

IV 8509



ROMÂNIA
UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS”
DIN GALAȚI



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

Alina-Ioana ARDELEAN

**Impactul transglutaminazei microbiene asupra gelurilor acide
obținute din proteinele laptelui din perspectiva relației
structură-funcție**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Anca Ioana Nicolau

GALATI
2012

Str. Domnească nr.47. cod poștal 800008, Galați, România. Tel.: +40 336. 130. 109, Fax: +40 236. 461. 353

Web: www.ugal.ro e-mail: rectorat@ugal.ro

MULȚUMIRI

Doresc să mulțumesc celor care mi-au fost alături și m-au susținut pe parcursul acestor trei ani și fără de care această muncă nu ar fi fost posibilă.

Recunoștința mea se îndreaptă către mentorul meu, dna. prof. coordonator dr. ing. Anca Ioana Nicolau, cea care mi-a dat aripi spre minunatul tărâm al cercetării. Către membrii comisiei de îndrumare: dna. ș.l. dr. ing. Nicoleta Stănciuc, dna. conf. dr. ing. Daniela Borda, dna. prof. dr. ing. Elisabeta Botez. Către dna. dipl. ing. dr. rer. nat. techn. Doris Jaros și dnul. decan prof. dipl. ing. dr. rer. nat. techn. habil. Harald Rohm pentru că m-au acceptat în grupul de cercetare privind tehnologia laptelui și mi-au supervizat munca desfășurată în laboratoarele din cadrul Technische Universität Dresden, Germania – Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik.

De asemenea, doresc să mulțumesc echipei proiectului POS DRU – EFICIENT pentru sprijinul financiar acordat; datorită acestuia am avut oportunitatea de a-mi desfășura activitatea de cercetare în cadrul uneia dintre cele mai prestigioase universități germane.

Mulțumirile mele se îndreaptă și către colegii mei din cadrul Technische Universität Dresden (Anja, Clemens, Stefan, Gunther, Susann, Mandy, Christiane, Felix, Thanet), care mi-au devenit prieteni.

Nu în cele din urmă, doresc să mulțumesc familiei mele și logodnicului meu, cărora le dedic această teză de doctorat.



LISTA CONTRIBUȚIILOR PERSONALE

Publicații în jurnale internaționale de referință

1. Ardelean, A. I., Otto, C., Jaros, D., Rohm, H. (2012). *Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk*. Small Ruminant Research (factor de impact 1.295), Volumul 106, pp. 47-53.
2. Ardelean, A. I., Jaros, D., Rohm, H. *Gelation behavior of goat milk cross-linked with microbial transglutaminase*. Trimisă la Dairy Science & Technology (factor de impact 1.12), faza: acceptat spre publicare.
3. Ardelean, A. I. *Microbial transglutaminase treatment of enriched goat milk changes the physical properties of set yoghurts obtained with an exopolysaccharide-producing culture*. Trimisă la International Dairy Journal (factor de impact 2.401), faza: sub recenzie.

Contribuții la conferințe internaționale

1. Ardelean, A. I. *Influence of transglutaminase treatment on acid-induced gels from enriched goat milk*, Milk Conference, Bern, Switzerland, 12-13 septembrie 2011, prezentare orală, www.milchwissenschaft.de.
2. Ardelean, A. I., Jaros, D., Rohm, H. *Effect of microbial transglutaminase in set-type goat milk yoghurt obtained with exopolysaccharide cultures, as affected by total solids content*, The Student Scientific Conference on Biotechnology & Biomedicine, Brno, Republica Ceha, 12-13 aprilie 2012, prezentare orală, <http://www.biomania.cz/>.
3. Ardelean, A. I., Jaros, D., Rohm, H. *Comparative study on transglutaminase cross-linked cow and goat milk gels*. 6th Central European Congress on Food (CEFood), Novi Sad, Serbia, 23-26 mai 2012, prezentare orală, <http://cefood2012.rs/>.

CUPRINS

MULȚUMIRI	I
LISTA CONTRIBUȚIILOR PERSONALE	II
1. INTRODUCERE	1
1.1 JUSTIFICAREA ȘTIINȚIFICĂ A TEMEI ALESE	1
1.2 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE	2
3. EFECTUL TRANSGLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA COMPORTAMENTULUI DE GELIFIERE AL LAPTELUI DE CAPRĂ	5
3.1 REZULTATE ȘI DISCUȚII	5
3.1.1 <i>Cinetica gelifierii</i>	5
3.1.2 <i>Caracterizarea gelurilor acide</i>	6
3.1.2.1 Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia oscilatorie de mică amplitudine	6
3.1.2.2 Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine	7
3.1.2.3 Determinarea capacității de reținere a apei a gelurilor acide	7
3.1.2.4 Susceptibilitatea proteinelor din lapte la reticularea indusă de MTGază	8
3.2 CONCLUZII.....	9
4. TRANSGLUTAMINAZA MICROBIANĂ ȘI ÎMBUNĂȚĂȚIREA PROPRIETĂȚILOR FIZICE ALE GELURILOR ACIDE OBȚINUTE DIN LAPTE DE CAPRĂ ÎMBOGĂȚIT CU LAPTE PRAF DEGRESAT	10
4.1 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	10
4.1.1 <i>Abordarea experimentală</i>	10
4.1.2 <i>Monitorizarea gelifierii</i>	11
4.1.3 <i>Caracterizarea gelurilor acide</i>	12
4.1.3.1 Impactul intensității tratamentului enzimatic asupra fermității gelurilor	12
4.1.3.2 Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine	13
4.1.3.3 Determinarea sinerezei gelurilor acide.....	14
4.1.3.4 Evaluarea gradului de reticulare prin SDS Poliacril gel electroforeză	15
4.2 CONCLUZII.....	15
5. EFECTUL TRANSGLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA GELURILOR ACIDE OBȚINUTE DIN LAPTE DE CAPRĂ ÎMBOGĂȚIT CU ZER PRAF	16
5.1 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	16
5.1.1 <i>Abordarea experimentală</i>	16

5.1.2	<i>Efectul MTGazei asupra cineticii de gelifiere</i>	18
5.1.3	<i>Efectul MTGzei asupra proprietăților reologice și fizice ale gelurilor acide</i>	18
5.1.3.1	Determinarea tăriei gelurilor acide folosind reologia oscilatorie de mică amplitudine.....	18
5.1.3.2	Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine.....	20
5.1.3.3	Determinarea sinerezei gelurilor acide.....	21
5.1.3.4	Evaluarea gradului de reticulare prin SDS Poliacril gel electroforeză.....	22
5.2	CONCLUZII.....	23
6. INFLUENȚA TRANSLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICE ALE		
IAURTULUI DE CAPRĂ OBTINUT CU CULTURĂ PRODUCĂTOARE DE EXOPOLIZAHARIDE.....		
6.1	REZULTATE ȘI DISCUȚII	24
6.1.1	<i>Abordarea experimentală</i>	24
6.1.2	<i>Fermitatea iaurturilor</i>	25
6.1.2.1	Efectul adaosului de substanță uscată.....	25
6.1.2.2	Efectul adaosului de MTGază	26
6.1.3	<i>Susceptibilitatea iaurturilor la sinereză</i>	27
6.1.4	<i>Cinetica procesului de fermentare și post-acidifierea</i>	28
6.1.4.1	Cinetica procesului de fermentare	28
6.1.4.2	Aciditatea titrabilă și post-acidifierea.....	29
6.2	CONCLUZII.....	30
7. PROVOCĂRI TEHNOLOGICE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR		
7.1	IMPORTANȚA PRACTICĂ A STUDIULUI DE CERCETARE EFECTUAT	31
7.2	PERSPECTIVE DE VIITOR	33
8.	CONCLUZII.....	34
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ		
		35

1. INTRODUCERE

1.1 Justificarea științifică a temei alese

În prezent, tendința pe piața alimentară globală este de a se consuma alimente cu o mare valoare nutritivă și proprietăți structurale și funcționale îmbunătățite. Pe o astfel de piață, în care cerințele consumatorilor privind calitatea produselor alimentare sunt din ce în ce mai mari, industria alimentară are nevoie de alimente/ingrediente noi, economice și de bună calitate.

Produsele lactate fermentate constituie o bază excelentă pentru obținerea unor astfel de produse care să corespundă cerințelor consumatorilor. Utilizarea laptelui de capră reprezintă o oportunitate în diversificarea pieței produselor lactate, deoarece ne permite dezvoltarea unor produse lactate fermentate cu valoare adăugată și cu caracteristici speciale, în comparație cu laptele de vacă (Haenlein, 2004; Slačanac et al., 2010). Laptele provenit de la rumegătoarele de talie mică, cum ar fi caprinele, este de interes economic special în țările în curs de dezvoltare, producția acestui tip de lapte putând fi considerată o strategie utilă în abordarea problemelor de nutriție (Haenlein, 2004). În plus, sectorul caprin prezintă un impact real în dezvoltarea durabilă, deși până în prezent rolul său a fost subestimat (Dubeuf, Morand-Fehr, & Rubino, 2004). Deși caprinele se cresc în toate țările (FAO, 2001), mulți autori au observat că sectorul caprin nu a fost bine susținut public sau academic, în comparație cu alte sectoare de producție animală, în special în comparație cu sectorul bovin. Mai mult chiar, utilizarea laptelui provenit de la rumegătoarele mici (cum este cazul laptelui de capră), poate reprezenta singura direcție în procesul de fabricație a produselor noi, precum cea a iaurturilor (Slacanac și al., 2010).

În industria produselor lactate, valoarea produselor depinde în mare măsură de proprietățile lor fizice, precum capacitatea de reținere a apei, vâscozitatea, capacitatea de gelifiere etc., drept urmare o atenție deosebită este îndreptată către îmbunătățirea acestor proprietăți, întrucât se pare că accentuarea atributelor

pozitive ale constituenților indigeni laptelui, încorporarea culturilor precursore îmbunătățirii sănătății și obținerea de texturi superioare vor contribui în mod decisiv la mărirea consumului de produse lactate fermentate în viitorul apropiat. Din păcate, este dificilă obținerea de iaurturi din lapte de capră cu consistență comparabilă cu cea a iaurturilor produse din lapte de vacă.

Producătorii de produse lactate folosesc diferite metode pentru a îmbunătăți proprietățile fizice ale iaurturilor din lapte de capră, precum: utilizarea polizaharidelor drept agenți de îngroșare, utilizarea unor culturi lactice pentru reducerea sinerezei, modificarea structurii proteinelor laptelui prin metode chimice, fizice, enzimatică sau combinate, prin asocierea proceselor de mai sus sau încorporarea de diferite proteine (și peptide).

Întrucât enzimele sunt considerate a fi un mijloc eficient în procesul biotehnologic, a căror acțiune poate fi controlată în matricea alimentară, noua direcție privind modificarea și/sau îmbunătățirea funcționalității, texturii, aspectului și aromei produselor lactate este dată de acești compuși cu acțiune catalitică.

În ziua de astăzi, numai transglutaminazele sunt folosite în industria alimentară pentru modificarea structurii produselor. Între acestea, transglutaminaza microbiană (MTGaza) extrasă din microorganismul *Streptoverticillium mobaraense* se bucură de un mare succes, îndeosebi în obținerea produselor lactate fermentate, datorită capacității sale de a forma legături de reticulare intra- și intermoleculare, legături ce duc la formarea de rețele puternice între moleculele proteice, rezultând geluri cu vâscozitate și capacitate de reținere a apei mărite, respectiv produse lactate cu proprietăți fizice îmbunătățite.

