilo naširoko se koristi u mediteranskim zemljama. Osim proteolitičkih enzima, ova vrsta sirila sadrži i lipolitičke enzime koji tijekom zrenja oslobađaju slobodne masne kiseline što pridonosi posebnim senzorskim karakteristikama sira (Law Barrie i Tamime, 2010).

Do devetnaestog stoljeća svi su sirevi proizvedeni na farmama koristeći sirila životinjskog podrijetla. U 1850-ima tadašnje mljekare zahtijevale su veće količine sirila, što je dovelo do industrijske proizvodnje ovog sirila. Sirilo je bilo prvi industrijski pripravak enzima sa standardiziranom enzimskom aktivnošću. Ovu pripravu razvio je austrijski liječnik Franz Soxhlet. (Andren, 2011)

Godišnji i svjetski porast proizvodnje sira zahtijevao je nove izvore sirila. Osim sirila životinjskog podrijetla danas se koriste FPC – fermentacijom proizveden kimozin, mikrobno sirilo i biljno sirilo. FPC se industrijski proizvodi fermentacijom genetskom modifikacijom uz bakteriju *Kluyveromyces lactis* ili gljivu *Aspergillus niger*. Biljno sirilo se ne proizvodi u komercionalnoj mjeri, već se proizvodi lokalno zahvaljujući prisutnim proteinazama u biljkama koje zgrušavaju mlijeko. Mikrobno sirilo se proizvodi uz mikroorganizme, najčešće uz *R. miehei* (Whitehurst i van Oort, 2010).

Cilj ovog završnog rada bio je opisati sve oblike sirila koji se upotrebljavaju u sirarstvu te na osnovu njihovih prednosti i nedostataka ih usporediti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŽIVOTINJSKO SIRILO

Životinjsko sirilo, kao izvorni pripravak sirila, ekstrakt je želučanih sokova sisavaca preživača (janjad, telad, jarad). Zbog visokog udjela kimozina, teleće sirilo se smatra idealnim enzimatskim pripravkom za proizvodnju sira. Sirilo se isključivo proizvodilo iz želuca mladih teladi do kraja dvadesetog stoljeća (Andren, 2011).

Sirilo se izlučuje kao neaktivni oblik prokimozina koji se aktivira izlaganjem kiseline. Uloga kimozina u probavi preživača je zgrušavanje ili koagulacija mlijeka u želucu. Također djeluje kao peptidaza koja katalizira razgradnju proteina. Novorođeni preživači dobivaju svoje imunoglobuline iz kolostruma tj. mlijeka izlučenog tijekom prvih 2-3 dana laktacije. Kimozin ima dovoljnu proteolitičku aktivnost da zgruša mlijeko, ali njegova opća proteolitička aktivnost je preslaba da bi oštetila imunoglobuline. Da mlijeko nije zgrušano, prebrzo bi prolazilo kroz želudac i bio bi manji stupanj probave proteina (Andren, 2011).

Najpoželjniji omjer kimozina i pepsina kod proizvodnje sira u običnim tekućim sirilima je 80:20. Omjer kimozina i pepsina ovisi o dobi i režimu hranjenja životinje. Općenito ekstrakti iz mladih životinja i životinja hranjenih mlijekom imaju više kazeina, dok ekstrakti iz odraslih životinja imaju više pepsina. Ako se životinja hrani koncentratima koji nisu mlijeko, udio kimozina smanjuje se na oko 30% u dobi od 6 mjeseci. Udio kimozina može iznositi 75 % čak i kod 6-mjesečne teladi koja pase ako joj se dopušta da sisa svoju majku. U svjetskoj proizvodnji sirila životinje se kolju u različitim dobima, a ekstrakti sadrže različite omjere enzima (Andren, 2011).

Danas se životinjska sirila proizvode uglavnom iz smrznutih želudaca (ranije su se koristili sušeni želuci), koji se melju u posebnim mlinovima i njihovi zimogeni (proenzimi koji ne pokazuju katalitičku aktivnost, ali se unutar organizma prevode u enzime) za zgrušavanje mlijeka se ekstrahiraju u 3–10 g na 100 g otopine NaCl u slanoj vodi. Zimogeni se aktiviraju u kimozin i pepsin snižavanjem pH na oko 2 tijekom 1 h, a zatim se pH podešava na oko 5,5 prije filtriranja i koncentriranja ekstrakta. Ekstrakt se dodatno filtrira kako bi se uklonile bakterije, a zatim se koncentracija NaCl povećava s oko 20 g na 100 g. Budući da omjer kimozina i pepsina ovisi o dobi i režimu hranjenja životinja od kojih se sirila dobivaju, različite serije sirila se miješaju kako bi se dobio željeni omjer kimozina i pepsina. Konačno, sirilo se razrjeđuje do određene jačine, koja se razlikuje među zemljama proizvođačima. Sirila se obično distribuiraju kao tekućine, ali mogu biti i u obliku praha. Treba napomenuti da proizvodnja sirila od starijih goveda, tj. odraslog govedeg sirila, uzrokuje više poteškoća tijekom faza filtriranja zbog visoke koncentracije mucina u ekstraktu. Proizvođači sirila riješili

su ovaj problem na mnogo različitih načina. Ekstrakti iz ovčjih i kozjih želudaca također se koriste kao sirila, ali u mnogo manjoj mjeri od goveđeg sirila. Omjer kimoзина i pepsina u tim sirilima također ovisi o dobi i režimu hranjenja životinja od kojih se dobivaju (Andren, 2011). Sirila u obliku paste tradicionalno se koriste u zemljama u mediteranskoj regiji i sadrže različite stupnjeve lipolitičke aktivnosti s kimozinom i pepsinom. Sirila od janjaca i kozlića koriste se u Grčkoj za proizvodnju sira Feta i Ketalotyri iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (Oštarić i sur., 2022).

2.1.1. Fizikalno-kemijske karakteristike

pH animalnog sirila ovisi o vrsti korištenog želuca tj. iz koje je životinje ekstrahirano, o uvjetima skladištenja i postupku pripreme. Može se podesiti na 5,5 što je pH komercijalnog tekućeg telećeg sirila. Tekuće sirilo koje se koristi za proizvodnju feta sira (iz janječeg i jarećeg želuca) ima pH od 4,71 do 4,74. Sirilo za proizvodnju Cabrales sira (iz jarećeg želuca) ima pH 4,0 (Moschopoulou, 2011).

Boja sirila većinom ovisi o prehrani životinje. Kreće se od bjelkaste do žućkaste ili zelenkaste. Životinje hranjene samo mlijekom proizvode sirilo bijele boje, dok one hranjene i travom proizvode sirilo zelenkaste boje (Moschopoulou, 2011).

Tekstura sirila u obliku paste i viskoznost tekućeg sirila ovisi o načinu pripreme. Sirilo u obliku paste može biti grubo i heterogeno ili kremasto i homogeno. Tekuća sirila obično su viskozna, a viskoznost ovisi o udjelu ekstrakcijske otopine tijekom ekstrakcije. Nakon bistrenja centrifugiranjem, mogu biti bistri (Moschopoulou, 2011).

