

ANNA DUDZIŃSKA, JACEK DOMAGAŁA, MONIKA WSZOŁEK

## WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNEGO NA MIKROORGANIZMY WYSTĘPUJĄCE W MLEKU I NA WŁAŚCIWOŚCI MLEKA

### Streszczenie

Technika wysokich ciśnień hydrostatycznych (UHP), będąca nowoczesną technologią utrwalania i kształtowania cech sensorycznych żywności, może być alternatywą obróbki termicznej wielu produktów spożywczych, w tym mleka.

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na mikroorganizmy zawarte w mleku oraz na główne właściwości mleka. Wegetatywne formy drożdży i pleśni oraz ich spory niszczone są przez ciśnienie 200 ÷ 400 MPa, a wegetatywne formy bakterii (również chorobotwórcze) – 300 ÷ 600 MPa, natomiast przetrwalniki > 1000 MPa. Wirusy wykazują bardzo różną odporność na ciśnienie. Obróbka wysokociśnieniowa, wywołując zmiany w składnikach mineralnych mleka, powoduje wzrost jego pH. Micele kazeinowe ulegają rozpadowi na drobne podjednostki, co w efekcie zmniejsza mętność i jasność mleka, a zwiększa jego lepkość. Odpowiednio dobrane parametry presuryzacji korzystnie oddziałują na właściwości technologiczne mleka. Ciśnienie 100 ÷ 300 MPa wpływa na: poprawę właściwości koagulacyjnych mleka traktowanego podpuszczką, skrócenie czasu koagulacji oraz skrócenie czasu żelowania. Ciśnienie 200 ÷ 400 MPa umożliwia otrzymanie twardszego skrzepu. Przy kwasowej koagulacji działanie wysokim ciśnieniem zwiększa szybkość zakwaszania, dzięki czemu uzyskuje się skrzep o większej sztywności, wytrzymałości i odporności na synerezę.

**Słowa kluczowe:** mikroorganizmy, barwa, lepkość, koagulacja podpuszczkowa, koagulacja kwasowa, presuryzacja

### Wprowadzenie

Spośród stosowanych obecnie metod utrwalania mleka najczęstszą jest obróbka termiczna (pasteryzacja, sterylizacja). Skutecznie redukuje ona poziom mikroorganizmów, jednak wpływa niekorzystnie na smak i barwę produktu, a także wywołuje de-

gradację cennych składników, jak witaminy. W mleku powoduje ponadto zmiany jego właściwości technologicznych, takie jak zmniejszenie zdolności krzepnięcia pod wpływem podpuszczki czy zdolności podstojowej. Celem producentów jest zatem stosowanie takiej technologii przetwarzania, która oprócz bezpieczeństwa mikrobiologicznego pozwoliłaby zachować naturalne lub stworzyć nowe, korzystne cechy sensoryczne produktu, przy jednoczesnym zminimalizowaniu niepożądanych zmian wywołanych obróbką [19, 29].

Jedną ze stosowanych technik jest oddziaływanie wysokim ciśnieniem, zwane presuryzacją, paskalizacją, obróbką wysokociśnieniową czy ciśnieniowaniem. Pozwala ono nie tylko na utrwalanie żywności poprzez niszczenie szkodliwych mikroorganizmów, ale również wpływa na kształtowanie tekstury, właściwości funkcjonalne oraz cechy sensoryczne produktu bez wywierania negatywnych skutków na jego składniki odżywcze. Główne zalety tej metody to [31, 43, 56]:

- eliminacja lub znaczne ograniczenie ogrzewania, dzięki czemu unika się termicznej degradacji składników żywności,
- wysoki poziom zachowania aromatu, barwy i wartości odżywczej,
- jednolita i natychmiastowa obróbka produktu,
- zmniejszone zapotrzebowanie na dodatki chemiczne,
- duży potencjał w zakresie projektowania nowych produktów ze względu na możliwość tworzenia nowej tekstury, smaku i właściwości funkcjonalnych.

Typowy system do obróbki wysokociśnieniowej składa się z czterech głównych części: zbiornika ciśnieniowego wraz z jego zamknięciem (np. w postaci tłoka) oraz płaszczem grzejnym, umożliwiającym uzyskanie odpowiedniej temperatury, systemu generującego ciśnienie, urządzenia kontrolującego i monitorującego ciśnienie i temperaturę oraz systemu przeladowującego produkt do i ze zbiornika. Zbiornik ciśnieniowy jest zazwyczaj cylindrycznym naczyniem wykonanym z niskostopowej stali o wysokiej wytrzymałości na rozciąganie. Grubość ścian zależy od maksymalnego ciśnienia roboczego, średnicy zbiornika i liczby cykli, na jaką komora została zaprojektowana [16, 36].