1.2 Scopul și obiectivele științifice

Efectele acestei enzime în laptele de vacă utilizat la producerea gelurilor acide/iaurturilor constituie un subiect amplu dezbătut de mulți cercetători (Jaros și al., 2006a; Buchert și al., 2010), însă puțină atenție este acordată laptelui de capră, în pofida calităților sale superioare. Conform literaturii de specialitate, până la ora actuală se cunosc doar trei studii privind utilizarea transglutaminazei microbiene în obținerea de iaurturi din laptele de capră, cu o prezentare sumară a efectelor acestei enzime asupra gelului acid: Farnsworth și colaboratorii (2006) au arătat că

utilizarea MTGazei în obținerea de iaurturi din lapte de capră poate da rezultate pozitive și că specificitatea acestei enzime variază în funcție de tipul de proteine din laptele de capră (Domagala și al., 2007; Rodriguez-Nogales, 2006).

Scopul și originalitatea temei de cercetare

Studii aprofundate trebuie efectuate asupra fracțiunilor proteice de origine caprină folosite drept substraturi, în prezența diversilor agenți de acidifiere, cu scopul de a se obține mai multe informații cu privire la impactul pe care îl are MTGaza asupra produselor lactate acide, din perspectiva relației structură-funcție în vederea obținerii de geluri acide cu proprietăți funcționale și structurale îmbunătățite, care pot sta la baza dezvoltării unor produse alimentare noi.

Astfel, influența transglutaminazei microbiene (MTGaza), enzimă capabilă să realizeze reticularea proteinelor, asupra proprietăților reologice și texturale ale gelurilor acide obținute din lapte de vacă, lapte de capră și lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat sau zer praf la 14% sau 18% substanță uscată, a constituit subiectul prezentei teze de doctorat. Acidificarea a fost obținută cu glucono- δ -lactonă sau prin fermentare cu o cultură starter producătoare de exopolizaharide. Timpul de incubare cu enzimă a variat în intervalul 0.5 - 7 h și inactivarea acesteia a fost realizată prin tratament termic sau adaos de N-etilmaleimidă. Proprietățile reologice ale gelurilor acide au fost investigate cu ajutorul tehnicilor reologice de mică și mare amplitudine. Pe lângă proprietățile reologice, s-a mai determinat sinereza gelurilor. SDS-PAGE a fost utilizată pentru a evidenția modificările structurale ale proteinelor reticulate de către MTGază care au condus la obținerea de geluri acide cu proprietăți funcționale diferite de cele ale gelurilor netratate enzimatic.

Obiectivele specifice

Obiectivele studiului de cercetare au constat în:

- investigarea influenței reticulării proteinelor cu MTGază asupra procesului de gelifiere și a texturii gelurilor acide obținute din lapte de capră integral și compararea acestor geluri cu cele obținute din laptele de vacă integral (date prezentate în capitolul 3). Nici unul dintre studiile menționate mai sus nu oferă

informații cu privire la impactul pe care îl are MTGaza asupra cineticii procesului de gelifiere a proteinelor de origine caprină.

- investigarea efectului MTGazei asupra gelurilor acide obținute din lapte de capră care a fost îmbogățit cu lapte praf degresat de origine bovină (date prezentate în capitolul 4). Din cunoștințele noastre, până în prezent nu a fost raportat nici un studiu care să „profite” de avantajele combinării tratamentului enzimatic cu metoda de creștere a conținutului în substanță uscată.
- investigarea efectului tratamentului enzimatic asupra gelurilor acide obținute din lapte de capră îmbogățit cu zer praf de origine bovină. Conform literaturii de specialitate, până în prezent nu a fost raportat nici un studiu care să combine avantajele oferite de adiția zerului praf și a transglutaminazei microbiene (date prezentate în capitolul 5).
- investigarea proprietăților fizice ale iaurturilor obținute din lapte de capră, „profitând” de proprietățile MTGazei și culturii producătoare de exopolizaharide. Conform literaturii de specialitate, până în prezent nu a fost raportat nici un studiu care să investigheze efectul tratamentului cu MTGază asupra proprietăților fizice ale iaurturilor din lapte de capră obținute cu culturi producătoare de exopolizaharide (date prezentate în capitolul 6).

Studiul de cercetare este structurat pe 8 capitole. În capitolul 2 sunt prezentate aspectele teoretice ale studiului de cercetare, în timp ce capitolele 3-6 prezintă studiul de cercetare în sine. Relevanța practică a studiilor și direcțiile de viitor sunt redate în capitolul 7, iar concluziile sunt prezentate în capitolul 8.

Cuvinte cheie: transglutaminaza microbială, lapte de capră, geluri acide, reologie.

3. EFECTUL TRANSGLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA COMPORTAMENTULUI DE GELIFIERE AL LAPTELUI DE CAPRĂ

3.1 Rezultate și discuții

3.1.1 Cinetica gelifierii

Pentru evaluarea impactului enzimei asupra procesului de gelifiere, pH-ul a fost monitorizat până la atingerea valorii de 4.2, corespunzătoare celui mai scăzut punct izoelectric, și anume al cazeinelor laptelui de capră.

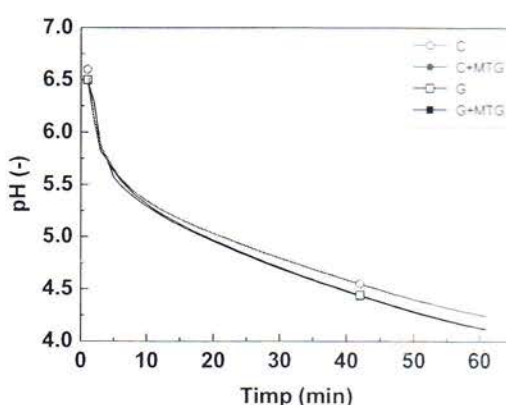


Figura 3-1. Modificările de pH ale laptelui de vacă (C) și laptelui de capră (G) tratat (simboluri pline) sau nu enzimatic (simboluri goale) cu 3 U MTG/g proteină. Gelifierea a fost realizată prin acidifiere cu 4% GDL la 30°C.

Cu toate că profilul pH/timp nu a fost afectat pe durată acidifierii de către enzimă (Figura 3-1), utilizând reologia de mică amplitudine, s-a putut evidenția că incubarea laptelui cu enzimă accelerează gelifierea (Tabel 3-1). Startul gelifierii a avut loc mai repede și la o valoare a pH-ului mai mare în laptele de vacă în comparație cu laptele de capră, pentru probele care au fost supuse tratamentului enzimatic.

Ipoteza emisă a constat în aceea că reticularea poate modifica acest mecanism de dezintegrare micelară, care ulterior cauzează gelifierea să aibe loc între particulele parțial reticulate la o valoare mai mare a pH-ului (Schorsch și al., 2000; Jaros și al., 2010).

Tabelul 3-1. Proprietățile fizice ale gelurilor acide obținute din lapte de vacă și de capră tratat sau nu enzimatic cu transglutaminază microbială (MTGază).

Parametru	Lapte de vacă		Lapte de capră	
	-MTGază	+ MTGază	-MTGază	+ MTGază
Startul gelifierii				
Timp (min)	12 ± 0.7	7 ± 0.7	18 ± 2.8	13 ± 2.8
pH (-)	5.3 ± 0.03	5.5 ± 0.05	5.0 ± 0.08	5.2 ± 0.01
G' maxim (Pa)	155 ± 4.2	175 ± 19.8	20 ± 6.8	44 ± 11.3
Timp (min)	42 ± 3.0	45 ± 1.0	60 ± 0.5	60 ± 0.0
pH (-)	4.6 ± 0.08	4.5 ± 0.03	4.1 ± 0.01	4.1 ± 0.01

3.1.2 Caracterizarea gelurilor acide

3.1.2.1 Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia oscilatorie de mică amplitudine

După cum se poate observa din figura 3-2, adaosul enzimei în laptele de vacă și laptele de capră a determinat creșterea fermității gelului.

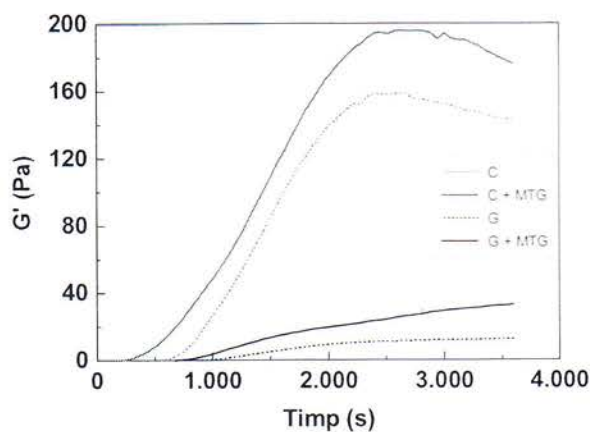


Figura 3-2. Evoluția modulului de elasticitate, G' (Pa), în probele de lapte de vacă și lapte de capră tratate sau nu enzimatic cu 3 U MTGază/g proteină.

Laptele de vacă a înregistrat un maximum al lui G' în apropierea punctului izoelectric (pI) al cazeinelor. Scăderea ulterioară a pH-ului a rezultat într-o scădere a fermității gelurilor, probabil datorită creșterii încărcăturii electrice nete (Horne, 2003). În ceea ce privește laptele de capră, G' maxim s-a înregistrat tot în jurul pI

de 4.2 al cazeinelor de origine caprină (Morgan și al., 2003). Chiar și după tratamentul enzimatic, gelurile acide de origine caprină au fost de trei ori mai moi în comparație cu gelurile obținute din lapte de vacă netratat cu MTGază.

3.1.2.2 *Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine*

În figura 3-3 sunt reprezentate curbele gelurilor acide obținute în urma măsurărilor reologice de largă amplitudine efectuate cu penetrometrul RSA III.

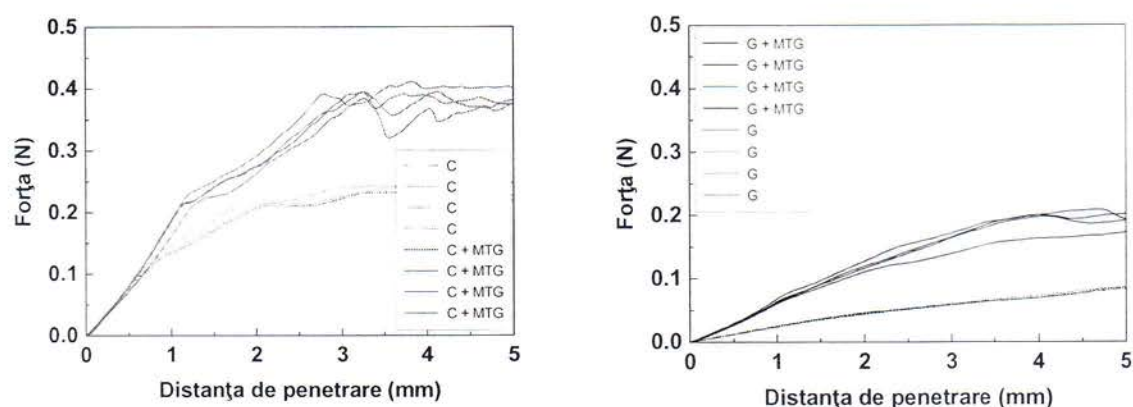


Figura 3-3. Curbele la penetrare a gelurilor acide obținute din lapte de vacă și lapte de capră, tratat sau nu enzimatic cu 3 U MTGază/g proteină.

Gelurile acide au fost obținute prin acidifierea la 30°C și 4% GDL a laptelui de vacă și de capră. Tratamentul enzimatic a fost realizat prin incubarea a 3 U MTGază/g proteină timp de 1 h. Inactivarea enzimatică s-a realizat prin tratament termic (85°C/10 min). Gelurile acide obținute în același mod, exceptând adaosul MTGazei, au constituit probele martor. În urma tratamentului enzimatic, fermitatea gelurilor acide a crescut de 1.13 și, respectiv 2.5 ori, pentru gelurile obținute din lapte de vacă și de capră.