2.1.2. Mikrobiološka kvaliteta

Mikrobiološka kakvoća komercijalnih sirila ovisi o kvaliteti sirovine, postupku pripreme i uvjetima skladištenja, a trebala bi ispunjavati zahtjeve Udruge proizvođača prirodnih prehrambenih enzima životinjskog podrijetla. Prema tim zahtjevima ukupan broj koliformnih bakterija ne smije prelaziti 30 cfu/g (cfu – colony forming unit, mjerna jedinica kojom se označava količina bakterija koje mogu tvoriti kolonije, odnosno koje su žive, sposobne za razmnožavanje i ostvarivanje svojih specifičnih učinaka), ukupan broj mezofilnih bakterija ne smije prelaziti $5 \cdot 10^4$ cfu/g, *E.coli* i *Salmonella sp.* ne smiju biti prisutne u 25 g, dok mikotoksini i antibakterijsko djelovanje trebaju biti odsutni (Moschopoulou, 2011).

2.1.3. Proteolitičke karakteristike sirila

2.1.3.1. Kimozin i pepsin

U želucu mladih preživača luče se enzimi kimozin, pepsin A i gastricin (ili pepsin B ili pepsin C). Pripadaju skupini asparaginskih proteinaza koje imaju dva ostatka Aspartata u svom aktivnom centru. Izlučuju se u sluzi želuca u obliku zimogena, a njihovo djelovanje je zgrušavanje i probava mlijeka. Neaktivni enzimi prokimozin, pepsinogen i progastricin prethode aktivnim oblicima kimozina, pepsina i gastricina (Moschopoulou, 2011).

Prokimozin i pepsinogen proizvode se intracelularno u stanicama fundicalnih žlijezda, dok se progastricin proizvodi uglavnom u površinskim epitelnim stanicama fundicalnih žlijezda. Na izlučivanje zimogena u želučanu sluznicu značajno utječu dob i prehrana životinje. Što je manje mlijeka u hranidbi životinja, proizvodi se više prokimozina. Kod teladi mlađe od tri mjeseca hranjenih mlijekom sadržaj prokimozina je 70-80 %, kao i kod telećeg želuca. Sadržaj enzima kod janjećih želuca ovisi o dobi i prehrani životinje. Janjeća sirila od mladih životinja hranjenih isključivo mlijekom ili mješavinom mlijeka i paše sadrže preko 80% kimozina. Isti slučaj primijećen je i kod sirila od jaradi (Moschopoulou, 2011).

Sekvenca aminokiselina telećeg prokimozina proučavana je prije mnogo godina. S tom sekvencom uspoređuju se one od janjaca i kozlića. Aminokiselinska sekvenca janjećeg prokimozina u pogledu N-terminalnog dijela vlo je slična onoj goveđeg podrijetla, ali janjeći prokimozin ima tri ostatka glikozamina i tri neutralna ostatka više. Asparagin je povezan s ugljikohidratnim komponentama (Moschopoulou, 2011).

Goveđi pepsinogen sastavljen je od 362 ± 2 aminokiseline i ima molekularnu masu od 38,9 kDa. Kozji pepsinogen sadrži tri izoenzima bez šećera i ima molekularnu masu od 40,4 kDa. Inaktivni zimogeni se prevode u aktivne enzime tijekom ograničene proteolize u kiselim uvjetima u kojima se dio poznat kao propart odsiječe od N-terminalnog dijela zimogena. Iz tog razloga zimogeni se mogu automatski aktivirati u kiselim uvjetima želuca. Tijekom pripreme sirila od mladih preživača ne provodi se postupak aktivacije (Moschopoulou, 2011).

Kimozin i pepsin imaju dvostruku ulogu u proizvodnji sira. Oni provode grušanje mlijeka u nekoliko minuta pri određenim uvjetima, a zatim doprinose proteolizi koja se događa tijekom zrenja sira. Stoga je omjer kimozina i pepsina u sirilu od velike važnosti jer utječe na njegova tehnološka svojstva poput aktivnosti zgrušavanja mlijeka i proteolitičke aktivnosti. Sadržaj proteolitičkih enzima u sirilu određuje se kromatografskom metodom (Moschopoulou, 2011).

2.1.3.2. Aktivnost zgrušavanja mlijeka

Soxhlet je dao najstariju definiciju prema kojoj se aktivnost zgrušavanja mlijeka (AZM) definira

kao volumen sirovog mlijeka koji se može zgrušati jednom jedinicom volumena sirila u 40 minuta na 35 °C. AZM tekućih sirila kreće se u rasponu od 1:1500 do 1:4000, dok za sirila u pastoznom obliku iznosi od 1:3000 do 1:30 00 (Moschopoulou, 2011).

Danas se ukupni AZM sirila mjeri prema IDF-ovom testu relativne aktivnosti zgrušavanja mlijeka (REMCAT metoda) na standardiziranom mlijeku i izražava se u IMCU (International Milk Clotting Units) po gramu ili mL paste od sirila ili tekućeg sirila (Moschopoulou, 2011).

AZM utječe na svojstva gruša stoga je značajna tehnološka karakteristika. Na AZG utječu postupak pripreme i uvjeti skladištenja. Otkriveno je da ekstrakcija otopinom 6 % NaCl i 2 % borne kiseline rezultira sirilom s visokim razinama aktivnosti zgrušavanja mlijeka (Moschopoulou, 2011).

Pokazalo se da je koagulacija kozjeg mlijeka brža sa sirilom od jareta nego sa koagulansom iz *R. miehei*. Janjeće sirilo napravljeno od praznog osušenog želuca brže zgrušava mlijeko u usporedbi sa sirilom od potpuno svježeg ili potpuno osušenog želuca. Janjeće sirilo od želuca osušenog na zraku i soljenog želuca dulje zadržava AZM nego sirilo napravljeno od svježeg usoljenog želuca. Janjeće tekuće sirilo držano na 4 °C tijekom 4 mjeseca polako počinje gubiti svoju AZM, dok sirilo u obliku paste od janječeg želuca držano pri 4 °C godinu dana ne gubi značajno svoju AZM (Moschopoulou, 2011).

2.1.3.3. Proteolitička aktivnost

Klmozin kao glavna proteinaza u sirilu specifično hidrolizira Phe-Met vezu, dok pepsin hidrolizira bez specifičnosti peptidne veze koje uključuju aromatske aminokiseline (Phe, Tyr i Trp). Ne postoji standardna metoda za mjerenje proteolitičke aktivnosti. Ona se može odrediti različitim tehnikama kao što su RP HPLC, Urea PAGE ili spektrofotometrija produkata oslobođenih iz mliječnih proteina ili sintetskih peptidnih supstrata probavljenih zajedno sa ispitanim sirilom. Proteolitička aktivnost može se odrediti i neizravnim postupkom kroz proteolizu sira, međutim rezultati mogu biti kontradiktorni budući da na proteolitičku aktivnost ne utječu jednako vrsta životinje iz koje je ekstrahirano sirilo ni sadržaj pepsina. Svako sirilo bolje hidrolizira kazein svoje vlastite vrste, a to se odražava i na proteolizu sira. Stoga je stupanj proteolize veći kod kozjeg sira tipa Camembert proizvedenog od jarećeg sirila nego kod sira kod kojeg je korišteno teleće sirilo. Također u siru PDO Murcia al Vino, pasta od janječeg sirila uzrokuje bolju proteolizu nego teleće sirilo. Niži stupanj proteolize primijećen je u zrelom Leon siru napravljenom od kravljeg sirovog mlijeka korištenjem sirila od jareta s farme koje sadrži 66 % pepsina. Naprotiv pasta od janječeg sirila ima najnižu proteolitičku aktivnost na ovčji kazein u usporedbi s telećim ili jarećim sirilom. Čini se da je u nekim

slučajevima sadržaj pepsina glavni faktor. Za sirila istog podrijetla s mliječnim supstratom povećanje sadržaja pepsina u pripravku sirila također povećava brzinu proteolize supstrata (Moschopoulou, 2011).

