

ANNA DUDZIŃSKA, JACEK DOMAGAŁA, MONIKA WSZOŁEK

WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNEGO NA PODSTAWOWE SKŁADNIKI MLEKA

Streszczenie

Degradacja składników żywności podczas obróbki termicznej powoduje, że poszukuje się nowych metod utrwalania produktów spożywczych. Alternatywą obróbki cieplnej może być zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, które pozwala nie tylko na konserwację żywności i niszczenie szkodliwych mikroorganizmów, ale również może mieć istotny wpływ na kształtowanie tekstury, właściwości funkcjonalnych oraz cech sensorycznych produktu bez wywierania negatywnych skutków na jego składniki odżywcze.

Obróbka wysokociśnieniowa powoduje obniżenie temperatury zamarzania wody, będącej głównym komponentem mleka. Micele kazeinowe rozpadają się na mniejsze podjednostki, czemu towarzyszy wzrost liczby cząstek kazeinowych i fosforanu wapnia. Białka serwatkowe ulegają denaturacji, a następnie agregacji i interakcji z kazeiną. Przy umiarkowanie wysokim ciśnieniu (200 ÷ 300 MPa) zachodzi krystalizacja tłuszczu mlekowego. Laktoza nie ulega zmianom pod wpływem presuryzacji. Krystaliczny fosforan wapnia powstały na skutek obróbki termicznej po obróbce wysokociśnieniowej powraca do postaci rozpuszczonej.

Słowa kluczowe: woda, kazeina, białka serwatkowe, enzymy, tłuszcz mlekowy, presuryzacja

Wprowadzenie

Mleko, będące układem wieloskładnikowym i rozproszonym, zawiera tłuszcz w stanie zemulgowanym, koloidalne cząstki białka (micele kazeinowe), niezagregowane białka globularne (białka serwatkowe), koloidalny fosforan wapnia oraz znaczną ilość składników niskocząsteczkowych. Najczęściej stosowaną metodą utrwalania mleka jest jego obróbka termiczna – pasteryzacja lub sterylizacja. Skutecznie obniża ona poziom niepożądaną mikroflory, ale równocześnie powoduje cały szereg niekorzystnych zmian w składnikach i właściwościach mleka, takich jak: denaturacja białek

Mgr inż. A. Dudzińska, prof. dr hab. inż. J. Domagała, dr hab. inż. M. Wszolek, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: rtdomaga@cyf-kr.edu.pl

serwatkowych, degradacja witamin, zubożenie mleka w wapń i fosfor, straty dostępnej lizyny i reakcje Maillarda. W efekcie obserwuje się pogorszenie naturalnego smaku, zapachu i barwy mleka. Następują także zmiany jego właściwości technologicznych, takie jak zmniejszenie zdolności krzepnięcia pod wpływem podpuszczki czy zdolności podstojowej mleka. Dlatego też poszukuje się alternatywnych nietermicznych metod utrwalania żywności, których celem byłoby zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu przy zachowaniu jego cech sensorycznych i wartości odżywczej. Jedną z technik spełniających powyższe założenia może być presuryzacja, czyli zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Technika ta, oprócz utrwalania żywności, umożliwia kształtowania tekstury, smaku oraz właściwości funkcjonalnych produktów. Wiele niekorzystnych przemian, jakie wywołuje w składnikach mleka tradycyjna obróbka termiczna, nie zachodzi podczas obróbki wysokim ciśnieniem [21, 43, 50, 54].

Obróbka wysokociśnieniowa, zwana również ciśnieniowaniem, presuryzacją lub paskalizacją, w literaturze anglojęzycznej znana pod skrótami UHP (ang. *Ultra High Pressure*), HHP (ang. *High Hydrostatic Pressure*) lub HPP (ang. *High Pressure Processing*) jest nowoczesną techniką utrwalania żywności, polegającą na poddaniu produktów spożywczych (płynnych lub stałych) działaniu ciśnienia od 100 do 900 MPa równomiernie w całej ich objętości [18].

Mimo że potencjał tej metody przetwarzania żywności znany był od końca XIX wieku [21], zainteresowanie nią wzrosło dopiero po 1970 r. ze względu na wcześniejszy brak odpowiednich urządzeń [9]. Pierwszy komercyjny produkt żywnościowy przetworzony technologią wysokociśnieniową został wprowadzony na japoński rynek w roku 1990 – był to dżem owocowy [17]. Obecnie produkty utrwalane tą techniką sprzedawane są w Japonii – soki owocowe, dżemy, sosy, ryż, ciasta i desery, w Hiszpanii – gotowana szynka plasterkowana, we Francji i Portugalii – sok jabłkowy i pomarańczowy, w USA – ostrygi, w Meksyku – guacamole. W Australii, Niemczech oraz Włoszech za pomocą wysokich ciśnień utrwalane są przetwory mięsne, m.in. żywność wygodna z mięsa drobiowego. Nie są natomiast dostępne w handlu produkty mleczarskie poddane obróbce wysokociśnieniowej [18, 31, 42, 53].

Wpływ wysokiego ciśnienia na podstawowe składniki mleka

Woda

Mleko zawiera przeciętnie około 87 % wody. Wysokie ciśnienie wywołuje w wodzie istotne zmiany, które mają bezpośredni lub pośredni wpływ na właściwości produktów żywnościowych. Do zmian tych zalicza się obniżenie temperatury zamarzania, zmniejszenie objętości oraz spadek pH.

