

VLIV MIKROBIÁLNÍ TRANSGLUTAMINASY NA TEXTURNÍ VLASTNOSTI MLÉČNÝCH FERMENTOVANÝCH VÝROBKŮ

Š. Marhons¹, I. Hyršlová², K. Medová², I. Mrvíková²,
J. Štětina¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta
potravinářské a biochemické technologie, Ústav mléka,
tuků a kosmetiky

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

The influence of transglutaminase on the textural properties of fermented dairy products

Abstrakt

Byl sledován vliv způsobu ošetření mléka mikrobiální transglutaminasou ve výrobě fermentovaného mléčného výrobku, s cílem dosáhnout lepších texturních vlastností. Pro experimenty byly vybrány jogurtové kultury CCDM 22 a směs kultur *S. thermophilus* CCDM 144 s *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767, které se vyznačují produkcí exopolysacharidů. Mikrobiální transglutaminasa (3 U/g bílkovin) byla aplikována do výroby jogurtů při teplotě 30 °C třemi různými způsoby: předinkubace mléka s následnou tepelnou inaktivací enzymu, 2 hodiny před inokulací jogurtové kultury a společně s jogurtovou kulturou. Nejvyšších tuhostí výrobků po výrobě bylo dosaženo u obou použitých jogurtových kultur při společné aplikaci enzymu s inokulem (333 ± 13 resp. 403 ± 71 Pa). Vyšší tuhosti, resp. viskozity a současně menších změn při skladování bylo dosaženo při použití směsné kultury s produkcí exopolysacharidů. Ošetření jogurtů mikrobiální transglutaminasou snížilo množství uvolněné syrovátky rozmíchaného koagulátu u všech enzymaticky ošetřených vzorků o 9 – 23 %.

Klíčová slova: transglutaminasa, enzymatická polymerace, jogurtové bakterie, reologie, jogurt

Abstract

In this work, the influence of milk treatment by microbial transglutaminase in the production of the fermented dairy product was studied, to achieve better textural properties. Yoghurt cultures RX CCDM 22 and a mixture of cultures of *S. thermophilus* CCDM 144 with *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767 with exopolysaccharides production were used. Microbial transglutaminase (3 U /g protein) was applied to yoghurt production at 30 °C in three different ways: preincubation of milk followed by thermal inactivation of the enzyme, 2 hours

before inoculation of the yoghurt culture and together with the yoghurt culture. The highest firmness of the products after production was achieved with both used yoghurt cultures (333 ± 13 and 403 ± 71 Pa, respectively) when microbial transglutaminase was applied at the same time as the yoghurt culture. Higher firmness, resp. viscosity and smaller changes during storage of yoghurt for 21 days were achieved using a mixed slimy culture. Treatment of yoghurts with microbial transglutaminase reduced the amount of released whey in all enzymatically treated samples by 9–23 %.

Keywords: transglutaminase, enzymatic polymerization, yoghurt cultures, rheology, yoghurt

Úvod

Problematikou posledních dekád je vylepšování vlastností výrobků s použitím širokého spektra přídatných látek, které se dnes potýkají s odporem části spotřebitelů a nebo nejsou v jiných zemích k výrobě vůbec povoleny. Právě proto se část výzkumu věnuje studiu transglutaminasy, která by mohla být prostředkem k dosažení cílené konzistence nejen nízkotučných mléčných výrobků (Ozer a kol., 2007, Lorenzen a kol., 2002). Mikrobiální transglutaminasa (EC 2.3.2.13) katalyzuje přenos acylu mezi γ -karboxamidovou skupinou vázaného glutaminu v peptidovém řetězci a primární ϵ -aminoskupinou aminokyseliny lysinu za vzniku isopeptidových vazeb. Je to jednoduchý polypeptid o molekulové hmotnosti cca 38 kDa. Optimální rozmezí pH pro mikrobiální transglutaminasu je 5 až 8 s reziduálním projevem aktivity při pH 4 a 9 (isoelektrický bod 8,9). Pro katalytickou aktivitu je optimální rozmezí teplot 40 – 50 °C. K intakci tohoto enzymu dochází již při záhřevech nad 70 °C po dobu několika minut (Kieliszek a Misiewicz, 2014, Ho a kol., 2000). Vhodnými substráty pro transglutaminasu jsou bílkoviny kaseinové frakce vzhledem k otevřené struktuře, zejména κ -kaseinu vyskytujícího se na povrchu kaseinových micel. Nativní syrovátkové bílkoviny nejsou příliš vhodnými substráty pro mikrobiální transglutaminasu. Jejich citlivost vůči enzymu může být zvýšena tepelnou denaturací, redukčními činidly anebo změnou pH (Ozer a kol., 2007). Tvorba polymerů prostřednictvím isopeptidových vazeb ovlivňuje vlastnosti výrobku díky nově vzniklé prostorové struktuře mléčných bílkovin. Jejich zesílení vede ke snížení permeability gelové struktury jogurtů, a tím ke zvýšení pevnosti výsledné struktury produktu Lorenzen a kol., 2002, Færgemand a Murray, 1998). U mléčných fermentovaných výrobků je transglutaminasa aplikována za účelem úpravy textury, viskozity a konzistence produktu. Jednou z výhod aplikace enzymu do jogurtů může být také prevence synereze (Farnsworth a kol., 2006; Lorenzen a kol., 2002). Podobný vliv na texturní vlastnosti fermentovaných mléčných výrobků (zvýšení tuhosti, snížení synereze) mají exopolysacharidy, což jsou extracelulární polysacharidy produkované mimo jiné některými kmeny jogurtových kultur. Exopo-