2.1.4 Lipolitičke karakteristike sirila

Tijekom zrenja lipolitički enzimi uzrokuju lipolizu sira, pridonoseći na taj način njegovom okusu. Mladi preživači su dobar izvor takvih enzima, a posebno sirilo u pastoznom obliku koje siru daje poseban pikantan okus. Osim toga postoje komercijalni pripravci lipaza od janjetine ili jaretine. Ti pripravci proizvode se iz tkiva gušterače ili predželuca, a dolaze u obliku praha. Na 1001 g mlijeka dovoljno je 2-15 g praha za željeni okus. Jareća lipaza daje najjači okus (Moschopoulou, 2011).

2.1.4.1. Lipolitički enzimi

Lipolitički enzimi prisutni u sirilu mladih preživača prvenstveno se sastoje od predželučanih lipaza i esteraza koje potječu iz sekretornih žlijezda smještenih u ždrijelu mladih životinja koje sisaju. Sisanje potiče otpuštanje predželučanih lipaza iz tkiva ždrijela, dopuštajući im da uđu u želudac. Dodatno, želučane lipaze izlučuje sluznica želuca. Predželučani lipolitički enzimi su glikoproteini koji sadrže 10 % ugljikohidrata, a njihove specifične karakteristike variraju ovisno o vrsti životinjskog sirila. Lipaze ili triaciglicerol lipaze primarno ciljaju triacilgliceride na granici lipid-voda, dok esteraze funkcioniraju u homogenom vodenom okruženju, hidrolizirajući supstrate topive u vodi. Posljedično, ovi enzimi olakšavaju hidrolizu triglicerida, diglicerida i monoglicerida, što rezultira proizvodnjom slobodnih masnih kiselina kao i diglicerida, monoglicerida i glicerola. Na njihovu aktivnost utječe vrsta supstrata (Moschopoulou, 2011).

Razlike između predželučanih lipaza i esteraza identificirane su korištenjem surfaktanata (tvar koja smanjuje površinsku napetost vode) u supstratima 4-nitrofenil butiratu i tributirinu. Otkriveno je da jareće preželučane lipaze funkcioniraju kao i lipaza i kao esteraza, a aktivnost ovisi o uvjetima reakcije. Stupanj dvostruke specifičnosti (prema kratkolančanim masnim kiselinama i na sn3 poziciji) u preželučanim lipazama povezan je s karakteristikama mlijeka. Janjeće i jareće preželučane lipaze oslobađaju manje C10 masne kiseline iz goveđe mliječne masti nego iz kozje mliječne masti, dok jareća lipaza oslobađa uglavnom masne kiseline srednje molekulske mase iz tri vrste mlijeka (Moschopoulou, 2011).

2.1.4.2. Lipolitička aktivnost

Zbog prisutnosti esteraze i želučane lipaze, lipolitička aktivnost je značajna karakteristika tradicionalnih sirila. Postupak aktivacije na pH 2,0 tijekom proizvodnje komercijalnog sirila uništava lipolitičku aktivnost (Moschopoulou, 2011).

Lipolitičko djelovanje sirila ovisi o dobi i prehrani životinje i o korištenom dijelu želuca. Lipolitička aktivnost sirila janjeta koje je isključivo na prehrani mlijekom prije klanja je 30-100 puta veća nego kod životinja koje su dohranjivane ispašom. Lipolitička aktivnost je veća ako je sirilo dobiveno iz cijelog želuca nego ako je dobiveno samo iz sadržaja želuca. (Moschopoulou, 2011)

Esteraze sirila mladih preživača pridonose lipolizi tijekom zrenja talijanskih sireva Fiore Sardo, Pecorino Romano i Canestrato Pugliese sa zaštićenom oznakom podrijetla, utječući na količinu i omjer oslobođenih slobodnih masnih kiselina i pridonose pikantanom okusu ovih sireva. Pasta od sirila napravljena isključivo od janjadi zaklane odmah nakon sisanja uzrokuje veću lipolizu u siru Fiore Sardo u usporedbi sa sirilom napravljenim od janjadi koja je puštena na pašu ili je zaklana nakon 12 sati od hranjenja. Sirilo od jarećeg želuca, samo ili zajedno s definiranom kulturom, povećava stupanj lipolize u kozjem siru proizvodeći uglavnom kratkolančane slobodne masne kiseline, posebno maslačnu kiselinu. Ista vrsta sirila povećava lipolizu u polutvrdom kozjem siru (Moschopoulou, 2011).

Janjeće sirilo obogaćeno probioticima ima povećano djelovanje lipolize kod proizvodnje Pecorino sira, proizvodeći više konjugirane linolne i linoleinske kiseline. Viši stupanj lipolize primijećen je i kod drugih ovčjih sireva koji koriste janjeće sirilo, u usporedbi s telećim ili drugim koagulansima mlijeka (Moschopoulou, 2011).

Lipolitička aktivnost obično se određuje potenciometrijskom metodom pH stat (titracija kod koje se kontrolirano dodaje razrijeđene kisele ili alkalne otopine za održavanje konstantnog pH) (Ficara, 2003) uz korištenje tributrina kao supstrata, iako je plinska kromatografija slobodnih masnih kiselina oslobođenih masti najpouzdanije metoda. Metodom pH stat rezultat se izražava kao jedinica preželučane lipaze (LFU), gdje je jedna LFU aktivnost koja oslobađa 1,25 mikromola maslačne kiseline po minuti pod uvjetima testa. Lipolitička aktivnost se također može mjeriti fluorimetrijskim, imunološkim te kolorimetrijskim i stektofotometrijskim metodama. Trenutno se priprema zajednička ISO-IDF standardna metoda koja se temelji na principu aktivnosti lipaze preželuca za mjerenje lipolitičke aktivnosti sirila (Moschopoulou, 2011).