Temperatura zamrażania wody przy ciśnieniu 1013 hPa wynosi 0 °C. Zastosowanie ciśnienia rzędu 50, 100 oraz 210 MPa powoduje obniżenie temperatury zamrażania odpowiednio do -4, -8 oraz -22 °C. Zjawisko to pozwala na przechowywanie żywności w temp. poniżej 0 °C bez tworzenia się kryształków lodu, szybkiego topnienia konwencjonalnie zamrożonej żywności, a także regulowania temperatury krystalizacji. Ponadto woda, która przy ciśnieniu atmosferycznym jest nieściśliwa, w 100 MPa ulega sprężeniu o około 4 %, a w 600 MPa – o 15 %. Umożliwia to zastosowanie izotermicznego ściskania, które w połączeniu z izobarycznym chłodzeniem, a następnie błyskawiczną dekompresją powoduje natychmiastową krystalizację wody. Utworzone wówczas bardzo małe kryształki lodu powodują jedynie niewielkie zniszczenia w składnikach żywności [20, 50].

Przy zastosowaniu obróbki na poziomie 1000 MPa wartość pH wody zmniejsza się o około jedną jednostkę, co tłumaczy się wzrostem jej dysocjacji. Może to mieć istotny wpływ na stabilność i właściwości produktów spożywczych, a także przeżywalność mikroorganizmów. Podobny spadek pH obserwuje się podczas ogrzewania wody od 25 do 100 °C [36].

Kazeina

Głównym białkiem mleka krowiego jest kazeina, fosfoproteid stanowiący około 2,5 % wszystkich składników mleka. Kazeina występuje w mleku w postaci kulistych, porowatych i silnie uwodnionych cząstek o średnicy od 50 do 250 nm zwanych micelami [22]. W badaniach wpływu wysokiego ciśnienia na mleko [47], przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego, zaobserwowano zmniejszenie rozmiarów miceli kazeinowych. W późniejszych badaniach wykorzystywano wiele różnorodnych metod, takich jak: granulometria laserowa (badanie uziarnienia), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscope* – TEM), spektroskopia korelacji fotonowej (ang. *Photon Correlation Spectroscopy* – PCS), a także turbidymetria. Udowodniono rozpad miceli na mniejsze cząstki przy zastosowaniu odpowiednio wysokiego ciśnienia, czemu towarzyszy wzrost liczby cząstek uwolnionych frakcji kazeinowych i fosforanu wapnia [30]. Po zastosowaniu spektroskopii korelacji fotonowej dowiedziono, że wielkość miceli kazeinowych pozostaje praktycznie niezmienna lub nieznacznie wzrasta (o około 9 %) przy obróbce do 200 MPa prowadzonej przez 15 ÷ 30 min w temp. 20 °C. Ciśnienie 250 MPa powoduje zwiększenie miceli o 25 %, natomiast wyższe ciśnienie, rzędu 300 ÷ 800 MPa, zmniejsza jej rozmiary o 50 % [23, 38]. Powyżej 300 MPa następuje redukcja średnicy miceli z 150 ÷ 200 nm w mleku niepoddanym obróbce do 40 nm w mleku poddanym działaniu wysokiego ciśnienia [15, 38]. Obróbka w 100 ÷ 150 MPa i 20 °C wywołuje wzrost objętości głównej populacji miceli i ogranicza ich dysocjację, która z kolei zachodzi przy 200 MPa. Intensywniejszy wzrost rozmiarów cząstek kazeiny przy 250 MPa związany

jest ze zjawiskiem agregacji uprzednio zdysocjowanych miceli. Przy jeszcze wyższych parametrach obróbki dominują cząstki o najmniejszych rozmiarach [46]. Poddawanie surowego mleka ciśnieniu 400 lub 600 MPa powoduje całkowite rozbitcie wszystkich dużych miceli na mniejsze fragmenty, co wykazano w analizie TEM [38].

Wpływ obróbki wysokociśnieniowej mleka na rozmiar miceli kazeinowych jest zależny od temperatury. Podczas gdy ciśnienie 200 MPa w temp. 20 °C nie ma istotnego wpływu na wielkość miceli, obróbka przy tym samym ciśnieniu, ale w 40 °C powoduje zwiększenie ich rozmiarów, a w 4 °C – zmniejszenie. Poddawanie mleka ciśnieniu 200 MPa w temp. 40 °C powoduje wyodrębnienie dwóch populacji miceli obserwowanych pod mikroskopem: jedne o średniej wielkości podobnej do tych, które uzyskano w próbkach poddanych działaniu ciśnienia w 4 lub 20 °C, drugie zaś znacznie większe, co ostatecznie powoduje wzrost średniej wielkości. Przy obróbce powyżej 450 MPa stwierdza się, niezależnie od temperatury, zmniejszenie rozmiarów miceli [1].

Wpływ obróbki prowadzonej w temp. 4 °C na zmniejszenie rozmiarów miceli związany jest prawdopodobnie z rozpuszczaniem koloidalnego fosforanu wapnia (ang. *colloidal calcium phosphate* – CCP), natomiast ich zwiększenie w 40 °C może być wynikiem interakcji pomiędzy fragmentami cząsteczek kazeiny i zdenaturowanymi na skutek ciśnienia białkami serwatkowymi [1, 6, 48]. Wywołane wysokim ciśnieniem interakcje białka serwatkowe – kazeina, analogiczne do tych spowodowanych przez obróbkę cieplną, mają znaczący wpływ na obserwowane zmiany w micelach kazeinowych mleka. Gdy mieszaniny κ -kazeiny i β -laktoglobuliny (β -lg) poddane są działaniu ciśnienia 400 MPa, obecność β -lg zmniejsza wrażliwość i dostępność κ -kazeiny, która następnie jest hydrolizowana przez chymozynę [41].