Stosowane zbiorniki mają zarówno pionową, jak i poziomą konfigurację oraz objętość wewnętrzną od 30 do powyżej 600 litrów. Ceny systemów wysokociśnieniowych wynoszą od 500 tys. do 2,5 mln USD, w zależności od pojemności urządzenia i stopnia automatyzacji, natomiast koszty przetwarzania – od 9 do 22 centów/kg, włączając koszty operacyjne i amortyzacji [47].

Stosowane w przemyśle urządzenia do obróbki wysokociśnieniowej pracują w systemie okresowym lub półciągłym. Wybór sprzętu zależy od rodzaju przetwarzanych produktów spożywczych. Produkty żywnościowe, składające się z dużych części stałych, poddawane są obróbce okresowej. Ciecze i produkty płynne mają dodatkową możliwość przetwarzania półciągłego. Systemy półciągłe stosowane do

przetwarzania płynnych artykułów żywnościowych zawierają kilka zbiorników, każdy wyposażony w swobodnie unoszący się tłok pozwalający dzielić zbiornik na dwie komory. Pierwsza komora wykorzystywana jest na płynną żywność, druga – na medium. Komora przeznaczona na żywność napelniana jest za pomocą niskociśnieniowej pompy, przez którą przepływa produkt. Po jej napelnieniu zawór zostaje zamknięty, a medium wpompowywane jest pod wysokim ciśnieniem do drugiej komory zbiornika, co powoduje kompresję płynu w pierwszej komorze. Po odpowiednim czasie przetrzymywania ciśnienie uwalniane jest z drugiej komory. Zawór komory „żywnościowej” zostaje otwarty, a kolejne porcje medium wprowadzane przez niskociśnieniową pompę do drugiej komory przesuwają tłok, który naciskając na płynny produkt powoduje jego usuwanie. Utrwalony produkt kierowany jest do sterylne go tanku, z którego dalej może być aseptycznie przekazywany do sterylnych opakowań [2].

### **Wpływ wysokich ciśnień na mikroorganizmy zawarte w mleku**

Każda z technik utrwalania żywności ma na celu zwalczanie mikroorganizmów chorobotwórczych, co zapewnia bezpieczeństwo produktu, a w drugiej kolejności – niszczenie drobnoustrojów powodujących psucie się żywności, co przedłuża jej okres przechowywania [37].

Odporność mikroorganizmów na ciśnienie jest uzależniona od parametrów obróbki, składników żywności oraz właściwości i stanu fizjologicznego drobnoustrojów. Na ogół komórki odporne na ogrzewanie są również bardziej odporne na ciśnienie, jednak istnieją liczne wyjątki. Ponadto, mikroorganizmy będące w logarytmicznej fazie wzrostu są zawsze bardziej wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia niż pozostające w fazie stacjonarnej, a spory są bardziej odporne niż formy dojrzałe [35, 41]. Wegetatywne formy drożdży i pleśni niszczone są przez ciśnienie w zakresie 200 ÷ 300 MPa [54], natomiast ich spory tracą aktywność przy 400 MPa [6]. Większość wegetatywnych form bakterii, łącznie z chorobotwórczymi patogenami, inaktywowana jest przy ciśnieniu 300 ÷ 600 MPa. Z kolei ich formy przetrwalnikujące są niszczone tylko przy bardzo intensywnej obróbce (> 1000 MPa), chociaż ciśnienie 50 ÷ 300 MPa pobudza je do kiełkowania, a dalsza umiarkowana obróbka cieplna bądź ciśnieniowa zabija je. Drobnoustroje Gram-dodatnie są bardziej odporne na presuryzację niż mikroorganizmy Gram-ujemne. Wykazano jednak znaczne różnice w odporności na ciśnienie w obrębie szczepów tego samego gatunku. Do osiągnięcia inaktywacji bakterie Gram-dodatnie wymagają stosowania ciśnienia 500 ÷ 600 MPa w temp. 25 °C przez 10 min, podczas gdy komórki Gram-ujemne są inaktywowane przy obróbce 300 ÷ 400 MPa w tej samej temperaturze, w ciągu 10 min. Wirusy stanowią niejednorodną grupę mikroorganizmów i wykazują bardzo różną odporność na działanie ciśnienia [41, 51].

