

## Maidon juoksuttaminen juustoksi ja laktoosin pilkkominen entsyymien avulla

Pauliina Lankinen, Antti Savin ja Sari Timonen

Mikrobiologian ja biotekniikan osasto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

### Työn tavoite

Työn tavoitteena on perehtyä mikrobien avulla tuotettuihin entsyymeihin joita hyödynnetään meijeriteollisuudessa maitotuotteiden valmistuksessa.

### Taustaa

Nykyään eri teollisuudenalojen hyödyntämät entsyymit on valmistettu lähes yksinomaan mikrobien avulla. Teollisuusentsyymejä tuotetaan viljelemällä mikrobeja kasvatusliemessä, josta niiden tuottamat entsyymit saadaan kerättyä, puhdistettua ja konsentroitua. Entsyymejä myydään käyttötarkoituksen mukaan jauheina, nesteinä tai rakeistettuina. Elintarviketeollisuus on yksi suurimmista entsyymejä hyödyntävistä teollisuudenaloista. Meijeriteollisuudessa entsyymejä käytetään etenkin juustojen, jogurttien ja vähälaktoosisten tuotteiden valmistuksessa. Juuston valmistuksessa maito on aluksi saostettava, jotta kiinteä ns. juustomassa saadaan erotettua jäljellejäävästä nesteestä eli herasta. Maidon saostaminen tapahtuu yleensä juoksuttimen avulla. Juoksutin sisältää entsyymejä, jotka katalysoivat maidon kaseiiniproteiinien pilkkoutumista. Maidon proteiineista noin 80 % on kaseiinia ja loput ovat heraproteiineja. Juoksuttimen tärkeimpänä entsyyminä toimii kymosiini eli renniini. Kymosiini on erikoistunut hydrolysoimaan ainoastaan maidon  $\kappa$ -kaseiinin fenyylialaniinin ja metioniin välistä sidosta. Sidoksen hydrolysoituminen johtaa proteiinien koaguloitumiseen ja saostumiseen. Saostuessaan proteiinit sitovat myös rasvaa. Heraproteiinit eivät saostu kymosiinin toimesta.

Juuston valmistuksessa heraa muodostuu lähes 90 % käytetystä maidon määrästä, eli 10 litrasta maitoa saadaan 1 kilo juustomassaa ja 9 kilo heraa. Hera onkin meijeriteollisuudessa muodostuva sivutuote, joka ilman jatkokäsittelyä on jätettä. Heraa hyödynnetään mm. laktoosin teollisen valmistamisen lähtöaineena, sekä eläinrehujen että elintarviketeollisuuden yleisenä raaka-aineena. Herasta eristettyjä heraproteiineja käytetään etenkin urheilijoiden suosiossa olevissa ravintolisissä.

Perinteisesti juoksutinta on eristetty teurastettujen vasikoiden mahalaukusta. Juustojen kysynnän kasvaminen ja vasikoiden saatavuuden heikentyminen on johtanut vaihtoestoisten

juoksuttimien kehittämiseksi aina 1960-luvulta lähtien. Uusien juoksuttimien kehittämisessä taloudellisemmat ja eettisemmät tuotantotavat ovat olleet tärkeässä asemassa. Eläinperäisen juoksuttimen rinnalle ovatkin tulleet mikrobiologiset tai mikrobeilla tuotetut juoksutteet. Mikrobiologisten juoksuttimien valmistamiseen käytetään pääasiallisesti sieniä, jotka tuottavat luonnostaan juustonjuoksuttimeksi soveltuvia proteolyttisiä eli proteiineja pilkkovia entsyymejä. Mikrobiologisena juoksuttimena käytetään etenkin *Rhizomucor miehei* -sienen tuottamia entsyymejä.

Geenitekniikan menetelmien kehittyminen on kuitenkin tuonut uusia mahdollisuuksia entsyymien tuottamiseen teollisessa mittakaavassa. Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla naudan kymosiini-geeni on pystytty siirtämään mikro-organismeihin, joissa sen tuottaminen on halvempaa ja tehokkaampaa. Kymosiiniä tuotetaan nykyään lähinnä sieni- tai bakteeriviljelmien avulla. Mikrobeilla saadaan tuotettua juoksutetta, joka sisältää lähinnä kymosiiniä, kun eläinperäisessä juoksuttimessa on myös muita entsyymeitä. Sienistä *Aspergillus niger* ja *Kluyveromyces lactis* ja bakteereista *Escherichia coli* ovat yleisimmät mikro-organismit kymosiinin tuotossa.