Rozpad miceli kazeinowych w mleku poddanym działaniu wysokiego ciśnienia zależy również od pH. Większy przyrost zawartości rozpuszczalnej kazeiny obserwuje się w mleku o pH 5,5 oraz 7,0 niż przy pH 6,7. W zakwaszonym środowisku obróbka wysokociśnieniowa powoduje intensywniejsze niszczenie koloidalnej struktury i w efekcie rozpuszczenie CCP. W przypadku mleka o odczynie bardziej alkalicznym, pomimo stabilizującego wpływu takiego pH na koloidalny fosforan wapnia, następuje zwiększenie odpychania elektrostatycznego [3].

Obróbka termiczna mleka przed presuryzacją wpływa na wywołane wysokim ciśnieniem zmiany w micelach. Działanie na mleko UHT ciśnieniem w zakresie 100 - 500 MPa powoduje zmniejszenie rozmiarów miceli kazeiny, ale w mniejszym stopniu niż ma to miejsce w mleku surowym. Sugeruje to, że micelle kazeinowe w mleku surowym są bardziej wrażliwe na ciśnienie niż wywołane obróbką cieplną kompleksy kazeiny i białek serwatkowych w mleku UHT. Zwiększenie średnicy miceli kazeinowych w mleku surowym poddanym działaniu wysokiego ciśnienia w temp. 40 °C nie jest obserwowane w mleku UHT [6, 48].

W przypadku mleka innych gatunków zwierząt obróbka wysokociśnieniowa również powoduje wzrost liczby cząstek uwolnionych frakcji kazeinowych w podobny sposób, jak ma to miejsce w mleku krowim [10, 32]. Międzygatunkowe różnice obserwuje się w kolejności dysocjacji poszczególnych frakcji białka. W mleku krowim porządek ten jest następujący: $\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$, natomiast w mleku kozim i owczym: $\kappa > \beta > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$. Kolejność dysocjacji zależy w dużej mierze od zawartości fosforanu seryny w kazeinie. Te frakcje, które poprzez dużą zawartość fosforanu seryny ściśle związane są z CCP dysocjują w mniejszym stopniu niż te, w których fosforanu seryny jest mniej. W mleku krowim większa dysocjacja silniej związanej z CCP β -kazeiny, w porównaniu z κ -kazeiną, może być uzależniona od tego, że część β -kazeiny nie jest usieciowana przez koloidalny fosforan wapnia w micelach kazeinowych [2].

Według Schradera i Buchheima [48] zmiany zachodzące w micelach kazeinowych podczas obróbki wysokociśnieniowej mleka wynikają z trzech procesów:

- 1) nieodwracalnego rozpadu CCP, wytrąconego podczas silnej obróbki termicznej mleka (np. sterylizacji UHT),
- 2) częściowego rozpuszczenia CCP, objawiającego się rozpadem miceli kazeinowych oraz agregatów kazeina – białka serwatkowe,
- 3) denaturacji białek serwatkowych, która w pewnym stopniu zależy od ciśnienia, temperatury i początkowej zawartości natywnych białek serwatkowych. Proces ten, przy odpowiednich parametrach, może zwiększać średnią wielkość miceli, ale nie może wystąpić w mleku poddanym silnej obróbce termicznej, w którym białka serwatki są już zdenaturowane.

Za rozpad miceli odpowiedzialne są również zmiany, jakie wysokie ciśnienie wywołuje w oddziaływaniach hydrofobowych, wodorowych oraz jonowych [49].

Białka serwatkowe

Głównymi frakcjami białek serwatkowych mleka krowiego są: β -laktoglobulina (β -lg), α -laktoalbumina (α -la), albumina serum i immunoglobuliny. W badaniach wpływu wysokiego ciśnienia na te frakcje białkowe wykazano, że ilość azotu niekazeinowego w serum uzyskanym po wirowaniu mleka zmniejsza się wraz ze wzrostem ciśnienia. Sugeruje to, że dochodzi tam do denaturacji białek serwatkowych, co oznaczono poprzez pomiar ich poziomu w rozpuszczalnej frakcji mleka o pH 4,6 [28, 33]. Dodatkowe badania wykazały, że α -la i β -lg, obecne w mleku, są bardziej wrażliwe na wywołaną wysokim ciśnieniem denaturację niż ma to miejsce w serwatce. Zdenaturowane białka serwatkowe poddane działaniu wysokiego ciśnienia w serum mleka pozbawionym kazeiny pozostają rozpuszczone, podczas gdy w ciśnieniowanym mleku mogą ulec wytrąceniu. Sugeruje to ich zdolność do wiązania się z micelami kazeinowymi [19, 23]. Stwierdzono, że zdenaturowana na skutek wysokociśnieniowej obróbki β -lg łączy się prawdopodobnie z κ -kazeiną [37, 41]. W rzeczywistości, znakowanie

immunologiczne β -lg wykazało punkty odpowiadające temu białku skupione bardzo blisko fragmentów miceli w mleku ciśnieniowanym [29, 51].