Przeprowadzono wiele badań mających na celu inaktywację mikroorganizmów chorobotwórczych i gnilnych mleka przy użyciu obróbki wysokociśnieniowej. Na ich podstawie udowodniono, że możliwe jest uzyskanie „surowego” mleka poddanego działaniu ciśnienia w zakresie 400 ÷ 600 MPa, którego jakość mikrobiologiczna jest porównywalna z jakością mleka pasteryzowanego w temp. 72 °C przez 15 s [3, 5, 42], lecz niesterylizowanego, ze względu na obecność odpornych na działanie ciśnienia zarodników. Aby osiągnąć dziesięciodniową trwałość mleka podczas przechowywania w temp. 10 °C, konieczne jest zastosowanie ciśnienia 400 MPa przez 15 min lub 600 MPa przez 3 min w temp. 20 °C [45].

W celu określenia wrażliwości drobnoustrojów chorobotwórczych i powodujących psucie się żywności zbadano w mleku owczym poddanym działaniu wysokiego ciśnienia pięć mikroorganizmów: *Escherichia coli* CECT 405 (wskaźnik zanieczyszczenia pochodzenia fekalnego), *Pseudomonas fluorescens* CECT 378 (reprezentant *Pseudomonas* spp., składnik mikroflory gnilnej w schłodzonym mleku), *Listeria innocua* CECT 910 (wskaźnik ludzkiego patogenu *L. monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* CECT 534 (składnik mikroflory gnilnej mastitisowego mleka) i *Lactobacillus helveticus* CECT 414 (mikroorganizm niechorobotwórczy, reprezentant mlekowej flory bakteryjnej) [12, 14, 15]. Zaobserwowano, że inaktywacja spowodowana wysokim ciśnieniem malała zgodnie z kolejnością: *P. fluorescens* > *E. coli* > *L. innocua* > *L. helveticus* > *S. aureus*. Inny efekt wykazywały mikroorganizmy na działanie wysokiego ciśnienia w połączeniu z temperaturą. *P. fluorescens*, *L. innocua* i *L. helveticus* charakteryzowały się większą odpornością na presuryzację w temp. 25 °C niż w temp. 4 °C, podczas gdy *E. coli* i *S. aureus* były bardziej wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia w temperaturze pokojowej niż w 4 °C.

Czystość mikrobiologiczna mleka poddanego obróbce wysokociśnieniowej może być oceniana poprzez badanie aktywności rodzimych enzymów mleka, których odporność na działanie wysokiego ciśnienia jest większa niż odporność drobnoustrojów patogennych. Enzymy te mogą być wykorzystywane jako wskaźniki intensywności działania wysokiego ciśnienia, analogicznie do fosfatazy alkalicznej czy laktoperoksydazy używanych do oceny skuteczności pasteryzacji mleka.

Fosfataza alkaliczna jest znacznie bardziej wytrzymała na działanie wysokiego ciśnienia w porównaniu z odpornością mikroorganizmów obecnych w mleku. Jej inaktywacja świadczy zatem o braku patogenów w mleku poddanym presuryzacji. Z drugiej strony użycie fosfatazy alkalicznej jako wskaźnika ciśnieniowej pasteryzacji prowadzi do nadmiernego przetwarzania mleka. Z tego powodu wymagany jest wskaźnik bardziej wrażliwy na działanie wysokiego ciśnienia [44].

Ze względu na wysoką odporność na działanie wysokiego ciśnienia, laktoperoksydaza nie może być wskaźnikiem ciśnieniowej inaktywacji mikroorganizmów w mle-

ku [44]. Bardziej wrażliwymi na obróbkę wysokociśnieniową enzymami są  $\gamma$ -glutamylotransferaza i izomeraza fosfoheksozowa [44].

### **Wpływ wysokiego ciśnienia na główne właściwości mleka**

#### *pH*

Zmiany, jakie wywołuje wysokie ciśnienie w składnikach mineralnych mleka mogą skutkować zmianą jego pH. Chociaż Johnston i wsp. [25] nie stwierdzili znaczącego wpływu ciśnienia do 600 MPa na pH odtłuszczonego mleka krowiego, w kilku kolejnych badaniach, którym poddano mleko kozie [8] oraz krowie surowe [4], pasteryzowane [48, 49] i UHT [4, 48] zaobserwowano wzrost pH. Zmiany wartości pH były szczególnie duże w przypadku mleka UHT w porównaniu z mlekiem surowym i pasteryzowanym. Przypuszcza się, że efekt ten związany jest z przemianami koloidalnego fosforanu wapnia, który wytrąca się w wysokiej temperaturze oraz rozpada w warunkach wysokiego ciśnienia. Wywołane obróbką wysokociśnieniową większe pH w mleku pasteryzowanym po 4 h przechowywania w warunkach otoczenia powróciło do stanu sprzed obróbki. W przypadku mleka UHT wzrost pH o 0,05 jednostki utrzymał się, co było prawdopodobnie spowodowane faktem, że podczas działania wysokiego ciśnienia wytrącony uprzednio pod wpływem obróbki UHT koloidalny fosforan wapnia oddysocjował nieodwracalnie z miceli kazeinowych [48]. Odwracalnością zmian wartości pH wywołanych wysokim ciśnieniem można tłumaczyć różnice w wynikach wielu badań.