lysacharidy jsou produkovány bakteriemi v tzv. kapsulární nebo volné formě (Hassan a kol., 2010). Mikrobiální transglutaminasu lze při výrobě fermentovaných mléčných výrobků aplikovat několika způsoby. Ze dvou nejběžněji užívaných možností je ošetření suroviny transglutaminasou s tepelnou inaktivací enzymu a následující fermentací. V druhém případě je enzym přidáván společně se startovací kulturou (Guyot a Kulozik, 2011). Dalšími důležitými parametry je, kromě fáze aplikace enzymu, také teplota inkubace, doba enzymatické reakce a dávka enzymu (Gharibzahedi a Chronakis, 2018). V předložené studii jsme se rozhodli stanovit vliv definované koncentrace transglutaminasy (3 U/ g bílkoviny) na mikrobiologické a reologické vlastnosti jogurtu, kdy byl enzym aplikován v různých výrobních fázích, a posoudit účinek použití kultury produkující a neprodukující exopolysacharidy ve vztahu k ošetření výrobků transglutaminasou.

Materiál a Metody

Mikroorganismy

Ze Sbírký mlékařských mikroorganismů (CCDM) Laktoflora® (Česká republika) byly pro testování vybrány – jogurtová kultura CCDM 22 (RX) a směšná kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 144 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767 (T) s prokázanou produkcí exopolysacharidů. Směšná kultura pro výrobu jogurtů byla připravena v poměru 2:1.

Výroba jogurtu

Všechny jogurty byly vyráběny ze vstupní suroviny 1,5 % UHT mléka (Mlékárna Pragolaktos a.s., Česká Republika) s přísadkou sušeného odstředěného mléka (50 g/l; Moravia Lacto a.s., Česká Republika), následně homogenizovány a pasterovány při teplotě 85 °C po dobu 10 minut. Po zchlazení bylo mléko očkováno 0,1 % (v/v) jogurtové kultury. Zrání jogurtů probíhalo v obalu při teplotě 30 °C po dobu 16-18 hod. V různých fázích výroby byla do výrobků přidávána transglutaminasa o dávce 3 U/g bílkovin (SAPRONA Texture LX2, C&P Group, Německo) následujícími způsoby:

1. Homogenizace → pasterace → inokulace (kontrola bez přísadky transglutaminasy)
2. Homogenizace → předinkubace mléka s enzymem (30 °C/2 hod) → pasterace (inaktivace) → inokulace
3. Homogenizace → pasterace → inkubace mléka s enzymem (30 °C/ 2 hod) → inokulace
4. Homogenizace → pasterace → inokulace + přísadka enzymu

Mikrobiologické a chemické analýzy

Počty jogurtových bakterií byly stanoveny dle normy ČSN ISO 7889 a chemické složení dle norem – stanovení celkové sušiny ČSN ISO 6731, stanovení obsahu tuku ČSN ISO 2446, stanovení celkového obsahu bílko-

vin – Kjeldahlova metoda, stanovení obsahu laktózy – komerční Lactose Assay Kit (Megazyme, Irsko).

Reologické vlastnosti

Reologické vlastnosti mléčných gelů byly stanoveny při teplotě 5 °C pomocí reometru Viscotester iQ (Thermo Haake, Německo) s geometrií lopatkového vřetene FL22. Byla stanovena časová závislost smykového napětí při frekvenci otáčení geometrie 100 rpm, Maximální hodnota napětí na počátku měření uvádí mez pevnosti gelu, z hodnoty napětí na konci měření (5 min) byla vypočtena zdánlivá viskozita při smykové rychlosti 10,4 s⁻¹. Následně byla stanovena závislost napětí na smykové rychlosti při poklesu frekvence otáčení geometrie ze 100 na 1 rpm za 2 minuty, ze které byla vyhodnocena zdánlivá viskozita při smykové rychlosti 1 s⁻¹.