Stopień denaturacji białek serwatkowych zależy od wielu czynników, m.in. od ciśnienia, czasu i temperatury obróbki, a także pH oraz gatunku zwierzęcia, od którego pozyskano mleko. Poddanie surowego mleka działaniu ciśnienia do 100 MPa nie wywołuje denaturacji β -lg, natomiast zastosowanie wyższych ciśnień skutkuje już określonym zakresem denaturacji [31, 33, 51]. Obróbka prowadzona w temperaturze pokojowej przez 15 - 30 min przy 200 i 400 MPa powoduje powstanie odpowiednio: $14 \div 16$ % oraz $82 \div 90$ % zdenaturowanej β -lg [15, 23]. Powyżej 400 MPa zachodzi stosunkowo niewiele dalszych zmian w tej frakcji białka [51]. Synergistyczne działanie temperatury i ciśnienia na stopień denaturacji β -lg odnotowano po obróbce surowego mleka przy ciśnieniu 300 MPa w temp. $50 \div 60$ °C oraz przy ciśnieniu 400 MPa w temp. $40 \div 60$ °C. W obu przypadkach poziom denaturacji był podobny i wyniósł prawie 100 % [25, 31]. Podczas ciśnieniowania mleka w temp. 4 °C uzyskano mniejszy stopień denaturacji β -lg niż w temp. 20 °C [1]. Denaturacja β -lg wywołana obróbką wysokociśnieniową jest mniejsza, gdy mleko zakwaszone jest do pH 5,5 lub 6,0, natomiast wzrasta przy pH 7,0 w stosunku do mleka o pH 6,7. Większa intensywność procesu w środowisku zasadowym jest spowodowana wyższą w takich warunkach reaktywnością wolnych grup tiolowych (-SH) [3]. W mleku różnych gatunków zwierząt β -lg może charakteryzować się różną odpornością na działanie wysokiego ciśnienia. Powyżej 100 MPa zaobserwowano większy zakres denaturacji β -lg w mleku owczym i kozim niż krowim. Szybkość i zakres denaturacji β -lg wzrasta wraz z ciśnieniem w kolejności: mleko owcze > mleko kozie > mleko krowie. Podobną wrażliwość β -lg na denaturację obserwuje się w mleku wymienionych gatunków zwierząt podczas obróbki termicznej w temp. ponad 80 °C [7, 33]. Opiswane różnice mogą być spowodowane różnicami międzygatunkowymi w strukturze β -lg oraz w innych składnikach mleka.

W porównaniu z β -lg, α -la jest znacznie mniej wrażliwa na denaturację pod wpływem wysokiego ciśnienia. Całkowicie zachowuje ona swe właściwości podczas obróbki w temp. 25 °C aż do 400 MPa [33]. Według niektórych autorów α -la, obecna w mleku surowym [25, 31] oraz chudym pasteryzowanym [29], nie ulega denaturacji nawet przy ciśnieniu 500 MPa w temperaturze pokojowej. Zastosowanie ciśnienia 600 MPa przez 15 - 30 min powoduje w tej samej temperaturze już 15- \div 33-procentową denaturację tej frakcji białka [23, 29]. Obróbka prowadzona w temp. $50 \div 60$ °C, podobnie jak w przypadku β -lg, znacznie zwiększa stopień denaturacji α -la. Prawie 60 % tego białka denaturuje przy ciśnieniu 400 MPa w temp. 60 °C [25, 31]. W przypadku mleka owczego i koziego α -la wykazuje podobną odporność na działanie ciśnienia do 500 MPa jak w mleku krowim [7, 33]. Mniejsza wrażliwość α -la na działanie wysokiego ciśnienia w porównaniu z β -lg wynika prawdopodobnie z różnic

w strukturze drugorzędowej, liczbie wiązań disiarczkowych i położeniu jonów Ca^{2+} . W przeciwieństwie do α -la, w β -lg istnieje wolna grupa tiolowa, która odgrywa kluczową rolę w wywołanej obróbką wysokociśnieniową agregacji białek serwatkowych, zachodzącej na skutek reakcji wymiany tiol – disiarczek [13]. Może to prowadzić również do oligomeryzacji α -la [27]. W istocie, dodanie do mleka, przed przystąpieniem do obróbki, środka blokującego grupy tiolowe zapobiega denaturacji zarówno α -la, jak i β -lg. Podobnie, denaturacja β -lg, wywołana wysokociśnieniowym przetwarzaniem mleka, znacznie wzrasta przy zasadowym pH, a zmniejsza się w kwaśnym, ze względu na większą reaktywność grup tiolowych w środowisku alkalicznym [3, 23].

Niewiele jest dostępnych danych na temat wpływu wysokiego ciśnienia na denaturację innych białek serwatkowych. Albumina serum obecna w surowym mleku, podobnie jak α -la, nie ulega zmianom przy ciśnieniu do 400 MPa w temperaturze pokojowej [33], natomiast immunoglobulina mleka koziego jest odporna na ciśnienie do 300 MPa [7].

Enzymy

Inaktywacja rodzimych enzymów mleka na skutek presuryzacji wzbudza zainteresowanie ze względu na możliwość wykorzystania ich jako wskaźników intensywności obróbki wysokociśnieniowej, analogicznie do fosfatazy alkalicznej czy laktoperoksydazy, używanych do oceny skuteczności pasteryzacji mleka.

Fosfataza alkaliczna jest stosunkowo odporna na działanie wysokiego ciśnienia, gdyż nie ulega inaktywacji w surowym mleku po 60 min obróbki w 400 MPa i 20 °C [33]; 50-procentową inaktywację wywołuje 90-minutowa obróbka w 500 MPa lub 10-minutowa w 600 MPa, a 100-procentowa inaktywacja następuje po 8 min w 800 MPa [45]. Wysokociśnieniowe przetwarzanie mleka prowadzone w wyższych temperaturach zwiększa inaktywację fosfatazy alkalicznej [44]. Taki synergistyczny efekt zaobserwowali również Ludikhuyze i wsp. [34] w temp. pomiędzy 25 i 60 °C oraz przy ciśnieniu powyżej 300 MPa. Z kolei bardzo wyraźny efekt antagonistyczny wykazali oni w przypadku niskiego ciśnienia i wysokiej temperatury, podając, że zastosowanie ciśnienia do 200 MPa chroni enzym przed termiczną inaktywacją.