#### *Barwa*

Rozpad miceli kazeinowych spowodowany wysokim ciśnieniem wpływa również na wygląd mleka. Zmniejszenie wartości  $L^*$  (jasność) oraz wzrost udziału barwy zielonej ( $- a^*$ ) i żółtej ( $+ b^*$ ) zaobserwowano przy obróbce wysokociśnieniowej mleka owczego [13]. Przyczyną zmiany jasności barwy był prawdopodobnie rozpad miceli kazeinowych na małe fragmenty, które zwiększają przezroczystość mleka [25]. Zmiany te były jednak wizualnie niedostrzegalne, co może pozytywnie wpływać na akceptację produktu przez potencjalnych klientów. Podobne wyniki uzyskali również inni badacze w przypadku mleka krowiego, wykazując niską czułość barwy mleka na wysokie ciśnienie. Obróbka w 200 MPa i 20 °C miała niewielki wpływ na wartość  $L^*$ , natomiast w 250 ÷ 450 MPa zmniejszyła jasność pasteryzowanego oraz regenerowanego mleka odtłuszczonego. Ciśnienie powyżej 450 MPa spowodowało niewiele większe zmiany. Jednak w mleku odtłuszczonym poddanym obróbce w 600 MPa przez 15 min zaobserwowano znaczące różnice w wartościach  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , które były dostrzegalne wizualnie [1, 9, 25, 42]. Ogrzewanie ciśnieniowanego mleka od 4 do 43 °C pozwoliło ponownie uzyskać barwę zbliżoną do mleka niepoddanego obróbce [25].

### *Lepkość*

Wpływ wysokiego ciśnienia na lepkość mleka nie jest jednoznacznie opisany w literaturze. Wielu badaczy uzyskało sprzeczne wyniki. Według Kim i wsp. [28] obróbka wysokociśnieniowa nie wpływa istotnie na omawiany parametr. W przeprowadzonych badaniach wykazali oni, że lepkość mleka przetwarzanego w 200 MPa przez 10 i 20 min jest taka sama jak mleka surowego, natomiast wydłużenie czasu obróbki do 30 min nieznacznie ją zwiększa. Z kolei według Harte'a i wsp. [18] oraz Huppertza i wsp. [20] przemiany zachodzące w strukturze micelarnej pod wpływem wysokiego ciśnienia powodują istotny wzrost lepkości odtłuszczonego mleka. Jest on tym większy, im wyższe jest ciśnienie i dłuższy czas obróbki. Zjawisko to tłumaczy się znacznym zwiększeniem hydratacji cząstek kazeinowych mleka poddanego presuryzacji. Rozpad miceli na mniejsze podjednostki o nieregularnym kształcie sprzyja przyłączeniu do nich cząsteczek wody [1, 39]. Ponadto, na skutek asocjacji zdenaturowanej  $\beta$ -laktoglobuliny ( $\beta$ -lg) z micelami następuje zwiększenie ujemnego ładunku elektrycznego miceli, powodując również wzrost ich solwatacji [1, 24].

### *Koagulacja podpuszczkowa*

Koagulacja podpuszczkowa mleka uważana jest za dwuetapowy proces, składający się z fazy enzymatycznej i koagulacyjnej. W fazie enzymatycznej następuje specyficzna hydroliza  $\kappa$ -kazeiny, która zostaje rozerwana na para- $\kappa$ -kazeinę, biorącą udział w tworzeniu skrzepu, i kazeinomakropeptyd (ang. *Casein Macro Peptide* – CMP), uwalniany do serwatki. W fazie koagulacyjnej ma miejsce agregacja zmodyfikowanych enzymatycznie miceli kazeinowych [31].

Wielu naukowców badało wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na różne parametry związane z koagulacją mleka pod wpływem podpuszczki, takie jak czas krzepnięcia podpuszczki (ang. *Rennet Coagulation Time* – RCT), czas, w którym skrzep jest dostatecznie związany do krojenia (czas żelowania) oraz więźność żelu podczas krojenia [24].