3.1.2.3 *Determinarea capacității de reținere a apei a gelurilor acide*

Gelurile au fost obținute prin acidifiere la 30°C cu 4% GDL, care imită acidifierea lentă produsă de cultura starter, dar spre deosebire de aceasta, procesul este

reproductibil, permițând, la nivel de laborator, studiul aprofundat al efectului MTGazei, fără variații cauzate de microorganisme. Impactul MTGazei asupra capacității gelurilor acide de a reține apa a fost investigată folosind metoda de centrifugare (Figura 3-4).

Este evident că gelurile acide obținute din laptele de capră (probele de referință, fără adaos de enzimă) prezintă o sinereză mai mică (de trei ori) comparativ cu gelurile de origine bovină și că tratamentul enzimatic a redus, în continuare, această valoare de două ori.

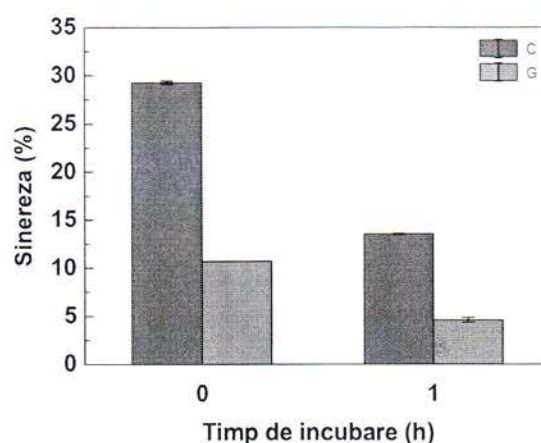


Figura 3-4. Valorile sinerezei obținute prin metoda centrifugării (6°C/20 min, 1000xg) pentru gelurile acide tratate sau nu enzimatic cu 3 U MTGază/g proteină. Inactivarea enzimatică s-a realizat prin tratament termic (85°C/10 min).

3.1.2.4 Susceptibilitatea proteinelor din lapte la reticularea indusă de MTGază

În figura 3-5 este prezentată electroforezograma ce evidențiază separarea diferitelor fracțiuni proteice pe baza masei moleculare. Analiza electroforetică a arătat că proteinele laptelui de vacă sunt mai susceptibile la reacția de reticulare inițiată de MTGază. Cantitatea estimată de proteină totală reticulată pentru fiecare tip de lapte a fost de aproximativ 31% în laptele de vacă, spre deosebire de numai 9.6% în laptele de capră.

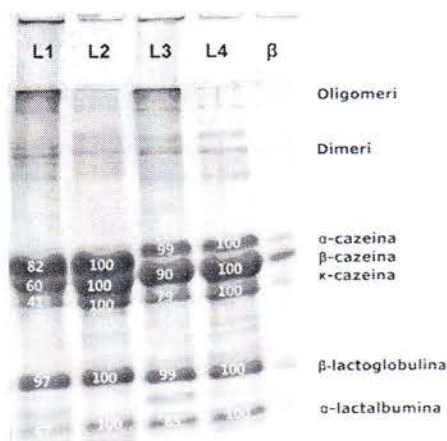


Figura 3-5. Electroforezogramele pentru laptele de vacă și de capră tratat sau nu enzimatic cu 3 U MTGază/ g proteină. Timpul de incubare a fost de 1h, inactivarea enzimei s-a realizat prin tratament termic la 85°C/10 min. Drept martor, s-a folosit β-caseina. Numerele se referă la densitatea relativă a benzilor respective.

Banda 1 (L1): lapte de vacă cu adaos de MTGază; Banda 2 (L2): lapte de vacă;
Banda 3 (L3): lapte de capră cu adaos de MTGază; Banda 4 (L4): lapte de capră.

3.2 Concluzii

Având în vedere potențialul pe care îl are MTGaza în industria produselor lactate fermentate, în studiul de față s-a investigat impactul reticulării cu MTGază asupra gelurilor acide obținute din lapte de capră, în comparație cu gelurile acide obținute din lapte de vacă, folosind sisteme model.

Studiul prezent a arătat că reticularea laptelui de vacă și de capră cu transglutaminază microbiană modifică cinetica de gelifiere și textura gelurilor acide. Astfel, tratamentul enzimatic a accelerat gelifierea, care a avut loc mai repede în laptele de vacă decât în laptele de capră, și a mărit fermitatea și capacitatea de reținere a apei de către geluri.

S-au obținut geluri cu fermitate diferită, în funcție de tipul de lapte (tratată enzimatic sau nu) și de originea acestuia (vacă sau capră). În pofida unui conținut proteic mic, gelurile obținute din lapte de capră tratat enzimatic au avut fermitate crescută și sinereză redusă, ca urmare a introducerii legăturilor ε(γGln)Lys de către transglutaminaza microbiană. Pe de altă parte, introducerea acestui tip de legături

covalente în laptele de vacă a fost mai intensă și se pare că a împiedicat formarea unei rețele proteice corespunzătoare, deși a avut un efect pozitiv în reducerea sinerezei.

Conform datelor obținute, se poate afirma că adaosul MTGazei constituie o unealtă eficientă în îmbunătățirea caracteristicilor texturale ale gelurilor acide obținute din lapte de vacă și lapte de capră. Însă, comparând gelurile acide obținute din lapte de vacă cu cele obținute din laptele de capră, valori general mai mici au fost obținute în cazul ultimelor, când conținutul redus în proteină a afectat caracteristicile gelului format. Acest aspect trebuie avut în vedere de tehnologii din industria alimentară, dacă se dorește obținerea unui produs lactat acid din lapte de capră cu un gel comparabil cu cel obținut din laptele de vacă.

4. TRANSGLUTAMINAZA MICROBIANĂ ȘI ÎMBUNĂȚĂȚIREA PROPRIETĂȚILOR FIZICE ALE GELURILOR ACIDE OBȚINUTE DIN LAPTE DE CAPRĂ ÎMBOGĂȚIT CU LAPTE PRAF DEGRESAT

4.1 Rezultate și discuții

4.1.1 Abordarea experimentală

Figura 4-1 prezintă curbele de penetrare ale gelurilor acide obținute din lapte de capră și de vacă supuse diferitelor tratamente. Este evident că gelurile din lapte de capră pur au fermitate mult mai mică decât gelurile obținute din lapte de vacă și că fiecare tratament în parte este capabil să crească fermitatea gelurilor de origine caprină. Drept urmare, abordarea experimentală a studiului de cercetare prezent a constat în combinarea celor două tratamente pentru a crea geluri cu fermitate suficient de mare.

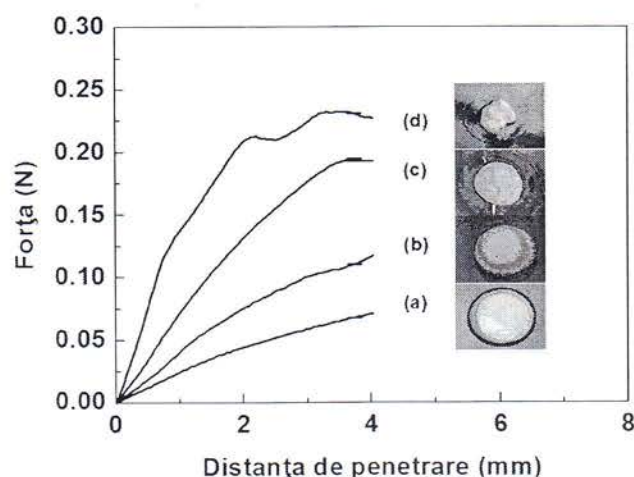


Figura 4-1. Curbele de penetrare ale gelurilor acide din (a) lapte de capră ($n = 4$), din lapte de capră tratat enzimatic cu 1.8 U MTG-ază/g proteină timp de 1 h (inactivare prin încălzire; $n = 4$), (c) din lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat de origine bovină la 18% substanță uscată și (d) din lapte de vacă ($n = 2$). Acidifierea s-a realizat cu 4% GDL la 30°C.

4.1.2 Monitorizarea gelifierii

Activitatea enzimatică poate fi stopată fie prin încălzire, fie prin adăugarea reactivului NEM, când se evită interferența reacțiilor secundare produse de căldură, precum denaturarea proteinelor. După cum se poate observa în figura 4-2, adaosul de MTGază în laptele de capră îmbogățit la 18% cu lapte praf degresat nu a influențat timpul necesar gelifierii, indiferent de modul de inactivare al enzimei.

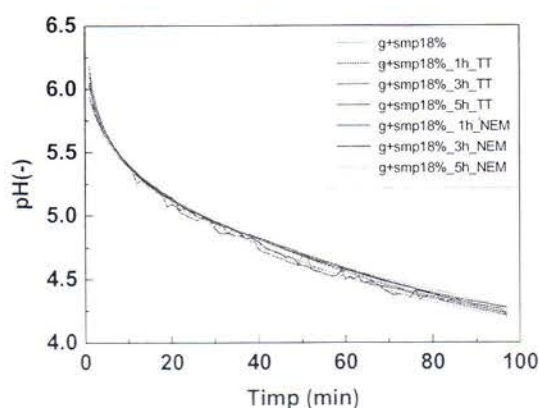


Figura 4-2. Modificările de pH ale laptelui de capră îmbogățit la 18% cu lapte praf degresat și tratat sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min), fie prin adaos de 0.1 % NEM. Gelifierea a fost realizată cu 4% GDL la 30°C.

4.1.3 Caracterizarea gelurilor acide

4.1.3.1 Impactul intensității tratamentului enzimatic asupra fermității gelurilor

În figura 4-3 sunt prezentate evoluțiile modului de elasticitate, G' (Pa), în probele de lapte de capră îmbogățite la 18% cu lapte praf degresat, tratate sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină pe parcursul procesului de gelifiere prin acidifiere cu 4% GDL la 30°C urmărită cu ajutorul reometrului ARES RFS II.

După cum se poate observa, adaosul enzimei în laptele de capră îmbogățit la 18% cu lapte praf degresat a determinat creșterea vâscozității gelurilor cu creșterea timpului de incubare la 5 h, urmată de o scădere a modului de elasticitate la prelungirea tratamentului de reticulare, indiferent de modul de inactivare enzimatică.

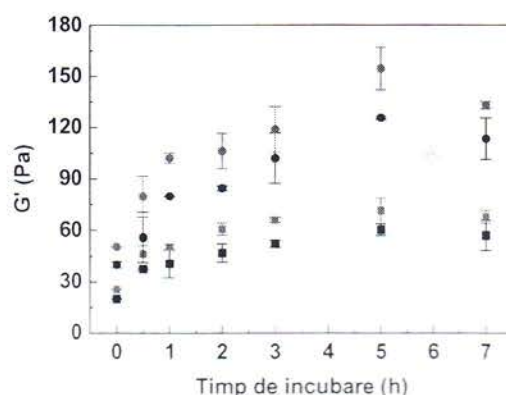


Figura 4-3. Valorile medii ($n = 2$) ale modului de elasticitate, G' (Pa), obținute la pH 4.6 (pătrate) și 4.2 (cercuri) ale gelurilor acide. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min, simboluri roșii), fie prin adaos de 0.1 % NEM (simboluri negre).

Geluri având modulul de elasticitate cel mai mare (155 Pa la pH 4.2) au fost obținute pentru laptele care a fost reticulat timp de 5 h și tratat termic pentru inactivarea enzimei. În comparație cu proba de referință (fără tratament enzimatic, 50 Pa), aceasta înseamnă o creștere a fermității gelului de aproximativ trei ori. Când tratamentul enzimatic a fost omis prin stoparea activității enzimatice cu reactivul NEM, fermitatea corespunzătoare gelului a fost de 126 Pa. Metoda ANOVA bifactorială a confirmat că aplicarea tratamentului termic a cauzat o creștere

semnificativă ($P < 0.05$) în G' . De asemenea, timpul de incubare influențează tăria gelului ($P < 0.05$).