Laktoperoksydaza jest wyjątkowo odporna na działanie wysokiego ciśnienia. Ludikhuyze i wsp. [35] zaobserwowali, że nie ulega ona istotnej inaktywacji po trwającej 140 min obróbce w 700 MPa i temp. 20 ÷ 65 °C. Autorzy ci stwierdzili, że istnieje wyraźny efekt antagonistyczny pomiędzy wysoką temperaturą i ciśnieniem. W temp. 73 °C, w której następuje szybka termiczna inaktywacja laktoperoksydazy w warunkach atmosferycznych, zastosowanie ciśnienia do 700 MPa całkowicie zatrzymuje inaktywację enzymu. Według innych źródeł około 20 % laktoperoksydazy ulega inaktywacji po 30 min w 600 MPa i 25 ÷ 40 °C [44] oraz niecałe 50 % – po 4 h w 800 MPa i 40 ÷ 60 °C [45].

Enzymami bardziej wrażliwymi na obróbkę wysokociśnieniową są γ -glutamylotransferaza i izomeraza fosfoheksozowa. Pierwszy z nich ulega całkowitej inaktywacji po 30 min przetwarzania w 600 MPa i 20 °C, natomiast drugi – po 15 min w 500 MPa i 20 °C [45]. Rademacher i Hinrichs [44] zaobserwowali, że im bardziej dany enzym jest odporny na działanie wysokiej temperatury, tym bardziej jest on wrażliwy na działanie wysokiego ciśnienia. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że ciśnienie i temperatura wywierają przeciwny wpływ na tworzenie się i rozpad międzycząsteczkowych oddziaływań stabilizujących molekuły. Oddziaływania hydrofobowe są wzmacniane przez temperaturę i jednocześnie osłabiane przez ciśnienie, natomiast wiązania wodorowe są destabilizowane jedynie przez wysoką temperaturę [7].

Odporność enzymów mleka na działanie wysokiego ciśnienia w temp. 20 °C jest związana z ich trzecio- i czwartorzędową strukturą i przedstawia się w kolejności: izomeraza fosfoheksozowa < γ -glutamylotransferaza < fosfataza alkaliczna < laktope-
roksydaza [44].

W przypadku lipazy lipoproteinowej [40] oraz oksydazy ksantynowej [39] zastosowanie obróbki do 400 MPa w temp. odpowiednio: 3 i 25 °C nie wywołało zmian w ich aktywności.

Aktywność plazminy mleka, należącej do grupy proteaz, jest uzależniona od skomplikowanego systemu aktywatorów plazminogenu i inhibitorów plazminy o różnej odporności cieplnej, wykazujących również różną odporność na działanie wysokiego ciśnienia [31]. Garcia-Risco i wsp. [14] podają, że aktywność plazminy w mleku pozostaje niezmienną po obróbce w co najmniej 400 MPa i temp. 25 °C przez 30 min. Z kolei Huppertz i wsp. [24] zaobserwowali, że zabiegi prowadzone w 400 i 600 MPa w temp. 20 °C przez 30 min zmniejszają aktywności plazminy o odpowiednio: 30 i 75 %, natomiast podniesienie temp. do 60 °C powoduje po 15 min obróbki w 400 MPa inaktywację enzymu na poziomie 86,5 %. Doświadczenia prowadzone w buforze fosforanowym, w obecności lub przy braku kazeinianu sodu wykazały, że plazmina jest prawie całkowicie odporna na ciśnienie do 600 MPa [51]. W buforze również stwierdzono synergistyczne działanie wysokiej temperatury i ciśnienia na inaktywację enzymu, ale jedynie w zakresie 300 ÷ 600 MPa. Przy ciśnieniach powyżej 600 MPa zaobserwowano działanie antagonistyczne, co zostało przypisane zmianom w strukturach stabilizujących plazminę i plazminogen [4]. Inaktywacja plazminy w buforze przy ciśnieniu powyżej 400 MPa jest znacznie większa w obecności β -lg, co sugeruje, że frakcja białkowa destabilizuje enzym w warunkach wysokiego ciśnienia. W mleku natomiast, pod wpływem wysokiego ciśnienia, następuje agregacja β -lg i/lub interakcja β -lg z uszkodzoną kazeiną, co sprawia, że plazmina jest bardziej odporna na presuryzację niż w buforze zawierającym β -lg [51].

Tłuszcz mlekowy

Traktowanie mleka ciśnieniem od 100 do 500 MPa wywołuje także zmiany w średnicach kuleczek tłuszczowych. Ciśnieniowa obróbka termiczna w temp. 25 i 50 °C prowadzi do wzrostu liczby małych kuleczek o średnicy w zakresie 1 ÷ 2 μm, natomiast w temp. 4 °C tendencja jest odwrotna. Jednocześnie nie następuje uszkodzenie otoczek kuleczek tłuszczowych, dzięki czemu nie obserwuje się procesów lipolitycznych. Zmiany średnicy kuleczek mogą być spowodowane zjawiskiem ich dezintegracji bądź agregacji [16].

Badania nad zawartością wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w mleku poddanym działaniu wysokiego ciśnienia wykazały, że ciśnienie w zakresie 100 ÷ 500 MPa stosowane w temp. 4, 25 i 50 °C nie wywołuje wzrostu ilości WKT. Co więcej, w temp. 50 °C obserwuje się zmniejszenie ich zawartości w stosunku do świeżego, nieogrzanego mleka. Zjawisko to jest bardzo korzystne dla uniknięcia niepożądanego smaku powstającego w mleku na skutek lipolitycznego jęlczenia [16].

Jak ujawniło badanie TEM, wysokociśnieniowa obróbka śmietanki w zakresie 100 ÷ 400 MPa wywołuje krystalizację tłuszczu mlekowego, a największy efekt uzyskano w 200 MPa. Nie wykazano żadnych różnic morfologicznych pomiędzy kuleczkami tłuszczu mlekowego powstałymi na skutek presuryzacji oraz konwencjonalnej krystalizacji przy ciśnieniu atmosferycznym [5].