Stwierdzono, że obróbka surowego mleka pod ciśnieniem 100 ÷ 300 MPa wpływa na poprawę jego właściwości koagulacyjnych. Zastosowanie ciśnienia 200 ÷ 250 MPa przez 30 min skróciło czas koagulacji, podczas gdy ciśnienie 400 i 600 MPa (30 min) ponownie ten czas wydłużyły – uzyskano wartość RCT odpowiednio podobną i 15 % wyższą niż w przypadku mleka nieprzetworzonego. Przy ciśnieniu 200 MPa czas obróbki w zakresie 10 ÷ 60 min pozwolił na uzyskanie zbliżonego wyniku. Z kolei przy 400 MPa ten sam przedział czasowy spowodował odmienne wyniki – dziesięciominutowe działanie ciśnieniem spowodowało skrócenie czasu krzepnięcia, a dłuższe oddziaływanie stopniowo zwiększało wartość RCT i ostatecznie po 60 min uzyskano wartość znacznie wyższą niż w przypadku mleka surowego [27, 33, 39, 55].

Lopez-Fandino i wsp. [33] stwierdzili, że wpływ wysokiego ciśnienia na czas żelowania jest podobny do wpływu, jaki wywołuje ono na RCT. Obróbka mleka surowego w 200 MPa przez 30 min skróciła czas potrzebny do uzyskania dostatecznie związłego skrzepu, natomiast ciśnienie do 400 MPa spowodowało, że czas żelowania osiągnął wartość zbliżoną do uzyskanej podczas żelowania mleka niepoddanego obróbce. Podobnie jak w przypadku RCT, czas żelowania zależał od czasu oddziaływania ciśnienia.

Zgodnie z wynikami, jakie otrzymali Lopez-Fandino i wsp. [33] zwiążłość żelu pozostała niezmieniona po działaniu ciśnienia 100, 200 oraz 400 MPa przez 30 min. Natomiast obróbka w 300 MPa spowodowała wzrost wartości tego parametru. Podobny efekt obserwowano również w przypadku mleka poddanego presuryzacji w 200 MPa przez 10 min. Wydłużenie czasu do 60 min nie spowodowało dalszych zmian. Obróbka w 400 MPa przez 10 min także zwiększyła zwiążłość żelu, jednak w tym przypadku dłuższy czas obróbki spowodował, że po 60 min uzyskano znacznie mniejszą zwiążłość niż w mleku niepoddanym działaniu ciśnienia.

Właściwości koagulacyjne mleka i związane z nimi: czas krzepnięcia pod wpływem podpuszczki, czas żelowania oraz zwiążłość żelu zależą od wielu czynników. Wśród nich kluczowe znaczenie ma poziom jonów wapnia. Należy zauważyć, że prawdopodobnie ze względu na odwracalność zmian wywołanych wysokim ciśnieniem, rozpadowi kazeiny nie towarzyszy wzrost aktywności uwolnionego  $\text{Ca}^{2+}$  [25, 32]. Jak podają Zobrist i wsp. [55], w wyniku działania wysokiego ciśnienia na mleko stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  wzrosło o 12 %, po czym na skutek ogrzewania próbki w 30 °C szybko zmalało do wartości początkowej.

Wywołane wysokim ciśnieniem zmiany micelarne powodują uwolnienie fragmentu  $\kappa$ -kazeiny do fazy rozpuszczalnej, wspomagając tym samym utratę ujemnego ładunku miceli oraz stabilizujących ją sił elektrostatycznych [9, 32, 39]. Wzrost udziału cząstek micelarnych, pozbawionych hydrofilowych końców polipeptydowych łańcuchów  $\kappa$ -kazeiny, promuje oddziaływania hydrofobowe, stymulując proces krzepnięcia [10, 27]. Jak stwierdzili również inni badacze, mleko zawierające micelle kazeinowe o zmniejszonej średnicy wykazuje większe właściwości koagulacyjne. Z mniejszych miceli uzyskuje się w efekcie bardziej zwiążły skrzep [33, 52].

Denaturacja  $\beta$ -lg przy ciśnieniu wyższym niż 200 MPa może zrównoważyć efekt, jaki powstaje na skutek przemian miceli kazeinowych, gdyż sprawia ona, że spada podatność  $\kappa$ -kazeiny na hydrolizę pod wpływem podpuszczki. Prowadzi to do spowolnienia lub zahamowania enzymatycznej fazy koagulacji [33]. Ponadto, sieciowanie  $\beta$ -lg z  $\kappa$ -kazeiną może niekorzystnie wpływać również na kolejny etap agregacji kazeiny, prawdopodobnie ze względu na zwiększenie odpychania elektrostatycznego. Needs i wsp. [39] nie stwierdzili żadnego wpływu ciśnieniowania mleka na szybkość hydrolizy  $\kappa$ -kazeiny. Wykazali oni natomiast, że ciśnienie promuje drugi etap koagulacji, wy-