2.1.5. Prednosti i nedostaci

Od životinjskih sirila teleće se sirilo smatra idealnim enzimom za zgrušavanje mlijeka u proizvodnji sira. Djelomičan razlog je zbog dobro poznate tradicionalne proizvodnje i zbog duge uporabe. Znanstvene činjenice potvrđuju tu preferenciju, jer teleće sirilo obično sadrži 80-90 % kimozina. To znači da je većina razgradnje kazeina usmjerena vrlo specifično na k-kazein kod zgrušavanja mlijeka, a ne na druge kazeine. Tijekom stvaranja grušča nespecifična proteoliza alfa i beta kazeina može rezultirati gubitkom kazeinskog dušika u sirutki, dok se pri tome smanjuje prinos sira. Još jedna prednost pri uporabi telećeg sirila je dobivanje tradicionalne teksture i okusa kod tvrdih i polutvrdih sireva. Procesom zgrušavanja mlijeka oslobađaju se različiti peptidi i aminokiseline koje mogu pridonijeti okusu sira. Kazein iz sirila izvrstan je izvor proteina, sadrži esencijalne aminokiseline koje su ključne za održavanje zdrave mišićne mase i gustoće kostiju. Sirila od ovaca i koza vrlo su slična sirilu od goveda, ali su najprikladnija za zgrušavanje mlijeka vlastite vrste. Javlja se problem gospodarstva i održivosti, korištenje tradicionalnog sirila može biti skupo i teško ga je nabaviti u nekim regijama. Opskrba životinjskim sirilom ograničena je brojem dostupnih teladi što ga može učiniti skupljim i otežanim za nabavu velikih količina. Ova nestašica također može povećati troškove proizvodnje sira. Proizvodnja životinjskog sirila pridonosi ekološkom otisku povezanom s uzgojem stoke, uključujući korištenje resursa, emisije stakleničkih plinova i degradaciju zemljišta. Neki ljudi mogu imati alergijske reakcije na životinjsko sirilo, osobito ako su osjetljivi na određene proteine koji se nalaze u životinjskim tkivima (Whitehurst i van Oort, 2010; Capper i sur., 1994).

2.2. FPC – FERMENTACIJOM PROIZVEDEN KIMOZIN

Proizvodnja kvalitetnog sirila ovisi o dostupnosti telećeg želuca. Zbog porasta proizvodnje sira i smanjenja broja teladi za klanje, sve je teže osigurati dovoljnu količinu sirovine po stabilnim cijenama, posebice za proizvodnju standardnog sirila s visokim udjelom kimozina. Ova je situacija uzrokovala visoke cijene sirila diljem svijeta i rezultirala potragom za alternativnim sredstvima za zgrušavanje. Najčešća alternativa telećem sirilu u industriji sira diljem svijeta je kimozin proizveden fermentacijom (FPC) (Garg i Johri, 1995).

Genetički inženjering omogućuje proizvodnju kimozina koji se nalazi u telećem sirilu putem mikroorganizama. Primjena genetičkog inženjeringa presađivanjem gena iz jednog organizma u drugi otkrivena je krajem 1970-ih i 1980-ih što je omogućilo unos kimozinskog gena teleta u mikroorganizam. Proizvodnja i komercijalizacija kloniranog kimozina bila je uspješna s ekspresijom potpuno aktivnog enzima u *Aspergillus niger* var. *Awamori*, *E. coli* i *Kluyveromyces lactis*. Rekombinantni teleći kimozin proizveden u ova tri organizma uspješno

je korišten u eksperimentalnoj proizvodnji nekoliko vrsta sireva uključujući Cheddar, Edam, Tilsit, Italian, Manchego, Colby, Emmental i Gouda (Whitehurst i van Oort, 2010; Garg i Johri, 1995).

2.2.1. Proizvodnja FPC

FPC se većim razmjerima proizvodi fermentacijom uz *Kluyveromyces lactis* ili *Aspergillus niger*. U oba slučaja mikroorganizam je modificiran korištenjem genske tehnologije ugradnjom gena telećeg prokimozina u organizam domaćina s odgovarajućim promotorom kako bi se osiguralo njegovo učinkovito izlučivanje u hranjivu podlogu. Enzim je lako uzgojiti i pročistiti iz kulture, za razliku od ranijeg sustava proizvodnje gdje se za proizvodnju kimozina koristila *E. coli*. Genetski kod za proizvodnju kimozina izoliran je iz stanica telećeg želuca. Plazmid mikroorganizma domaćina se izolira i cijepa kako bi se omogućilo dodavanje kimozinske DNA. Formira se hibridni plazmid koji sadrži genetsku informaciju za proizvodnju kimozina. Plazmid koji sadrži genom kimozina ponovno se ubacuje u mikrobnu stanicu domaćina. Stanica domaćina raste u prikladnom mediju za proizvodnju većih količina kimozina (Garg i Johri, 1995).

2.2.2. Prinos, svojstva sira i proteoliza

Aktivnost telećeg sirila pri sirenju je drugačija u usporedbi s korištenim FPC-ovima. Kod telećeg sirila blago je smanjena stopa stvrdnjavanja gruša što se može pripisati prisutnosti pepsina. Nije uočen gubitak prinosa u sirevima (Colby i Cheddar) proizvedenim s FPC, u usporedbi sa telećim sirilom, jer je koncentracija goveđeg pepsina bila relativno mala. Kod korištenja FPC iz *K. lactis*, sastav i prinos sira nije se značajno razlikovao. Međutim zreli sir napravljen s rekombinantim kimozinom sadržavao je nešto više ukupnih laktata, manje propionske kliseline i manje propionskih bakterija te nešto viši indeks zrenja. Stopa, tip proteolize i način razgradnje kazeina tijekom zrenja su jednaki korištenjem FPC-a i telećeg kimozina (Garg i Johri, 1995).

Općenito sir proizveden s FPC smatra se jednako zrelim kao i onaj proizveden telećim sirilom. Razvoj teksture tijekom zrenja i kvaliteta sira Cheddar proizvedenog telećim sirilom i FPC-om iz *E.coli* nisu se značajno razlikovali. Sir napravljen s FPC iz *K. lactis* nije se razlikovao u organoleptičkoj kakvoći sira od sira proizvedenog sa standardnim sirilom. U svakom pokušaju sir je dobio slične ocjene za okus, boju i tijesto. Usporedba senzorske kvalitete sira Gouda

jasno je otkrila da FPC iz *K. lactis* daje proizvod koji se u bilo kojem aspektu kvalitete nije razlikovao od sira proizvedenog standardiziranim telećim sirilom (Garg i Johri, 1995).

2.3. MIKROBNO SIRILO

Mikrobna sirila koji se koriste u proizvodnji sira većih razmjera potječu iz podloga kulture nekih filamentoznih gljiva, kao što su *Rhizomucor miehei* (najkorišteniji) i *Rhizomucor pusillus* (poznata kao mucorpepsin), ili iz *C. parasitica* (poznata kao endothiapepsin). Mikrobna sirila nisu proizvodi GMO. Lako se proizvode u neograničenim količinama, a njihova se svojstva mogu poboljšati primjenjujući biotehnološke spoznaje (Feijoo-Siota i sur., 2014).