Krystalizacja tłuszczu mlekowego pod wpływem obróbki wysokociśnieniowej jest spowodowana przesunięciem do wyższej wartości temperatury przemiany fazowej. Do 200 MPa temperatura krystalizacji i topnienia zwiększa się o odpowiednio: 16,3 °C i 15,5 °C/100 MPa, [11]. Powyżej 350 MPa intensywność krystalizacji jest znacznie ograniczona ze względu na mniej intensywny wzrost kryształów, spowodowany mniejszą ruchliwością cząsteczek tłuszczu [6].

Laktoza

Pod wpływem tradycyjnej obróbki termicznej laktoza obecna w mleku i w przetworach mlecznych może ulegać izomeryzacji do laktulozy, a następnie degradacji do kwasów i innych cukrów. Brak tych związków obserwuje się po obróbce w 100 ÷ 400 MPa prowadzonej przez 10 ÷ 60 min w temp. 25 °C. Sugeruje to, że w mleku poddanym działaniu wysokiego ciśnienia nie zachodzą reakcje Maillarda oraz izomeryzacja laktozy [33].

Składniki mineralne

Wapń, będący podstawowym makroelementem mleka, może występować w kilku formach [26]:

- wapń całkowity – całkowita zawartość wapnia w mleku,

- wapń koloidalny – wapń związany bezpośrednio z cząsteczkami kazeiny w przypadku braku fosforanów oraz wapń, który tworzy integralną część z koloidalnym fosforanem wapnia (CCP),
- wapń dyfundujący (wapń rozpuszczalny) – wapń obecny w fazie rozpuszczalnej w postaci wolnych jonów wapnia (Ca^{2+}) lub kompleksu utworzonego głównie przez cytrynian lub fosforan,
- wapń jonowy – jonowa forma wapnia (Ca^{2+}).

W przeprowadzonych dotychczas badaniach uzyskano różne, niekiedy sprzeczne wyniki odnośnie wpływu obróbki wysokociśnieniowej na stężenie jonów wapnia w mleku [10, 28, 32]. Większość badaczy uważa jednak, że poziom wapnia dyfundującego zwiększa się na skutek działania wysokiego ciśnienia. Wzrost taki zaobserwowano po obróbce mleka w 200 MPa [11]. Traktowanie pasteryzowanego mleka ciśnieniem 400 MPa również powoduje zwiększenie ilości wapnia dyfundującego, podczas gdy obróbka termiczna ma niewielki wpływ lub nawet redukuje jego poziom. Wydaje się zatem, że wysokie ciśnienie powoduje rozpad natywnego koloidalnego fosforanu wapnia (CCP) [6, 49]. Powstały na skutek obróbki termicznej krystaliczny fosforan wapnia pod wpływem działania wysokiego ciśnienia powraca do stanu rozpuszczalnego [50].

Zawartość rozpuszczalnego wapnia, magnezu i fosforu w mleku krowim i kozim zwiększa się na skutek obróbki w zakresie do 300 MPa, natomiast przy wyższych ciśnieniach (400 MPa) ilość poszczególnych pierwiastków zaczyna się zmniejszać. Z kolei podczas obróbki mleka owczego aż do ciśnienia 400 MPa wzrasta zawartość soli dyfuzyjnych [32]. Według innych badaczy, ciśnienie w zakresie 100 ÷ 500 MPa i temp. 20 oraz 45 °C nie ma większego wpływu na poziom koloidalnego wapnia i fosforu w mleku kozim. Tłumaczy się to faktem, że wysokie ciśnienie wywiera inne działanie na sole mineralne mleka, które przed analizą było przez jakiś czas przechowywane [30].

Inne związki

W przeciwieństwie do obróbki cieplnej, która oddziałuje zarówno na kowalencyjne, jak i niekowalencyjne wiązania, obróbka wysokociśnieniowa prowadzona w temperaturze pokojowej i umiarkowanej rozrywa jedynie stosunkowo słabe wiązania chemiczne (wiązania wodorowe, hydrofobowe, jonowe). Dlatego też małe cząsteczki, takie jak: witaminy, aminokwasy, cukry proste i związki smakowo-zapachowe, zostają zachowane [8]. Ciśnienie 400 MPa stosowane przez 30 min w temp. 25 °C nie wywołuje istotnych strat pod względem zawartości witamin B₁ i B₆ [52]. Garcia Risco i wsp. [15] stwierdzili, że zabiegi prowadzone przy 400 MPa przez 15 min w temp. 40 ÷ 60 °C zmniejszają aktywność proteolityczną, a w 25 ÷ 60 °C utrzymują lub poprawiają właściwości sensoryczne mleka. Sugeruje to, że odpowiednia kombinacja parametrów

obróbki może być wykorzystana do produkcji mleka o dobrych właściwościach sensorycznych ze zwiększoną trwałością.