Vaznost vody

Stanovení vaznosti jogurtů bylo provedeno v centrifugačních zkumavkách s objemem 15 ml při teplotě 5 °C. Jogurt byl nejprve rozmíchán míchadlem Ultra-Turrax T25 (IKA-Werke GmbH & Co., Německo) při frekvenci otáček 12 000 min⁻¹ po dobu 5 minut. Rozmíchaný koagulát byl pomocí centrifugy EBA 200 (Hettich GmbH & Co. KG, Německo) vystaven odstředivé síle 3000 RCF po dobu 15 minut. Vyhodnocení vaznosti vody (míry synerese) bylo stanoveno jako množství uvolněné syrovátky vztažené na celkové množství jogurtu.

Stanovení stupně polymerace

Pro stanovení stupně polymerace proteinů byla použita gelová permeační chromatografie na přístroji ÄKTA Pure (GE Healthcare, USA) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, USA) dle práce Guyot a Kulozik (2011). Jako mobilní fáze byl použit pufr obsahující 6M močovinu, 0,1M fosfát sodný, 0,1M chlorid sodný, 0,1 hm.% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát hydrát (CHAPS). Příprava vzorků spočívala v odstranění tuku z neutralizovaného vzorku (pH 7) odstředěním a následným kyselým vysrážením a odstředěním kaseinové frakce, která byla po neutralizaci rozpuštěna v mobilní fázi s přísadkou 1 hm.% dithiothreitolu. Pro samotnou separaci byl zvolen průtok mobilní fáze 0,50 ml·min⁻¹ s nástřikem 50 µl vzorku. Stanovení frakcí bílkovin probíhalo pomocí UV detektoru při vlnové délce 280 nm. Z chromatogramu byly vyhodnocovány plochy píků v rozmezí retenčních časů 14 – 21 minut jako oligomery. Monomery byly vyhodnocovány jako plochy píků v retenčních časech od 24 do 28 minut. Výpočet stupně polymerace byl proveden dle následující rovnice.

$$\text{Stupeň polymerace} = \frac{A_{\text{oligomery}}}{A_{\text{celková}}} \cdot 100 (\%)$$

Kde je: $A_{\text{oligomery}}$ Plocha píků oligomerů bílkovin.
 $A_{\text{celková}}$ Celková plocha píků oligomerů a monomerů bílkovin.

Výsledky a diskuse

Mikrobiální transglutaminasu, jak už bylo zmíněno v úvodu, lze do výroby mléčných fermentovaných výrobků aplikovat několika způsoby. V předložené studii byly testovány tři varianty aplikace transglutaminasy – v prvním případě byl enzym přidán do mléka a po dvou hodinách při 30 °C inaktivován pasterací (2.), v druhém byl enzym přidáván po pasteraci a dvě hodiny před očkovaním jogurtovou kulturou (3.) a v posledním případě byl enzym aplikován společně s jogurtovou kulturou (4.).

Některé studie poukazují na mírně negativní vliv přídavku mikrobiální transglutaminasy na růst a životaschopnost jogurtových bakterií – *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Příkladem je pokles počtu živých kolonií *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v jogurtech ošetřených tímto enzymem během skladování (6 týdnů) v práci Neve a kol. (2001). Pravděpodobným důvodem poklesu počtu živých laktobacilů je snížení dostupnosti zdrojů dusíku – proteinů a peptidů s nízkou molekulovou hmotností a jednoduchých aminokyselin. Oproti tomu, ve studii Dinkci (2012) nebyl během 14 dní skladování pozorován významný vliv na počet životaschopných kultur při použití různých koncentrací mikrobiální transglutaminasy (0,74; 1,29 a 1,85 U/g bílkoviny). V předložené studii nebyl také pozorován žádný významný negativní vliv transglutaminasy na životaschopnost a růst jogurtových bakterií po 21 dnech skladování (Tab. 1). Všechny jogurty splňovaly podmínku minimálního celkového počtu mikroorganismů (>10⁷ KTJ/g) vyhlášky č. 274/2019 Sb. U všech jogurtů byly stanoveny i základní chemické parametry: sušina 14,51 ± 0,18 %; tuk 1,51 ± 0,07 %; bílkoviny 4,99 ± 0,23 %; laktóza 7,13 ± 0,15 %.