2.3.1. Karakteristike mikrobnih koagulanata

Mukorpepsin, koju izlučuju dvije blisko povezane vrste *R. pusillus* i *R. miehei*, je asparaginska proteaza. Kao enzim za zgrušavanje mlijeka prvi put se koristio tijekom šezdesetih zbog nedostatka telećeg sirila. Ove dvije gljive proizvode enzime slične strukture, s time da su ta dva enzima klasificirana kao varijante. Pokazuju 83 % homolognih sekvenci i imunološki su unakrsno reaktivni iako pokazuju neke razlike u svojim peptidima. Optimalni pH za mukorpepsin je oko 4 (varira ovisno o supstratu). Oba enzima zbog njihovog selektivnog cijepanja κ -kazeina uz relativno nisku proteolitičku aktivnost, imaju relativno visoku aktivnost zgrušavanja mlijeka. Oba enzima preferirano (kao i kimozi) cijepaju Phe105-Met106 vezu κ -kazeina. Proizvode se kao zimogeni sa signalnim peptidom koji obuhvaća 22 ostatka, propeptidom od 44 aminokiseline (položaj 23-66) i zrelim proteinom koji sadrži 361 aminokiselinu u slučaju *R. pusillus*. Kod *R. miehei*, polipeptidni prekursor se sastoji od signalne sekvence od 22 aminokiseline, propeptida od 47 ostatka (23-69) i zrele proteaze od 361 aminokiseline. Kod enzima *R. pusillus* moguća su 3 mjesta glikolizacije (Asn79, Asn113, Asn188). Samo su prvi i posljednji (Asn 79 i Asn118) pronađeni glikolizirani kada se eksprimiraju u *S. cerevisiae*. Položaji aminokiselina isti su i za *R. miehei* (Asn 79 i Asn188). Patogena gljiva *C. parasitica* (kestenova plamenjača) proizvodi asparaginsku jednolančanu proteinazu endothiapepsin koja se sastoji od 330 aminokiselina, molekularne mase 33,8 kDa. Enzim se proizvodi u zimogenom obliku (419 aminokiselina) s potencijalnim signalnim peptidom (20 aminokiselina), propeptidom (69 aminokiselina, pozicija 21-89) i zrelim enzimom koji sadrži 330 aminokiselina. Ima kiseli optimalni pH i nizak pl (oko 5,5). ima visoku

proteolitičku aktivnost, nisku ovisnost o ionskoj jakosti i visoku termostabilnost. Koristi se samo za sireve koji se obrađuju na visokim temperaturama, poput Ementalera. Aktivnost enzima za zgrušavanje mlijeka u početku se pripisalo cijepanju iste κ -kazeinske veze hidrolizirane telećim kimozinom, no kasnije se pokazalo da endotiapepsin cijepa prethodnu κ -kazeinsku peptidnu vezu (Ser104-Phe105) (Feijoo-Siota i sur., 2014).

2.3.2. Novi načini unaprjeđenja

Mikrobna sirila se prvenstveno koriste u neindustrijskim primjenama kod proizvodnje svježih sireva. Sirila koje proizvode *R. miehei*, *R. pusillus* i *C. parasitica* su komercijalno dostupna pod različitim nazivima još od 1970-ih. Kod proizvodnje sira najčešće se koristi enzim iz kulture *R. miehei*. Glavno ograničenje ovih koagulanta je toplinska stabilnost i nizak omjer aktivnosti zgrušavanja u odnosu na proteolitičku aktivnost (C/P). Nakon zagrijavanja gruš, visoka toplinska stabilnost proteaza *R. miehei* i *R. pusillus* rezultira postojanošću enzimske aktivnosti. Tijekom dugih razdoblja sazrijevanja termostabilnost enzima stvara neugodne arome i gorak okus u siru (Feijoo-Siota i sur., 2014).

Razvijene su nove kemijske i genetske metode kako bi se asparaginske proteinaze učinile osjetljivima na toplinu, bez gubitaka njihove aktivnosti zgrušavanja mlijeka. Također razvijene su nove metode za povećanje omjera C/P. U ovu svrhu proučavana je kristalna struktura asparaginske kiseline proteinaze iz *R. miehei* i došlo je do zaključka da visok stupanj glikolizacije utječe na visoku termičku stabilnost. Enzim je na temelju ove strukture uspješno modificiran za stvaranje proteina sa smanjenom toplinskom stabilnošću i većom aktivnošću zgrušavanja mlijeka, u usporedbi s nativnim enzimom. Stupanj glikolizacije enzima ovisi o aminokiselinskoj sekvenci i o vrsti mikroorganizma. *R. pusillus* proteinaza ima nizak stupanj glikolizacije. Rekombinantni enzim izražen u *S. cerevisiae* bio je visoko glikoliziran i kvasac ga je lučio učinkovitije. Deglikolizacija rekombinantne nemutirane proteinaze proizvedene u *S. cerevisiae* rezultira enzimom s povećanim C/P omjerom zbog povećane aktivnosti zgrušavanja mlijeka, ali je i dalje taj omjer niži od prirodnog nerekombinantnog enzima. Međutim otkriveno je da je rekombinatna asparaginska proteinaza podvrgnuta toplinskoj inaktivaciji proizvela 0,2 % veći prinos feta sira u usporedbi s prinosom dobivenim s termolabilnim prirodnim enzimom. Neke od modifikacija za smanjenje toplinske stabilnosti mikrobnog koagulanta *Rhizomucor* uključuje nitriranje, karbamilaciju i deglikolizaciju izazvanu perjodatom. Djelovanje asparaginske proteinaze od *R. pusillus* na zgrušavanje mlijeka se povećava aciliranjem proteinaze s kiselim anhidridima. Sredstvo koje se u tu svrhu pokazalo najboljim je meleinski anhidrid. Međutim ovaj spoj je doveo do smanjenja aktivnosti

zgrušavanja mlijeka korištenjem mikrobnog koagulant iz *R. miehei*. Asparaginska proteinaza iz *R. pusillus* tretirana s jantarnim anhidridom pokazala je povećanu aktivnost zgrušavanja mlijeka i omjer C/P. Mutageneza je još jedan potencijalno održiv pristup za stvaranje gljivičnih apsaraginskih proteinaza sa smanjenom termostabilnošću koji se mogu koristiti kao koagulansi u mlijeku (Feijoo-Siota i sur., 2014).

2.3.3. Klasifikacija koagulanata

Sva poznata mikrobn sirila koja se koriste za proizvodnju sira su gljivičnog podrijetla. Većina bakterijskih proteaza opisanih kao enzimi za zgrušavanje mlijeka pokazala su se neprikladnima, uglavnom zato što imaju previsoku proteolitičku aktivnost. Od dva mikrobn sirila koja se koriste za proizvodnju sira, dominira sirilo proizvedeno iz plijesni *Rhizomucor miehei*. Postoje četiri tipa mikrobnih koagulanata koji imaju značajno veću proteolitičku aktivnost od kimozina. Prvo, prirodni tip, često označen kao 'tip L', koji karakterizira vrlo velika stabilnost na toplinu. Drugi, destabilizirani proizvod, često označen kao 'tip TL', nastaje oksidacijom prirodnog enzima, i karakterizira ga termolabilnost, veća ovisnost o pH i nešto manja proteolitička aktivnost od tipa L. Treći, dodatno termolabilni oblik, označen kao 'tip XL', nastaje jačom oksidacijom nego tip TL, i karakterizira ga dodatna termolabilnost, veća ovisnost o pH i nešto manja proteolitička aktivnost od tipa TL. Četvrti, kromatografski pročišćeni oblik tipa XL, označen kao 'tip XLG ili XP', ima funkcionalna svojstva poput tipa XL, ali sadrži manje neenzimatskih nečistoća. Sirilo proizvedeno iz plijesni *Cryphonectria parasitica* karakterizira vrlo visoka opća proteolitička aktivnost, dobra formacija gruša, niska ovisnost o pH i velika termolabilnost. Zbog svojih svojstava, proizvod se koristi samo za sireve zagrijavane na visokim temperaturama, kao što je Ementaler. Sirilo iz *Rhizomucor pusillus* slično je proizvodu iz *R. miehei*. Ono se koristio u prošlosti, ali nema prednosti u odnosu na koagulans iz *R. miehei*, i više se ne proizvodi komercijalno (Law i Tamime, 2010).