Myös maidon sokeria eli laktoosia voidaan pilkkoa entsyymien avulla, jolloin saadaan vähälaktoosisia tai laktoosittomia tuotteita. Laktoosi on disakkaridi, joka muodostuu yhdestä glukoosi- ja galaktoosimonomeeristä. Elimistössä laktoosi pilkkoutuu pienemmiksi yksiköiksi ohutsuolen erittämän laktaasientsyymien ( $\beta$ -D-galaktosidaasi) toimesta. Nisäkkäille on yleistä, että laktaasin erityis heikkenee tai loppuu kokonaan imeväisiän jälkeen. Ihmisen evoluution aikana osalle maapallon väestöstä on kuitenkin tapahtunut mutaatio laktaasi-geenissä, jonka seurauksena laktaasin erittyminen voi jatkua koko aikuisiän. Mutaatio on yleinen etenkin Euroopan väestön keskuudessa. Tilaa, jossa elimistö ei enää eritä laktaasientsyymiä tai sen erityis on heikentynyt, kutsutaan hypolaktasiaksi. Tällaisilla henkilöillä ruoan sisältämä laktoosi ei pilkkoudu ohutsuolessa, vaan se kulkeutuu paksusuoleen mikrobien hyödynnettäväksi. Hypolaktasiasta kärsiville henkilöille laktoosi aiheuttaa yleisesti vatsan särkyä, ilmavaivoja ja ripulia. Laktoosin imeytymättömyydestä johtuvia vatsaoireita kutsutaan yhteisnimellä laktoosi-intoleranssi. Elintarviketeollisuudessa vähälaktoosisia ja laktoosittomia tuotteita valmistetaan entsyymien avulla. Elintarvikkeita kutsutaan vähälaktoosisiksi, jos ne sisältävät laktoosia alle 1 g / 100 g tuotetta. Apteekeissa myydään myös erilaisia laktaasientsyymivalmisteita, jotka on tarkoitettu syötäväksi ennen laktoosipitoisen aterian nauttimista.

## **Työn periaate**

Työssä on tarkoitus soveltaa menetelmiä, joita käytetään juuston ja vähälaktoosisten tuotteiden valmistuksessa. Maidon saostaminen juustomassaksi ja heraksi suoritetaan mikrobiologisella juoksuttimella ja erottuvan heran sisältämää laktoosia pilkotaan laktaasientsyymivalmisteella. Laktoosin pilkkoutumien glukoosiksi todetaan glukoosin määritysliuskan avulla. Positiivisessa reaktiossa liuska muuttaa väriä glukoosin pitoisuudesta riippuen, mutta negatiivisessa ei tapahdu muutosta.

## Työhön liittyviä kysymyksiä

- Miksi elintarvikkeiden valmistuksessa voidaan käyttää geenimuunneltujen organismien tuottamia entsyymejä, mutta siitä ei tarvitse ilmoittaa tuotesisällössä?
- Mihin glukoosin määrittämisessä tapahtuva värireaktio perustuu?

## Työturvallisuus

Työssä tulee noudattaa hyviä laboratoriotyöskentelytapoja. Työn aikana on suositeltavaa käyttää suojatakkia ja suojakäsineitä.

## Työn arvioitu aika

Noin 45 – 60 minuuttia.

## Tarvikkeet

- Maito (ei laktoositon)
- Juustonjuoksutin (apteekista)
- Laktaasientsyymivalmiste kapseli (apteekista esim. Nolact tai Lactrase®)
- Glukoosi mittausliuska (esim. apteekista saatava Uristix)
- 100 ml mittalasi tai vastaava
- 100 ml keitinpullo tai vastaava lämpöä kestävä lasiastia
- Lämmitettävä vesihaude, voidaan myös käyttää kattilaa ja lämmittää siinä vettä lämpölevyllä tai bunsen-liekillä
- Lämpömittari
- 100 ml dekantterilasi tai vastaava
- Harsoliina (apteekista saatava leveä sideharso käy myös hyvin)
- Suppilo
- 2 ml ruisku (apteekin lääkeruisku)
- Lusikka
- Kertakäyttöinen Pasteur-pipetti tai vastaava
- Suojatakki ja suojakäsineet



Kuva 2. Maidon saostuminen.