4.1.3.2 **Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine**

În figura 4-4 sunt reprezentate curbele medii ($n=3$) ale gelurilor acide obținute prin acidifierea la 30°C și 4% GDL a laptelui praf degresat, tratate sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină obținute în măsurătorile reologice de largă amplitudine cu ajutorul penetrometrului RSA III Rheometric Scientific Inc. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min), fie prin adaos de 0.1% NEM. După cum se poate observa, adaosul enzimei a condus la o creștere a fermității gelurilor cu creșterea timpului de incubare, înregistrându-se un maxim după 5 h de incubare.

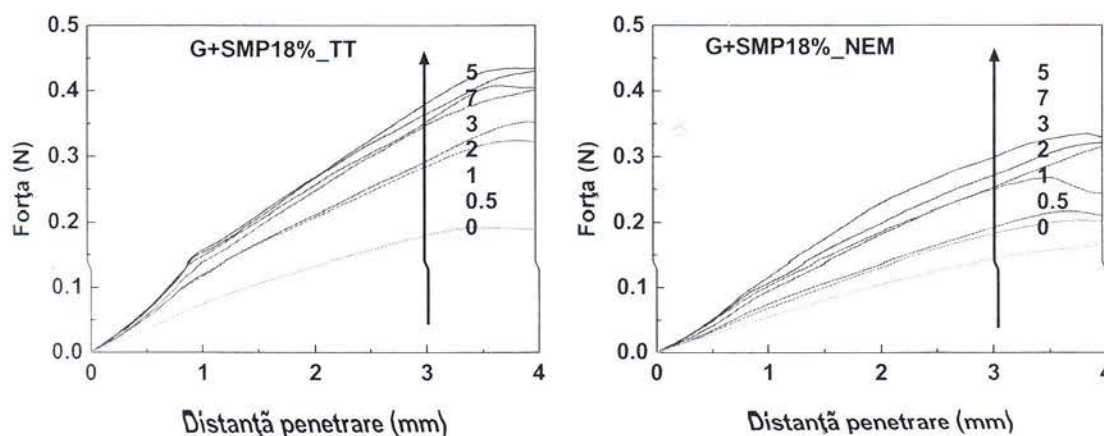


Figura 4-4. Curbele medii ($n = 3$) ale gelurilor acide obținute în urma măsurătorilor efectuate cu penetrometrul RSA III. Fiecare curbă reprezintă media a 3 curbe.

Panta acestor curbe a fost calculată folosind o ajustare liniară cu ajutorul software-ului RSI Orchestrator (versiunea 6.5.6) și a fost utilizată ca fiind un indicator al fermității gelurilor (Figura 4-5).

Așa cum este ilustrat în figura 4-5, fermitatea gelurilor acide a crescut în cazul probelor tratate enzimatic concomitent cu creșterea timpului de incubare a MTGazei până la atingerea unui maxim la 5 h, după care a început să scadă. Acest comportament a fost evident atât în probele tratate termic, cât și a celor tratate cu

După cum se poate observa în figura 4-6, sinereza a scăzut cu creșterea timpului de incubare, valori mai scăzute obținându-se pentru probele tratate termic. Gelurile obținute din laptele tratat enzimatic au avut valori scăzute ale sinerezei și valori mari ale tăriei și fermității în comparație cu gelurile de control (netratate enzimatic).

4.1.3.4 Evaluarea gradului de reticulare prin SDS Poliacril gel electroforeză

Analiza densității pixelilor corespunzătoare electroforezogramelor (Figura 4-7) a evidențiat, în intervalul de timp urmărit (timp de incubare cuprins între 0-7 h), că fracțiunea proteică κ -cazeina a fost cea mai susceptibilă la reticularea cu MTGază, fiind urmată de β - și α _S-cazeină, rezultând cu formarea de compuși cu masă moleculară mare (oligomeri și dimeri), evidenți în partea superioară a electroforezogramelor (Figura 4-7). În laptele netratat termic (G+SMP18%_NEM), proteinele laptelui de capră au fost mai puțin susceptibile la reacția de reticulare indusă de MTGază.

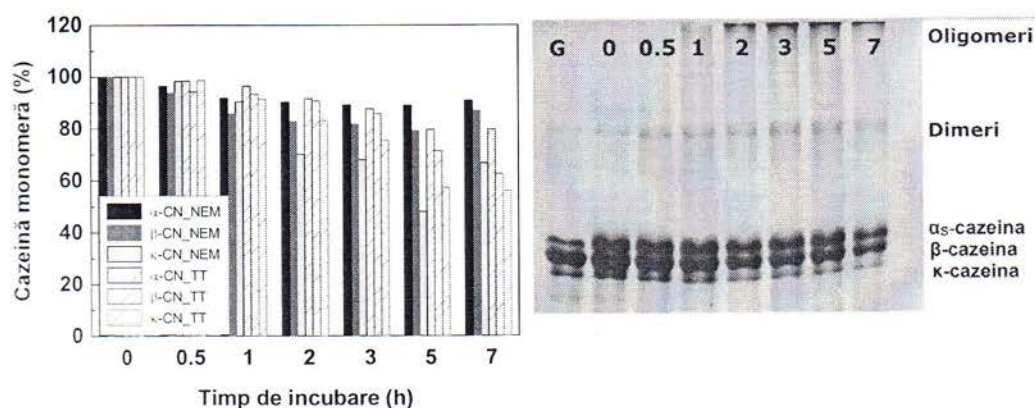


Figura 4-7. Efectul timpului de incubare asupra scăderii conținutului în cazeină monomeră și o electroforezogramă corespunzătoare, în care numerele se referă la timpul de incubare cu MTGază.

4.2 Concluzii

În prezentul studiu, a fost investigată influența transglutaminazei microbiene (MTGaza) asupra proprietăților reologice și texturale ale gelurilor acide obținute din lapte de capră îmbogățit la 18% substanță uscată cu lapte praf degresat de origine

bovină.

Gelurile acide tratate enzimatic timp de aproximativ 5 h cu transglutaminază microbiană au obținut valorile cele mai mici ale sinerezei și mai mari ale fermității gelului. Când inactivarea MTGazei s-a realizat cu ajutorul unui reactivului NEM, au fost obținute valori ușor mai mici în comparație cu gelurile acide pentru care s-a aplicat tratamentul termic în vederea stopării activității enzimatice, evidențiind contribuția legăturilor de interschimb de tipul SH/SS dintre proteinele denaturate la formarea rețelei proteice.

Rezultatele noastre indică posibilitatea obținerii de geluri acide din lapte de capră cu caracteristici texturale îmbunătățite. De asemenea, s-a observat că atât cantitatea de substanță uscată, cât și intensitatea tratamentului termic împreună cu gradul de reticulare pot fi folosite pentru adaptarea proprietăților fizice ale gelurilor.

Pe baza rezultatelor obținute, se poate concluziona că adaosul MTGazei în laptele de capră îmbogățit la 18% cu lapte praf degresat bovin a rezultat în obținerea cu succes de geluri acide având caracteristici funcționale îmbunătățite (sinereză redusă, fermitate crescută a gelului). Aplicarea unui astfel de tratament enzimatic în laptele de capră folosit drept materie primă la obținerea de băuturi lactate acide ar putea constitui o nouă direcție în procesul de fabricație.

5. EFECTUL TRANSGLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA GELURILOR ACIDE OBȚINUTE DIN LAPTE DE CAPRĂ ÎMBOGĂȚIT CU ZER PRAF

5.1 Rezultate și discuții

5.1.1 Abordarea experimentală

Este greu de obținut geluri acide obținute din lapte de capră având consistența comparabilă cu cea a gelurilor acide din lapte de vacă. Figura 5-1 arată curbele de penetrare a gelurilor acide obținute din lapte de capră (G) și de vacă (C), precum și din lapte de capră îmbogățit la 18% s.u. cu lapte praf (G+SMP18%), cu zer praf (G+WPP18%) sau lapte de capră care a fost tratat cu MTGază (G+MTG).

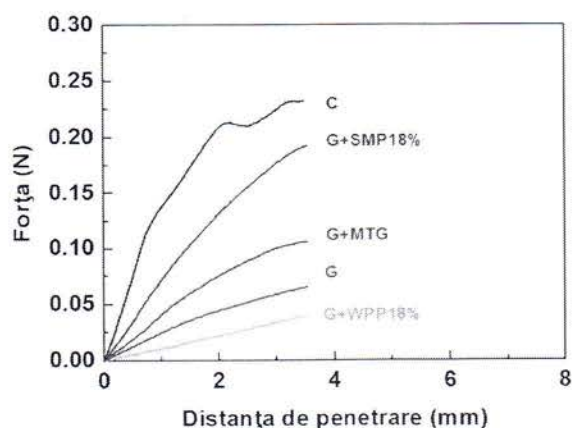


Figura 5-1. Curbele de penetrare obținute cu penetrometrul RSA III.

Este evident că gelurile din lapte de capră pure (fără nici un adaos/tratament) au o fermitate a coagulului mult mai mică în comparație cu fermitatea gelurilor obținute din laptele de vacă. Efectul tratamentului enzimatic cu MTGază, a adaosului de lapte praf (SMP), cât și aplicarea combinată a acestor două metode (adaos de MTGază și SMP) au fost investigate în studiile precedente (capitolele 3 și 4).

În studiul de față s-a investigat efectul adaosului de zer praf (WPP) în laptele de capră. Din figura 5-1 se poate observa că îmbogățirea laptelui de capră cu WPP nu a avut un efect pozitiv asupra îmbunătățirii consistenței gelului, aceasta fiind scăzută, în pofida creșterii conținutului de s.u. la 18% cum a fost recomandat de Tamime și colaboratorii (2011), Lucey & Singh (1998) sau Tamime & Robinson (1999). Pe de altă parte, adăția de MTGază în laptele de capră a determinat o creștere semnificativă asupra fermității gelului, însă nu suficient de mare cât să se poată obține o consistență comparabilă cu consistența coagulului obținut din lapte de vacă; de aceea, următoarea etapă a constat în tratarea laptelui de capră îmbogățit până la 18% s.u. cu zer praf cu transglutaminază microbiană. Pentru a putea identifica modificările induse de enzimă, s-a proiectat o schemă în două etape, una în care MTGaza este inactivată printr-un tratament termic (85°C/10 min), alta în care tratamentul termic a fost omis, stoparea activității enzimatice făcându-se prin adăția unei substanțe inhibitoare numite NEM.

268691



5.1.2 Efectul MTGazei asupra cineticii de gelifiere

Figura 5-2 arată cinetica de gelifiere pentru gelurile acide obținute din lapte de capră îmbogățit la 18% s.u. cu zer praf (G+WPP18%), cât și pentru gelurile obținute în urma incubării la 40°C cu MTGază pentru intervale diferite de timp.

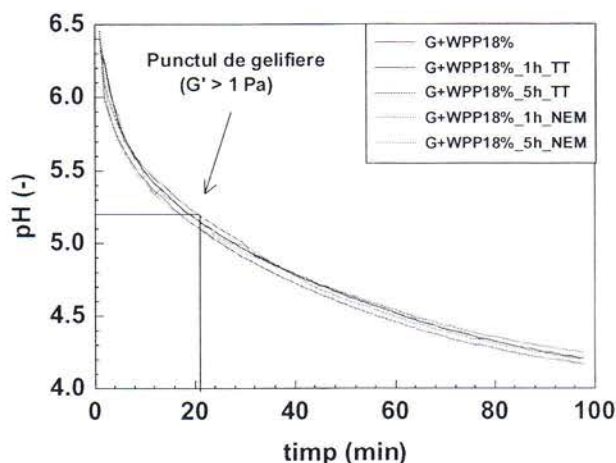


Figura 5-2. Modificările de pH ale laptelui de capră fortificat la 18% cu zer praf și tratat sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min), fie prin adaos de 0.1% NEM. Gelifierea a fost realizată cu 4% GDL la 30°C.