2.3.4. Prednosti i nedostaci

Mikrobna sirila koriste se u mnogim proizvodima zbog svoje ekonomske konkurentnosti. Proizvodnja sira prema FAO-u od 1961. godine porasla je za faktor od 3,5. To je utjecalo na ubrzano svjetsko istraživanje o razvoju novih zamjena za životinjsko sirilo. Upotreba telećeg sirila trenutno predstavlja samo 20-30 % od ukupne upotrebe enzima za zgrušavanje mlijeka. Mikrobn koagulansi su dopušteni u košer, halal, vegeterijanskim, organskim i proizvodima bez GMO-a (Feijoo-Siota i sur., 2015.).

Glavno ograničenje ovog tipa sirila je toplinska stabilnost i nizak C/P omjer. Stvorene su toplinski labilne varijante kako bi se olakšala njihova toplinska inaktivacija i omogućilo njihovo korištenje u industriji mlijeka, gdje se sirutka koristi kao nusproizvod. Mikrobnost sirila pokazuje veću proteolitičku aktivnost u usporedbi s telećim sirilom ili FPC-om, što može uzrokovati manji prinos sira i razvoj gorčine tijekom zrenja (Feijoo-Siota i sur., 2015).

2.4. BILJNO SIRILO

Među raznim koagulansima koji se koriste u tehnologiji sira značajno mjesto zauzimaju biljna sirila. Mnogi enzimi iz biljaka su se pokazali sposobnima za zgrušavanje mlijeka. Odabir prikladnog biljnog koagulansa važan je zbog sve veće globalne potražnje za sirom uz smanjenu ponudu telećeg sirila. Biljno sirilo dobiva se iz biljaka koje posjeduju enzime za zgrušavanje. Ovi biljni ekstrakti koriste se kao koagulansi za mlijeko još od davnina. Neki primjeri uključuju kardunski čičak, koru smokve ili koprive. Biljna sirila postala su predmetom sve većeg interesa u industriji sira zbog svoje jednostavne dostupnosti i jednostavnih procesa pročišćavanja. Enzimski aktivnost biljnog sirila uglavnom je povezana s djelovanjem asparaginskih proteaza ili onih s ostacima serina i cisteina. Korištenje različitih tipova biljnih proteaza u tehnologiji sira utječe na stupanj razgradnje proteinske matrice mlijeka, što dovodi do razlika u senzorskim svojstvima sira. Sirevi proizvedeni biljnim sirilima mogu postati gorkog okusa zbog prekomjerne proteolitičke aktivnosti, što ograničava njihovu industrijsku upotrebu. Za postizanje bolje kvalitete konačnog proizvoda od velike je važnosti odabir odgovarajućeg biljnog sirila i kontrola parametara proizvodnje. Ključni korak u odabiru odgovarajuće zamjene za teleće sirilo je procjena enzimskih aktivnosti (aktivnost zgrušavanja mlijeka i proteolitička aktivnost). Reološka i senzorska svojstva proizvedenih sireva povezana su s omjerom tih aktivnosti. Visoka vrijednost ovog omjera osigurava izvrstan proizvod sa željenom čvrstoćom i bez otpuštanja gorkih okusa tipičnih za biljne proteaze (Amira i sur., 2017).

2.4.1. Enzimi

Biljne proteaze se klasificiraju u različite skupine na temelju katalitičkog mehanizma koji se koristi tijekom hidrolitičkog procesa. Glavne vrste biljnih proteaza za zgrušavanje mlijeka su asparaginske, serinske i cisteinske. Broj i vrsta enzima ovisi o vrsti biljke i o dijelu unutar same biljke (Amira i sur., 2017).

2.4.1.1. Asparaginske proteinaze

Nalaze se u mnogim biljnim vrstama. Sudjeluju u razgradnji proteina tijekom procesa razvoja biljke, mehanizmu skladištenja proteina, reakcijama na stres i patogene i u procesima starenja biljke. Ovi enzimi imaju dva asparaginska ostatka odgovorna za katalitičku aktivnost, čija je specifičnost djelovanja usmjerena prema cijepanju peptidnih veza između hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Većina ovih enzima su heterodimerni proteini s velikim podjedinicama od 28-35 kDa i malim podjedinicama od 11-16 kDa (Amira i sur., 2017).

2.4.1.2. Serinske proteinaze

Na svojim aktivnim mjestima imaju serinske ostatke. Njihova glavna uloga u biljkama je gotovo jednaka kao i kod asparaginskih proteinaza, uz neke dodatne značajke. Serinske proteinaze su široko rasprostranjene u biljakama i nalaze se u nekoliko taksonomskih skupina. Ekstrahirani su, pročišćeni i karakterizirani iz nekoliko dijelova biljaka, posebice iz voća (Amira i sur., 2017).

2.4.1.3. Cisteinske proteinaze

Zovu se još i tiol proteinaze, imaju katalitički mehanizam koji uključuje cisteinsku skupinu na njihovom aktivnom mjestu (Amira i sur., 2017).

2.4.2. Enzimatska uloga biljnih proteinaza

Korištenjem biljnog sirila, dva glavna koraka enzimatske koagulacije mlijeka provode se na isti način kao i kod koagulacija telećim sirilom. Osim glavne funkcije zgrušavanja mlijeka, biljne proteaze imaju važnu ulogu kod početka zrenja sira. Hidrolizom sira pomoću zaostalog koagulasa nastaju supstrati za neke bakterije, čija razgradnja omogućuje razvoj arome tijekom zrenja. Intenzitet ovog učinka na kvalitetu sira ovisi o vrsti biljnog koagulansa, njegovoj dozi i enzimatskoj aktivnosti. Najvažnije svojstvo proteaza koja se koriste u proizvodnji sira je aktivnost koagulacije mlijeka, te sposobnost enzima da specifično hidrolizira κ -kazein iz mlijeka. Ona se mjeri različitim metodama (Amira i sur., 2017).

Što se tiče proizvodnje sira korištenjem biljnih sirila, početni cilj je uvijek proizvodnja koagulansa s maksimalnom specifičnom koagulantnom aktivnošću. Ova aktivnost ovisi o

nekoliko čimbenika, kao što su vrsta biljke, dio biljke, vrsta i koncentracija proteaza. Najveća aktivnost zgrušavanja primijećena je u ekstraktu lateksa, nakon kojeg slijede ekstrakti stabljike, lišća i cvjetova *Calotropis gigantea*. Dok je kod ekstrakata *C. cardunculus* najveća aktivnost uglavnom u cvjetovima. Vodeni ekstrakti iz cvjetova naširoko su korišteni kao zamjena za životinjsko sirilo u nekim obrtničkim sirevima iz Italije, Portugala i Španjolske (Amira i sur., 2017).

2.4.3. Utjecaj biljnih sirila na senzorska svojstva sira

Određivanje senzorskih svojstava sira je bitan korak u procjeni sposobnosti biljnog sirila da uspješno zamijeni teleće sirilo. Ova svojstva ovise o vrsti biljnog sirila. Neka sirila daju sireve sličnih organoleptičkih i senzorskih svojstava koja se dobivaju korištenjem životinjskih sirila. Drugi doprinose stvaranju vrlo različitih tekstura i okusa zbog prekomjerne proteolitičke aktivnosti i proizvodnje gorkih peptida. Stoga je provedeno nekoliko istraživanja kako bi se usporedila tekstura, okus i boja različitih sireva uz korištenje biljnih sirila (Amira i sur., 2017).