korzystując do doświadczenia mleko inkubowane uprzednio ze środkiem blokującym grupy tiolowe. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że denaturacja  $\beta$ -lg stopniowo zmniejszała podpuszczkową agregację miceli przy ciśnieniu 250 MPa. Podobnie, w przypadku mleka pozbawionego białek serum nie nastąpiło wydłużenie czasu krzepnięcia po obróbce w 400 i 600 MPa oraz w sytuacji, gdy asocjacja  $\beta$ -lg z micelami kazeinowymi była ograniczona przez dodanie jodanu(V) potasu ( $\text{KIO}_3$ ) [55]. Można zatem stwierdzić, że wpływ wysokiego ciśnienia na właściwości koagulacyjne mleka zależy od sumarycznego efektu dwóch przeciwstawnych mechanizmów: rozpadu miceli kazeinowych oraz denaturacji  $\beta$ -lg.

Temperatura ciśnieniowania również odgrywa istotną rolę. Obróbka prowadzona w niskiej temperaturze (np. 3 zamiast 21 °C) zwiększyła szybkość krzepnięcia mleka [40]. Zastosowanie temp. 50 i 60 °C znacznie utrudniło jego koagulację, powodując denaturację białek serwatkowych oraz powstanie dużych miceli kazeinowych. Stwierdzono, że działanie ciśnieniem w wysokiej temperaturze opóźnia krzepnięcie oraz zmniejsza wytrzymałość żelu [22, 33]. W przypadku mleka poddanego uprzednio obróbce cieplnej w temp. 65 °C przez 30 min, presuryzacja w 400 MPa, 22 °C przez 15 min znacznie skróciła czas żelowania i zwiększyła zwięzłość skrzepu [38]. Huppertz i wsp. [23] stwierdzili, że pomimo wydłużenia czasu krzepnięcia surowego mleka, obróbka prowadzona w 400 i 600 MPa, stosowana do mleka uprzednio ogrzewanego (90 °C, 10 min), znacznie ten czas skróciła. Jest zatem prawdopodobne, że gdy znaczna część białek serwatkowych jest już zdenaturowana, to wpływ wysokiego ciśnienia na micelle kazeinowe staje się głównym mechanizmem, który powoduje ostatecznie skrócenie czasu koagulacji [23].

Mleko pochodzące od różnych gatunków zwierząt inaczej reaguje na działanie wysokiego ciśnienia. Obróbka wysokociśnieniowa mleka owczego i koziego nie wpływa na poprawę ich właściwości koagulacyjnych [33, 52]. Ogrzewanie również ma mniejszy wpływ na czas krzepnięcia mleka oraz zwięzłość żelu niż w przypadku mleka krowiego [7, 46]. Odmienny wpływ wysokiego ciśnienia na mleko owcze i kozie w porównaniu z krowim mógł być spowodowany różnicami w składzie poszczególnych frakcji kazeiny, inną wielkością miceli, różną mineralizacją i hydratacją. Ponadto, w mleku owczym i kozim większa niż w mleku krowim część  $\beta$ -lg denaturowała w 200 i 300 MPa. To również mogło wpływać na względne wydłużenie czasu krzepnięcia mleka. Podobnie, w przypadku mleka bawolego, nastąpiły jedynie niewielkie zmiany micelarne oraz znaczna denaturacja  $\beta$ -lg, a więc działanie wysokiego ciśnienia wydłużyło czas koagulacji oraz zmniejszyło wytrzymałość żelu [24].

#### *Koagulacja kwasowa*

W świeżym mleku, którego pH wynosi 6,6 ÷ 6,8 poszczególne frakcje miceli kazeinowych połączone są mostkami wapniowymi, a ujemny ładunek elektryczny miceli



sprzyja powstawaniu stabilizujących je warstw hydratacyjnych. Warstwy te zapewniają wzajemne odpychanie się cząstek kazeinowych. Mechanizm koagulacji kwasowej polega na obniżeniu pH mleka do punktu izoelektrycznego kazeiny równego 4,6. Wówczas liczba zdysocjowanych grup kwasowych i zasadowych miceli jest taka sama, a jej zewnętrzny ładunek wynosi 0. Mostki wapniowe rozpadają się, a jony wapnia oddysocjują do serwatki. Ponadto micelle tracą warstwy hydratacyjne, co ułatwia ich wzajemny kontakt i tworzenie międzymicelarnych wiązań. W efekcie tworzy się żel [34].