Reakcí katalyzovanou mikrobiální transglutaminasou mezi volnými glutaminovými a lysinovými zbytky v peptidových řetězcích vznikají prostřednictvím isopeptidových vazeb oligomerní struktury. K tomuto zesílení dochází zejména na povrchu kaseinových micel. V této práci bylo proto sledováno relativní zastoupení oligomerů bílkovin vzniklých po dvou hodinách enzymatické reakce (výrobní postup 2. a 3.). Celkové zastoupení

oligomerů po enzymatické reakci bylo 38,8 ± 2,8 %, což odpovídá nárůstu o 19 % oproti neošetřenému mléku. Mazuknaite a kol. (2013) ve své práci sledovali vliv dávky enzymu a teploty na celkový obsah vzniklých oligomerů bílkovin. Výstupem jejich studie bylo dosažení celkového množství 32 % bílkovinných oligomerů při teplotě 40 °C za 60 minut enzymatické reakce (4 U/g bílkovin). Dosažení porovnatelného stupně polymerace za polovinu doby enzymatické reakce je přisuzováno optimálnějším teplotním podmínkám pro enzymatickou reakci (Kieliszek a Misiewicz, 2014).

Z technologického hlediska byl zkoumán vliv aplikace mikrobiální transglutaminasy v různých částech technologického postupu a exopolysacharidů produkovaných jogurtovou kulturou na reologické vlastnosti finálních výrobků. Hodnocení sledovaných parametrů probíhalo po výrobě a po 21 dnech skladování (Tab. 2 a 3).

Parametr, který určuje vlastnosti nerozmíchaného koagulátu, je mez pevnosti gelu a představuje vnímání textury jogurtu spotřebitelem při nabírání a rozmíchávání lžící. Uvedené hodnoty zdánlivé viskozity (při smykové rychlosti 10 s⁻¹) pak vyjadřují vnímání konzistence jogurtu při následném míchání jogurtu lžící. Ošetření mléka mikrobiální transglutaminasou vede k tvorbě modifikované struktury s užšími póry, ve kterých dochází k zadržování vody obsažené ve výrobku (Zhang a kol., 2012). Byla stanovena míra synerese resp. vaznost vody jako množství uvolněné syrovátky při namáhání v odstředivém poli (Tab. 4). Tvorba prostorové sítě prostřednictvím transglutaminasy zapříčinila ve všech případech ošetření významné snížení množství uvolněné syrovátky při namáhání. Snížení synerese jogurtů ošetřených mikrobiální transglutaminasou zaznamenali i např. Chen a kol. (2018) po ošetření koncentráту mléčných bílkovin mikrobiální transglutaminasou při teplotě 35 °C (2,5 U/g proteinu; 1 h). V případě kontrolní kultury RX bylo dosaženo nejnižší míry synerese v případě ošetření mléka 2 hodiny před inokulací kultury. U směsné kultury T nebyl vliv způsobu aplikace MTG statisticky průkazný (P>0,05). Průměrně se synerese ošetřených jogurtů snížila o 9 – 23 % oproti neošetřenému kontrolnímu pokusu.

Z tabulky 2 je patrné, že aplikace transglutaminasy do výroby jogurtů průkazně (P<0,05) zvýšila mez pevnosti

Tab. 1 Počty jogurtových bakterií a hodnoty pH po výrobě a po 21 dnech skladování (log KTJ/g)

Kultura / vzorek	pH	0 dní			21 dní			
		<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lbc. bulgaricus</i>	Σ jogurtových bakterií	pH	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lbc. bulgaricus</i>	Σ jogurtových bakterií
RX 1	4,77	8,83	7,20	8,84	4,24	8,46	6,90	8,47
2	4,89	8,51	7,08	8,52	4,31	8,48	6,81	8,49
3	4,60	8,90	7,92	8,94	3,98	8,30	7,84	8,43
4	4,93	7,26	6,69	7,36	4,20	7,53	6,52	7,57
T 1	4,73	8,84	6,92	8,84	4,20	8,49	6,72	8,50
2	4,67	8,30	7,36	8,35	4,24	8,49	6,78	8,50
3	4,66	8,28	7,18	8,31	4,11	8,18	6,91	8,20
4	4,74	8,45	8,26	8,66	4,15	7,95	6,89	7,99

* RX – jogurtová kultura CCDM 22 (kontrola),

T – směsná kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 144 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767. (táhlovitá kultura)

Tab. 2 Porovnání meze pevnosti a zdánlivé viskozity nerozmíchaného koagulátu po výrobě a po 21 dnech skladování

Kultura / Vzorek	0 dní		21 dní	
	Mez pevnosti (Pa)	Zdánlivá viskozita (Pa.s)*	Mez pevnosti (Pa)	Zdánlivá viskozita (Pa.s)*
RX 1	163 ± 12,8 ^{a, A}	1,99 ± 0,12 ^{a, A}	205 ± 31,1 ^{a, B}	2,67 ± 0,33 ^{a, B}
2	189 ± 12,8 ^{b, A}	2,85 ± 0,20 ^{b, A}	234 ± 8,9 ^{a, B}	3,67 ± 0,21 ^{b, B}
3	322 ± 34,0 ^{c, A}	5,13 ± 0,73 ^{c, A}	456 ± 14,0 ^{b, B}	5,81 ± 0,75 ^{c, A}
4	333 ± 13,4 ^{c, d, A}	3,97 ± 0,52 ^{d, A}	533 ± 76,1 ^{b, B}	5,58 ± 0,58 ^{c, d, B}
T 1	387 ± 23,5 ^{e, A}	3,83 ± 0,14 ^{d, A}	352 ± 5,8 ^{c, B}	3,88 ± 0,05 ^{b, A}
2	395 ± 83,2 ^{e, d, e, f, A}	5,22 ± 0,16 ^{c, A}	415 ± 9,5 ^{d, A}	5,84 ± 0,16 ^{c, d, B}
3	350 ± 9,1 ^{c, f, g, A}	8,55 ± 0,85 ^{e, A}	380 ± 24,5 ^{c, e, B}	10,66 ± 0,87 ^{e, B}
4	403 ± 71,8 ^{c, d, e, f, g, A}	7,07 ± 0,77 ^{f, A}	396 ± 27,6 ^{d, e, A}	9,61 ± 0,95 ^{e, B}

* při smykové rychlosti 10,4 s⁻¹ po rozmíchání koagulátu (5 min při frekvenci otáček lopatkového míchadla 100 rpm) průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka 3 stanovení; hodnoty s odlišnými malými písmeny v horním indexu ve sloupci jsou statisticky průkazně odlišné (P < 0,05), hodnoty s odlišnými velkými písmeny v horním indexu značí statistickou průkaznou odlišnost (P < 0,05) hodnot daného parametru před a po skladování.

* RX – jogurtová kultura CCDM 22 (kontrola),

T – směsná kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 144 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767. (táhlivá kultura)

Tab. 3 Zdánlivá viskozita rozmíchaného koagulátu po výrobě a po 21 dnech skladování

Kultura / Vzorek	0 dní	21 dní
	Zdánlivá viskozita při smykové rychlosti 1 s ⁻¹ η_1 (Pa.s)	Zdánlivá viskozita při smykové rychlosti 1 s ⁻¹ η_1 (Pa.s)
RX 1	9,4 ± 0,5 ^{a, A}	13,0 ± 1,4 ^{a, B}
2	13,9 ± 0,9 ^{b, A}	18,6 ± 1,4 ^{b, B}
3	69,4 ± 6,5 ^{c, d, A}	102,8 ± 4,5 ^{c, B}
4	61,3 ± 13,5 ^{c, A}	115,0 ± 16,5 ^{c, d, B}
T 1	12,4 ± 0,6 ^{a, A}	14,7 ± 0,3 ^{a, B}
2	20,1 ± 0,7 ^{f, A}	25,8 ± 1,2 ^{e, B}
3	82,4 ± 7,7 ^{g, A}	136,0 ± 6,6 ^{f, B}
4	80,6 ± 8,7 ^{d, g, A}	139,0 ± 1,4 ^{a, B}

* po rozmíchání koagulátu (5 min při frekvenci otáček lopatkového míchadla 100 rpm)

průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka 3 stanovení; hodnoty s odlišnými písmeny v horním indexu ve sloupci jsou statisticky průkazně odlišné (P < 0,05), hodnoty s odlišnými velkými písmeny v horním indexu značí statistickou průkaznou odlišnost (P < 0,05) viskozity před a po skladování.

* RX – jogurtová kultura CCDM 22 (kontrola),

T – směsná kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 144 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767. (táhlivá kultura)

Tab. 4 Množství uvolněné syrovátky po namáhání v odstředivém poli

Kultura / Vzorek	Množství uvolněné syrovátky (%)	Kultura / Vzorek	Množství uvolněné syrovátky (%)
RX 1	53,0 ± 1,2 ^a	T 1	48,6 ± 0,4 ^e
2	45,5 ± 2,5 ^b	2	43,5 ± 0,3 ^{b, c}
3	42,8 ± 0,7 ^c	3	44,8 ± 1,1 ^{b, d}
4	46,5 ± 1,7 ^{b, d}	4	47,0 ± 1,6 ^{b, d}

průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka 4 stanovení; hodnoty s odlišnými písmeny v horním indexu jsou statisticky průkazně odlišné (P < 0,05).

* RX – jogurtová kultura CCDM 22 (kontrola),

T – směsná kultura *Streptococcus thermophilus* CCDM 144 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767. (táhlivá kultura)

i viskozity po výrobě ve všech způsobech použití u obou použitých kultur, s výjimkou meze pevnosti vzorků připravených směsnou jogurtovou kulturou (T) s produkcí exopolysacharidů. Nejvyšších mezí pevnosti i viskozity bylo dosaženo při aplikaci enzymu před fermentací s následnou inokulací a při současné aplikaci enzymu s kulturou. Podobné poznatky zaznamenali i Ziarno a Zareba (2020), kteří ve své práci docílili požadované pevné struktury jogurtů při aplikaci mikrobiální transglu-

aminasy (1,5 U/g proteinu) 12 hodin před fermentací. Jogurty vyrobené pomocí směsné jogurtové kultury (T) vykazovaly vyšší meze pevnosti i viskozity všech vzorků vůči kontrolní kultuře RX, což odpovídá účinku exopolysacharidů na texturní vlastnosti (Tiwari a kol., 2021, Genès a kol., 2011).

Během skladování došlo ve většině případů k navýšení meze pevnosti o 5 – 60 %, pouze u vzorků T1 a T4 došlo ke statisticky neprůkaznému (P > 0,05) snížení meze pevnosti o 9 resp. 1 %. Při aplikaci enzymu společně s jogurtovou kulturou zůstává transglutaminasa ve výrobku reziduálně aktivní. Ze získaných dat se nabízí, že reziduální aktivita transglutaminasy negativně ovlivňuje tyto vlastnosti výrobku během skladování. Bönisch a kol. (2007) toto tvrzení ve své práci vyvrací a přisuzuje tuto problematiku spíše sekundárnímu účinku ošetření transglutaminasou nekovalentním interakcím proteinových oligomerů a jejich roli v gelové struktuře během skladování. Přítomnost exopolysacharidů směsné kultury (T) vliv MTG na pevnost gelu snížila, zatímco v případě zdánlivé viskozity došlo k synergickému působení obou faktorů.

Dále byly hodnoceny tokové vlastnosti rozmíchaného koagulátu. Působení transglutaminasy během fermentace (3. a 4.) ovlivnilo charakter jeho tokového chování, které nebylo možno, na rozdíl od zbývajících vzorků, popsat modelem viskoplastické látky. Při vyhodnocení byla proto pouze odečtena zdánlivá viskozita při smykové rychlosti 1 s⁻¹ (Tab. 3), která má přímý vztah k textuře výrobku a odpovídá například stékání koagulátu ze lžice nebo vnímání viskozity výrobku v ústech. Vliv působení MTG na hodnoty zdánlivé viskozity

byl ovšem obdobný. V tomto případě bylo opět dosaženo vyšších viskozit u vzorků s použitou směsnou kulturou (T) s produkcí exopolysacharidů. K významnějším nárůstům zdánlivé viskozity došlo u vzorků s neinaktivovanou transglutaminasou. Ve své práci Farnsworth a kol. (2006) zaznamenali zvýšení viskozity jogurtů po ošetření mléka mikrobiální transglutaminasou s následnou inaktivací enzymu a inokulací kultur. Těchto výsledků bylo dosaženo i v naší studii, kdy došlo k nárůstu viskozity

ty ošetřených vzorků vůči neošetřeným. V průměru se zdánlivá viskozita zvyšovala během skladování u všech enzymaticky ošetřených vzorků, kdy u vzorků společné aplikace enzymu s jogurtovou kulturou došlo ke zvýšení zdánlivé viskozity o osminásobek.

Ošetření mléka mikrobiální transglutaminasou vede k tvorbě modifikované struktury s užšími póry, ve kterých dochází k zadržování vody obsažené ve výrobku (Zhang a kol., 2012). Byla stanovena míra synerese resp. vaznost vody jako množství uvolněné syrovátky při namáhání v odstředivém poli (Tab. 4). Tvorba prostorové sítě prostřednictvím transglutaminasy zapříčinila ve všech případech ošetření významné snížení množství uvolněné syrovátky při namáhání. Snížení synerese jogurtů ošetřených mikrobiální transglutaminasou zaznamenali i např. Chen a kol. (2018) po ošetření koncentráty mléčných bílkovin mikrobiální transglutaminasou při teplotě 35 °C (2,5 U/g proteinu; 1 h). V případě kontrolní kultury RX bylo dosaženo nejnižší míry synerese v případě ošetření mléka 2 hodiny před inokulací kultury. U směsné kultury T nebyl vliv způsobu aplikace MTG statisticky průkazný ($P > 0,05$). Průměrně se synerese ošetřených jogurtů snížila o 9–23 % oproti neošetřenému kontrolnímu pokusu.

Závěr

Dosahování lepších vlastností potravinářských výrobků je dnes velmi diskutované téma. Výrobní sektor se potýká s nátlakem spotřebitelů, kteří považují používání zahušťujících, stabilizačních a emulgačních látek za negativní vlastnost výrobku, která je odrazuje od jeho zakoupení. Proto bylo cílem našeho výzkumu ověřit možnosti výroby jogurtu s lepšími texturními vlastnostmi prostřednictvím modifikace mléčných bílkovin mikrobiální transglutaminasou a posoudit způsob její aplikace společně s modifikací textury výrobku pomocí kultur produkující exopolysacharidy. Ošetření mikrobiální transglutaminasou společně s exopolysacharidy se dle dosažených výsledků jeví jako velmi příznivé v ohledu sníženého množství uvolněné syrovátky, které může negativně ovlivnit spotřebitele v jeho vnímání finálního výrobku. Stejně jako vliv na texturní vlastnosti výrobku má samotné vedení enzymatické reakce co se týče teploty inkubace, dávky enzymu, doby enzymatické reakce a způsob aplikace v technologickém postupu. Dle našich experimentů docházelo k nejvyššímu nárůstu tuhosti jogurtů po výrobě při společné aplikaci enzymu se směsnou jogurtovou kulturou *S. thermophilus* CCDM 144 a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767. Obecně se reologické vlastnosti jogurtů během skladování mění. Tyto změny mohou být způsobené tvorbou nových vazeb mezi bílkovinami s rostoucí kyselostí výrobku. Nárůst těchto vlastností byl zaznamenán u všech enzymaticky ošetřených vzorků, kdy bylo dosahováno podstatně vyšší viskozity, a to zejména u vzorků, ve kterých zůstával enzym aktivní. Produkce exopolysacharidů směsnou kul-

turou ovšem minimalizovala změny pevnosti gelu během skladování enzymaticky ošetřených jogurtů.

Poděkování

Tato práce mohla být uskutečněna díky finanční podpoře Národní agentury pro zemědělský výzkum (MZE ČR) při řešení projektu č. QK 1910024.

Literatura

- ČSN 57 0530 (1979): Metody zkoušení mléka a mléčných výrobků, Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 2446 (2010): Mléko – Stanovení obsahu tuku (Rutiní metoda), Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 6731 (2011): Mléko, smetana a zahuštěné neslazené mléko – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda), Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 7889 (2004): Jogurt – Stanovení počtu charakteristických mikroorganismů – Technika stanovení počtu kolonií při 37 °C, Český normalizační institut, Praha.
- Vyhláška č. 274/2019 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje
- Bönisch, M. P., Huss, M., Lauber, S., Kulozik, U. (2007). Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 585–595.
- Chen, L., Li, Y., Han, J., Yuan, D., Lu, Z., Zhang, L. (2018). Influence of transglutaminase-induced modification of milk protein concentrate (MPC) on yoghurt texture. *International Dairy Journal*, 78, 65–72.
- Dinkci, N. (2012). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of strained yoghurt. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(13), 2238–2246.
- Færgemand, M., Murray, B. S. (1998). Interfacial Dilatational Properties of Milk Proteins Cross-Linked by Transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 884–890.
- Farnsworth, J. P., Li, J., Hendricks, G. M., Guo, M. R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65(1–2), 113–121.
- Gentès, M.-C., St-Gelais, D., Turgeon, S. L. (2011). Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 91(5), 645–661.
- Gharibzadeh, S. M. T., Chronakis, I. S. (2018). Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. *Food Chemistry*, 245(August 2017), 620–632.
- Guyot, C., Kulozik, U. (2011). Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 21(9), 628–635.
- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., Qvist, K. B. (2010). Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632–1638.
- Ho, M.-L., Leu, S.-Z., Hsieh, J.-F., Jiang, S.-T. (2000). Technical Approach to Simplify the Purification Method and Characterization of Microbial Transglutaminase Produced from *Streptococcus lactis* var. *lactis*. *Journal of Food Science*, 65(1), 76–80.
- Kieliszek, M., Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59(3), 241–250.
- Lorenzen, P. C., Neve, H., Mautner, A., Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 152–157.
- Mazuknaite, I., Guyot, C., Leskauskaite, D., Kulozik, U. (2013). Influence of transglutaminase on the physical and chemical properties of acid milk gel and cottage type cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(3–4), 119–124.
- Neve, H., Lorenzen, P. C., Mautner, A., Schlimme, E., Heller, K. J. (2001). Effects of transglutaminase treatment on the production of set skim milk yoghurt: Microbiological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53(4), 349–359.

- Ozer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A., Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17(3), 199–207.
- Tiwari, S., Kavitha, D., Devi, P. B., Halady Shetty, P. (2021). Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1585–1595.
- Zhang, L. L., Zhang, L. W., Han, X., Li, Y. H. (2012). Effects of Fat on Relationship between Particle Size and Physical Properties of Cross-Linking Yogurt by Purified Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587. *Advanced Materials Research*, 468–471 (February 2012), 1631–1637.
- Ziarno, M., Zareba, D. (2020). The effect of the addition of microbial transglutaminase before the fermentation process on the quality characteristics of three types of yogurt. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 109–119.

Korespondující autor: Ing. Štěpán Marhons,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Technická 5, 166 28 Praha 6,
email: Stepan.Marhons@vscht.cz

*Přijato do tisku: 5. 11. 2021
Lektorováno: 20. 11. 2021*

VLIV ČASU DOJENÍ A TÝDNE LAKTACE NA VARIABILITU NÁDOJE A SLOŽENÍ MLÉKA U DOJNIC V ČASNÉ LAKTACI

Magdaléna Štolcová, Dalibor Řehák, Luděk Bartoň
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

**Effects of milking time and week of lactation
on the variability in milk yield and milk
composition in early lactation dairy cows**

Abstrakt

Hodnocení vlivu času dojení a týdne laktace na variabilitu nádoje a obsahu mléčných složek bylo provedeno u 71 dojnic holštýnské plemene v období prvních pěti týdnů laktace. Celkem bylo použito 568 vzorků mléka z ranního a odpoledního nádoje. Množství nadojeného mléka během prvních pěti týdnů laktace se postupně zvyšovalo a výrazně vyšší nádoj byl pozorován při ranním dojení. Obsah tuku s postupující laktací naopak klesal. Signifikantně vyšší obsah mléčného tuku byl pozorován v mléce z odpoledního dojení. Kromě základních složek byly sledovány také rozdíly ve složení mastných kyselin (MK) mléčného tuku. Obsah MK s krátkým řetězcem (SCFA) a kyseliny palmitové (C16:0) se s postupující laktací významně zvyšoval, zatímco obsah MK s dlouhým řetězcem (LCFA), kyseliny stearové (C18:0) a kyseliny oktadecenové (C18:1) s postupující laktací výrazně klesal. Obsah SCFA, MK se středně dlouhým

řetězcem a C16:0 byl vyšší ve vzorcích mléka z ranního dojení, zatímco obsah LCFA, mononenasycených MK a C18:1 byl naopak vyšší ve vzorcích z odpoledního dojení. Vývoj obsahu MK souvisí především s metabolickou zátěží v rané fázi laktace. Příčiny rozdílů v obsahu MK mléčného tuku mezi vzorky mléka z ranního a odpoledního dojení dosud nejsou zcela zřejmé a budou pravděpodobně souviset s cirkadiánními rytmy. Tyto rozdíly však mohou hrát důležitou roli při hodnocení vztahů mezi přímými indikátory energetické bilance a jednotlivými složkami mléka.

Klíčová slova: holštýnský skot, dojení, složení mléka, mastné kyseliny mléčného tuku, infračervená spektroskopie

Abstract

The effect of milking time and lactation week on the variability in milk yields and milk contents was investigated in 71 Holstein dairy cows during the first five weeks of lactation. A total of 568 milk samples from morning and afternoon milkings were used. The amount of milk gradually increased during the first five weeks of lactation and a higher milk yield was observed during the morning milking. On the contrary, the fat content decreased with advancing lactation. A significantly higher milk fat content was observed in the milk from the afternoon milking. In addition to the basic components, the differences in milk fatty acid (FA) composition were also determined. The content of short-chain FA (SCFA) and palmitic acid (C16:0) increased significantly with advancing lactation, while the content of long-chain FA (LCFA), stearic acid (C18:0), and octadecenoic acid (C18:1) gradually decreased as the lactation advanced. The content of SCFA, medium-chain FA, and C16:0 was higher in the milk samples from the morning milking, while the content of LCFA, monounsaturated FA, and C18:1 was higher in the samples from the afternoon milking. The progression of milk FA contents is mainly related to the metabolic load in early lactation. The causes of different milk FA contents between morning and afternoon milking samples have not been completely explained yet and will probably be related to circadian rhythms. However, these differences can play an important role in assessing the relationships between direct energy balance indicators and some of milk components.

Key words: Holstein cattle, milking, milk components, milk fatty acids, infrared spectroscopy

Úvod

Složení mléka je ovlivněno mnoha faktory, mezi které patří především výživa, roční období, genetika, pořadí a fáze laktace, ale také čas a četnost dojení. Změny základních složek mléka v průběhu dojení jsou poměrně známé, ale přesné důvody této variability se dosud zjistit nepodařilo. Stanovení těchto změn je podstatné pro