Podsumowanie

Micelle kazeinowe zawierające duże ilości fosforanu wapnia zwiększają swoje rozmiary przy obróbce do 250 MPa na skutek agregacji i interakcji z β -laktoglobuliną, po czym zaczynają rozpadać się na podjednostki pod ciśnieniem powyżej 300 MPa. Przyczyną tego jest rozpuszczenie koloidalnego fosforanu wapnia oraz destabilizacja wiązań jonowych, wodorowych i hydrofobowych. W wyniku obróbki wysokociśnieniowej białka serwatkowe ulegają denaturacji w temperaturze otoczenia, a następnie – agregacji. Większa wrażliwość β -laktoglobuliny w stosunku do α -laktoalbuminy wynika z obecności grupy tiolowej i mniejszej liczby stabilizujących wiązań disiarczkowych. Zastosowanie umiarkowanie wysokiego ciśnienia (200 ÷ 300 MPa) znacznie przyspiesza krystalizację zemulgowanego tłuszczu mlecznego poprzez zwiększenie temperatury przemiany fazowej. Jednocześnie ilość WKT pozostaje niezmienną, co pozwala na uniknięcie lipolitycznego jęczenia. Laktoza nie ulega reakcjom Maillarda ani izomeryzacji. Ponadto powstały na skutek obróbki termicznej krystaliczny fosforan wapnia pod wpływem działania wysokiego ciśnienia powraca do stanu rozpuszczalnego. W dyfuzyjnej fazie mleka wzrasta zawartość wapnia, magnezu i fosforu przy ciśnieniu do 300 MPa.

Opisane zmiany powodowane przez wysokie ciśnienie w składnikach mleka, a przede wszystkim w strukturze białka, umożliwiają opracowania minimalnie przetworzonych produktów mleczarskich o korzystnych cechach sensorycznych, reologicznych i teksturalnych. Jednocześnie zmniejszenie aktywności lipolitycznej i proteolitycznej pozwala na zwiększenie trwałości mleka, a brak zmian w związkach niskocząsteczkowych – na zachowanie jego wartości odżywczej.

Literatura

- [1] Altuner E. M., Alpas H., Erdem Y. K., Bozoglu F.: Effect of high hydrostatic pressure on physico-chemical and biochemical properties of milk. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 392-396.
- [2] Aoki T., Yamada N., Kako Y.: Relationship between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of β -casein from bovine casein micelles on cooling. *Agr. Biol. Chem.*, 1990, **54**, 2287-2292.
- [3] Arias M., Lopez-Fandino R., Olano A.: Influence of pH on the effects of high pressure on milk proteins. *Milchwissenschaft*, 2000, **55**, 191-194.
- [4] Borda D., Indrawati, Smout C., Van Loey A., Hendrickx M.: High pressure thermal inactivation of a plasmin system. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 2351-2358.
- [5] Buchheim W., Abou El-Nour A. M.: Induction of milkfat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fett Wiss. Technol.*, 1992, **94**, 369-373.
- [6] Buchheim W., Schrader K., Morr C.V., Frede E., Schutt M.: Effects of high pressure on the protein, lipid and mineral phase of milk. In: Heat treatments and alternative methods. Special Issue No. 9602. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1996, pp. 202-213.

- [7] Considine T., Patel H.A., Anema S.G., Singh H., Creamer L.K.: Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2007, **8**, 1-23.
- [8] Datta N., Deeth H. C.: High pressure processing. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Ed.). Academic Press, London, UK, 2003, pp. 1327-1333.
- [9] Datta N., Deeth H.C.: Heat treatment of milk non-thermal technologies: high pressure processing. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd ed.* J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Ed.). Academic Press, USA, 2011, pp. 732-737.
- [10] De la Fuente M.A., Olano A., Casal V., Juarez M.: Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goats' milk. *J. Dairy Res.*, 1999, **66**, 65-72.
- [11] Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J.: Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 3267-3274.
- [12] Frede E., Buchheim W.: The influence of high pressure upon the phase transition behaviour of milk-fat and milk-fat fractions. *Milchwissenschaft*, 2000, **55**, 683-686.
- [13] Funtenberger S., Dumay E.M., Cheftel J.C.: High pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 912-921.
- [14] Garcia-Risco M.R., Cortes E., Carrascosa A.V., Lopez-Fandino R.: Microbial changes in high-pressure-treated milk during refrigerated storage. *J. Food Protect.*, 1998, **61**, 735-737.
- [15] Garcia-Risco M.R., Recio I., Molina E., Lopez-Fandino R.: Plasmin activity in pressurized milk. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 728-734.
- [16] Gervilla R., Ferragut V., Guamis B.: High hydrostatic pressure effects on colour and milk-fat globule of ewe's milk. *J. Food Sci.*, 2001, **66** (6), 880-885.
- [17] Hać-Szymańczuk E., Mroczek J.: Perspektywy techniki wysokich ciśnień w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2006, **4**, 24-27.
- [18] Hać-Szymańczuk E., Mroczek J.: Zastosowanie techniki wysokich ciśnień w technologii żywności, a szczególnie w przetwórstwie mięsa. *Med. Weter.*, 2006, **62**, 637-640.
- [19] Hinrichs J., Rademacher B.: Kinetics of combined thermal and pressure-induced whey protein denaturation in bovine skim milk. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 315-323.
- [20] Hinrichs J., Rademacher B., Kessler H.G.: Food processing of milk products with ultrahigh pressure. In: *Heat treatments and alternative methods*. Special Issue No. 9602. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1996, pp. 185-201.
- [21] Hogan E., Kelly A.L., Sun D.-W.: High pressure processing of foods: An overview. In: *Emerging Technologies for Food Processing*. D.-W. Sun. Ed. Elsevier, London, UK, 2005, pp. 3-32.
- [22] Horne D.S.: Casein micelle structure and stability. In: *Milk proteins: From Expression to Food*. A. Thompson, M. Boland, H. Singh. Academic Press, USA, 2009, pp. 133-162.
- [23] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: High pressure treatment of bovine milk: Effects of casein micelles and whey proteins. *J. Dairy Res.*, 2004, **71**, 97-106.
- [24] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: Plasmin activity and proteolysis in high pressure-treated bovine milk. *Le Lait*, 2004, **84**, 297-304.
- [25] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. *Food Chem.*, 2004, **87**, 103-110.
- [26] Huppertz T., Kelly A.L., Fox P.F.: Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 561-572.
- [27] Jegouic M., Grinberg V.Y., Guingant A., Hartle T.: Baric oligomerization in α -lactalbumin/ β -lactoglobulin mixtures. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 19-22.
- [28] Johnston D.E., Austin B.A., Murphy R.J.: Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 1992, **47**, 760-763.
- [29] Lanciotti R., Vannini L., Pittia P., Guertzoni M.E.: Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 753-760.