W badaniach wpływu wysokiego ciśnienia na kwasowe krzepnięcie mleka analizowano zarówno mleko, jak i gotowy produkt, którym najczęściej był jogurt. Stwierdzono, że obróbka wysokociśnieniowa sprzyja kwasowej koagulacji. Z uwagi na zmiany, jakie wysokie ciśnienie wywołuje w pojemności buforowej mleka, żelifikacja ukwaszonego mleka rozpoczyna się przy wyższych wartościach pH niż w mleku niepoddanym działaniu wysokiego ciśnienia [9, 50]. Ponadto Huppertz i wsp. [21] zaobserwowali, że szybkość ukwaszania mleka ciśnieniowanego, zaszczepionego bakteriami kwasu mlekowego, jest znacznie większa. Naukowcy uznali, że przyczyną był wywołany wysokim ciśnieniem rozpad kazeiny, powodujący zwiększenie podaży azotu dostępnego dla bakterii.

Odnotowano również znaczną poprawę właściwości mechanicznych skrzepu utworzonego z mleka poddanego działaniu wysokiego ciśnienia. Charakteryzował się on większą sztywnością, wytrzymałością i odpornością na synerezę, co było spowodowane zwiększoną hydratacją białka oraz jego gęstszym usieciowaniem [53]. Według Johnstona i wsp. [26] poprawa właściwości mechanicznych żelu związana jest z tworzącymi micelle łańcuchami, które budują wypełnioną płynem strukturę o drobnych porach ograniczających ruch cieczy. Agregacja małych cząstek micelarnych powoduje tworzenie zwartych kompleksów, na powierzchni których znajduje się częściowo zdenaturowana  $\beta$ -lg, przyczyniająca się do zwiększenia wytrzymałości żelu i jego odporności na synerezę [17, 26]. Obróbka wysokociśnieniowa mleka sprawia, że w skrzepie micelle kazeinowe występują jako cząsteczki o gładkiej powierzchni, tworzące gęsto ułożone pasma. Pomimo międzymicelarnych oddziaływań micelle wydają się nie łączyć ze sobą, lecz przeplatają się w matrycy gęstej substancji amorficznej. W przypadku termicznej obróbki mleka micelle tworzące skrzep są rozdzielone przez gęsto występujące, nitkowate elementy na ich powierzchni [30].

Ferragut i wsp. [11] opracowali technologię wytwarzania z surowego mleka jogurtu, stosując różne kombinacje temperatury (10, 25, 55 °C) i ciśnienia (200, 350, 500 MPa). Każdorazowo obróbka trwała 15 min. Uzyskane jogurty porównano z jogurtem z mleka pasteryzowanego (70 °C, 10 min). Zaobserwowano, że w jogurcie wyprodukowanym z mleka poddanego obróbce w 350 lub 500 MPa i temp. 25 lub 55 °C koagulacja rozpoczęła się przy wyższych wartościach pH. Uzyskano twardszy

skrzep niż miało to miejsce w przypadku jogurtu otrzymanego z mleka pasteryzowanego. Twardość skrzepu była tym większa, im wyższe zastosowano ciśnienie i temperaturę obróbki. Nie stwierdzono natomiast różnic w synerezie badanych jogurtów. Po 20 dniach przechowywania w temp. 4 °C wszystkie jogurty zachowały odpowiednią twardość, natomiast prawidłowe utrzymanie serwatki wewnątrz skrzepu wykazały tylko te jogurty, które otrzymano z mleka poddanego obróbce wysokociśnieniowej. Inni badacze stwierdzili z kolei poprawę lepkości jogurtu mieszanego, wyprodukowanego metodą zbiornikową z odłuszczonego mleka poddanego działaniu wysokiego ciśnienia od 100 do 600 MPa w ciągu do 1 h w porównaniu z jogurtem z mleka niepoddanego obróbce. Najlepsze efekty uzyskano przy obróbce w 400 MPa przez 15 min oraz 600 MPa przez 5 min. Dalsze działanie ciśnienia do 60 min powodowało już niewielki wzrost lepkości jogurtu [53].