2.4.3.1. Tekstura i okus

Polutvrđi sir proizveden s onopordozinom ekstrahiranim iz cvjetova *Onopordum acanthium* pokazao je slične karakteristike kao i drugi komercijalni sirevi iste vrste. Ima blagu gorčinu sa slatkim naknadnim okusom zajedno s jakim zrelim okusom, koji je blago slan. Tekstura mu je dobra. Određena tekstura sira uglavnom je posljedica primarne proteolize mliječnog kazeina pomoću biljnih sirila, a ne prevladavajuće mikroflore. Tvrdoća svih sireva smanjuje se zbog enzimatske hidrolize kazeina tijekom sazrijevanja (Amira i sur., 2017).

Jedan primjer polutvrđog sira je Peshwari koji je napravljen od potpuno ili djelomično obranog mlijeka. Koristi se biljno sirilo iz korijena đumbira (*Zinigiber officinale*) koji se naziva đumbirova proteinaza. Za razliku od sira proizvedenog sa onopordozinom, sir proizveden uz pomoć đumbira ima kremastu teksturu i tijekom skladištenja ne dolazi do pogoršanja okusa i pojave gorčine. Slična tekstura postignuta je i kod sira Murcia al vino, korištenjem biljnog sirila. Mekši je, kremastiji i manje zrnat sir od istog sira pripremljenog uz teleće sirilo. Unatoč pretjeranim aktivnostima i razlikama u teksturi, neki biljni ekstrakti poput onih u *C. cardunculus* korišteni su u pripremi mekih sireva poput Roquerfort i Serra da estrela (Ben Amira i sur., 2017).

Nekoliko biljnih ekstrakata bi moglo uspješno zamijeniti teleći kimozi u smislu svojstava teksture. Na primjer gruš proizveden uz ekstrakt Kivija pokazuje slične vrijednosti parametara koji opisuju elastičnost i tvrdoću kao i gruš proizveden uz kimozi. S druge strane ekstrakt

dinje ne proizvodi gruš dobre teksture posebno vezano za tvrdoću. To se pripisuje visokoj proteolitičkoj aktivnosti što rezultira niskim omjerom aktivnost zgrušavanja mlijeka/proteolitička aktivnost. Kod analize okusa sira Mozarella proizvedenog uz ekstrakt kivija, rezultati su pokazali odsustvo gorkog okusa. Nije primijećena razlika pripremljenog uzorka i komercijalnog sira Mozarelle (Amira i sur., 2017).

Što se tiče zrelih sireva, postignuti su pozitivni rezultati korištenjem određenih biljnih ekstrakata. Ekstrakt cvijeta *Cynara scolymus* smatra se dobrom zamjenom za životinjsko sirilo kod proizvodnje sireva tipa Gouda. Fizikalno-kemijski parametri analizirani tijekom zrenja i organoleptička svojstva koja su postignuta su slična onima uz korištenje životinjskog sirila. Kod proizvodnje sireva s biljnim sirilom okus je povezan s vrstom mlijeka i njegovim sastavom. Uz bolji izbor mlijeka mogu se izbjeći nedostaci u okusu. Na primjer ekstrakt koagulansa *C. cardunculus* uspješno je iskorišten kod proizvodnje sira od kozjeg i ovčjeg mlijeka, koji za rezultat nemaju izražen gorak okus. Dok sirovi proizvedeni od kravljeg mlijeka uz isti ekstrakt imaju tendenciju razvijanja nepoželjne gorčine. To je vjerojatno rezultat ovčjih kazeina koji su manje osjetljivi od govedih kazeina na stvaranje hidrofobnih gorkih peptida nakon proteolitičkog djelovanja (Amira i sur., 2017).

2.4.3.2. Boja

Biljna sirila proizvode sireve poboljšane vizualne kvalitete, uglavnom boje, što je od velike važnosti za ispunjavanje zahtjeva potrošača. Smanjenje koncentracije biljnog ekstrakta (kruto/tekuće) i volumena koagulansa dodanog u mlijeko doprinosi boljim rezultatima boje. Također su provedene studije u kojima se testirala sposobnost biljnog sirila da proizvede sir usporediv s onim od telećeg sirila. Sirevi pripremljeni s ekstraktom *C. cardunculus* imaju tamniju i izraženiju žutu boju od sireva proizvedenih sa životinjskim sirilom. Korištenjem ultrafiltriranog mlijeka s istim koagulanskom dovodi do poboljšanja boje koja postaje svjetlija i manje žuta (Amira i sur., 2017).

2.4.3.3. Prinos sira

Određivanje prinosa po težini sira je jedan od najvažnijih parametara koji treba uzeti u obzir pri odabiru odgovarajuće zamjene za teleće sirilo. Optimalni prinos sira bitan je kod proizvodnje sira. Od ispitivanih biljnih sirila, većina su se ispostavila da nisu prikladna za proizvodnju sira u industrijskim razmjerima. Sirevi su skloni gubitku proteina kao rezultat prekomjerne proteolitičke aktivnosti (Amira i sur., 2017).

2.4.4. Ficus carica L.

Smokva je voće koje je posebno dobro prilagođeno različitim ekološkim uvjetima zemalja mediteranskog područja, a više od 600 kultivara se lokalno uzgajaju i nazivaju sortama. *Ficus carica L.* je obična smokva, vrsta koja se sastoji od brojnih sorti sa značajnom genetskom različitosti. Od velike je komercijalne važnosti. Ima sposobnost zgrušavanja mlijeka i njegov lateks (može se opisati kao gusta, kremasto bijela tvar koja nalikuje mlijeku, iako se može pojaviti i kao vodenasta suspenzija u nijansama žute ili narančaste) se stvara u specijaliziranim stanicama poznatim kao laticiferi, koje mogu biti pojedinačne stanice ili skupine stanica koje stvaraju cijevi, kanale ili međusobno povezane mreže unutar različitih dijelova biljaka) predstavlja važan izvor mnogih proteolitičkih enzima poznatih pod općim nazivom ficin. Ficin se odnosi na proteinski prah koji se priprema od plodova stabala smokve iz roda *Ficus*. Ficin pripada cistricin proteinazama. Sadrži dvije skupine proteolitičkih enzima, prva skupina ima visoku aktivnost zgrušavanja mlijeka, ali nisku proteolizu, a druga ima visok proteolitički učinak. Utvrđeno je postojanje više oblika ficina. Primjena lateksa od smokava u proizvodnji mliječnih proizvoda je vrlo ograničena. Sir Cheddar proizveden s ekstraktom smokve, nakon 8 mjeseci zrenja nije pokazao nikakvu razliku u usporedbi sa kontrolnim sirom proizvedenog uz životinjsko sirilo. Analizirana je upotreba pročišćenog ficina u proizvodnji sira i organoleptička svojstva, pokazalo se da nema razlika u okusu ni teksturi. Iako je upotreba ficina u tradicionalnoj proizvodnji sira nije proširena, u istočnoj Turskoj se koristi u mliječnom proizvodu koji se zove teleme. Ima sličnu teksturu kao jogurt, slatkastog je okusa, a tradicionalno se priprema dodajući nekoliko kapi ficina u mlijeko. U Italiji se lateks od smokve koristi za proizvodnju Caciocotte. Paralelno su se napravile usporedbe profilan proteinaze koristeći lateks od smokve i teleće sirilo. Pokazalo se da lateks od smokve ima snažno proteolitičko djelovanje. Drugo istraživanje pokazalo je da skuta napravljena sa ficinom je samo malo mekša i nešto manje težine od skute napravljene sa životinjskim sirilom. Također je ustanovljeno da uporaba ficina za zgrušavanje mlijeka u pripremi mlijeka dovodi do veće gorčine u mladom siru. Daljnja hidroliza gorkih peptida dovodi do nestanka gorčine pri produljenom odležavanju sira (Lomolino i sur., 2015).