- [30] Law A.J.R., Leaver J., Felipe X., Ferragut V., Pla R., Guamis B.: Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46** (7), 2523-2530.
- [31] Lopez-Fandino R.: High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 1116-1131.
- [32] Lopez-Fandino R., De la Fuente M.A., Ramos M., Olano A.: Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. *J. Dairy Res.*, 1998, **65**, 69-78.
- [33] Lopez-Fandino R., Olano A.: Cheese-making properties of ovine and caprine milks submitted to high pressures. *Le Lait*, 1998, **78**, 341-350.
- [34] Ludikhuyze L., Claeys W., Hendrickx M.: Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: A kinetic study. *J. Food Sci.*, 2000, **65**, 155-160.
- [35] Ludikhuyze L., Claeys W., Hendrickx M.: Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey. *J. Dairy Res.*, 2001, **68**, 625-637.
- [36] Marshall W.L., Frank E.U.: Ion product of water substance, 0 - 1000 °C, 1 - 10000 bars. New international formulation and 1st background. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1981, **10**, 295-304.
- [37] Nabhan M.A., Girardet J.-M., Campagna S., Gaillard J.-L., Le Roux Y.: Isolation and characterization of copolymers of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, κ -casein, and α_{S1} -casein generated by pressurization and thermal treatment of raw milk. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 3614-3622.
- [38] Needs E.C., Stenning R.A., Gill A.L., Ferragut V., Rich G.T.: High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Res.*, 2000, **67**, 31-42.
- [39] Olsen K., Kristensen D., Rasmussen J.T., Skibsted L.H.: Comparison of the effect of high pressure and heat on the activity of bovine xanthine oxidase. *Milchwissenschaft*, 2004, **59**, 411-413.
- [40] Pandey P.K., Ramaswamy H.S.: Effect of high-pressure treatment of milk on lipase and γ -glutamyl transferase activity. *J. Food Biochem.*, 2004, **28**, 449-462.
- [41] Pandey P.K., Ramaswamy H.S., St-Gelais D.: Effect of high pressure processing on rennet coagulation properties of milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2003, **4**, 245-256.
- [42] Pietrzak D.: Perspektywy stosowania wysokich ciśnień w produkcji żywności wygodnej z mięsa drobiowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **2** (69), 16-28.
- [43] Pietrzak D., Trejda E., Ziarno M.: Wpływ wysokiego ciśnienia na wybrane właściwości oraz trwałość kotlecików z mięsa drobiowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **1** (74), 68-78.
- [44] Rademacher B., Hinrichs J.: Effects of high pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: Reaction kinetics, inactivation and potential application. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 655-661.
- [45] Rademacher B., Pfeiffer B., Kessler H.G.: Inactivation of microorganisms and enzymes in pressure-treated raw milk. In: *High pressure food science, bioscience and chemistry*. N. S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, pp. 145-151.
- [46] Regnault S., Thiebaud M., Dumay E., Cheftel J.C.: Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: Effects on casein micelle size distribution. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 55-68.
- [47] Schmidt D.G., Buchheim W.: Elektronenmikroskopische untersuchung der feinstruktur von caseinmicellen in kuhmilch. *Milchwissenschaft*, 1970, **25**, 596-600.
- [48] Schrader K., Buchheim W.: High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. II. Kinetics of the casein micelle disintegration and protein interactions in milk. *Kieler Milch. Forsch.*, 1998, **50**, 79-88.
- [49] Schrader K., Buchheim W., Morr C.V.: High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung*, 1997, **41**, 133-138.

- [50] Schwertfeger M., Buchheim W.: Application of ultra high pressure technology in food processing. *New Food*, 1999, 46-49.
- [51] Scollard P.G., Beresford T.P., Needs E.C., Murphy P.M., Kelly A.L.: Plasmin activity β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 835-841.
- [52] Sierra I., Vidal Valverde C., Lopez Fandino R.: Effect of high pressure on the vitamin B₁ and B₆ content in milk. *Milchwissenschaft*, 2000, **55** (7), 365-367.
- [53] Trujillo A., Capellas M., Saldo J., Gervilla R., Guamis B.: Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2002, **3**, 295-307.
- [54] Żyngiel W., Kolenda H.: Wpływ wysokiego ciśnienia na zawartość sacharydów w sokach z marchwi utrwalonych technologią HPP. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **4** (63), 149-162.

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON BASIC COMPONENTS OF MILK

S u m m a r y

Degradation of food ingredients during heat treatment sets off searches for new methods of food preservation. The use of high hydrostatic pressure can be an alternative to heat treatment. This method makes it possible to preserve food products and to destroy harmful micro-organisms; also, it can significantly impact the forming of textures, functional properties, and sensory qualities of a product with no negative effects on its nutrients.

High-pressure treatment causes the freezing point of water, a main component of milk, to decrease. Casein micelles disaggregate into smaller structures and this process is accompanied by the increase in the number of casein particles and calcium phosphate. Whey proteins become denatured and, then, they aggregate and interact with casein. At a moderately high pressure (200 ÷ 300 MPa), a process of milk fat crystallization takes place. Lactose does not change under the pressure. Crystalline calcium phosphate, formed as a result of the heat treatment, returns to the dissolved state after the high pressure treatment.

Key words: water, casein, whey proteins, enzymes, milk fat, pressurization ☒