## Työn suoritus

1. Mittaa 50 ml maitoa 100 ml:n pulloon ja lämmitä maito 40 °C:een vesihauteessa. Maidon lämpenemistä tulee seurata lämpömittarilla, jotta vältetään maidon ylikuumentumiselta.
2. Lisää 1 ml juustonjuoksutinta maitoon ja sekoita muutaman minuutin ajan (kuva 2).
3. Anna maidon seisoa 10–20 minuutin ajan ja seuraa proteiinien saostumista. Tässä vaiheessa maito alkaa erottua juustomassaksi ja heraksi (kuva 3). Saostuman muodostuttua sekoita lusikalle juustomassa rakeiseksi heran erottamiseksi massasta.
4. Leikkaa sopivan kokoinen pala harsokangasta ja suodata seos uuteen dekanterilasiin, jolloin juustomassa saadaan erotettua herasta (kuva 4).
5. Jaa hera kahteen eri astiaan. Lisää yhden laktaasikapselin sisältö toisen astian joukkoon ja sekoita. Laktaasi alkaa pilkkoa heran sisältämää laktoosia.
6. Tiputa pipetillä muutama pisara entsyymillä käsiteltyä heraa glukoosin mittaliuskan päälle ja seuraa värinmuutosta. Vertailuna käytä myös heraa jota ei ole käsitelty entsyymillä (kuva 5). Huom! Tulos luetaan käytettävän määritysliuskan ohjeiden mukaan.



Kuva 3. Juustomassan muodostuminen.

Kuva 4. Juustomassan ja heran erottaminen

## Havaintoja työstä ja lisämenetelmiä

- Miksi maitoa ei saa lämmittää yli 40 °C:een? Kokeile korkeammissa lämpötiloissa ja vertaile tuloksia.
- Onko lämpötilalla merkitystä jos maito saostetaan muulla tavoin (esim. hapolla)?
- Kokeile maidon saostamista jääkaappikylmällä maidolla. Mitä voit todeta?

## Työn kustannusarvio

Työn ohjeissa olevia tarvikkeita voidaan soveltaa tilanteen mukaan. Hinta-arvio apteekista saataville tuotteille: juustujuoksutin (4,2 €), laktaasientsyymivalmiste (5-10 €) ja glukoosin määritysliuska (n. 20 €). Koko työn kustannusarvio on noin 50 €.

## Vastauksia kysymyksiin

**Miksi elintarvikkeiden valmistuksessa voidaan käyttää geenimuunneltujen organismien tuottamia entsyymejä, mutta siitä ei tarvitse ilmoittaa tuotesisällössä?**

Lähes kaikki elintarviketeollisuudessa käytettävät entsyymit tuotetaan nykyään muuntogeenisillä mikrobeilla. Tuotteiden jalostuksessa ja valmistuksessa entsyymejä käytetään apuaineina ja koska se ei päädy lopulliseen tuotteeseen, sitä ei tarvitse mainita pakkausmerkinnöissä. Entsyymien tuottamiseen käytetty mikrobi tuhoutuu entsyymien puhdistusvaiheessa, eikä siten päädy elintarvikkeeseen.

## Mihin glukoosin määrittämisessä tapahtuva värireaktio perustuu?

Värireaktio perustuu kahden eri entsyymien, glukoosioksidiaasin ja peroksidiaasin, perättäisiin entsyymireaktioon. Ensimmäisessä reaktiossa glukoosioksidiaasi katalysoi glukoosin hapettumista, jossa muodostuu vetyperoksidia ja glukonihappoa. Peroksidiaasi taas katalysoi vetyperoksidin ja liuskan sisältämän kromogeeniortotolidin välistä reaktiota, joka havaitaan eri värisävyjen muodostumisena.

Glukoosin määrittäminen voi myös toteutua käyttämällä glukoosioksidiaasia, peroksidiaasia ja kaliumjodidia. Tällöin peroksidiaasi hapettaa vetyperoksidin avulla värittömän kaliumjodidin jodiksi, joka on väriltään ruskeaa.

Kuva 5. Glukoosi mittaliuskan värireaktio