2.4.5. Prednosti i nedostaci

Biljna sirila su postala predmetom sve većeg interesa u industriji sira zbog svoje jednostavne dostupnosti i jednostavnih procesa pročišćavanja. Upotrebom biljnih proteaza u proizvodnji

sireva promiče se veća dostupnost vegetarijancima i može poboljšati njihov nutritivni unos. Većina biljnih sirila proizvodi sireve gorkog okusa zbog prekomjerne proteolitičke aktivnosti što ograničava njihovu industrijsku upotrebu. Još jedan nedostatak je tekstura sira koja se razlikuje od sira proizvedenog sa životinjskim sirilom. Ovi nedostaci su uglavnom posljedica prekomjerne proteolitičke aktivnosti i zbog niskih omjera MCA/PA (Amira i sur.).

Od davnina su se cvjetovi *C. cardunculus* koristili u tradicionalnoj proizvodnji sira, posebno u Portugalu, gdje se smatra superiornim za sireve poput Serre i Serpe. Kardunski koagulansi nisu široko korišteni, ali se proizvode i koriste lokalno u nekim mediteranskim zemljama (Faccia i sur., 2012).

Biljno sirilo rijetko se ne koristi za komercijanu proizvodnju. Njihova upotreba je vrlo ograničena za proizvodnju sira u velikim količinama. Također se ne koriste zbog njihovog negativnog učinka na prinos sira i razvoj gorčine. Sadržaj suhe tvari, tvrdoća, gumastost i sposobnost žvakanja pokazuju značajne razlike u sirevima napravljenih s biljnim sirilima i telećim sirilom. I u usporedbi sa telećim sirilom koagulacija je spora (Whitehurst i van Oort, 2010).

3. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu istraženi su različiti tipovi sirila koji se koriste u proizvodnji sira, uključujući životinjsko sirilo, FPC (fermentacijom proizveden kimozin), mikrobnno sirilo i biljno sirilo.
2. Svaki od ovih tipova ima svoje specifične karakteristike i prednosti, ali i određene nedostatke.
3. Životinjsko sirilo, koje se tradicionalno koristi, dobiva se iz želuca mladih teladi, janjadi i koza. Iako je učinkovito, u procesu koagulacije mlijeka najveći problemi koji se javljaju su da njegova dostupnost može biti ograničena zbog ograničenog broja dostupne teladi i radi značajnog ekološkog otiska.
4. FPC je razvijen kao alternativno rješenje koje koristi tehnologiju rekombinantne DNA za proizvodnju kimozina. Ovaj tip sirila pokazuje slična svojstva kao teleće sirilo i ima značajan udio na tržištu zbog svoje visoke učinkovitosti i konzistentnosti. Eventualni nedostatak bi mogao biti slabije prihvaćanje genetske modifikacije u tehnologiji proizvodnje sirila.
5. Mikrobnno sirilo, proizvedeno od različitih vrsta plijesni, također se koristi u industriji sira. Iako može pružiti dobru koagulaciju mlijeka, njegova visoka proteolitička aktivnost

može negativno utjecati na teksturu i okus sira.

6. Biljno sirilo, dobiveno iz biljaka kao što su kardunski čičak i smokva, nudi alternativu za veganske sireve. Međutim, zbog varijabilnosti u enzimskim aktivnostima, može utjecati na kvalitetu konačnog proizvoda, često rezultirajući gorčinom i slabijim prinosom sira.
7. Svaki tip sirila ima svoje specifične prednosti i mane koje proizvođači sira moraju uzeti u obzir pri odabiru odgovarajućeg sredstva za koagulaciju mlijeka. Kontinuirana istraživanja i razvoj u području biotehnologije mogli bi dovesti do novih i poboljšanih tipova sirila koji će zadovoljiti potrebe industrije i potrošača.

4. POPIS LITERATURE

Andrén A (2011) Cheese: rennets and coagulants. U: Fuquay, J W (ured.) Encyclopedia of Dairy Sciences, 2.izd., Academic Press, 574-578. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00069-8>

Low Barrie A, Tamime AY (2010) Technology of cheesemaking, 2. izd., Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey.

Mercola J (2024) 90% of U.S. cheese contains GMO made by pfizer. *Biochecked*. <https://nourishcooperative.com/blog/genetically-modified-ingredients-in-most-us-cheeses>.
Pristupljeno: 30. kolovoza 2024.

Oštarić F, Antunac N, Cubric-Curik V, Curik I, Jurić S, Kazazić S i sur. (2022) Challenging sustainable and innovative technologies in cheese production: A review. *Processes* **10**, 529. <https://doi.org/10.3390/pr10030529>

Garg SK, Johri BN (1995) Application of recombinant calf chymosin in cheesemaking, *J Appl Anim Res* **7**, 105-114. <https://doi.org/10.1080/09712119.1995.9706060>

Liburdi K, Boselli C, Giangolini G, Amatiste S, Esti M (2019) An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species. *Foods* **8**, 600. <https://doi.org/10.3390/foods8120600>

Amira BA, Besbes S, Attia H, & Blecker C (2017) Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *Int J Food Prop* **20**, 76–93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>

Lomolino G, Zannoni S, Di Pierro G (2015) Characterization of crude esterase activity from two plants used in cheese making: *Cynara cardunculus* L. and *Ficus carica* L. *Food Biotechnol* **29**, 297-316. <http://dx.doi.org/10.1080/08905436.2015.1091976>

Feijoo-Siota L, Blasco L, Rodríguez-Rama JL, Barros-Velázquez J, de Miguel T, Sánchez-Pérez A i sur. (2014) Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Adv DNA Gene Seq* **8**, 44-55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25564028/>

Whitehurst JR, van Oort M, (2010) *Enzymes in Food Technology*, 2. izd., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Moschopoulou E (2011) Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Rumin Res* **101**, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09>

Britannica (2018) Zymogen. Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/science/zymogen>. Pristupljeno 30. kolovoza 2024.

Ficara E, Rozzi A, Cortelezzi P (2013) Theory of pH titration. *Biotechnol Bioeng* **82**, 28-37. <https://doi.org/10.1002/bit.10541>

Capper JL, Cady RA, Bauman DE (2009) The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J Anim Sci* **87**, 2160–2167. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1781>

Faccia M, Picariello G, Trani A, Di Luccia A, Loizzo P, Lamacchia C i sur. (2012) Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *Eur Food Res Technol* **234**, 527-533. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1668-0>

Izjava o izvornosti

Ja Ime i Prezime izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis