

Využití transglutaminázy při výrobě tvarohu

Pavel Vintr

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel Vintř**
Osobní číslo: **T15454**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití transglutaminázy při výrobě tvarohu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište technologii výroby tvarohu.
2. Charakterizujte transglutaminázu a možnosti jejího použití v mlékárenském průmyslu.

II. Praktická část

1. Vytvořte modelové vzorky tvarohů s přídavkem a bez přídavku transglutaminázy.
2. Proveďte jejich základní chemickou analýzu.
3. Sledujte jejich viskoelastické vlastnosti.
4. Stručně shrňte závěry práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] LEE, S.Y., CHOI, M-J., CHO, H-Y., DAVAATSEREN, M. Effects of High-Pressure, Microbial Transglutaminase and Glucono-Lactone on the Aggregation Properties of Skim Milk. *Korean Journal Food Science*. 36, 3, 2016, 335-342.

[2] DI PIERRO, P., MARINIELLO, L., SORRENTINO, A., GIOSAFATTO, C. V. L., CHIANESE, L., PORTA, R. Transglutaminase-Induced Chemical and Rheological Properties of Cheese. *Food Biotechnology*. 24, 2010, 107-120.

[3] DMYTRÓW, I., JASIŃSKA, M., DMYTRÓW, K. Effect of microbiological transglutaminase on selected physicochemical properties of tvarog. *Italian Journal of Food Science*. 4, 22, 2010, 449-460.

Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Michaela Černíková, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

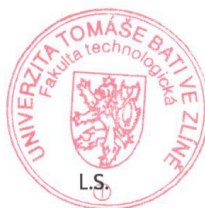
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Vinkt Pavel

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 23.5.18

Vinkt Pavel

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje využití transglutaminázy v procesu tvorby tvarohu. Jedná se o významný enzym, používaný v oblasti potravinářství. Práce je rozdělena do dvou základních částí. Teoretická část práce je zaměřena na popis technologie výroby tvarohu. To zahrnuje dopravu mléka a jeho příjem do mlékárny, následné tepelné ošetření, odstředění, homogenizaci a deaeraci. Dále jsou zde popsány bakterie mléčného kvašení a vlivy syřidla, které jsou využívány při výrobě tvarohu. Konec této teoretické části je zaměřen na obecnou charakterizaci transglutaminázy a možnosti jejího použití v mlékárenském průmyslu. Praktická část práce se věnuje zjišťování vlivu transglutaminázy na tvorbu tvarohu. Jsou zde prezentovány experimenty zaměřené na viskoelastické vlastnosti vznikajícího gelu v procesu výroby tvarohu. Jsou při nich použity dvě koncentrace transglutaminázy při třech teplotách (20,0; 22,5 a 25,0 °C).

Klíčová slova: tvaroh, transglutamináza

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the use of transglutaminase in the process of curd cheese production. It is an important enzyme that is used in the food industry. The thesis is divided into two basic parts. The theoretical part of the thesis is focused on description of the technology of curd cheese production. This includes the transport of milk and its intake to the dairy, subsequent heat treatment, centrifugation, homogenization and deaeration. Hereinafter, lactic acid bacteria and the influence of rennet that is used to produce curd cheese are described. The end of this theoretical part focuses on the general characterization of transglutaminase and its usage in and out of the dairy industry. The practical part deals with the study of the influence of transglutaminase on the production of cottage cheese. Here are presented results of curd viscoelastic properties during cheese production and during cooling. In these thesis were used two concentrations of transglutaminase at three different temperatures. (20,0; 22,5 a 25,0 °C).

Keywords: curd, transglutaminase

Tímto bych chtěl srdečně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce MVDr. Michaele Černíkové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost, trpělivost, čas, cenné rady a konzultace při zpracování bakalářské práce a v neposlední řadě za odborné vedení a praktickou pomoc.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 TECHNOLOGIE VÝROBY TVAROHU.....	12
1.1 DOPRAVA MLÉKA.....	12
1.2 PŘÍJEM MLÉKA V MLÉKÁRNĚ.....	13
1.3 TEPelné ošetření mléka.....	14
1.3.1 Pasterace mléka.....	14
1.3.2 Pasterační zařízení.....	15
1.4 DALŠÍ ZPŮSOBY TEPelnÉHO ošetření mléka.....	17
1.4.1 Ultratepelné ošetření mléka (UHT).....	17
1.4.2 Sterilace v obalu.....	18
1.5 Odstředění mléka.....	18
1.6 HOMOGENIZACE.....	19
1.7 STANDARDIZACE.....	19
1.8 DEAERACE.....	20
1.9 MLÉKAŘSKÉ KULTURY PRO VÝROBU TVAROHU.....	20
1.9.1 Kyselé srážení mléka.....	20
1.10 SYŘIDLO K VÝROBĚ TVAROHU.....	21
1.10.1 Sladké srážení mléka.....	21
1.11 TVAROH.....	21
1.11.1 Tradiční výroba tvarohu.....	22
1.11.2 Výroba odstředivkovým způsobem.....	23
1.11.3 Výroba termotvarohu.....	23
1.12 VADY TVAROHŮ.....	23
2 CHARAKTERIZACE TRANSGLUTAMINÁZY A MOŽNOSTI JEJÍHO POUŽITÍ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU.....	25
2.1 VYUŽITÍ MODERNÍCH POTRAVINÁŘSKÝCH ENZYMŮ PŘI VÝROBĚ POTRAVIN.....	25
2.2 TRANSGLUTAMINÁZA.....	25
2.2.1 Transglutamináza v mlékárenském průmyslu.....	26
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	28
3 CÍLE PRÁCE.....	29
4 MATERIÁL A METODIKA.....	30
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
ZÁVĚR.....	44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	50
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51

SEZNAM TABULEK.....	52
SEZNAM PŘÍLOH.....	53

ÚVOD

Oblast potravinářství je průmyslový obor, jenž se věnuje zpracování živočišných a také rostlinných surovin pro účely výroby potravin. Její nedílnou součástí je také mlékárenský průmysl, který se zabývá zpracováním mléka na rozličné mléčné produkty. Mléko a z něj vyrobené potraviny jsou odpradáвна spjaty s výživou člověka. Mnoho lidí si v dnešní době nedokáže představit život bez různých mléčných výrobků. Mezi ně se zcela určitě řadí i tvaroh a jeho různé modifikace. Nedílnou součástí výroby tvarohu mohou být různé druhy enzymů. Tyto enzymy se mohou v potravinách vyskytovat přirozeně (mikrobiální, živočišné, rostlinné) anebo tam mohou být záměrně přidávány, aby došlo k vylepšení určitých specifických vlastností.

Jedním z mikrobiálních enzymů, který se v potravinářství používá je i transglutamináza. Pro jeho jedinečné vlastnosti je předpoklad jeho hojného použití v potravinářském průmyslu. V posledních letech je transglutamináza využívána nejen při výrobě tvarohu, ale i jogurtů a také například v masném průmyslu. Tento enzym svým působením zdokonaluje určité fyzikální vlastnosti potravin, jako je elasticita, viskozita, prodloužení trvanlivosti, krémovitost a zlepšení konzistence.

Cílem práce proto bylo zjistit, zda a jakým způsobem transglutamináza ovlivňuje výrobu tvarohu a jaký má vliv na jeho výsledné viskoelastické vlastnosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY TVAROHU

Tvaroh je mléčný výrobek s hrudkovitou konzistencí, který má smetanovou chuť a bílou barvu. Základní surovinou pro výrobu tvarohu je kravské mléko. Tvaroh se z něj vyrábí srážením kazeinu, bílkoviny obsažené v mléce. Jedná se o velmi zdravou a vysoce nutričně hodnotnou potravinu. Níže následuje popis výroby tvarohu.

1.1 Doprava mléka

Svoz mléka je součástí celého mlékárenského procesu a výroby konzumního mléka a mléčných výrobků včetně tvarohu. Dovoz mléka musí být zajištěn tak, aby byl zabezpečen plynulý provoz výroby a nevznikaly zbytečné prostoje. Svozový plán, který je vypracován mlékárnou, je tvořen seznamem pravidelných linek a tzv. jízdním řádem určujícím v kolik hodin daná svozová linka přijede. Nedochozí tak k prostojům a frontám u příjmové stanice. Dovoz mléka do mlékáren značně ovlivňuje celou výrobu a při velkých vzdálenostech činí dovoz podstatnou část ceny mléka (*HÖKL, Jan a Mirko ŠTĚPÁNEK, 1962*).

Mléko nesmí být při dopravě vystaveno možnosti znečištění, příliš prudkému otřásání (aby se tuk nestloukl v hrudky), nepříznivému vlivu vysokých nebo naopak nízkých teplot. Zvýšení teploty mléka v průběhu dopravy má za následek silné rozmnožení mikroorganismů vyskytujících se v syrovém mléce, zpravidla bakterií mléčného kvašení. Jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících kvalitu mléka je proto jeho teplota. Správné podmínky musí být dodrženy během celé přepravy. Chladicí řetězec musí být zachován a při dodání mléka do mlékárny nesmí teplota zchlazeného mléka překročit 10 °C. Pokud není svoz mléka prováděn každý den, musí být mléko u prvovýrobce zchlazeno na teplotu 6 °C nebo nižší. Při denním svozu musí být mléko podle nařízení ihned ochlazeno na teplotu 8 °C nebo nižší (*GAJDŮŠEK, Stanislav, 1998, Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004*).

V současné době jsou nejpoužívanějším dopravním zařízením pro transport mléka automobilové cisterny. Cisterny na svoz mléka mají uzavřené nerezové nádrže ve tvaru zploštělého ležatého válce. Existují nejrůznější typy cisteren, které mají přepravní objem od 2 000 do 26 000 litrů mléka. Nejvíce jsou využívány cisterny s objemem 26 000 litrů. Cisterny určené pro tento druh transportu musejí být označeny nápisem „mléko“ nebo „potraviny“. Uvnitř cisteren jsou komory rozdělené přepážkami ([online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.cisterny-parcisa.cz>). Každá cisterna je také vybavena vlnolamou a průtokoměrem

na měření množství vydaného mléka a zařízením pro automatický odběr vzorku odkapem tzv. autosampler, který pracuje na principu peristaltické pumpy. Zařízení je uloženo v chladičí skříni a mezi jeho součásti patří i kalibrovaný průtokoměr. Toto nové zařízení zvyšuje bezpečnost práce. Řidiči nemusí lézt na cisternu pro odběr cisternového vzorku. Automatický odběr je přehlednější a pohodlnější (PENG, Jian a Aroma WAN, 1997-HEN, Jie a kol., 2017).

1.2 Příjem mléka v mlékárně

Z cisteren se mléko čerpá v příjmové části mlékárny. Kontroluje se především teplota mléka a přítomnost reziduí inhibičních látek (RIL) v cisternovém vzorku mléka. Řidič je povinen předat bazénové vzorky mléka od prvovýrobce do příjmové laboratoře mlékárny. Tyto vzorky slouží k dohledání reziduí inhibičních látek v případě, že jsou rezidua inhibičních látek zjištěna u cisternového vzorku mléka. Příjmová laboratoř mlékárny musí dále provádět vyšetření bazénových vzorků mléka podle vlastních potřeb. Množství mléka se dá zjistit měřicími objemovými čerpadly nebo magneticko-indukčními průtokoměry. Může se také měřit podle hmotnosti mléka v cisterně na mostních vahách. Provozovatel mlékárny musí zajistit, aby bylo mléko po přijetí okamžitě zchlazeno na teplotu, která nepřekračuje 6 °C. Tato teplota musí být udržena do doby zpracování (JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014).

Příjmová stanice mlékárny by měla být vybavena dostatečnou skladovací kapacitou, aby nebyla ohrožena plynulá výroba a chod provozu. Příjmová stanice by měla být vybavena filtry, čerpadlem, odlučovačem vzduchu a objemovým průtokovým měřidlem. Z cisterny je mléko přečerpáno přes filtr, v němž se zachytí hrubší nečistoty, protéká odlučovačem vzduchu, průtokoměrem a deskovým chladičem do úschovných tanků. Tanky na příjem mléka jsou konstruovány na objem 100 000 až 200 000 l. Bývají jednoplášťové bez izolace. Teplota mléka je udržována na 5 až 8 °C. Objem přijatého mléka lze zjistit mechanickým průtokoměrem. Dále je zjišťováno složení a kvalita mléka podle vzhledu, vůně, kyselosti, teploty, obsahu tuku a dalších ukazatelů (BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990, JANŠTOVÁ, Bohumíra a Josef HOLEC, 2004).

1.3 Tepelné ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka je jedním z nejdůležitějších procesů celé technologie výroby mléka a mléčných výrobků. Cílem tepelného ošetření je zničení choroboplodných mikroorganismů v mléce a také minimalizace zdravotního rizika vyvolaného těmito potenciálně přítomnými patogeny. Tepelné ošetření zajišťuje bezpečnost a prodloužení trvanlivosti mléka. Syrové mléko obsahuje mnoho mikroorganismů, které pro lidi představují různá zdravotní nebezpečí a také mikroorganismy přispívající k rychlé zkáze mléka (*FORMAN, Ladislav a Jaroslav ČEPIČKA, 1990, BUŇKA, František a kol., 2013*).

1.3.1 Pasterace mléka

Pasterace mléka je nejdůležitějším způsobem tepelného ošetření mléka. Účelem pasterace je zničení vegetativní mikroflóry včetně patogenních mikroorganismů. Používá se záhřev na teplotu od 65 do 125 °C. Pasterační způsob ošetření mléka musí odpovídat příslušným právním předpisům a zaručovat zdravotní nezávadnost mléka a mléčných výrobků. Účinek pasterace se dá posoudit podle výše použité teploty, doby trvání záhřevu a rychlosti dosažení požadované teploty. Účinnost pasterace se vyjadřuje tzv. pasteračním efektem. Pasterační efekt vyjadřuje podíl mikroorganismů inaktivovaných při pasteraci. Pohybuje se kolem 99,99 % (*FORMAN, Ladislav a Jaroslav ČEPIČKA, 1990, BUŇKA, František a kol., 2013, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*).

Rozlišujeme tři druhy pasterace:

- 1) Vysoká pasterace, při které je mléko zahříváno na 85 °C a teploty vyšší po dobu několika sekund (desítek sekund). Dosahuje se pasteračního efektu 99,99 %. Vysoká pasterace probíhá na kontinuální lince a patří mezi nejúčinnější. Proto se nejvíce využívá u pasterace konzumního mléka. Naproti tomu smetana je pasterována nejméně při 90 °C a naopak maximální pasterační teplota je 110 °C.
- 2) Šetrná pasterace, při níž působí vysoká teplota po krátkou dobu. Mléko je zahříváno na teplotu 72–75 °C po dobu 15–20 sekund a pasterační efekt je 99,9 %. Šetrná pasterace se používá především pro tepelné ošetření mléka na výrobu sýrů.
- 3) Dlouhodobá pasterace je charakterizována aplikací nízké teploty po dlouhou dobu. Mléko se zahřívá na 63–65 °C po dobu 30 minut a dosahuje se pasteračního efektu v rozmezí 95-99 %. Tento typ pasterace se může použít například u přípravy základní směsi k výrobě

mražených smetanových krémů (*ŠNIRC, Jůlius, Jozef GOLIAN a spol., 2016, BUŇKA, František a kol., 2013, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin*).

1.3.2 Pasterační zařízení

Pasteraci mléka je možno provádět na různých typech pasteračních zařízení, z nichž je možné jmenovat:

- Kotlový pastér, který se ve velkoobjemových mlékárnách již nepoužívá. Stále se může používat především v mini mlékárnách nebo na farmách. Jedná se o kotel, ve kterém je mléko ohříváno horkou vodou z mezistěny kotle. Je vybaven míchadlem, teplotním čidlem a regulátorem teploty.
- Trubkový pastér se skládá z trubek do sebe zasunutých. Mléko protéká v tenké vrstvě ve střední trubce a je zahříváno ze dvou stran. Nejčastěji se používají pro pasteraci nad 100 °C. Vysoká rychlost proudícího mléka snižuje napalování na stěny.
- Deskový pastér neboli deskový výměník tepla je nejpoužívanějším zařízením na tepelné ošetření mléka. Je využíván k ohřevu i chlazení mléka vzájemnou výměnou tepla čili regenerací (*JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014*).

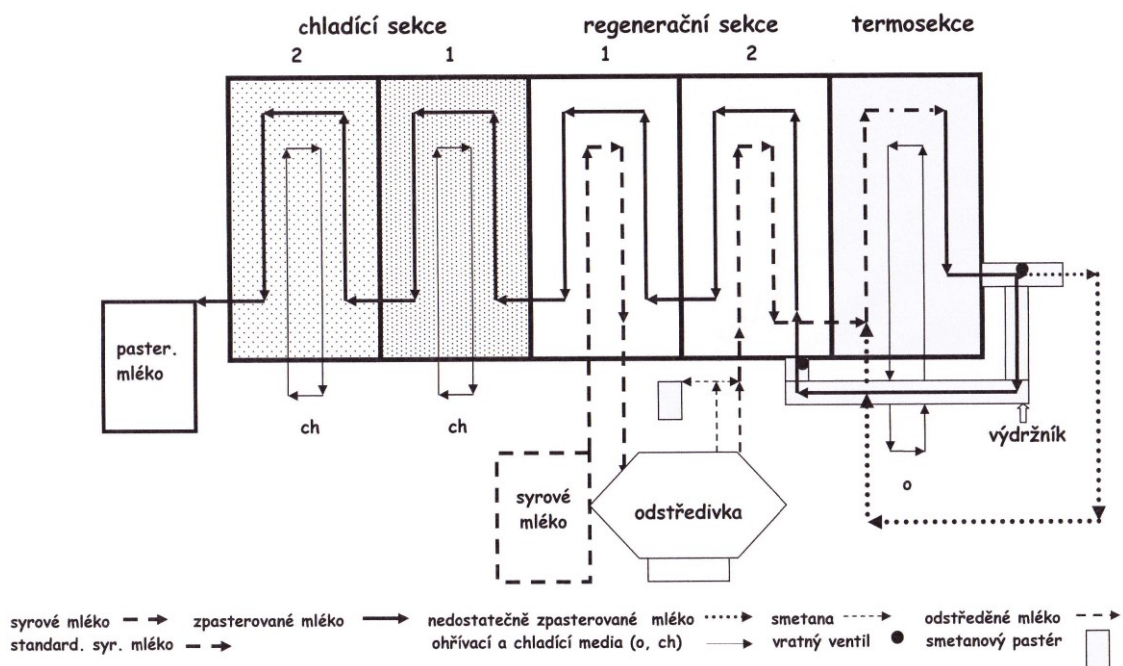
Základním prvkem pastéru jsou pracovní desky z nerezového ocelového plechu, které jsou navzájem spojeny gumovým těsněním. Desky mají uspořádané výstupky a úzké lomené žlábků, tím se dosahuje turbulentního proudění mléka, což vede k rychlejší výměně tepla a k celkovému prohrátí mléka. Přítok mléka je veden otvory, které jsou umístěny v rozích desek. Desky jsou zavěšeny na vodících tyčích, seřazeny do určitých sekcí a navzájem jsou spojeny sešroubováním nebo jsou svařeny. Jednotlivé sekce jsou od sebe odděleny mezistěnami. Počet desek záleží na velikosti pastéru a může se pohybovat od 10 do 200. Mezi deskami pastéru je mléko ohříváno. Po jedné straně desky prochází zahřívána kapalina a po druhé straně v protisměru ohřívací kapalina.

Deskový pastér má pět sekcí:

- 1) první regenerace (předehřívá syrové mléko na odstředivou teplotu)
- 2) druhá regenerace (předehřívá mléko z odstředivky před vlastní pasterací)
- 3) pasterační sekce, tzv. termosektor (vlastní pasterace)

- 4) první chladicí sekce (chlazení vodou)
- 5) druhá chladicí sekce (chlazení ledovou vodou) (BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990, BUŇKA, František a kol., 2013, JANŠTOVÁ, Bohumíra 2012).

Syrové mléko je čerpáno z úchovného tanku čerpadlem do první regenerační sekce k předehřátí na teplotu kolem 40-45 °C, poté je vedeno na odstředivku, kde je oddělována smetana. Ta pak odtéká do samostatné pasterační sekce. Mléko z odstředivky putuje do druhé regenerační sekce, kde je mléko zahřáto horkým již zpasterovaným mlékem na teplotu kolem 60-65 °C, a přechází do pasterační sekce. V pasterační sekci (termostekce) dochází k záhřevu mléka horkou vodou na požadovanou pasterační teplotu. Poté je mléko vedeno přes výdržník do druhé regenerační sekce, pak do první regenerační sekce a úplně nakonec do první a druhé chladicí sekce. Tam se mléko ochlazuje na teplotu pod 10 °C (JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014, BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990).



Obrázek 1: Schéma pasterace mléka (převzato z JANŠTOVÁ, Bohumíra, 2012)

Pastér je vybaven mimo jiné následujícím zařízením: automatický regulátor teploty, automatické bezpečnostní zařízení, které brání nedostatečnému záhřevu mléka, automatický bezpečnostní systém, který brání smíchání tepelně ošetřeného mléka s mlékem nedostatečně zahřátým, automatické registrační zařízení. Mezi automatické bezpečnostní zařízení, které

brání nedostatečnému záhřevu mléka, patří teplotní čidlo a vratný ventil. Tento ventil umožňuje navrácení nedostatečně zahřátého mléka zpět do celého procesu pasterace. Další nezbytnou součástí bezpečnostního systému je automatické registrační zařízení, které ukládá získané údaje z registračních teploměrů (*BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990*).

1.4 Další způsoby tepelného ošetření mléka

1.4.1 Ultratepelné ošetření mléka (UHT)

Podle platné legislativy je možné syrové mléko ošetřit i velmi vysokou teplotou (UHT-Ultra-high temperature). Ultratepelným ošetřením mléka dochází v mléce ke zničení téměř všech mikroorganismů včetně spór a k inaktivaci enzymů. U mléka se prodlužuje trvanlivost na 3 až 6 měsíců. Výsledkem je prakticky sterilní produkt (trvanlivé mléko). UHT ošetření je prováděno při velmi vysoké teplotě, a to 135–150 °C po velmi krátkou dobu 3–4 s, čímž dojde k zajištění zdravotní nezávadnosti (*TAMIME, Adnan, 2009, DEETH, Hilton a Nivedita, DATTA, 2011*). UHT ošetření je možné provádět přímým či nepřímým způsobem.

Přímý UHT záhřev je technologie tepelného ošetření mléka vyznačující se jednou specifickou výhodou a tou je, že mléko nepřichází do kontaktu s horkým kovovým povrchem, nenapaluje se a tím se snižuje riziko vzniku typické vařivé příchuti. Přímý ohřev lze rozdělit na dva způsoby: vstřikování páry do mléka (uperizace) nebo vstřikování mléka do páry (palarizace). Uperizace je způsob kontinuální sterilace, kdy se mléko vstříkem ostré páry zahřívá velmi krátce až na teplotu 150 °C. Doba záhřevu bývá 1 sekunda s následnou výdrží 3–4 sekund. Mléko se předeřívá na deskovém výměníku na teplotu 70–80 °C. Pak je čerpáno vysokotlakou pumpou do injektoru (uperizátoru), kde se vstříkem páry okamžitě zahřívá na požadovanou teplotu. Poté se mléko dvoustupňově chladí, nejprve v expanzní nádrži, kde dochází k odloučení přidané vody a teprve potom v aseptickém výměníku tepla. Palarizace probíhá v infuzní komoře. Mléko se čerpá z vyrovnávací nádrže a je předeříváno v deskovém výměníku na teplotu kolem 70–75 °C. Uvnitř infuzní komory je uložena tryska, která středem komory rozprašuje tenké pramínky mléka. Ze stran je přiváděna ostrá pára proti mléku, které je tak rychle a šetrně zahříváno na sterilační teplotu 143–145 °C po dobu 1 sekundy. Poté upravené mléko přichází do výdržníku, kde musí být udržováno při sterilační teplotě 3–4 sekundy. Pak je vedeno do expandéru, kde se teplota mléka sníží na 75–73 °C, a zároveň dochází k odstranění zvodnění mléka. Aseptickým čerpadlem je mléko vedeno do homogemizátoru a do výměníku, kde se ochladí na teplotu plnění (25–22 °C) anebo se čerpá do

úchovných tanků (*John W. Fuquay a Patrick J, 2011, BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990*).

Pro nepřímý ohřev mléka se využívají desková nebo trubková zařízení, podobná pasteračním zařízením, která se vyrábí z nerezové oceli. Jako topné médium se uvádí horká voda a pára. Počáteční ohřev je proveden v části regenerace. Vstupující mléko se zde ohřívá a vystupující mléko naopak chladí. Systém pro nepřímý ohřev obsahuje přehřívací sekci, kde se mléko udržuje při 90 °C po dobu 30-60 s. Následuje termosektor, kde se dosáhne teploty minimálně 135 °C. Poté mléko proudí do výdržníku a do chladicí sekce (*John W. Fuquay a Patrick J, 2011, BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990*).

1.4.2 Sterilizace v obalu

Sterilizace je proces, při kterém se mléko ošetřuje nepřímým ohřevem v hermeticky uzavřených obalech (nejčastěji kovových, případně skleněných). Teplota u tohoto procesu musí být nejméně 100 °C. Při sterilizaci dochází k devitalizaci všech mikroorganismů, včetně bakteriálních spór. Díky tomu je dosaženo sterility mléka. Trvanlivost takto upraveného mléka bývá při pokojové teplotě až několik týdnů. Kontrolní vzorky mléka jsou ponechány 15 dnů při 30 °C, nebo 7 dnů při 55 °C, v neotevřeném obalu. U kontrolních vzorků nesmí být zjištěna žádná změna, která by mohla, jakkoliv ohrozit finální produkt (*BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK, 1990, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004*).

1.5 Odstředění mléka

Odstředování patří mezi nejdůležitější fyzikální procesy používané v mlékárenském průmyslu. Základním principem odstředění je oddělení mléčného tuku ve formě smetany od odstředěného mléka. Mléčný tuk, který je v podobě mikroskopických tukových kuliček, má nižší hmotnost než mléčné plazma, kde jsou tukové kuličky dispergované. Syrové mléko má v závislosti na plemeni po nadojení 3,6 až 6,5 % mléčného tuku. Odstředěním se získá smetana o obsahu 35 až 40 % tuku. Mléčný tuk je tedy ve smetaně přibližně 10x zkoncentrovaný (*FORMAN, Ladislav a Jaroslav ČEPIČKA, 1990, BUŇKA, František a kol., 2013*).

V mlékárenském provozu existují různé typy odstředivek. Nejčastěji se však využívají takzvané talířové odstředivky. Odstředivá síla bubnu odstředivky je kolem 6 000 až 8 000 otáček za minutu. Výkon jednotlivých odstředivek se velmi liší, nejčastěji se pohybuje kolem

10 000 až 25 000 l·h⁻¹. Teplota mléka pro oddělení tuku a kalů od odstředěného mléka je 40-50 °C. Proto se odstředivka umísťuje za 1. regenerační sekci pastéru. Zde se mléko přede- hřeje na teplotu 60 °C. Při odstřeďování se odstředěné mléko soustřeďuje u stěny bubnu a smetana je vytlačována směrem do středu, k ose otáčení. Mechanické nečistoty se pomocí odstředivé síly oddělují na stěnu bubnu do takzvaného odstředivkového kalu, který je odvá- děn do nádoby, která navazuje na odsmetaňovací odstředivku, kde je sterilován parou (ZADRAŽIL, Karel, 2002, BUŇKA, František a kol., 2013).

1.6 Homogenizace

Homogenizace je důležitou součástí technologického postupu zpracování mléka. Jedná se o mechanický proces přeměny tukových kuliček v mléce. Tuk v mléce je ve formě různě vel- kých tukových kuliček. Homogenizace mléka je prováděna s cílem zmenšit velikost tuko- vých kuliček. Tím je potlačeno vyvstávání smetany u mléčných výrobků. Při homogenizaci dochází k tomu, že se tukové kuličky mléka roztrhají vysokým tlakem (5 až 25 MPa) při teplotě 50 až 80 °C. Poté co se takto mléko upraví, už tuk nevyvstává. Tukové kuličky jsou chráněny vrstvou, která je tvořena proteiny, fosfolipidy a neutrálními glycidy (MICHALSKI, Marie-Caroline a Caroline JANUEL, 2006).

V mlékárenských provozech se k homogenizaci používají homogenizátory. Je to pístové čerpadlo s výkonem od 250 do 30 000 l·h⁻¹. Základním funkčním prvkem homogenizátoru je upravená ventilová vysokotlaká komora. Odstředěná smetana se nasává do válce písto- vého čerpadla. Smetana se zde stlačí a vhání do hlavice homogenizátoru. Pomocí vysokého tlaku se pootevře ventil homogenizační hlavice a malou štěrbinou proudí smetana. Směr proudění, změna rychlosti a větší pokles tlaku způsobí rozbití tukových kuliček (JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014, FORMAN, Ladislav a Jaroslav ČEPIČKA, 1990, BUŇKA, František a kol., 2013).

1.7 Standardizace

Další potřebnou úpravou je standardizace mléka. Standardizace je operace, kdy se upravuje obsah tuku, bílkovin, případně sušiny v mléce. Smísením smetany a odstředěného mléka dochází k získání požadované tučnosti mléka. Snížení je možné dosáhnout přidávkem sme- tany, resp. odstředěného mléka. K tomu se používají standardizační zařízení (KADLEC, Pa- vel a kol., 2012).

1.8 Deaerace

Deaerace slouží k snižování obsahu vzduchu v mléce. Patří mezi základní procesy při zpracování mléka a smetany. Cílem je minimalizace obsahu vzduchu, zmenšení rizika oxidace tuku a zlepšení funkce řady zařízení (průtokoměr, odstředivka). Deaerační zařízení bývá součástí linek v mlékárenských provozech. Odvětrávací zařízení se skládá z odvětrávací komory a čerpadla. V zařízení dochází k rozstříknutí teplého mléka nebo smetany do komory s mírným vakuem, odstraní se tak většina vzduchu a těkavých pachových látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat sensorické vlastnosti mléka. Deaerace také zlepšuje průběh homogenizace, dále snižuje riziko napalování při tepelném ošetření mléka, zvyšuje viskozitu a odstraňuje nežádoucí těkavé látky (KADLEC, Pavel a kol., 2009).

1.9 Mlékařské kultury pro výrobu tvarohu

Mlékařské kultury jsou klíčové pro výrobu mléčných výrobků, zejména kysaných (fermentovaných) mléčných výrobků, tvarohu, sýrů a také např. probiotických produktů. Vyrábějí se v různých formách. Forma mlékařských kultur může být lyofilizovaná, tekutá a mražená. Mohou se aplikovat jako provozní zákys nebo jako kultury pro přímé očkování výroby (ZADRAŽIL, Karel, 2002, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016).

Na výrobu tvarohu se používá smetanová kultura, která je tvořena kyselinotvornými a aromatickými bakteriemi. Obsahuje mezofilní koky rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Optimální podmínky kultivace mezofilní smetanové kultury je teplota 21-23 °C. Doba kultivace bývá v rozmezí 16-18 hodin (KADLEC, Pavel, 2002, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016).

1.9.1 Kyselé srážení mléka

Kyselé srážení mléka je způsobeno především tvorbou kyseliny mléčné, po přidavku bakterií mléčného kvašení. Kyselé srážení je reverzibilní proces. Přídavkem alkálie se vysrážený kazein opět převede do rozpustného stavu jako anion a přidáním kyseliny nad izoelektrický bod přechází kazein do roztoku jako kation. Pomocí bakterií mléčného kvašení nebo přidavkem potravinářské kyseliny, vzniká samotná mléčná sraženina. Ta je po zpracování a oddělení vzniklé syrovátky základem výroby u sýrů, tvarohů a tvarohových výrobků (ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, BUŇKA, František a kol., 2013, GÖRNER, Fridrich a kol., 2004).

1.10 Syřidlo k výrobě tvarohu

Na výrobu tvarohu se v České republice používá klasické živočišné chymosinové syřidlo získané extrakcí slezu sajících telat a jehňat. Používá se také mikrobiální syřidlo Chy-max plus. Aktivní složkou syřidla je proteolytický enzym chymosin, který má žluto-bílou barvu a mírně slanou chuť. Ideální aktivita chymosinu se pohybuje v rozmezí pH 4,8-6,1 při teplotě 30-40 °C. Užití je jak u tvarohu vyrobeného tradičním způsobem, tak i u tzv. odstředivkového tvarohu. V dnešní době můžeme preparáty srážející mléko rozdělit na chymosin, mikrobiální enzymy a rostlinné preparáty. Velmi používanými koagulanty jsou preparáty mikrobiálního původu, které pocházejí z mikromycet nebo kvasinek. Nejméně rozšířená jsou v dnešní době syřidla rostlinná. Za zmínku stojí především květy artyčoků nebo ostropestřec mariánský. Ty se využívají především při výrobě sýrů (*ŠNIRC, Jůlius, Jozef GOLIAN a kol., 2016*).

1.10.1 Sladké srážení mléka

Převážná část sýrů se vyrábí sladkým neboli enzymatickým srážením mléka. Samotné enzymatické srážení mléka můžeme rozdělit na fázi primární, sekundární a terciární. V primární fázi dochází ke štěpení peptidické vazby k-kazeinu mezi 105 a 106 aminokyselinou. V další fázi po rozštěpení k-kazeinu dochází v přítomnosti Ca^{2+} iontů ke srážení kazeinových frakcí a vzniku samotné sýřeniny. V terciární fázi probíhá proteolýza bílkovin. Optimální aktivní kyselost mléka při sladkém srážení je pH 5,5. Při vyšším pH se prodlužuje doba srážení. Přidavkem vápenatých solí se dá zkrátit doba srážení (*ŠNIRC, Jůlius, Jozef GOLIAN a spol., 2016, BUŇKA, František a kol., 2013, GÖRNER, Fridrich a kol., 2004*).

1.11 Tvaroh

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb. v aktuálním znění, se tvarohem rozumí nezrající sýr získaný kyselým srážením, nebo u kterého převládá kyselé srážení nad srážením pomocí syřidla. Tvaroh je mléčný výrobek tužší konzistence. Řadí se do skupiny tzv. „kyselých sýrů“. Podle tučnosti se tvarohy dle vyhlášky 397/2016 Sb., v platném znění, dělí na skupiny, které jsou uvedeny v Tabulce 1 (*KADLEC, Pavel a kol., 2012, GAJDŮŠEK, Stanislav, 1998, Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*).

Tabulka 1: Rozdělení tvarohu podle konzistence a obsahu tuku v sušině (*Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*)

Tvaroh	Tuk v sušině (v % hmot.)
tučný	Více než 38
polotučný	25 až 15
Nízkotučný nebo jemný	Méně než 15
Odtučněný nebo měkký nebo tvrdý	Méně než 5

Konečný výrobek by měl mít mírně kyselou chuť. Trvanlivost je pro každý druh tvarohu rozdílná. Nejdelší trvanlivost mají termizované tvarohy. Datum minimální trvanlivosti je až 40 dní od data výroby. U delšího skladování tvarohů dochází k uvolňování syrovátky. Po čase se také začíná měnit chuť tvarohu. Proteolýza kazeinu je příčinou vzniku chuťových vad, především hořknutí tvarohu (*KADLEC, Pavel a kol., 2009, NORTON, Ian T, 2011, FOX, Paul McSWEENEY, 2004*).

1.11.1 Tradiční výroba tvarohu

Tradiční výroba tvarohu v České republice je stále velmi žádaná. Používá se vysoká pasteurace o teplotě 85 °C po dobu 12 až 20 sekund. Díky pasteraci se zničí maximální podíl vegetativních forem mikroorganismů. Dochází také ke zvýšené denaturaci syrovátkových bílkovin, které zvyšují vaznost vody. Odstředěné mléko se po pasteraci napouští do tvarohářských van. Mléko se sráží v tvarohářských vanách zaočkováním 0,5-1,0 % mezofilního zákysu a přísadkou syřidla. Zakysávací teplota je 21-25 °C. Tvarohovina se pokrájí a po dosažení požadované kyselosti syrovátky (22 až 24 °SH) se sraženina vypouští do čistých tvarožníků, které se po naplnění ukládají na odkapní vany. Naplněné tvarožníky se překládají, čímž se urychluje odkapávání syrovátky. Tvarožníky se plní jen do poloviny obsahu, aby byla urychlena filtrace syrovátky. Tvarožníky je potřeba dobře ošetřovat tak, aby byla splněna hygiena výroby a odkapávání syrovátky. Celková doba odkapávání činí v průměru 2,5 až 4,0 hodiny. Tvarohy se chladí pod 10 °C a balí nejčastěji o hmotnosti 250 g a 500 g. Výrobek se balí do hliníkové fólie s vnitřní pergamenovou vrstvou. Pro velkoobchodatele se balí také do drumů (plastové pytle s obsahem 5 kg, případně 10 kg tvarohu) (*KADLEC, Pavel, 2002, SUKOVÁ, Irena, 2006*).

1.11.2 Výroba odstředivkovým způsobem

U výroby odstředivkovým způsobem se mléko pasteruje šetrně při teplotě 74–75 °C s výdrží 20 až 40 sekund. Srážecí teplota je u odstředivkového způsobu výroby tvarohu vyšší, a to 26 až 30 °C. Při nižší teplotě sraženina nedostatečně prokysá. Naopak při vyšší teplotě má tvaroh příliš vysokou kyselost. Koagulace nastane po přidání mezofilní kultury (0,5–1%). Dávkování syřidla je 2 až 20 ml syřidla na 1000 l mléka. Pepsinové syřidlo se přidá po dosažení titrační kyselosti 8,4 °SH. Dosáhnutí požadované titrační kyselosti 36–40 °SH trvá v průměru 18 hodin. Po zrání se musí sraženina rozmíchat. Vzniklá sraženina je odstředována po přešlém míchání ve speciální tvarohářské odstředivce. Přímým odstředěním tvarohového koagulátu vzniká tvaroh, který má sušinu 20 % w/w. Pokud je potřeba zvýšit sušinu, musí se tvaroh dolisovat na lisovacím zařízení (*STRMISKA, Josef a kol., 1991, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, NORTON, Ian T, 2011*).

1.11.3 Výroba termotvarohu

Termotvaroh se dá zařadit mezi novější výrobky. Jako surovina se výborně hodí pro výrobu tvarohových specialit, například krémů, dezertů nebo termixů. U termotvarohu se používá vysoká pasterace, protože mléko lépe váže vodu. Pasterace probíhá při teplotě 82–92 °C po dobu 5 až 6 minut. Pro výrobu termotvarohu se používá odstředěné mléko. Mléko se obdobně zaočkuje mezofilními či termofilními mlékařskými kulturami (0,5–1,0 %). Poté se přidává pepsinové syřidlo. Srážení u této výroby trvá 14 až 18 hodin. Před odstředováním probíhá termizace při teplotě 60 °C po dobu 4 minut. Tento postup zaručí delší trvanlivost, a to až 21 dní. Zmíněná termizace je podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb. v platném znění, tepelné ošetření mléčných výrobků po ukončení kysacího procesu a před balením k potlačení nebo zastavení aktivity přítomné mléčné mikroflóry až do teploty 80 °C. U výroby termotvarohu je zvýšená výtěžnost, díky zachycení až 50 % syrovátkových bílkovin, které lépe váží vodu. Termotvaroh má sušinu 17 % w/w, proto se nejvíce využívá na pomazánky nebo různé dezerty apod. (*FOX, Paul. F, 2004, STRMISKA, Josef a kol., 1991*).

1.12 Vady tvarohů

V průběhu výroby tvarohů, případně během doby skladování může docházet ke vzniku vad tvarohu. Nejčastějšími vadami tvarohů jsou:

nízká sušina – způsobeno nedolisováním (nízká teplota, krátká doba lisování, malý tlak, velký objem tvarožníků, vysoká pasterace u odstředivkového způsobu výroby tvarohu, přítomnost inhibičních látek v mléce),

překysání – dlouhá doba srážení, vysoká teplota v průběhu celé výroby, příliš velká dávka mlékařské kultury,

nedokysání – nízká teplota, inhibiční látky v mléce, nevhodně zvolený technologický postup,

uvolnění syrovátky v obalu – nízká sušina tvarohu, špatná manipulace s výrobkem, vysoká skladovací teplota,

plesnivění – špatně uzavřený obal, tvoří se bublinky plynu,

hořká chuť – kontaminace kvasinkami a proteolytickými mikroorganismy.

2 CHARAKTERIZACE TRANSGLUTAMINÁZY A MOŽNOSTI JEJÍHO POUŽITÍ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

2.1 Využití moderních potravinářských enzymů při výrobě potravin

Enzymy jsou zdrojem veškerého života na zemi. Žádný živý organismus bez nich nedokáže existovat. Pro zdraví člověka mají enzymy zásadní význam. Při výrobě potravin je člověk využívá u přeměny mléka na sýr, šťávy z ječmene na pivo, nebo těsta na chléb. Potravinářské enzymy se získávají z rostlinných a živočišných zdrojů, nebo z mikroorganismů. Výrobcům potravin se díky enzymům daří vyrábět plnohodnotné potraviny a také dokáží snížit ekonomické náklady na výrobu (zvýšená výtěžnost u výroby tvarohu). Jako další pozitiva lze uvést kvalitnější vzhled, nutriční hodnota, nebo textura potravin. V současné době se na výrobu potravin používá obrovské množství enzymů, které jsou vhodné pro různé druhy výrobků. Nejvíce se enzymy využívají v práškové formě, čímž je zabezpečena jednoduchá aplikace, manipulace a minimální problémy při skladování (BEILEN, Jan B. Van a Zhi LI, 2002, VODRÁŽKA, Zdeněk, 1998).

2.2 Transglutamináza

Enzym transglutamináza, zkráceně TG, je mezinárodně registrovaný společností Asociace výrobců fermentovaných enzymů se sídlem v Bruselu. Je to proteolytický enzym a jeho mezinárodní označení je EC 2.3.2.13. Výskyt v přírodě byl zjištěn v rostlinných organizmech i živočišných tkáních. Získává se fermentací živného média z bakterie *Streptoverticillium morabaraense*. Mechanismus účinku enzymu spočívá ve vytváření silné kovalentní vazby mezi aminokyselinami glutaminem a lyzinem v živočišných bílkovinách, což má vliv na výrazně lepší fyzikální vlastnosti potravin, jako je termostabilita, elasticita, tvorba emulzí, prodloužení trvanlivosti, schopnost vázat vodu atd. Díky této a spoustě dalších vlastností se dá využít v mnohých odvětvích potravinářského průmyslu. Transglutamináza na rozdíl od enzymů, které vyvolávají hydrolýzu, tedy štěpení bílkovin, přispívá k vytvoření nových vazeb (spojuje aminokyseliny). Enzym TG katalyzuje acyl transferové reakce mezi γ -karboxamidovými skupinami peptidově vázaných glutaminových zbytků a ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků, což vede k tvorbě intra a intermolekulárních izopeptidových vazeb. Průběh reakcí katalyzovaných TG však závisí na dalších parametrech, jako je tlak, chemické vlastnosti a

teplota prostředí (*PASTERNAK, Ralf, 1998, WANG, Wen-qiong, 2018, DMYTRÓW, Izabela a kol. 2010*).

2.2.1 Transglutamináza v mlékárenském průmyslu

Transglutamináza se v mlékárenském odvětví uplatňuje především při výrobě tvarohů, sýrů, jogurtů, nebo mražených smetanových krémů. U všech těchto výrobků, po aplikaci transglutaminázy nedochází ke změně organoleptických vlastností jako je chuť, vůně, vzhled atd. V případě mléčných fermentovaných výrobků s nízkým obsahem tuku umožňuje transglutamináza zlepšit reologické vlastnosti (*PASTERNAK, Ralf, 1998, WANG, Wen-qiong, 2018, LEE, SY a kol., 2016*).

U zrajících sýrů syrovátka lépe odkapává a nezůstává v sýřenině. Sýřenina je dále elastičtější, nedrobí se a finální výrobek se dá mnohem lépe krájet. Minimalizují se také ztráty při krájení u balených plátkových sýrů. Díky rovnoměrnějšímu odkapávání syrovátky se v podstatě upravuje obsah vody a tím se snižuje množství laktózy v sýřenině. Následný účinek je utlumení mléčné fermentace, což má důležitou roli při dohřívání sušiny u tvrdých sýrů eidamského typu (*DJOULLAH, Attaf, 2018*).

U tvarohů je díky provázání kazeinu a syrovátkových bílkovin pevnou kovalentní vazbou sraženina pevnější a elastičtější. Syrovátkové bílkoviny zůstávají ve sraženině, a proto je syrovátka řidší a lépe odkapává v porovnání s rychlostí odkapu např. při výrobě polotvrdých sýrů. Dále se také zvyšuje výtěžnost tvarohu. Na 1 kg tvarohu lze díky přidavku transglutaminázy (500 g TG / 3000 l mléka) ušetřit až kolem 0,5 l mléka (*CHEN, Lintianxiang, 2018, PASTERNAK, Ralf, 1998, MARINIELLO, Loredana a kol., 2010*).

Přidání transglutaminázy do mléka způsobuje menší nerovnováhu v růstu bakterií, stejně jako životaschopné laktobacily. Vliv zkřížené vazby na proces okyselení byl také pozorován v tomto případě u mezofilních počátečních kultur používaných při výrobě tvarohu. Reologická analýza ukázala statisticky významný vliv transglutaminázy na tvrdost vzorků. Mikrobiologická transglutamináza může vytvářet kovalentní vazby mezi bílkoviny molekul. Transglutamináza zvyšuje kapacitu zadržování vody a sílu gelu a vyšší reologické a emulgační vlastnosti. (*DMYTRÓW, Izabela a kol. 2010*).

Jogurty mají po přidání transglutaminázy pevnou, gelovitou konzistenci a hladkou smetanovou texturu. Barva ani chuť se nemění. Jogurt je také odolnější vůči mechanickým otřesům

při manipulaci a přepravě. Enzymový přípravek se aplikuje rovněž i k prodloužení trvanlivosti (*MOHAMMAD, Seyed, 2018*).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vliv enzymu transglutaminázy na viskoelastické vlastnosti tvořícího se tvarohu, tedy v průběhu srážení mléčné bílkoviny, a následně na konzistenci již vytvořeného tvarohu.

Pro naplnění tohoto cíle bylo nejprve v rámci teoretické části práce dílčími cíli

- popsat procesy probíhající při výrobě tvarohu, včetně jednotlivých technologických kroků,
- charakterizovat enzym transglutaminázu a uvést příklady jeho použití v potravinářství.

V praktické části pak bylo cílem

- vyrobit modelové vzorky s obsahem transglutaminázy a bez její aplikace (kontrolní vzorky),
- provést základní chemickou analýzu, resp. stanovení hodnot aktivní (pH) a titrační kyselosti,
- sledovat viskoelastické vlastnosti modelových vzorků tvarohů s obsahem transglutaminázy a bez ní,
- výsledky vhodně formulovat a diskutovat s dostupnou literaturou,
- shrnout závěry práce.

4 MATERIÁL A METODIKA

Modelové vzorky tvarohu byly vyráběny při třech různých teplotách se dvěma koncentracemi transglutaminázy. Všechny vzorky byly vyráběny z mléka stejné šarže s tím, že každý den bylo použito nové balení téže šarže odstředěného mléka. Nejprve byl vyroben provozní zákys, a to ze 400 ml mléka a 20 ug kultury. Jako kultura byla použita DVS Flora Danica (mezofilní kultura; Chr. Hansen, Nizozemí). Výroba zákysu probíhala při $25,0 \pm 0,2$ °C po dobu 24 hodin. U mléka pro výrobu zákysu bylo stanoveno pH pomocí vpichového pH metru s kombinovanou skleněnou elektrodou (pH Spear, Eutech Instruments Eu-rope B. V., Landsmeer, Nizozemí) a titrační kyselost dle Soxhlet Henkela. Kyselost mléka podle Soxhlet-Henkela je dána počtem ml 0,25 mol·l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného spotřebovaných při titraci 100 ml mléka za přidavku fenolftaleinu jako indikátoru. Vyjádří se ve stupních Soxhlet-Henkela (°SH) na 100 ml výrobku. 1 °SH odpovídá 1 ml 0,25 mol·l⁻¹ NaOH (VORLOVÁ, Lenka a kol., 2014). Následně byla hodnota pH a titrační kyselosti stanovena u provozního zákysu a také u vyrobených modelových vzorků tvarohu. Analýzy aktivní a titrační kyselosti byly u každého vzorku prováděny 3 x.

Na výrobu kontrolních modelových vzorků tvarohu bylo použito 500 ml mléka, 10 ml provozního zákysu, 400 ul syřidla (Chymax M, Chr. Hansen, Nizozemí) zředěného 1:9 deionizovanou vodou. Směs pro výrobu tvarohu byla po aplikaci všech potřebných ingrediencí intenzivně po dobu jedné minuty rozmíchána v zásobní lahvi. Poté bylo ze zásobní lahve odebráno 40 g směsi (naváženo s přesností na 0,01 g) do měřicí geometrie vytemperované na 20,0; 22,5 nebo 25,0 °C (viz níže). Zbylá část směsi byla ve stejné zásobní lahvi vložena do termostatu na příslušnou teplotu (20,0; 22,5 nebo 25,0 °C). Do směsi (v zásobní lahvi) byl vložen pH metr vybaven automatickým zapisovacím zařízením. Pokles hodnot pH byl zaznamenáván po dobu 55 000 s. Kromě kontrolních modelových vzorků byly vyráběny také vzorky, do kterých byla přidána transglutamináza SAPRONA TG1 L (C&P Group GmbH, Rosshaupten, Německo), a to v nižší koncentraci (dále značeno NK) 37,5 mg/500 ml a ve vyšší (dvojnásobné) koncentraci (dále značeno VK) 75 mg/500 ml.

Na měření viskoelastických vlastností byl použit rotační viskozimetr HAAKE RheoStress 1 (Thermo ScientificTM, Brémy, Německo). Použita byla geometrie válec ve válci, objem válce 40,1 ml, velikost štěrbin 7,2 mm. Nejprve byl vzorek v geometrii promíchán po dobu 60 s při gradientu rychlosti 120,0 s⁻¹. Poté došlo během jedné minuty ke snižování gradientu

rychlosti do nulové hodnoty, vzorek byl převrstven 6,0 ml jedlého oleje pro zabránění vysychání vzorku. Viskoelastické vlastnosti tvořícího se gelu tvarohu byly snímány při konstantní deformaci 0,01 a frekvenci 0,1 Hz po dobu 54000,0 s. Následovalo chlazení vzorku na teplotu 6 °C po dobu 10800,0 s (při stejné deformaci a frekvenci, jako během tvorby gelu). Konečnou fází měření bylo sledování viskoelastických vlastností vytvořeného gelu při konstantní deformaci 0,01, v rozsahu frekvencí 0,05 až 100,00 Hz, při teplotě 6,0 °C.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části byly prováděny experimenty srážení mléka za přítomnosti enzymu transglutaminázy ve dvou koncentracích v závislosti na třech různých teplotách srážení. Při jednotlivých teplotách byl vždy proveden experiment srážení mléka bez přítomnosti TG, jako kontrolního vzorku. Kromě vlastního srážení byl následně proveden experiment sledující změny viskoelastických vlastností vzniklého tvarohu. Rovněž byly pozorovány změny hodnot pH v průběhu srážení mléka. Jednotlivá data jsou prezentována pro všechny vybrané teploty, a to pro 20,0 °C; 22,5 °C a 25,0 °C. Základem výroby tvarohů je kyselé srážení. Kyselé srážení je významnou technologickou vlastností, a je vyvoláno působením kyseliny mléčné produkovanou bakteriemi mléčného kvašení. Kyselé srážení je proces kdy se kazeinové bílkoviny převedou ze stavu koloidního roztoku do stavu gelu. Kazein v mléce je heterogenní směs proteinů obsahujících fosfor. Kazeinový komplex obsahuje frakce alfa, beta a kappa. Většina kazeinových frakcí se v mléce vyskytuje ve formě tzv. kazeinových micel, které obsahují přibližně 94 % proteinů a 6 % nízkomolekulárních látek. Tyto micely jsou zodpovědné za bílý neprůhledný vzhled mléka. Kazein, stejně jako jiné bílkoviny, je tvořen mnoha aminokyselinami. Každý z nich může mít kladný nebo záporný náboj v závislosti na pH. Při určité hodnotě pH budou všechny pozitivní náboje a všechny negativní náboje na bílkovině v rovnováze, takže čistý náboj na proteinu bude nulový. Tato hodnota pH je známá jako izoelektrický bod proteinu a je to obecná hodnota pH, při níž je protein nejméně rozpustný. U kazeinu činí přibližně 4,6 pH, při které se vysráží kyselý kazein (BUŇKA, František a kol., 2013, B.CELLI, Giovana, 2018).

Tabulka 2: Hodnoty aktivní a titrační kyselosti mléka, zákysu a tvarohu vyrobených za různých teplotních podmínek. Vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka.

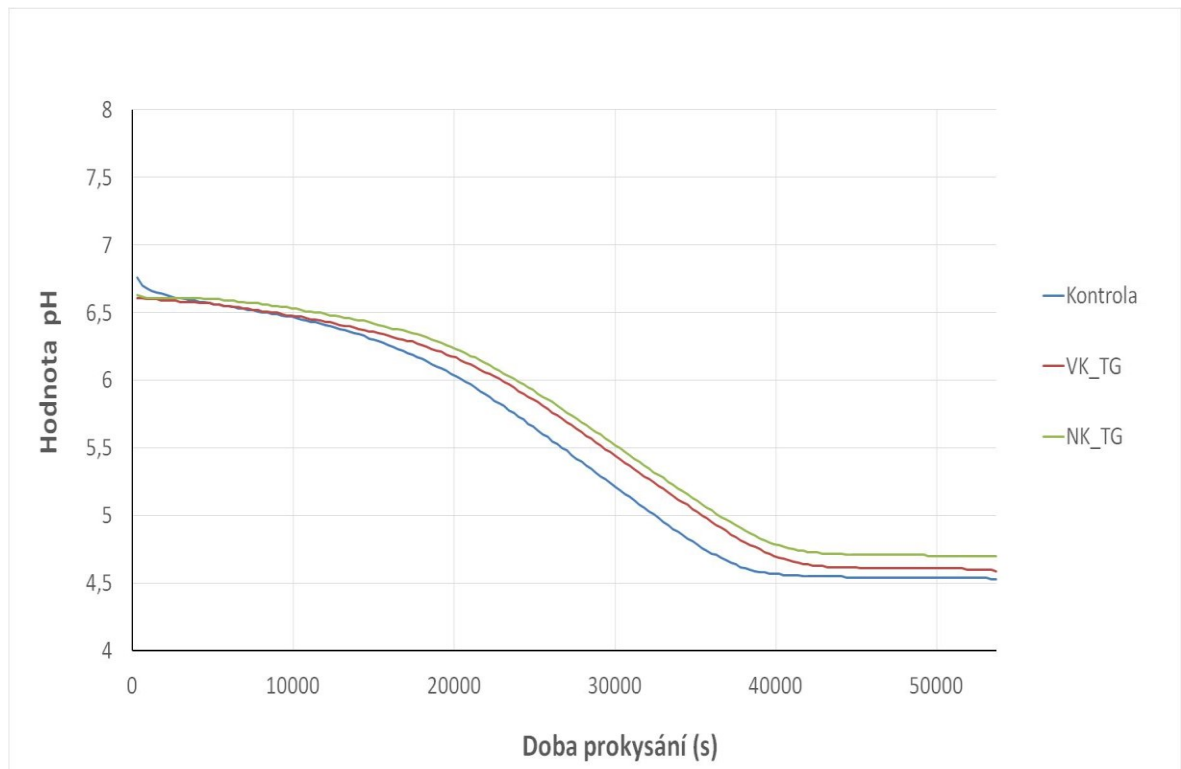
Teplota	Mléko		Zákys		Tvaroh	
	aktivní kyselost (pH)	titrační kyselost (°SH)	aktivní kyselost (pH)	titrační kyselost (°SH)	aktivní kyselost (pH)	titrační kyselost (°SH)
25,0	6,76 ± 0,01	5,2 ± 0,1	4,33 ± 0,03	38,0 ± 0,2	4,43 ± 0,01	38,3 ± 0,7
20,0	6,72 ± 0,01	5,4 ± 0,2	4,45 ± 0,02	36,0 ± 0,4	4,39 ± 0,10	37,0 ± 0,4
22,5	6,67 ± 0,03	5,2 ± 0,3	4,31 ± 0,02	38,1 ± 0,1	4,29 ± 0,01	37,1 ± 0,2

Aktivní kyselost je dána koncentrací vodíkových iontů v mléce, vyjadřuje se v hodnotách pH. Stanoví se na pH metru (*VORLOVÁ, Lenka a kol., 2014*).

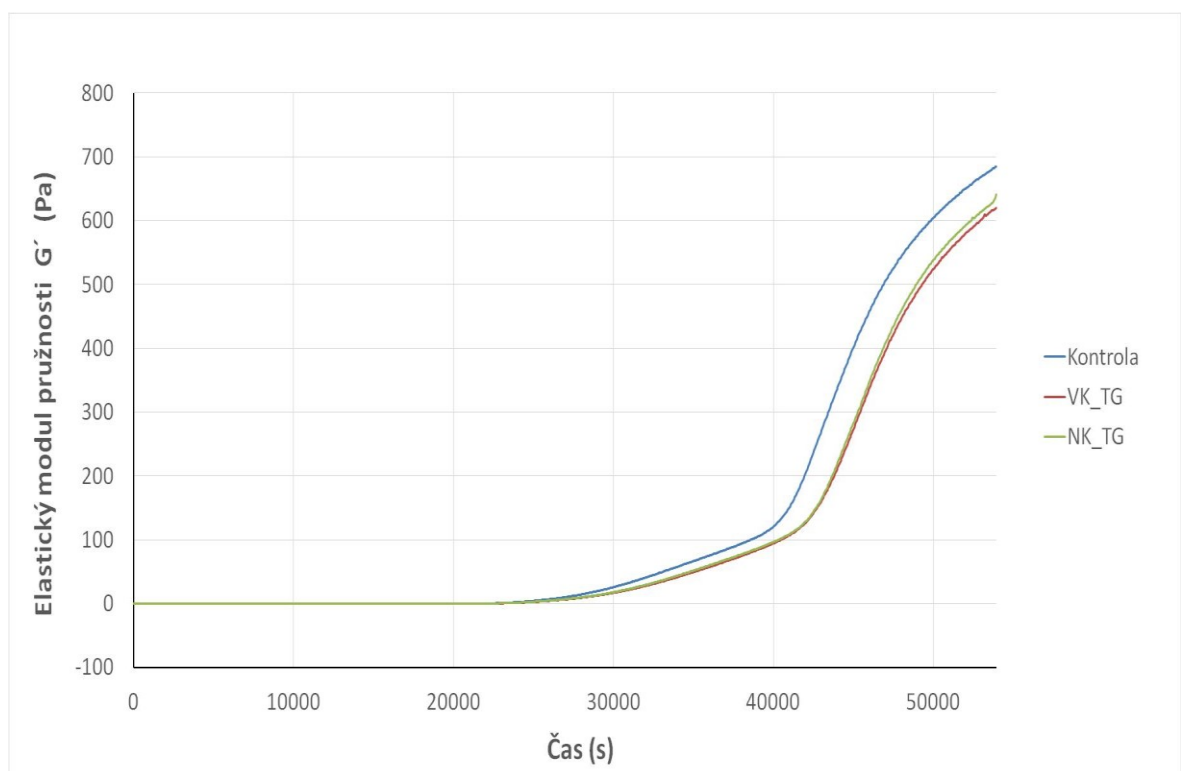
Z tabulky č. 2 je patrné, že se hodnoty statisticky téměř nelišily. Nejnižší hodnota pH pro mléko byla u teploty 22,5 °C. Při stejné teplotě byla nejnižší hodnota pH i pro zákys a tvaroh. Naopak nejvyšší hodnoty aktivní kyselosti (pH) a titrační kyselosti (°SH) pro mléko, zákys a tvaroh vycházely v průměru u teploty 25,0 °C.

Graf kysací křivky znázorněný na Obr. 2 vyjadřuje závislost pH na době prokysání. Na začátku byla naměřena hodnota pH v rozmezí 6,60 až 6,76. V časovém intervalu 0-14 400 sekund hodnota pH všech tří vzorků klesala velmi pozvolna z původní hodnoty na hodnoty kolem 6,40. V dalším časovém intervalu až do hodnoty 40 000 sekund docházelo k výraznějšímu poklesu hodnoty pH u všech tří vzorků. Od hodnoty 40 000 sekund se hodnota pH všech tří vzorků ustálila na hodnotách v rozmezí 4,50 až 4,00. Z průběhu křivek je patrné, že v časových intervalech 0-14 000 sekund a od 40 000 sekund jsou hodnoty pH u vzorků s vyšší koncentrací TG, nižší koncentrací TG a kontrolního vzorku téměř totožné. Při pH 4,60 docházelo ke srážení kazeinových micel a ke vzniku gelu. Izoelektrický bod kazeinu nastává v hodnotě pH 4,60 (*BUNKA, František a kol., 2013*).

V první fázi enzym (syřidlo) odděluje specifický fragment jednoho z kazeinů. Při přirozené hodnotě pH mléka musí být rozštěpeno přibližně 80 % kazeinu, aby se umožnila agregace micel. Dalším stupněm je fyzikální proces agregace kazeinových částic za vzniku gelu. Začíná se tvořit nepřetržitá trojrozměrná síť, která zachycuje vodu uvnitř a tvoří se gel. Nižší pH zvyšuje enzymovou aktivitu syřidla a neutralizuje odpuzování náboje mezi micelami. Proto primární i sekundární stavy koagulace probíhají rychleji při nižším pH. Optimální teplota koagulace pro tvarohy je 20–25 °C ([online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/enzymic-coagulation-milk>).



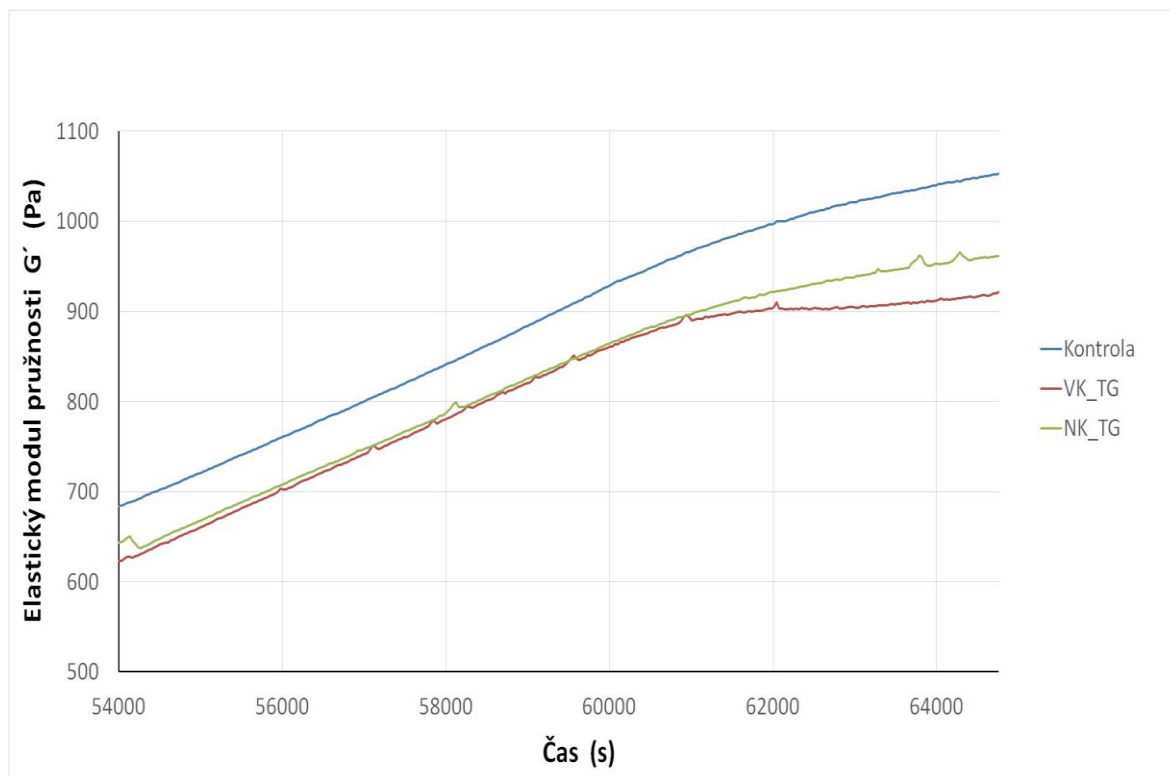
Obrázek 2: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 20,0 °C



Obrázek 3: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 20,0 °C na čase prokysávání

Z výsledků měření zobrazených na Obr. 3 vyplývá, že do hodnoty cca 25 000 sekund se hodnota elastického modulu pružnosti G' téměř neměnila, a pohybovala se v rozmezí 0-1 Pa. Od tohoto času nastával pozvolný růst hodnot elastického modulu pružnosti a tím docházelo ke zvyšování tuhosti vzorků, a to až do doby kolem 40 000 sekund. Tento nárůst tuhosti odpovídá začátku poklesu pH a molekuly bílkovin spolu začínají agregovat. Dochází zde ke vzniku koagulátu, křivky se stabilizují na hodnotě pH 4,60 kde nastává izoelektrický bod (což je patrné z Obr. 2). V tomto intervalu také docházelo k mírně vyššímu nárůstu tuhosti kontrolního vzorku v porovnání s oběma vzorky s TG. Hodnota elastického modulu pružnosti kontrolního vzorku G' se pohybuje kolem 121 Pa, zatímco TG v rozmezí 95-97 Pa. Od cca 40 051 sekund docházelo k strmému nárůstu hodnot elastického modulu pružnosti a rapidnímu zvyšování tuhosti vzorků, což je dáno srážením bílkovin při pH blížícím se izoelektrickému bodu, které je podstatou kyselého srážení při výrobě tvarohu (*ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, BUŇKA, František a kol., 2013, GÖRNER, Fridrich a kol., 2004*). Tento progresivní nárůst trvá až do časové hodnoty kolem 54 000 sekund. Hodnoty G' na konci intervalu jsou na hodnotách v rozmezí 620-685 Pa. Hodnota G' je v tomto okamžiku pro kontrolní vzorek o přibližně 50 Pa vyšší než u obou vzorků s TG. Je tedy možné říci, že kontrolní vzorek vykazoval vyšší tuhost než vzorky s TG, a to bez ohledu na její koncentraci. Po tomto intervalu lze ze znázorněných křivek odvodit, že se rychlost růstu hodnoty G' v závislosti na čase začíná zpomalovat, jelikož už nedochází k dalšímu intenzivnímu srážení bílkovin.

Na Obr. 4 je znázorněna závislost G' na čase v průběhu chlazení vzorku po jeho vysrážení. Měření bylo prováděno od 54 000 sekund, kdy se hodnoty G' pohybovaly v rozmezí 620-685 Pa (viz výše). Od této doby docházelo ke konstantnímu lineárnímu nárůstu hodnot G' až do intervalu 61 000 sekund. Hodnoty G' byly v tomto čase přibližně 890-960 Pa. Hodnoty G' byly pro kontrolní vzorek vyšší než hodnoty elastických modulů pružnosti vzorků s přidavkem transglutaminázy, a to v celém rozsahu měření. Křivky elastických modulů pružnosti pro nižší (NK) i vyšší (VK) koncentraci transglutaminázy byly téměř totožné. Od tohoto časového úseku docházelo ke zmírnění nárůstu hodnot G' až do konce intervalu měření. Od cca 61 000 s jsou patrné mírně vyšší hodnoty G' u vzorků s vyšší koncentrací TG než u vzorků s nižší koncentrací použitého enzymu. Ve stejném intervalu docházelo také k pomalejšímu zvyšování tuhosti kontrolních vzorků bez aplikace transglutaminázy.

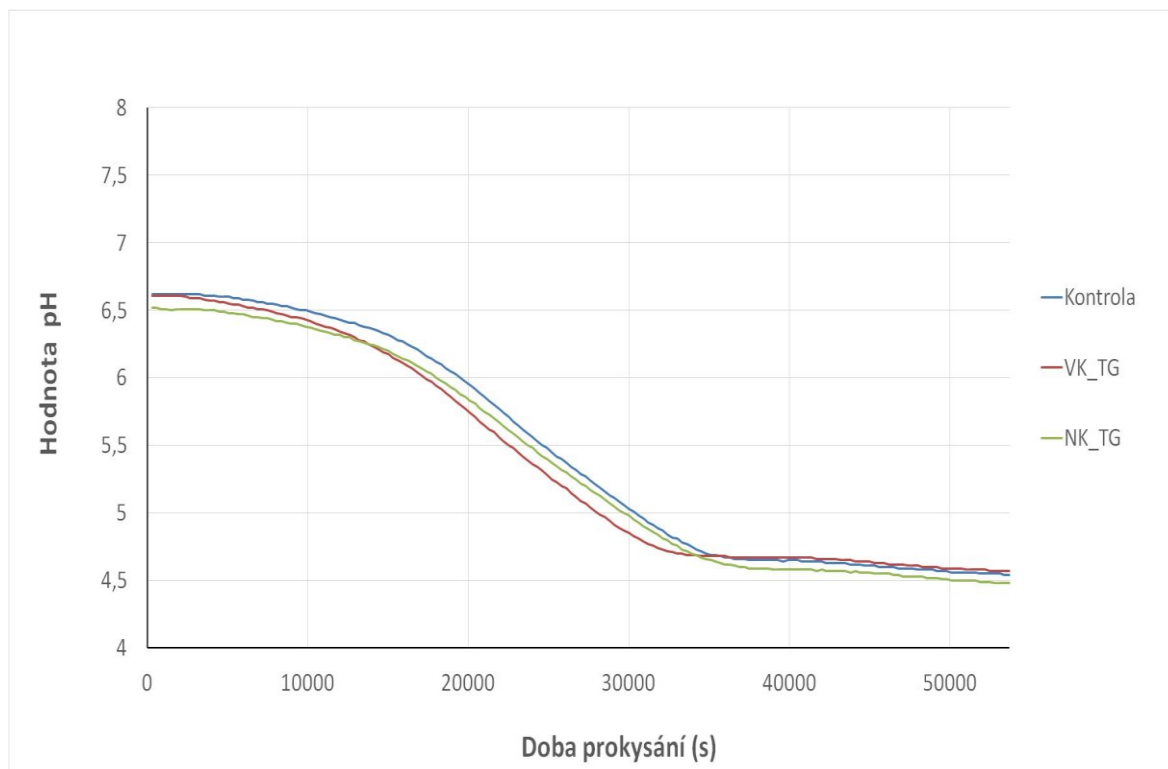


Obrázek 4: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 20,0 °C na 6 °C

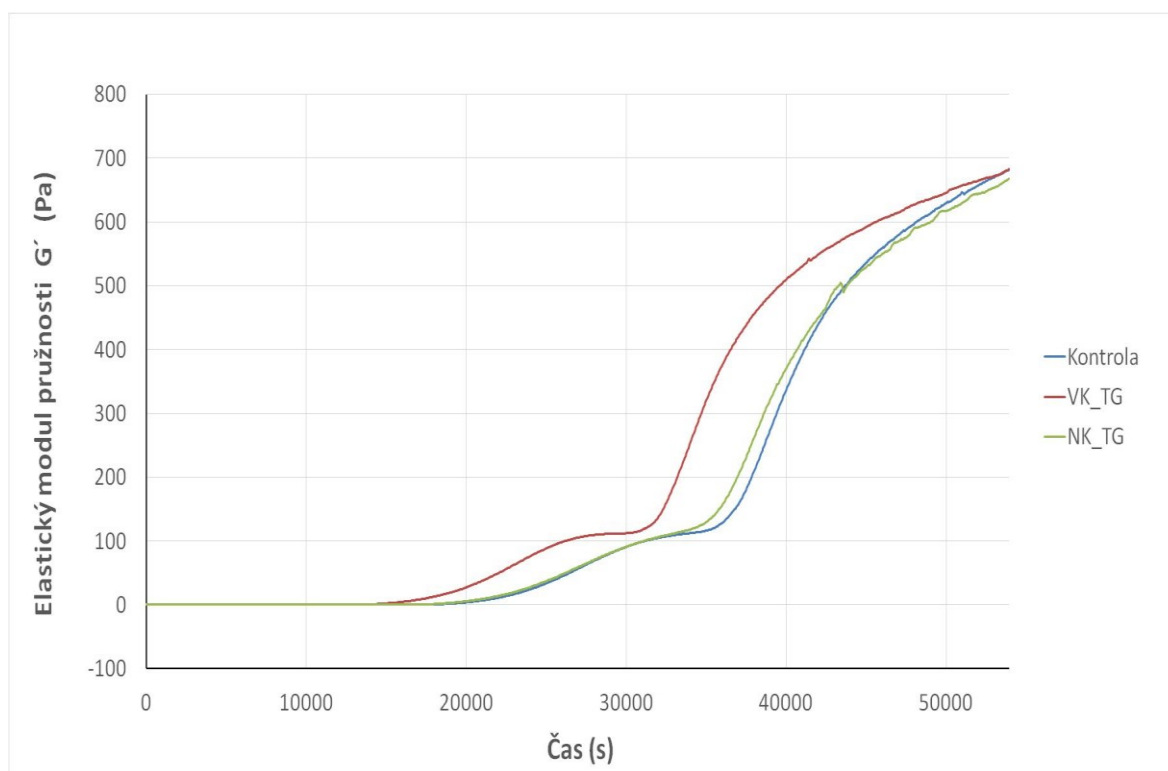
Z grafu na Obr. 5 je patrné, že k prokysávání došlo rychleji než při teplotě 20,0 °C. Teplota 22,5 °C byla pro mezofilní mikroorganismy optimální. Takzvaná lag fáze, kdy se buňky přizpůsobují prostředí a syntetizují potřebné enzymy je časově kratší než u teploty 20,0 °C. V další fázi se buňky začínají dělit a křivka přechází do fáze vyrovnaného růstu. Buňky se dělí stejným tempem a počet buněk roste exponenciálně (SCHINDLER, Jiří, 2014).

Počáteční hodnota pH byla v rozmezí 6,50 až 6,65. V intervalu 0-13 500 s hodnota pH všech vzorků klesala pozvolna na hodnoty pH kolem 6,30. V dalším intervalu až do hodnot kolem 33 000 s nastával výrazný pokles hodnoty pH u všech tří vzorků. Od začátku doby měření až do konce tohoto intervalu byla hodnota pH kontrolního vzorku stále nepatrně vyšší a lehce kolísala. Od hodnoty kolem 33 000 s se pokles pH všech tří křivek téměř zabrzdil a dále jen velmi pozvolna klesal. Hodnoty pH byly na konci měřeného intervalu v rozmezí 4,48 až 4,57 a byly tedy téměř totožné.

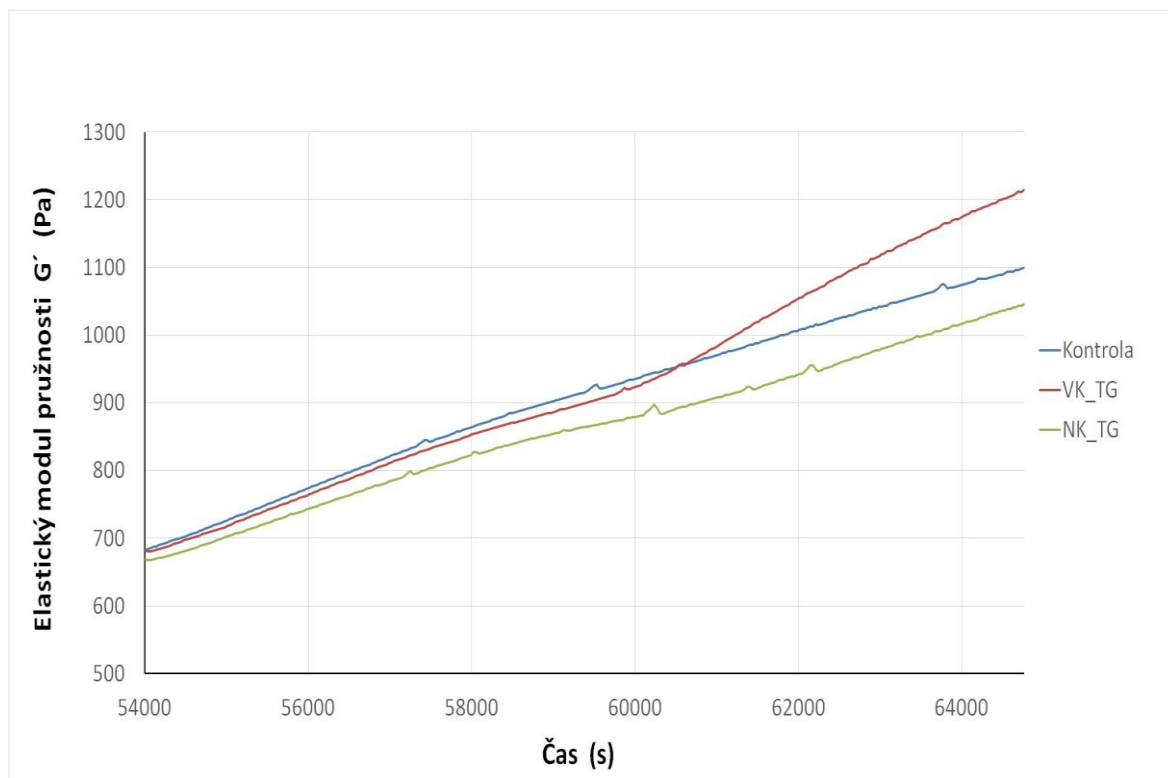
Z grafu na Obr. 6 vyplívá, že se hodnota elastického modulu pružnosti G' v intervalu 0 až přibližně 15 000 téměř neměnila, a pohybovala se v rozmezí 0-1 Pa. Od tohoto časového intervalu nastával pozvolný růst až do intervalu kolem 33 000 s.



Obrázek 5: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 22,5 °C



Obrázek 6: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 22,5 °C na čase prokysávání



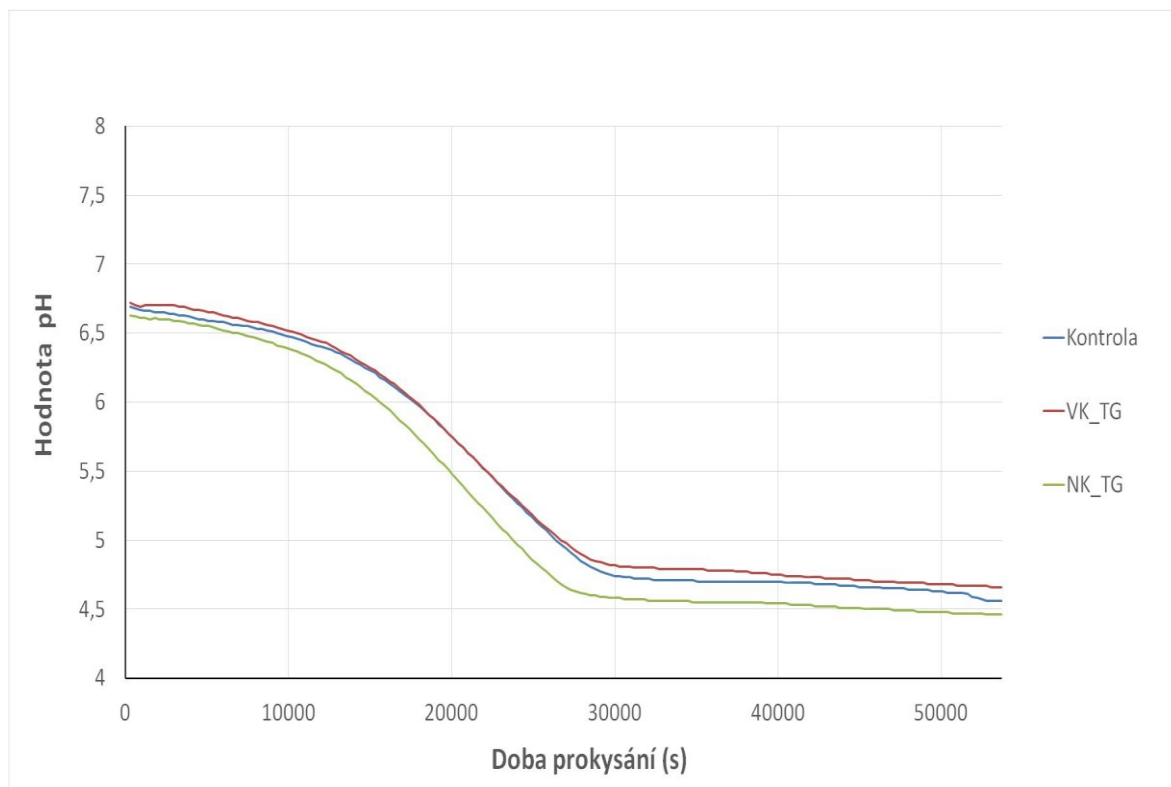
Obrázek 7: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 22,5 °C na 6 °C

Docházelo tedy ke zvyšování tuhosti vzorků. Pokles pH všech tří vzorků probíhal v tomto případě rychleji než u teploty 20,0 °C. Molekuly bílkovin spolu začínaly agregovat a vznikal koagulát. Hodnota G' na konci intervalu byla přibližně 100 Pa. Od 33 048 s docházelo k progresivnímu nárůstu zaznamenávaných hodnot. Docházelo zde k vyššímu nárůstu tuhosti vzorků s vyšší koncentrací TG v porovnání s kontrolním vzorkem TG. Zvyšování tuhosti vzorků, je dáno srážením bílkovin, kdy se pH postupně blíží izoelektrickému bodu. Tento progresivní nárůst trval až do intervalu kolem 54 000 sekund. Hodnoty G' na konci intervalu jsou na hodnotách 660-680 Pa. Od 54 000 s nastává zpomalení progresivity nárůstu a hodnoty G' téměř konstantně stále stoupají. Z Obr. 7, který popisuje závislost elastického modulu pružnosti na frekvenci v průběhu chlazení vzorků, je zřejmé, že hodnoty G' byly pro vzorky s nižší koncentrací TG menší než hodnoty G' kontrolního vzorku a vzorku s vyšší koncentrací TG, a to v celém rozsahu měření. Hodnoty G' jsou na konci intervalu přibližně 1043 Pa pro vzorek s nižší koncentrací TG a 1220 Pa pro vzorek s vyšší koncentrací TG. Rozdíl mezi NK TG a VK TG je tedy asi 200 Pa.

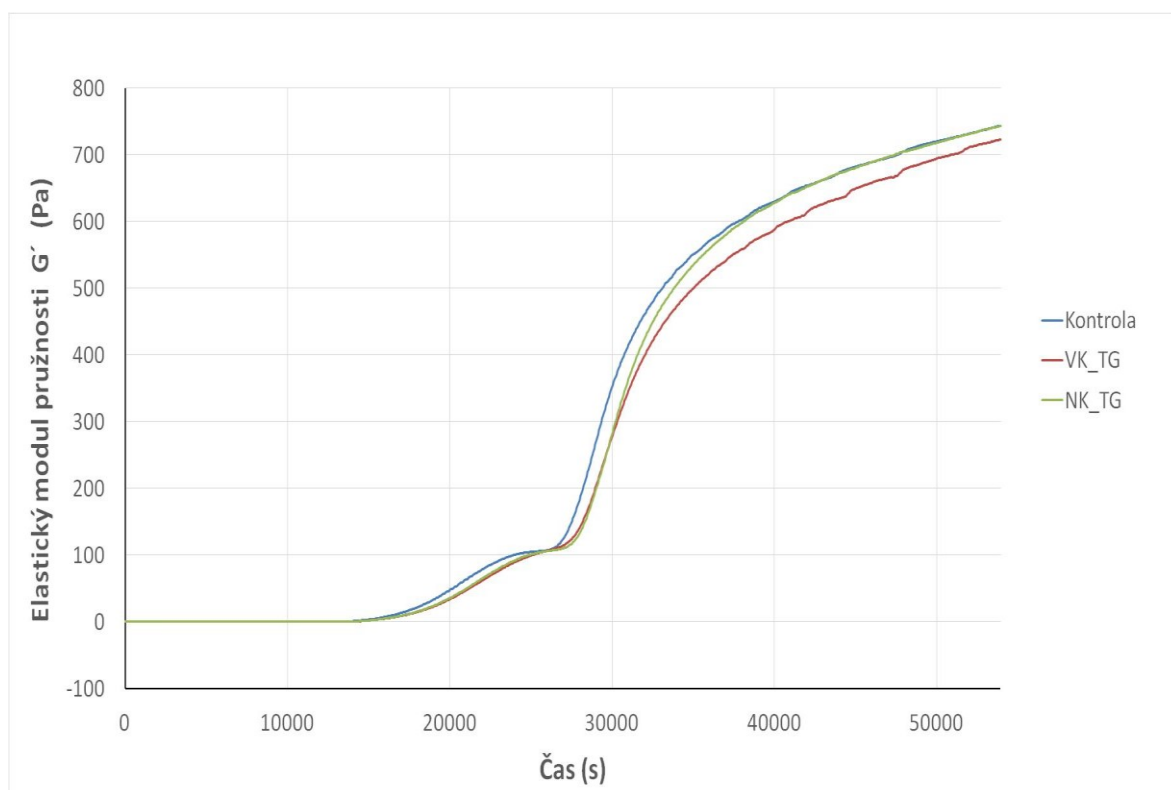
Graf kysací křivky znázorněný na Obr. 8 vyjadřuje závislost pH na době prokysání. Počáteční hodnota pH byla opět v rozmezí 6,60 až 6,75. V intervalu 0-13 000 sekund hodnota pH všech tří vzorků klesala velmi pozvolna z původní hodnoty na hodnoty kolem 6,30. Je zde možné zaregistrovat rychlejší pokles vzorků s nižší koncentrací TG na nižší hodnoty pH oproti kontrolnímu vzorku. Při dalším časovém úseku až do hodnoty 30 000 sekund docházelo k výraznějšímu poklesu hodnoty pH u všech tří vzorků. Tento pokles má ustálenou tendenci. Vzorky s nižší koncentrací TG měly rozdílnou hodnotu pH o cca 0,25 oproti kontrolnímu vzorku. Od hodnoty 30 000 sekund se pokles pH všech tří vzorků téměř zastavil a dále jen velmi pozvolna klesal. Hodnoty pH na konci byly v rozmezí 4,50 až 4,70. V průběhu prokysávání opět docházelo k postupnému vzniku gelu, který je znázorněn hodnotami G' na Obr. 9.

Ze zobrazených křivek na Obr. 9 vyplývá, že se hodnota elastického modulu pružnosti G' v intervalu 0 až přibližně 15 000 téměř neměnila, a pohybovala se v rozmezí 0-1 Pa. Od 12 072 sekund nastával pozvolný růst elastického modulu pružnosti až do intervalu kolem 26 000 sekund. Docházelo také k nepatrnému zvýšení hodnot G' kontrolního vzorku v porovnání se vzorky s TG. Hodnota G' byla přibližně 100 Pa. Od intervalu 26 000 sekund docházelo k strmému nárůstu hodnot G' . Tento progresivní nárůst trval až do časové hodnoty kolem 35 000 sekund. Hodnoty G' byly na hodnotách 500-550 Pa. Nejvýraznější změna je u vzorku s vyšší koncentrací TG, která od 30 029 sekund začíná měnit hodnotu G' oproti vzorku s nižší koncentrací TG, a to tak, že hodnoty G' u vzorku VK TG jsou o 30 Pa nižší než u vzorků s NK TG a vzorků kontrolních bez obsahu TG. Poté docházelo ke zmírnění rychlosti růstu hodnoty G' v závislosti na čase. Z uvedených výsledků je možné konstatovat, že při teplotě 25,0 °C nedocházelo k významným změnám v hodnotách tuhosti modelových vzorků s obsahem transglutaminázy nebo bez ní.

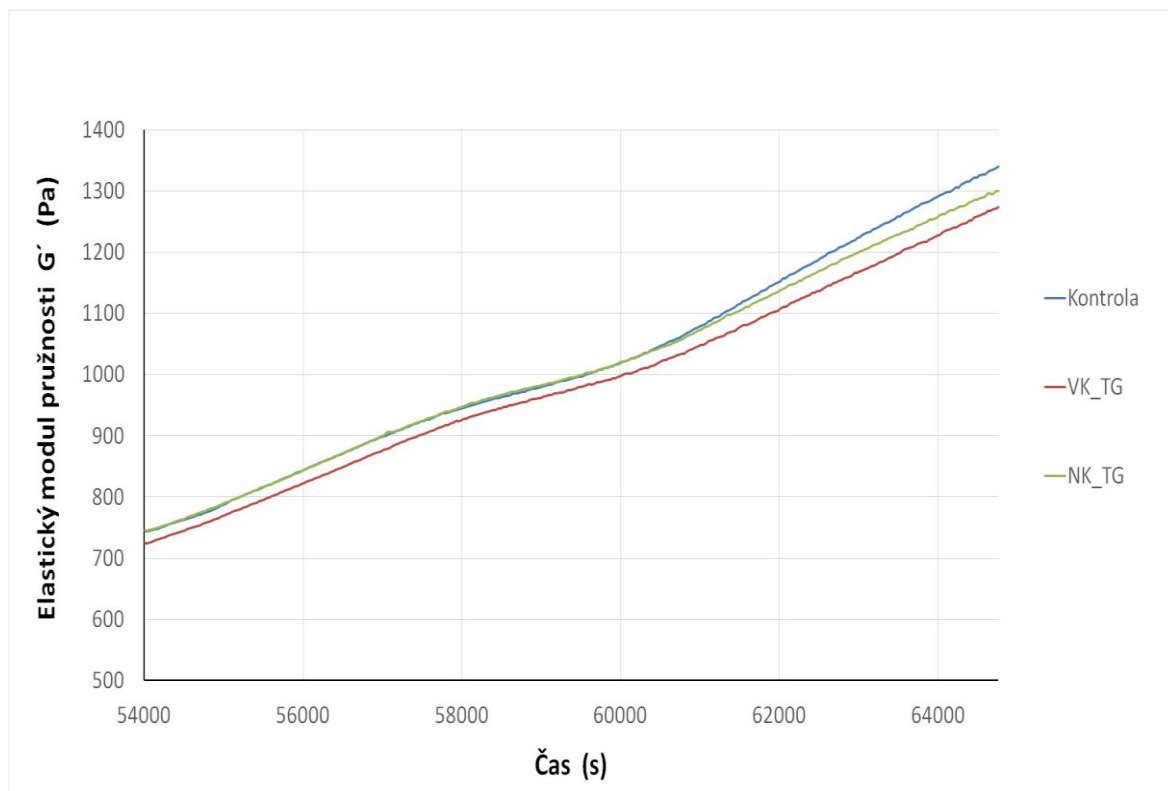
Na Obr. 10 je znázorněna závislost G' na čase v průběhu chlazení vzorku po jeho vysrážení. Na začátku se hodnoty G' pohybovaly v rozmezí 730-750 Pa. Od začátku lze pozorovat konstantní lineární nárůst hodnoty G' až do konce měření. Maximální hodnoty G' jsou na konci doby chlazení a pohybují se v hodnotách přibližně 1260-1350 Pa. Od intervalu 61 500 sekund docházelo postupně ke zvyšování zvýšení tuhosti kontrolního vzorku o 25 Pa na rozdíl od vzorků s nižší a vyšší koncentrací TG.



Obrázek 8: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 25 °C

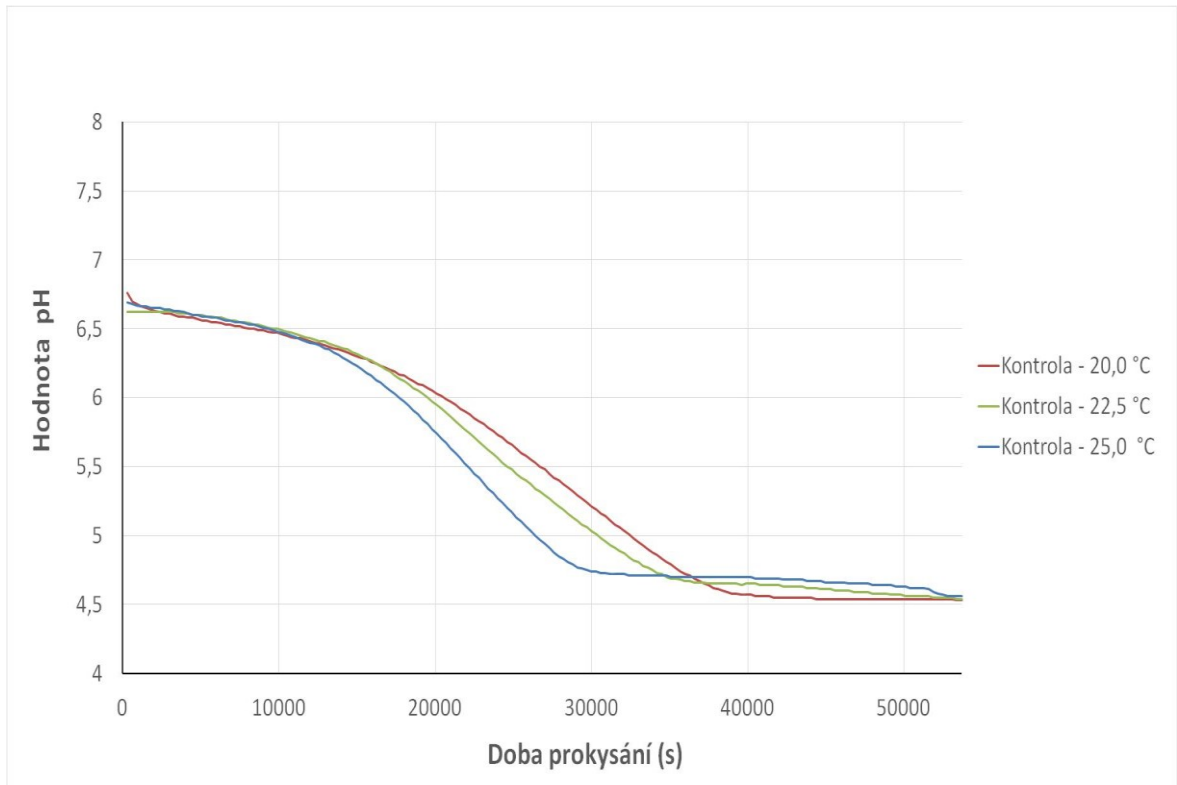


Obrázek 9: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 25 °C

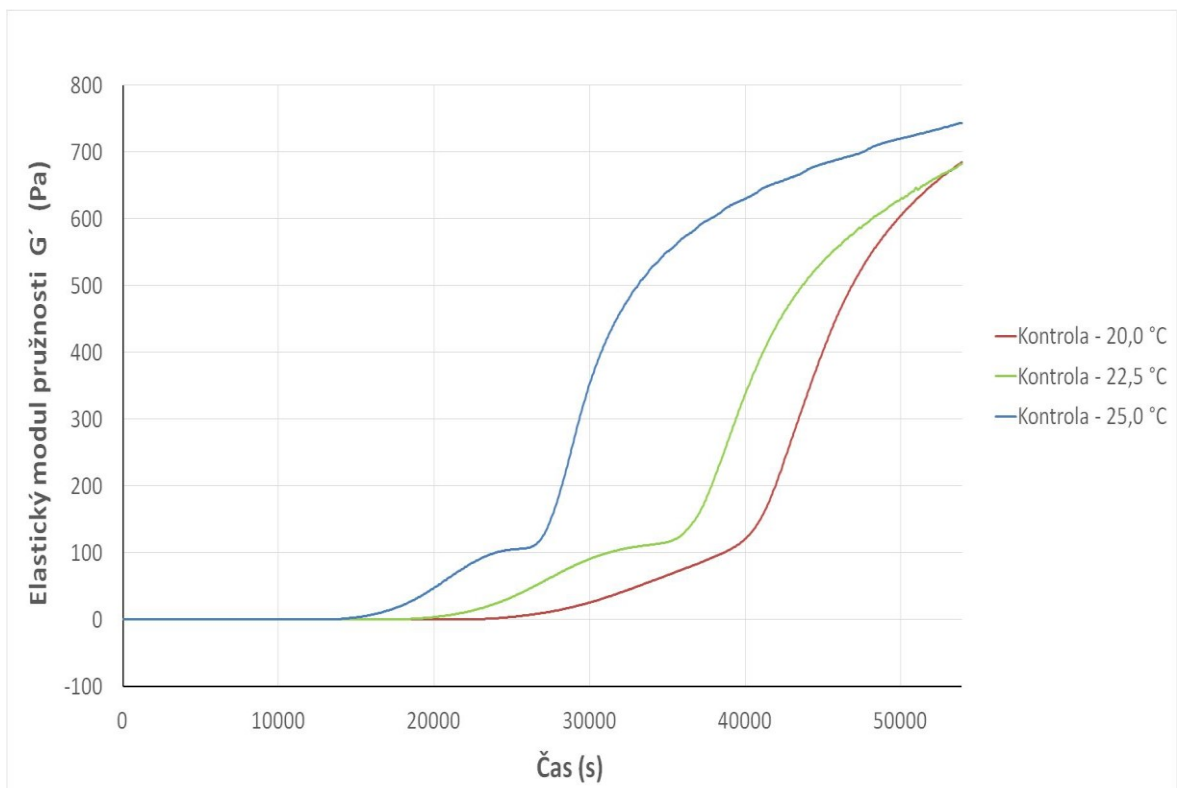


Obrázek 10: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 25 °C na 6 °C

Graf na Obr. 11 zobrazuje závislost pH na čase prokysání. Jsou zde znázorněny křivky kontrolních vzorků pro všechny tři použité teploty (20,0; 22,5 a 25,0 °C). Výchozí hodnota pH křivek je v rozmezí 6,66 až 6,76. V časovém intervalu 0-12 500 s hodnota pH všech tří křivek pozvolna klesala na hodnoty kolem 6,40. Všechny křivky vykazují téměř stejné hodnoty pH. V intervalu od 14 900 s docházelo k výraznějšímu poklesu hodnot pH u všech tří křivek až na hodnoty 4,57–4,70. Hodnoty pH se zde však rozcházejí. Nejrychlejší pokles pH byl zaznamenán pro vzorky kontrol prokysávajících při teplotě 25,0°, kdy na hodnotu pH 4,70 se tento vzorek dostal v čase přibližně 30 000 s. Kontrola prokysávající při 22,5 °C se dostala na hodnotu pH 4,66 v čase 36 500 s. Hodnota pH 4,57 kontrolního vzorku prokysávající při nejnižší použité teplotě 20,0 °C byla dosažena za 39600 s. V dalším časovém úseku až do 53700 s byl pokles hodnot pH všech tří kontrolních vzorků zastaven a ustálen na téměř konstantních hodnotách kolem 4,55 pH.



Obrázek 11: Srovnání závislosti pH na čase prokysávání pro teploty 20,0; 22,5 a 25,0 °C



Obrázek 12: Srovnání závislosti elastického modulu pružnosti pro teploty 20,0; 22,5 a 25,0 °C

Souhrnné znázornění tvorby gelu tvarohu při všech třech použitých teplotách je u kontrolních vzorků bez obsahu transglutaminázy znázorněno na Obr. 12. Z uvedeného grafu vyplývá, že hodnota elastického modulu pružnosti G' se v počátku měření, kdy ještě nedocházelo k tvorbě gelu, pohybovala u všech kontrolních vzorků (stejně jako u vzorků s TG, viz výše) v rozmezí 0-1 Pa a byla téměř neměnná. Tento stav trval přibližně do hodnoty 15 000 s. Následně docházelo k odchýlení jednotlivých křivek vyjadřujících G' v závislosti na čase srážení pro vzorky kontrol srážících se při různých teplotách. Hodnot 110–130 Pa dosáhla první křivka pro 25,0 °C, a to v čase kolem 26 000 s. Následována byla křivkou pro 22,5 °C, která těchto hodnot dosáhla v čase 35 000 s. Křivka vyjadřující srážení při 20,0 °C dosáhla těchto hodnot v čase 39 000 s. Rychlost srážení a zvyšování pevnosti gelu odpovídalo rychlosti prokysávání vyjádřené hodnotami pH na Obr. 11 (*B.CELLI, Giovana, 2018, ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN a kol., 2016, BUŇKA, František a kol., 2013, GÖRNER, Fridrich a kol., 2004*). U všech křivek poté docházelo k rychlému nárůstu hodnot G' na přibližně 500 Pa. Poté následuje zpomalení nárůstu hodnot G' pro všechny analyzované vzorky. Naměřený časový posun mezi křivkami se postupně začínal vytrácet. V čase 54 000 s byla hodnota elastického modulu pružnosti pro vzorek tvarohu vyrobeného při 25,0 °C bez aplikace TG 744 Pa, pro vzorky tvarohů vyrobených při 22,5 a 20,0 °C pak byla tato hodnota 678 Pa. Z uvedeného je možné říci, že se nejtuzší tvaroh byl získán při 25,0 °C.

ZÁVĚR

Prezentovaná práce řeší pouze malou část z velmi zajímavé oblasti potravinářství. A tou je možné použití různých enzymů při výrobě nejrůznějších druhů potravinářských produktů, které potom získávají určité významné vlastnosti. Tato práce byla zaměřena na použití mikrobiálního enzymu transglutamináza při výrobě mléčného produktu, a to tvarohu.

V teoretické části práce byla popsána ucelená technologie výroby tvarohu. Dále zde byla obecně charakterizována transglutamináza a její možné použití v mlékárenském průmyslu.

Praktická část práce je vypracovaná na základě provedených experimentů. Jsou zde prezentována data měření vlivu transglutaminázy na tvorbu tvarohu. Dále se zkoumají viskoelastické vlastnosti vznikajícího gelu v procesu srážení (výrobu tvarohu) s dvěma koncentracemi TG při třech různých teplotách. Rovněž jsou pozorovány změny hodnot pH v průběhu srážení mléka při výrobě tvarohu.

Je zřejmé, že i přes staletí trvající výroby tvarohu, se nacházejí stále možnosti, jak tento proces výroby zefektivnit a zdokonalovat. Výsledkem je pak ještě kvalitnější a chutnější tvaroh.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

B.CELLI, Giovana, Alireza Abbaspourrad, Rohit Kapoorb, Raheleh Ravanfara a Siva Kalippanb. Annatto-entrapped casein-chitosan complexes improve whey color quality after acid coagulation of milk. *Food Chemistry*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.071>.

BEILEN, Jan B. Van a Zhi LI. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, roč. 13, č. 4, s. 338-344. ISSN 09581669

BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK. *Chemie a technologie mléka: určeno pro posl. fak. potravinářské a biochemické technologie*. Praha: Mezinárodní organizace novinářů, 1990. ISBN 8070800755.

BUŇKA, František. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. ISBN isbn978-80-7454-254-1.

CISTERNY PRO DOPRAVU A SBĚR MLÉKA: [online]. [cit.]. Dostupné z: <http://www.cisterny-parcisa.cz/>

DEETH, H.C. a N. DATTA. Ultra-High Temperature Treatment (UHT): Heating Systems. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, 699-707. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00216-8. ISBN 9780123744074

DI PIERRO, P., MARINIELLO, L., SORRENTINO, A., GIOSAFATTO, C. V. L., CHIANESE, L., PORTA, R. Transglutaminase-Inducted Chemical and Rheological Properties of Cheese. *Food Biotechnology*. 24, 2010, 107-120.

DJOULLAH, Attaf, Florence HUSSON a Rémi SAUREL. Gelation behaviors of denatured pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment. *Food Hydrocolloids* 77. 2018.

DMYTRÓW, I., JASÍNSKA, M., DMYTRÓW, K. Effect of microbiological transglutaminase on selected physicochemical properties of tvarog. *Italian Journal of Food science*. 4, 22, 2010, 449-460.

EDITOR-IN-CHIEF, John W. Fuquay a Patrick J. Fox EDITORS. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011. ISBN 9780123744074.

Enzymic Coagulation of Milk. University of Guelph: Food Science [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/enzymic-coagulation-milk>

FORMAN, Ladislav. Mlékárenská technologie II. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1994. ISBN 80-7080-214-6.

FORMAN, Ladislav a Jaroslav ČEPIČKA. Technologie: Mlékárenská výroba: Učební text pro 1. roč. středních odb. učilišť. Praha: Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství České republiky, 1990. ISBN 8071050091.

FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0-12-26-3653-8.

FOX, P - McSWEENEY, P - COGAN, T - GUINEE, T.: Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. 1 General Aspects, 2004, 431 stran

GAJDŮŠEK, Stanislav. Mlékařství II. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN isbn80-7157-342-6.

GÖRNER, Fridrich. a Lubomír. VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN isbn80-96-7064-9-7.

HAN, Xue, Yan LIU, Michael J. SELIG, Alireza ABBASPOURRAD a Lijun YIN. Transglutaminase-treated conjugation of sodium caseinate and corn fiber gum hydrolysate: Interfacial and dilatational properties. Carbohydrate Polymers 187. 2018.

HÖKL, Jan a Mirko ŠTĚPÁNEK. Hygiena potravin. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1962. Zemědělská výroba.

CHEN, Jie, Ali TABATABAEI, Doug ZOOK, Yan WANG, Anne DANKS a Kathe STAUBER. A surrogate analyte-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endogenous cyclic nucleotides in rat brain. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2017, 146, 361-368 [cit.]. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.08.040. ISSN 07317085.

CHEN, Lintianxiang, Yan LI, Jie HAN, Dongdong YUAN, Zhang LU a Liebing ZHANG. Influence of transglutaminase-induced modification of milk protein concentrate (MPC) on yogurt texture. *International Dairy Journal* 78. 2018.

JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-635-3.

JANŠTOVÁ, Bohumíra a Josef HOLEC. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků: návody k praktické výuce v mlékařské dílně*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2004. ISBN isbn80-7305-486-8.

JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ. *Produkce mléka a technologie mléčných výrobků*. Brno: VFU Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-712-1.

KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-510-2.

KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN isbn978-80-7418-051-4.

KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN isbn978-80-7418-145-0.

LEE, S.Y., CHOI, M-J., CHO, H-Y., DAVAATSEREN, M. Effects of High-Pressure, Microbial Transglutaminase and Glucono-Lactone on the Aggregation Properties of Skim Milk. *Korean Journal Food Science*. 36, 3, 2016, 335-342.

MICHALSKI, Marie-Caroline a Caroline JANUEL. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2006, 17(8), 423-437 [cit. 2017-11-16]. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.02.004. ISSN 09242244.

MOHAMMAD, Seyed, Taghi GHARIBZAHEDI a Ioannis S. CHRONAKIS. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yo-gurt products. *Food Chemistry* 245. 2018.

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu

NORTON, Ian T., Fotios SPYROPOULOS a Philip COX, ed. Practical food rheology: an interpretive approach. Chichester: Wiley-Blackwell, c2011. ISBN 978-1-4051-9978-0

[online]. [cit. 2017-11-22]. Dostupné z: <http://www.svet-potravin.cz/clanek.aspx?id=2911>

PASTERNAK, Ralf, Simone DORSCH, Jens T. OTTERBACH, Isabella R. ROBENEK, Sabine WOLF a Hans-Lothar FUCHSBAUER. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptococcus thermophilus* Purification, characterisation and sequence of the zymogen. 1998. ISSN-EJB 98 0477/4.

PENG, Jian a Aroma WAN. Measurement of Henry's Constants of High-Volatility Organic Compounds Using a Headspace Autosampler. Environmental Science & Technology [online]. 1997, 31(10), 2998-3003 [cit.]. DOI: 10.1021/es970240n. ISSN 0013-936x.

SCHINDLER, Jiří. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopln. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.

STRMISKA, Josef, Vladimír HUŠEK a Rudolf MINAŘÍK. Výroba tvarohu a tvarohových specialit: Nové technologie. Praha: SNTL, 1991. Technika a technologie potravinářského průmyslu. ISBN 80-03-00481-0.

SUKOVÁ, Irena. Syrovátka v potravinářství. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.

ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN, Karol HERIAN, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ a Margita ČANIGOVÁ. Mlieko a mliečne výrobky. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2016. ISBN 978-80-552-1451-1.

ŠUSTOVÁ, Květoslava a Vladimír SÝKORA. Mlékárenské technologie. V Brně: Mendelova univerzita, 2013. ISBN isbn978-80-7375-704-5.

TAMIME, A. Y. Milk processing and quality management. Malden, MA: Wiley-Blackwell Pub./Society of Dairy Technology, 2009. ISBN sbn1405145307.

VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-330-4.

VORLOVÁ, Lenka. Chemie potravin a chemické laboratorní metody: praktická cvičení. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-688-9.

Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje

WANG, Wen-qiong, Xue HAN, Huaxi YI a Lan-wei ZHANG. The ultra filtration efficiency and mechanism of transglutaminase enzymatic membrane reactor (EMR) for protein recovery from cheese whey. *International Dairy Journal* 80. 2018.

ZADRAŽIL, Karel. *Mlékařství: (přednášky)*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, 2002. ISBN 8086642151.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TG	transglutamináza
Tzv.	takzvaný
Např.	například
Obr.	obrázek
Č.	číslo
Max.	maximum
UHT	vysokoteplotní úprava
Tj.	to jest
VK	vyšší koncentrace
NK	nižší koncentrace
°SH	Soxhlet Henkel
pH	aktivní kyselost
% w/w	hmotnostní procenta
RIL	rezidua inhibičních látek

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma pasterace mléka (převzato z JANŠTOVÁ, Bohumíra, 2012).....	16
Obrázek 2: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 20,0 °C	34
Obrázek 3: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 20,0 °C na čase prokysávání	34
Obrázek 4: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 20,0 °C na 6 °C.....	36
Obrázek 5: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 22,5 °C	37
Obrázek 6: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 22,5 °C na čase prokysávání	37
Obrázek 7: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 22,5 °C na 6 °C.....	38
Obrázek 8: Závislost pH na čase prokysávání při teplotě 25 °C	40
Obrázek 9: Závislost elastického modulu pružnosti při teplotě 25 °C	40
Obrázek 10: Závislost G' na čase v průběhu chlazení z teploty 25 °C na 6 °C.....	41
Obrázek 11: Srovnání závislosti pH na čase prokysávání pro teploty 20,0; 22,5 a 25,0 °C.....	42
Obrázek 12: Srovnání závislosti elastického modulu pružnosti pro teploty 20,0; 22,5 a 25,0 °C.....	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení tvarohu podle konzistence a obsahu tuku v sušině (<i>Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje</i>)	22
Tabulka 2: Hodnoty aktivní a titrační kyselosti mléka, zákysu a tvarohu vyrobených za různých teplotních podmínek. Vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka.	32

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: NÁZEV PŘÍLOHY