Procesul de gelifiere a fost considerat definitiv la atingerea pH-ului de 4.2, care corespunde punctului izoelectric al cazeinelor de origine caprină (Morgan și al., 2003; Ould-Eleya și al., 1998). Această valoare a fost atinsă după aproximativ 97 min. Este evident că adaosul a 1.8 U MTGază/g proteină nu a influențat gelifierea, indiferent de timpul de incubare sau modul de inactivare enzimatică (tratament termic sau NEM).

5.1.3 Efectul MTGzei asupra proprietăților reologice și fizice ale gelurilor acide

5.1.3.1 Determinarea tăriei gelurilor acide folosind reologia oscilatorie de mică amplitudine

În figura 5-3 (stânga) sunt prezentate valorile medii ale modulului de elasticitate extrase din curbele de evoluție ale parametrului G' la pH 4.6 (timp de acidifiere 53

min) pentru probele de lapte de capră îmbogățit la 18% cu zer praf, care au fost tratate sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină la intervale diferite de timp (0 ÷ 7 h). Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min), fie prin adaos de 0.1% NEM.

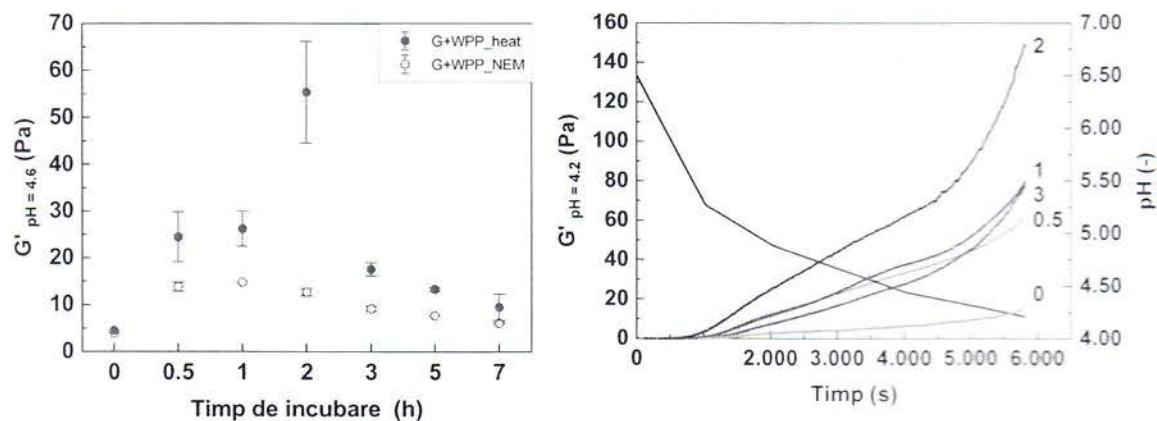


Figura 5-3. Valorile medii ($n = 3$) ale modulului de elasticitate, G' (Pa) la pH 4.6 vs. timpul de incubare (stânga); curbele medii ($n = 3$) ale evoluției G' până la atingerea pH-ului 4.2 (dreapta).

După cum se poate observa, în setul de experimente în care inactivarea MTGazei s-a realizat cu ajutorul căldurii, adaosul enzimei a determinat creșterea vâscozității gelurilor cu creșterea timpului de incubare, înregistrându-se un maxim după 2 h de tratament enzimatic. Prolungirea timpului de incubare enzimatică mai mult de 2 h a afectat negativ vâscozitatea gelurilor. Conform acestor date, gradul de reticulare joacă un rol esențial asupra consistenței gelurilor acide.

În studiul prezent, pentru a diferenția între efectele produse de căldură (precum formarea de legături -S-S-) și efectele produse de MTGază (precum formarea de legături $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$), s-a efectuat un al doilea set de experimente în care inactivarea MTGazei s-a realizat prin adaosul reactivului NEM. Valorile modulului de elasticitate au crescut modest în urma adaosului enzimei, obținând valori cuprinse între 6.1 Pa (după 7 h de incubare) și 14.8 Pa (după 1 h de incubare). Metoda Anova bifactorială a confirmat influența ($P < 0.05$) căldurii asupra tăriei gelurilor. Inactivarea enzimei cu ajutorul căldurii (85°C/10 min) a contribuit la deplierea

proteinelor din zer care, la rândul lor, au participat la formarea rețelei proteice prin schimburi SH/SS.

Adiacent, evoluția modulului de elasticitate (Figura 5-3, dreapta) pentru probele în care activitatea enzimatică a fost stopată prin aplicarea tratamentului termic a evidențiat o creștere a tăriei gelurilor acide cu scăderea pH-ului la valoarea 4.2, care reprezintă pI al cazeinelor din laptele de capră. În continuare, tăria gelurilor acide obținute la pH 4.2 este investigată aplicând reologia de mare amplitudine.

5.1.3.2 Determinarea fermității gelurilor acide folosind reologia de mare amplitudine

În figura 5-4 sunt reprezentate curbele medii ($n = 3$) ale gelurilor acide obținute prin acidifierea cu 4% GDL la 30°C, tratate sau nu enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină obținute în măsurătorile reologice de largă amplitudine cu ajutorul penetrometrului RSA III Rheometric Scientific Inc. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min), fie prin adaos de 0.1% NEM.

După cum se poate observa, adaosul enzimei a condus la o creștere a fermității gelurilor cu creșterea timpului de incubare, înregistrându-se un maxim după 2 h de incubare, indiferent de modul de inactivare enzimatică. O activitate prelungită a MTGazei (timp de incubare 3 – 7 h) a determinat o reducere în fermitatea gelurilor.

Conform rezultatelor analizei fermității gelurilor, este evident că introducerea legăturilor $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$ de către MTGază, care sunt legături covalente puternice, au contribuit la îmbunătățirea proprietăților texturale ale gelurilor tratate enzimatic în comparație cu gelurile fără adaos de enzimă, în care interacțiunile dominante sunt de natură fizică (Walstra și al., 1999). Adiacent, tratamentul termic inițial aplicat pentru inactivarea MTGazei a determinat o creștere semnificativă ($P < 0.05$) asupra fermității gelurilor acide, ca urmare a denaturării proteinelor din zer cu formarea de legături disulfurice, care sunt, de asemenea, legături covalente puternice (200-400 kJ/mol).

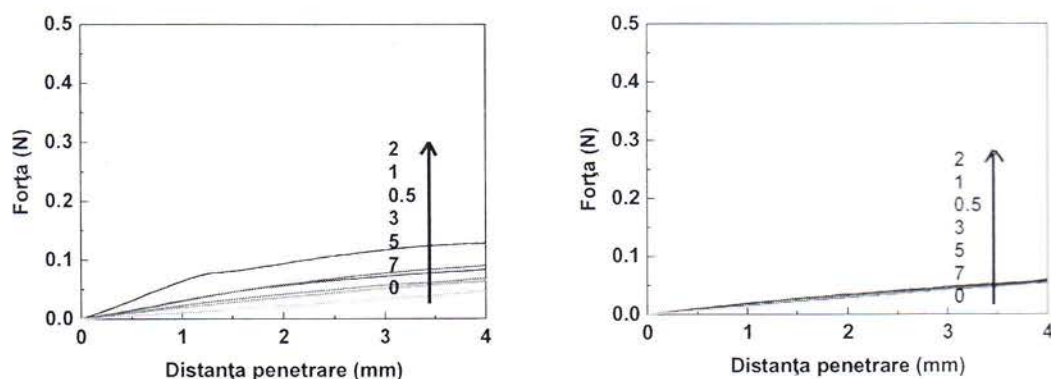


Figura 5-4. Curbele medii ($n = 3$) ale gelurilor acide obținute în urma măsurătorilor efectuate cu penetrometrul RSA III. Fiecare curbă reprezintă media a 3 curbe.

Când NEM a fost utilizat pentru inhibarea activității enzimice, gelurile rezultate au fost caracterizate de valori reduse ale fermității, întrucât interacțiunile dominante în aceste sisteme care nu au fost supuse unui tratament termic sunt de natură fizică (electrostatice, hidrofobe, legături de hidrogen) fiind legături slabe (5-80 kJ/mol) (Eissa & Khan, 2006).

5.1.3.3 Determinarea sinerezei gelurilor acide

Gelurile acide obținute din lapte de capră îmbogățit cu zer praf au înregistrat o scădere maximă a sinerezei (43%) după 1 h incubare cu MTGază, atunci când inactivarea enzimei a fost obținută prin tratament termic (Figura 5-5).

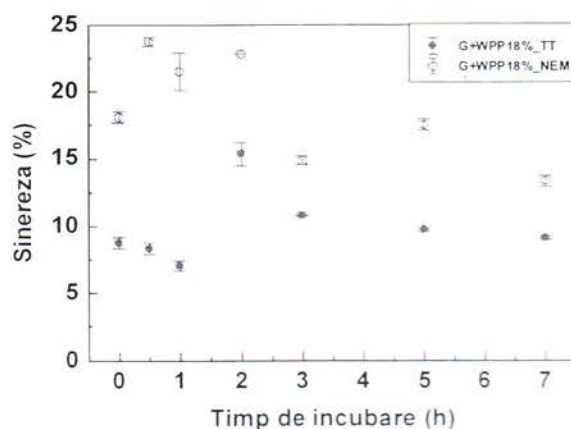


Figura 5-5. Valorile sinerezei obținute prin metoda centrifugării.

Când tratamentul termic a fost omis și activitatea MTGazei a fost stopată prin adăugarea reactivului NEM, gelurile obținute au fost aproape lichide, zerul praf acționând mai mult ca o substanță de umplere inertă (Lucey și al., 1999).

5.1.3.4 Evaluarea gradului de reticulare prin SDS Poliacril gel electroforeză

SDS PAGE este folosită cu succes în evidențierea formării legăturilor de tip $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$.

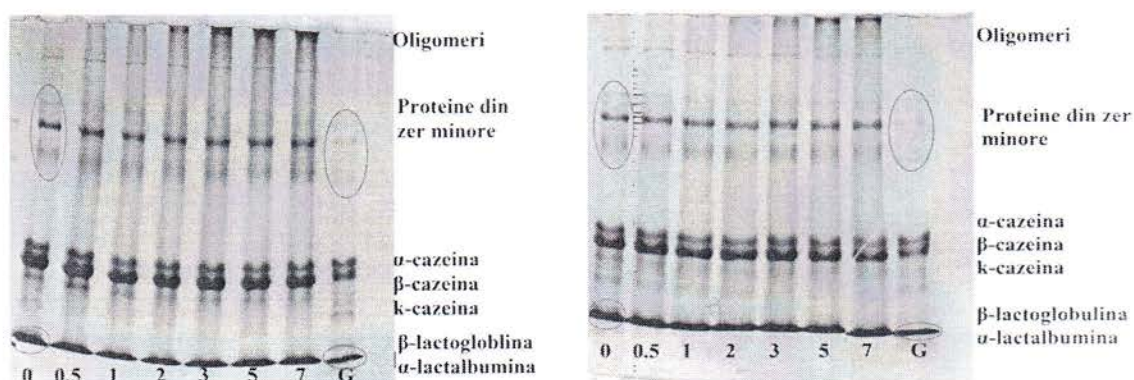


Figura 5-6. Electroforezogrammele substraturilor obținute din lapte de capră îmbogățit la 18% cu zer praf, (ne)tratat enzimatic cu 1.8 U MTGază/g proteină, incubat pentru 0-7 h. Inactivarea enzimatică s-a realizat fie prin tratament termic (85°C/10 min) (G+WPP18%_TT, stânga), fie prin adaos de 0.1% NEM (G+WPP18%_NEM; dreapta). Laptele de capră (G) a fost folosit drept martor.

Întrucât inactivarea enzimatică s-a realizat prin căldură, un factor răspunzător de denaturarea proteinelor din zer, în alt set de experimente s-a omis căldura, iar stoparea activității MTGazei s-a realizat prin adaosul agentului de blocare a grupării sulfhidril din centrul activ al enzimei, respectiv NEM. Acest lucru permite investigarea efectelor induse de MTGază la nivel molecular, respectiv a legăturilor $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$ formate, fără implicarea altor tipuri de legături. Din figura 5-6, în intervalul de timp urmărit (timp de incubare cuprins între 0 - 7 h), se observă că, dintre cazeinele laptelui, κ -cazeina a fost cea mai susceptibilă fracțiune proteică la reticularea MTGazei, fiind urmată de β -cazeină și α -cazeină, rezultând în scăderea în intensitate a benzilor respective și apariția de noi benzi în partea superioară a electroforezogramelor. Benzile astfel formate reprezintă oligomerii care nu au putut

migra prin gel, având masă moleculară mare, de ~ 200 kDa (De Jong & Koppelman, 2002). Conform analizei macroscopice (vizuale), aceste benzi sunt mai intense în cazul substraturilor în care s-a aplicat tratamentul termic pentru inactivarea enzimei (G+WPP18%_TT), subliniind importanța denaturării proteinelor din zer.

5.2 Concluzii

În studiul de față s-a investigat influența transglutaminazei microbiene (MTGaza) asupra proprietăților reologice și texturale ale gelurilor acide obținute din lapte de capră îmbogățit la 18% substanță uscată cu zer praf. Zerul praf a fost ales drept substanță de îmbogățire datorită caracteristicilor sale de a constitui un aditiv ieftin și ușor accesibil, cu importante efecte benefice asupra sănătății individului.

Gelurile au fost obținute prin acidifiere cu 4% glucono- δ -lactonă la 30°C. Timpul de incubare cu MTGaza a fost variat de la 0.5 h la 7 h, iar inactivarea enzimatică a fost realizată fie prin aplicarea unui tratament termic la 85°C timp de 10 minute, fie prin adăugarea N-Etilmaleimidei (NEM), permițând omiterea reacțiilor cauzate de căldură, precum denaturarea proteinelor. Proprietățile reologice ale gelurilor acide au fost investigate folosind reologia oscilatorie de mică amplitudine și reologia de mare amplitudine (prin teste de penetrare). În plus, au fost efectuate măsurători ale sinerezei pentru a investiga capacitatea de reținere a apei de către structurile proteice formate în urma tratamentului enzimatic cu 1.8 U MTGaza/g proteină în comparație cu proba de referință netratată enzimatic. SDS Poliacril gel electroforeza a fost aplicată pentru a explica rezultatele obținute de-a lungul măsurătorilor și a explica efectul MTGazei în sistemele analizate.

În cazul gelurilor acide obținute din laptele de capră îmbogățit la 18% cu lapte zer praf și tratat enzimatic timp de aproximativ 2 h s-au obținut valori mici ale sinerezei și mari ale fermității gelului. Prelungirea timpului de incubare cu MTGaza a afectat negativ proprietățile reologice și texturale ale gelurilor. SDS PAGE a evidențiat prezența unor compuși cu masă moleculară mare rezultați ca produși ai reacției enzimatică în special cu creșterea timpului de acțiune al MTGazei. Acești compuși macromoleculari au apărut ca fiind reponsabili de alterarea proprietăților gelurilor

reticulate timp prelungit, când au inhibat dezvoltarea unei rețele proteice corespunzătoare pe parcursul gelifierii.

În cazul sistemelor bazate pe proteine globulare cum sunt proteinele din zer, aplicarea unui tratament termic este determinant pentru caracteristicile gelurilor (mărirea consistenței coagulului, reducerea sinerezei), întrucât analizele efectuate pe sistemele netratate termic au evidențiat o fermitate de 3 ori mai mică și sinereză crescută a gelurilor acide incubate 2 h cu MTGază. Conform rezultatelor obținute în studiul de față efectuat, denaturarea termică a proteinelor din zer, cu inducerea reacțiilor de interschimb SH/SS, este necesară obținerii unei rețele proteice cu structură îmbunătățită cu ajutorul MTGazei.

Pe baza rezultatelor obținute, se poate concluziona că adaosul MTGazei în laptele de capră îmbogățit la 18% cu zer praf a rezultat în obținerea cu succes de geluri acide având caracteristici funcționale îmbunătățite (sinereză redusă, fermitate crescută a gelului) pentru un timp de incubare de aproximativ 2 h.

Aplicarea unui astfel de tratament mixt (adaos de proteine din zer și de MTGază) în laptele de capră folosit drept materie primă la obținerea de iaurturi este raportat pentru prima oară în literatura de specialitate și ar putea constitui o nouă direcție în procesul de fabricație.

6. INFLUENȚA TRANSGLUTAMINAZEI MICROBIENE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICE ALE IAURTULUI DE CAPRĂ OBȚINUT CU CULTURĂ PRODUCĂTOARE DE EXOPOLIZAHARIDE

6.1 Rezultate și discuții

6.1.1 Abordarea experimentală

Întrucât adaosul de MTGază în sistemele proteice, precum este laptele, a fost raportat de mulți cercetători (Jaros și al., 2006) ca fiind o metodă eficientă în creșterea fermității iaurturilor și deoarece studiile efectuate pe sisteme model (acidifiere cu GDL; capitolele 3 și 4) au arătat o îmbunătățire considerabilă a

gelurilor astfel tratate, în studiul de față s-a investigat efectul tratamentului enzimatic (incubare pentru 2 h la 40°C cu 1.8 U MTGază/g proteină, urmată de stoparea activității enzimatice prin tratament termic) asupra fermității iaurturilor obținute din lapte de capră, lapte de capră îmbogățit la 14 și 18% s.u. cu lapte praf degresat. Studiul de față investighează efectul adaosului de MTGază, dar și a conținutului diferit de s.u. asupra proprietăților reologice și fizice ale iaurturilor obținute cu o cultură lactică producătoare de exopolizaharide (EPZ).

6.1.2 Fermitatea iaurturilor

6.1.2.1 Efectul adaosului de substanță uscată

S-a investigat, după 2 și 9 zile de depozitare a probelor la rece, efectul îmbogățirii laptelui de capră cu lapte praf de origine bovină, la diferite concentrații, asupra fermității iaurturilor.

În figura 6-1 se observă o creștere a fermității cu creșterea conținutului de s.u. Astfel, iaurturile cu 14% și 18% s.u. au înregistrat o fermitate de 12, respectiv 31 ori mai mare comparativ cu iaurturile care au fost produse din laptele de capră pur (neîmbogățit cu s.u., având 10% s.u.), evidențiind importanța conținutului total de s.u. și, în particular a conținutului în proteină.

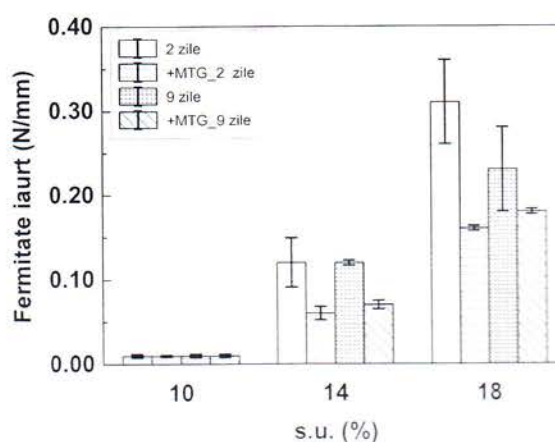


Figura 6-1. Influența creșterii conținutului de substanță uscată (%) a laptelui de capră și a tratamentului enzimatic (1.8 U MTG/g proteină; 2 h: 40°C) asupra fermității iaurturilor (N/mm) produse cu YO-MIX 410. Măsurătorile au fost efectuate după 2 și 9 zile de depozitare la rece.

Metoda Anova a confirmat un impact semnificativ al conținutului de s.u. asupra fermității iaurturilor ($\alpha < 0.05$). În plus, depozitarea la rece nu a afectat consistența iaurturilor ($\alpha > 0.05$).

6.1.2.2 Efectul adaosului de MTGază

După cum se observă în figura 6-1, adaosul de MTGază nu a avut nici un efect asupra fermității iaurturilor obținute din lapte de capră pur, acestea fiind caracterizate de o fermitate de 0.01 N/mm. Poate fi speculat că laptele de capră cu conținut redus în s.u. (de exemplu, 10%), cum este cel analizat în studiul de față, manifestă o tendință scăzută în formarea unei rețele proteice, întrucât conținutul de cazeină nu este suficient pentru formarea unui gel. Această speculație este confirmată de analiza Anova, conform căreia conținutul de s.u. are un efect semnificativ ($\alpha < 0.05$) asupra consistenței gelurilor acide.

În cazul iaurturilor obținute din lapte de capră căruia i s-a adăugat lapte praf pentru mărirea conținutului în s.u., adaosul MTGazei le-a modificat comportamentul reologic; astfel, iaurturile conținând 14% s.u. (3.3% proteină), caracterizate printr-o valoare a fermității de 0.12 ± 0.029 N/mm conform analizei reologice de largă amplitudine, au obținut în urma tratamentului enzimatic o valoare scăzută a fermității, de numai 0.06 ± 0.008 N/mm. Același factor de reducere a fermității iaurturilor a fost observat, de asemenea, pentru iaurturile cu un conținut de s.u. de 18%, când introducerea de noi legături de către MTGază în rețeaua proteică a redus de două ori fermitatea inițială a iaurturilor (Figura 6-3; 0.31 ± 0.05 N/mm - iaurturi fără MTGază vs. 0.16 ± 0.03 N/mm - iaurturi cu MTGază). Adiacent, nu trebuie uitat faptul că la formarea iaurturilor a fost utilizată o cultură producătoare de EPZ. Este bine știut, din literatură, că EPZ interacționează cu proteinele din lapte (Duboc & Mollet, 2001), iar prezența unor legături noi de tipul $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$ între diferitele fracțiuni proteice, în special cazeine, poate rezulta în formarea de iaurturi cu proprietăți reologice diferite.

Metoda Anova a arătat și aici că fermitatea iaurturilor nu este semnificativ influențată ($\alpha > 0.05$) de timpul de depozitare (2 și 9 zile), rămânând aproximativ constantă pe durata depozitării (Yüksel & Erdem, 2010) și nici de tratamentul enzimatic.

6.1.3 Susceptibilitatea iaurturilor la sinereză

În figura 6-2 sunt redate valorile medii ($n = 3$) și deviația standard ale sinerezei pentru iaurturile obținute din diferitele substraturi (s.u., MTGază) pe parcursul perioadei de depozitare la rece. Este evident că îmbogățirea laptelui de capră cu lapte praf degresat a redus semnificativ sinereza iaurturilor. De asemenea, iaurturile obținute din substraturile tratate enzimatic au înregistrat valori ale sinerezei mai mici, de aproximativ două ori, în comparație cu iaurturile luate drept martor (fără adaos de MTGază). Metoda Anova a evidențiat o influențată semnificativă ($\alpha > 0.05$) a depozitării probelor la rece timp de 1 săptămână asupra valorilor sinerezei, acestea fiind independente de tratamentul enzimatic. În ceea ce privește iaurturile obținute cu 18% s.u., adaosul MTGazei a determinat o creștere a sinerezei, deși ne semnificativă din punct de vedere statistic ($\alpha > 0.05$), ce a putut fi vizualizată macroscopic (Figura 6-3). O creștere semnificativă ($\alpha < 0.05$) a fost înregistrată și în cazul iaurturilor fără adaos de MTGază după o depozitare la rece timp de o săptămână, când rearanjamente suplimentare au avut loc în interiorul rețelei proteice, ca urmare a post-acidifierii.

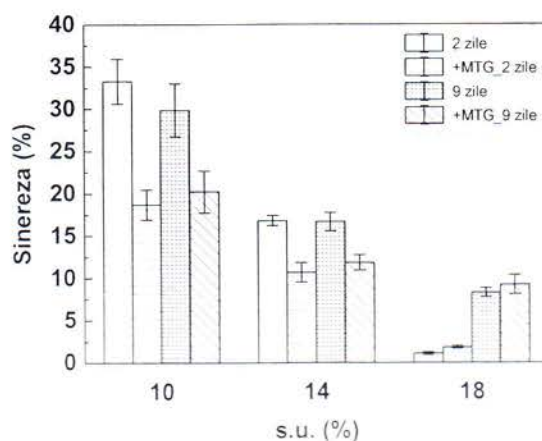


Figura 6-2. Sinereza iaurturilor cu conținut diferit de s.u., obținute cu sau fără transglutaminază microbială (MTG), după 2 și 9 zile de depozitare la rece.

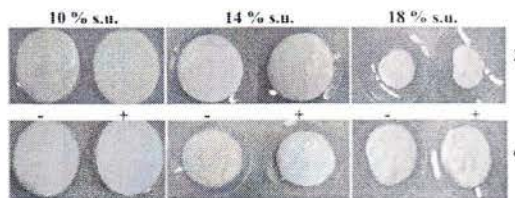


Figura 6-3. Imagini după 2 și 9 zile de depozitare la rece ale iaurturilor cu coagul ferm obținute din lapte de capră (10% s.u.) îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de s.u. de 14% și 18%, care a fost tratat enzimatic (+) sau nu (-) cu MTGază.

6.1.4 Cinetica procesului de fermentare și post-acidifierea

6.1.4.1 Cinetica procesului de fermentare

Efectul adaosului MTGazei (1.8 U/g proteină, 2h/40°C) asupra cineticii de fermentare a laptelui de capră și a laptelui de capră îmbogățit cu lapte praf degresat de origine bovină pentru obținerea unui conținut final de s.u. de 14% și 18% a fost urmărit cu ajutorul unui pH-metru automat pe parcursul acidifierii microbine cu 0.1% cultură starter producătoare de EPZ (YO-MIX 410) la 43°C, până la atingerea valorii pH-ului de 4.56 ± 0.02 (Figura 6-4).

După cum se observă, tratamentul laptelui cu enzimă nu a afectat viteza de fermentare a laptelui (Wroblewska și al., 2011). În schimb, aceasta a fost influențată de creșterea conținutului în s.u. a laptelui de capră.

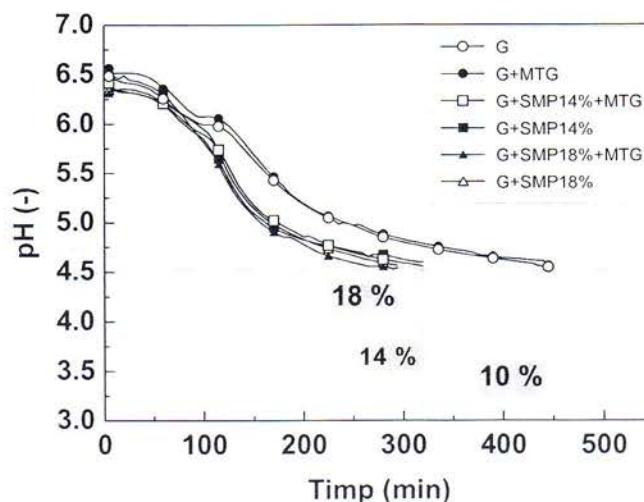


Figura 6-4. Curbele de fermentare ale laptelui de capră îmbogățit sau nu cu s.u. la 14% și 18%, tratat sau nu enzimatic cu MTGază (1.8 U/g proteină, 2 h, 40°C).

6.1.4.2 Aciditatea titrabilă și post-acidifierea

Stabilitatea iaurturilor la depozitare, în termeni de aciditate titrabilă și post-acidifiere, a fost determinată după 2 și 9 zile de repaus la rece. Aciditatea a fost evaluată în funcție de concentrația de acid lactic produs; în plus, probele depozitate au fost analizate în ceea ce privește valoarea pH-ului (post-acidifierea).

După cum se poate observa în figura 6-5, iaurturile netratate enzimatic au avut valori general mai mari ale acidității titrabile în comparație cu iaurturile obținute din probele de lapte care a fost supuse reticulării proteinelor prin adaosul de enzimă, sugerând faptul că legăturile introduse de MTGază au avut un rol stabilizator. De asemenea, este evidentă o creștere a acidității probelor cu creșterea conținutului de s.u.

O scădere a valorii pH-ului cu timpul de depozitare a fost evidentă pentru setul de iaurturi cu 10% și 18% s.u., exceptând iaurturile cu 14% s.u. Acestea din urmă au fost caracterizate de valori constante ale acidității și pH-ului pe durata depozitării. Metoda Anova nu a evidențiat nici un impact semnificativ ($\alpha > 0.05$) al tratamentului enzimatic asupra acestor parametri.

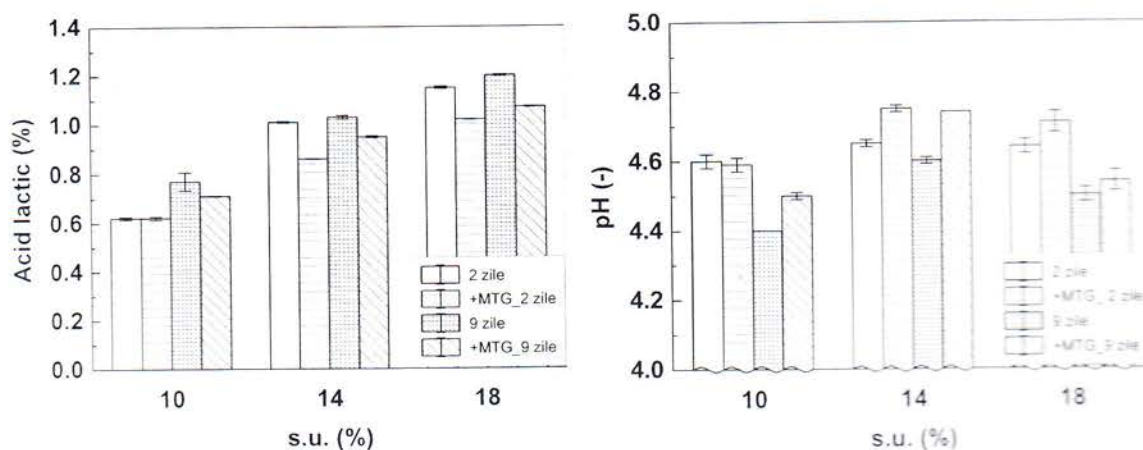


Figura 6-5. Aciditatea titrabilă (stânga) și post-acidifierea (dreapta) după 2 și 9 zile de depozitare la rece a iaurturilor cu coagul ferm obținute din lapte de capră îmbogățit sau nu cu lapte praf degresat până la 14% sau 18% s.u., tratat sau nu enzimatic (1.8 U MTGază/g proteină, 2 h, 40°C).

Aceste rezultate sunt în concordanță cu măsurătorile reologice și analiza sinerezei probelor de iaurt, care au evidențiat o structură proteică stabilă a acestui tip de iaurturi. Se știe că proprietățile texturale ale iaurturilor ce conțin EPZ sunt influențate de o serie de factori precum încărcătura electrică a biopolimerului, pH, tărie ionică și raport proteină:polizaharid (Goh și al., 2008). Conform rezultatelor obținute și ținând cont de aceste aspecte, un conținut de 14% s.u. utilizat la producția iaurturilor în condițiile specificate apare ca fiind o direcție fezabilă în procesul de fabricare.

6.2 Concluzii

Contrar așteptărilor, tratamentul enzimatic cu transglutaminază microbiană nu a îmbunătățit fermitatea iaurturilor obținute cu cultură producătoare de exopolizaharide. Astfel, reticularea proteinelor din lapte cu enzimă timp de 2 h a scăzut sinereza și fermitatea gelurilor de aproximativ două ori, comparativ cu gelurile obținute din probele de control (netratate enzimatic). În plus, a fost observată o corelație inversă între sistemele model și probele de iaurt; dacă în primul caz enzima a contribuit la dublarea fermității gelurilor acide, în cel din urmă caz a redus de două ori această caracteristică.

Acest mecanism nu era așteptat întrucât enzima crează legături adiționale, de reticulare, care sunt responsabile de creșterea consistenței gelurilor acide, după cum a fost evidențiat pe sistemele model (e.g. acidifiere cu GDL; capitolul 4). Se pare că efectul reticulării proteinelor cu transglutaminaza microbiană este defavorizat de producerea de exopolizaharide, când formarea polimerilor cu masă moleculară mare poate restricționa construirea unei rețele proteice corespunzătoare. Studii aprofundate sunt necesare în această direcție.

7. PROVOCĂRI TEHNOLOGICE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR

7.1 Importanța practică a studiului de cercetare efectuat

Posibilitatea de a concepe produse lactate noi, cu valoare nutritivă adăugată și proprietăți funcționale îmbunătățite, cu beneficii pentru sănătate, obținute pe cale naturală prin intermediul produșilor naturali, cum sunt MTGaza, proteinele zerului, culturile lactice producătoare de exopolizaharide, constituie o abordare atractivă și oferă o perspectivă atât pentru consumatori, cât și pentru producători, pentru obținerea unor alimente funcționale. În plus, după cum observa Slacanac și colaboratorii (2010), utilizarea laptelui de capră poate reprezenta singura direcție în procesul de fabricație a produselor noi, precum cea a iaurturilor.

Studiul de cercetare prezent a dezbătut efectul pe care îl are transglutaminaza microbiană asupra proprietăților texturale ale gelurilor obținute din lapte de capră și lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat sau zer praf la 14% sau 18% substanță uscată. Acidificarea a fost obținută cu glucono- δ -lactonă sau prin fermentare cu o cultură starter producătoare de exopolizaharide. O comparație cu gelurile obținute din lapte de vacă este prezentată în figura 7-1.

Conform rezultatelor obținute, îmbogățirea laptelui de capră având conținut scăzut de substanță uscată (s.u.), respectiv de proteină (10% s.u., 2.5% proteină), cu lapte praf degresat de origine bovină până la un conținut total de s.u. de 18% (4.7% proteină) conduce la obținerea unor iaurturi cu coagul ferm și consistență îmbunătățită. Analiza reologică (de mare amplitudine) a arătat că aplicarea tratamentului enzimatic (1.8 U MTGază/g proteină, timp de 2 h/40°C) în obținerea de iaurturi cu coagul ferm din lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de 18% s.u., utilizând cultură bacteriană producătoare de exopolizaharide (YO-MIX 410), rezultă în geluri având fermitate similară cu cea a gelurilor acide obținute din lapte de vacă (Figura 7-1, reprezentare cu albastru).

Totodată, o reducere în conținutul de s.u. de la 18% la 14% este, de asemenea, posibilă în producerea de iaurturi din lapte de capră cu consistență îmbunătățită. Astfel, se pot obține iaurturi din lapte de capră care a fost îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de 14% s.u. și ulterior tratat enzimatic având o

consistență asemănătoare cu cea a gelurilor acide obținute din lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de 18% s.u. sau cu cea a gelurilor acide obținute din lapte de capră îmbogățit cu zer praf până la un conținut de 18% s.u. și ulterior tratat enzimatic (Figura 7-1, reprezentare cu roșu). O corelație asemănătoare este obținută în cazul iaurturilor produse din lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de 14% s.u. și a gelurilor acide produse din lapte de capră îmbogățit cu lapte praf degresat până la un conținut de 18% s.u. și ulterior tratat enzimatic (Figura 7-1, reprezentare cu verde).

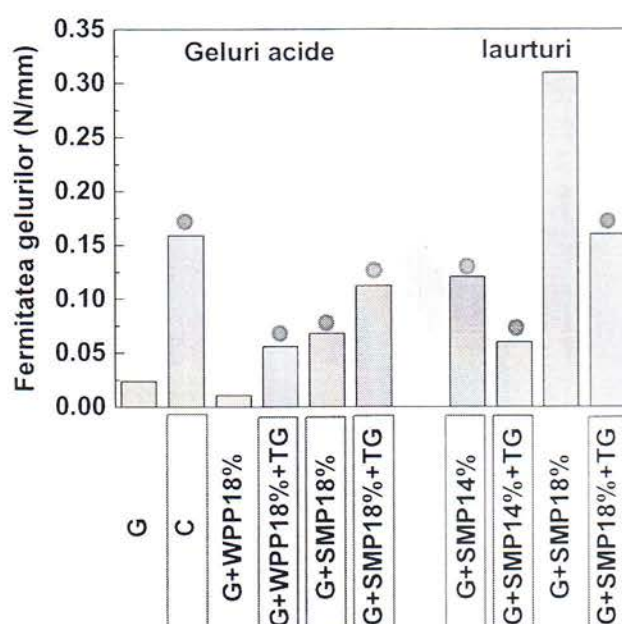


Figura 7-1. Fermitatea gelurilor (N/mm) obținute din lapte de vacă (C) și din lapte de capră (G) îmbogățit cu zer praf (WPP) sau lapte praf degresat de origine bovină (SMP) la 14 și 18% s.u., în prezență sau nu de transglutaminază microbială (TG; incubare 1.8 UTGază/g proteină, 40°C/2 h; inactivare 85°C/10 min). Acidifierea s-a realizat cu 4% (w/v) GDL sau 0.1% (w/v) YO-MIX 410.

Rezultatele cercetării pot fi utilizate de către producătorii de produse lactate atât pentru diversificarea gamei de produse, cât și pentru creșterea competitivității pe piața alimentară.

7.2 Perspective de viitor

În plus, pentru a veni în întâmpinarea cerințelor consumatorilor de alimente cât mai puțin procesate, în figura 7-2 este prezentată o direcție de studiu de cercetare pentru viitor. Incubarea enzimei simultan cu adaosul culturii starter va permite o reducere a costurilor energetice. În această situație, transglutaminaza microbiană va fi inactivată de scăderea treptată a pH-ului mediului de reacție, ca urmare a acțiunii bacteriilor lactice asupra lactozei din lapte.

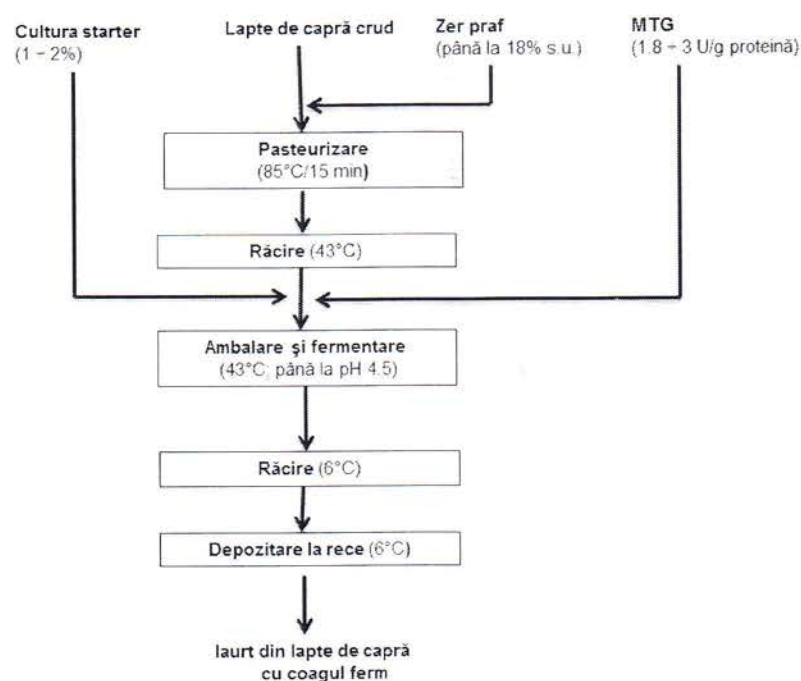


Figura 7-2. Obținerea iaurtului din lapte de capră cu coagul ferm în prezență de transglutaminază microbiană (MTG).

Utilizarea MTGazei în industria alimentară va contribui semnificativ la rezolvarea multor probleme legate de foamete și de deficiențe de proteine în țările în curs de dezvoltare, precum și în rezolvarea problemelor legate de sănătate și de protecția mediului în țările dezvoltate (Zhu și al., 1995).

8. CONCLUZII

Studiul de cercetare a avut la bază încercări de a îmbunătăți proprietățile fizice și reologice ale gelurilor acide de origine caprină. Abordarea experimentală originală a constat în stimularea interacțiunilor dintre proteinele laptelui (de origine caprină și bovină) prin intermediul transglutaminazei microbiene (MTGază) și a fost condusă atât prin acidifiere cu glucono- δ -lactonă, cât și prin acidifiere microbiană. Cercetarea a fost sistematizată în patru capitole.

Studiul a concluzionat că transglutaminaza microbiană acționează precum o unealtă eficientă în îmbunătățirea caracteristicilor texturale ale gelurilor acide de origine caprină și că, dacă se dorește obținerea unui produs lactat acid din lapte de capră cu un gel comparabil cu cel obținut din laptele de vacă, trebuie să se țină cont de conținutul redus în proteine al laptelui de capră.

A fost evidențiată importanța conținutului în substanță uscată (prin adaos de lapte praf degresat sau de zer praf de origine bovină), a intensității tratamentului termic (cu inducerea reacțiilor de interschimb SH/SS, necesare în sistemele pe bază de proteine globulare), precum și a gradului de reticulare pentru îmbunătățirea proprietăților fizice ale gelurilor acide. Conform rezultatelor acestor studii, aplicarea unui astfel de tratament mixt (adaos de lapte praf degresat sau zer praf de origine bovină și de MTGază) în laptele de capră folosit drept materie primă la obținerea de iaurturi este raportat pentru prima oară în literatura de specialitate și ar putea constitui o nouă direcție în procesul de fabricație.

Întrucât efectul MTGazei observat în sisteme model poate fi diferit de cel în iaurturi, studiul de cercetare a fost extins la acidifierea microbiană. Contrar așteptărilor, tratamentul enzimatic cu transglutaminază microbiană nu a îmbunătățit fermitatea iaurturilor obținute cu cultură producătoare de exopolizaharide. Totodată, datele au subliniat importanța îmbogățirii laptelui de capră sărac în proteine și oportunitatea reducerii sau chiar eliminării sinerezei acestor produse aplicând tratamentul enzimatic. Totuși, întrucât analizele au evidențiat o oarecare incompatibilitate enzimă-exopolizaharide, se recomandă efectuarea unor cercetări pe aceleași substraturi, însă cu o cultură bacteriană clasică (care să nu producă

exopolizaharide).

Conform rezultatelor obținute, a fost propusă, drept direcție de cercetare viitoare, obținerea unui iaurt din lapte de capră îmbogățit cu zer praf, cu adaosul simultan a transglutaminazei microbiene și culturii lactice.

În urma studiului de cercetare efectuat, se poate concluziona că reticularea proteinelor din lapte de către transglutaminază microbiană, prin introducerea noilor legături covalente, de tipul $\epsilon(\gamma\text{Gln})\text{Lys}$, modifică la nivel molecular structura proteinelor, implicit a proprietăților lor funcționale (i.e. de gelifiere, de agregare, capacitate de reținere a apei), cu obținerea de geluri ce prezintă structuri proteice noi, diferite de cele obținute în cazul gelurilor tradiționale (netratate enzimatic).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- De Jong, G. A. H. & Koppelman, S. J., 2002. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, Volumul 67, pp. 2798-2806.
- Domagala, J., Sady, M., Grega, T. & Najgebauer-Lejko, D., 2007. Changes in texture of yoghurt from goat's milk modified by transglutaminase depending on pH of the milk. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Volumul 23(5-6), pp. 171-178.
- Dubeuf, J. P., Morand-Fehr, P. & Rubino, R., 2004. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*, Volumul 51(2), pp. 165-173.
- Duboc, P. & Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, Volumul 11, pp. 759-768.
- Eissa, A. S. & Khan, S. A., 2006. Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. *Food Hydrocolloids*, Volumul 20, pp. 543-547.
- 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*, Volumul 65, pp. 113-121.
- Goh, K. T., Sarkar, A. & Singh, H., 2008. Milk protein- polysaccharide interactions. În: A. Thompson, M. Bolan & H. Singh, ed. *Milk proteins: from expression to food*. Burlington: Academic Press, pp. 347-376.
- Haenlein G F W and Abdellatif M A., 2004. Trends in small ruminant husbandry and nutrition and specific reference to Egypt. *Small Ruminant Research*, Volumul 51, pp. 185-200.
- Haenlein G F W., 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, Volumul 51, pp.

155-163.

Horne, D. S., 2003. Casein micelles as hard spheres: limitation of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A*, Volumul 213, pp. 255-263.

Jaros, D., Jacob, M., Otto, C. & Rokm, H., 2010. Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, Volumul 20, pp. 321-327.

Lucey, J. A. & Singh, H., 1998. Formation and physical properties of acid milk gels : a review. *Food Research International*, Volumul 30(7), pp. 529-542.

Lucey, J. A., Munro, P. A. & Singh, H., 1999. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, Volumul 9, pp. 275-279.

Ould-Eleya, M. M., Desobry-Banon, S., Vetier, N. & Hardy, J., 1998. Étude rhéologique des gels acides de laits de vache , de chèvre et de brebis. *Le lait*, Volumul 78, pp. 453-459

Morgan, F. și alții, 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, Volumul 47, pp. 39-49.

Rodriguez-Nogales, J. M., 2006. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins. *Process Biochemistry*, Volumul 31, pp. 430-437.

Schorsch, C., Carrie, H., Clark, H. & Norton, I. T., 2000. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *International Dairy Journal*, Volumul 10, pp. 519-528.

Slačanac, V. și alții, 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, Volumul 63, pp. 171-189.

Tamime, A. Y. & Robinson, R. K., 1999. *Yoghurt science and technology*. 2 ed. s.l.:Woodhead Publishing.

Tamime, A., Wszolek, M., Božanić, R. & Özer, B., 2011. Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research*, Volumul 101, pp. 2-16.

Wróblewska, B. și alții, 2010. Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volumul 27, pp. 215-227.

Yüksel, Z. & Erdem, Y. K., 2010. The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, Volumul 63(1), pp. 86-97.

Zhu, Y și alții, 1995. Microbial transglutaminase- a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, Volumul 44, pp.277-282.

268.691



5,00