### Podsumowanie

Poszczególne rodzaje mikroorganizmów wykazują bardzo różną oporność na działanie wysokiego ciśnienia. Wegetatywne formy drożdży i pleśni niszczone są przy ciśnieniu 200 ÷ 300 MPa, natomiast ich spory tracą aktywność w około 400 MPa. Większość wegetatywnych form bakterii, łącznie z chorobotwórczymi patogenami, inaktywowana jest przez obróbkę między 300 a 600 MPa. Z kolei ich formy przetrwalnikujące niszczone są tylko powyżej 1000 MPa, chociaż ciśnienie 50 ÷ 300 MPa pobudza je do kiełkowania, a dalsza umiarkowana obróbka cieplna bądź ciśnieniowa zabija je. Drobnoustroje Gramdodatnie do osiągnięcia inaktywacji wymagają stosowania ciśnienia 500 ÷ 600 MPa w temp. 25 °C przez 10 min, podczas gdy komórki Gramujemne są inaktywowane przy ciśnieniu 300 ÷ 400 MPa w analogicznych warunkach czasowych i temperaturowych. Wirusy stanowią niejednorodną grupę mikroorganizmów o różnej odporności na wysokie ciśnienie. Obróbka wysokociśnieniowa wywołuje wzrost pH mleka, co jest związane z przemianami koloidalnego fosforanu wapnia. Rozpad miceli kazeinowych sprawia, że oceniana instrumentalnie barwa mleka ulega zmianie – zmniejsza się jego jasność, wzrasta udział barwy zielonej i żółtej. Drobne cząsteczki kazeinowe, połączone ze zdenaturowaną  $\beta$ -lg, mają ponadto większą zdolność hydratacji, co zwiększa lepkość mleka. Odpowiednio dobrane parametry wysokociśnieniowego oddziaływania wpływają korzystnie na właściwości technologiczne mleka. Ciśnienie 100 ÷ 300 MPa poprawia właściwości koagulacyjne mleka pod wpływem podpuszczki, skraca czas koagulacji oraz czas żelowania. Ciśnienie 200 ÷ 400 MPa pozwala otrzymać twardszy skrzep. Przy kwasowej koagulacji działanie wysokiego ciśnienia zwiększa szybkość ukwaszania, dzięki czemu uzyskuje się skrzep o większej sztywności, wytrzymałości i odporności na synerezę.

### 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] Balasubramaniam V.M., Farkas D., Turek E.J.: Preserving foods through High-Pressure Processing. *Food Technol.*, 2008, **62 (11)**, 32-38.
- [3] Black E.P., Kelly A.L., Fitzgerald G.F.: The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of micro-organisms in milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2005, **6**, 286-292.
- [4] 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.
- [5] Buffa M., Guamis B., Royo C., Trujillo A.J.: Microbial changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurised and high-pressure-treated milk. *Food Microbiol.*, 2001, **18 (1)**, 45-51.
- [6] Butz P., Funtenberger S., Haberditzl T., Tauscher B.: High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1996, **29**, 404-410.
- [7] Calvo M.M., Leaver J.: Influence of heating on caseinomacropeptide formation in cow's, ewe's and goat's milk. *Milchwissenschaft*, 2000, **55**, 553-555.
- [8] 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.
- [9] Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J.: Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 3267-3274.
- [10] Devi A.F., Liu L.H., Yacine Hemar Y., Buckow R., Kasapis S.: Effect of high pressure processing on rheological and structural properties of milk – gelatin mixtures. *Food Chem.*, 2013, **141**, 1328-1334.
- [11] Ferragut V., Martinez V.M., Trujillo A.J., Guamis B.: Properties of yoghurts made from whole ewe's milk treated by high hydrostatic pressure. *Milchwissenschaft*, 2000, **55**, 267-269.
- [12] Gervilla R., Capellas M., Ferragut V., Guamis B.: Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *J. Food Protect.*, 1997, **60 (1)**, 33-37.
- [13] 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.
- [14] Gervilla R., Mor-Mur M., Ferragut V., Guamis B.: Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated into ewe's milk by high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 1999, **16 (2)**, 173-184.
- [15] Gervilla R., Sendra E., Ferragut V., Guamis B.: Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* inoculated into ewe's milk to high hydrostatic pressure. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82 (6)**, 1099-1107.
- [16] Hać-Szymańczuk E., Mroczek J.: Perspektywy techniki wysokich ciśnień w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2006, **4**, 24-27.
- [17] Harte F., Amonte M., Luedecke L., Swanson B.G., Barbosa-Canovas G.V.: Yield-stress and micro-structure of set yogurt made from high hydrostatic pressure-treated full fat milk. *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 2245-2250.
- [18] Harte F., Luedecke L., Swanson B., Barbosa-Canovas G.V.: Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 1074-1082.
- [19] 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.
- [20] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: High pressure-induced changes in the creaming properties of bovine milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2003, **4**, 349-359.

- [21] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: Influence of high pressure treatment on the acidification of bovine milk by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 2004, **59**, 246-249.
- [22] Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L.: Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. *Food Chem.*, 2004, **87**, 103-110.
- [23] Huppertz T., Hinz K., Zobrist M.R., Uniacke T., Kelly A.L., Fox P.F.: Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties of heated milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2005, **6**, 279-285.
- [24] 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.
- [25] Johnston D.E.: High pressure effects on milk and meat. In: *High Pressure Processing of Foods*. D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, A.P. M. Hasting. University Press, Loughborough, UK, 1995, pp. 99-121.
- [26] Johnston D.E., Murphy R.J., Rutherford J.A., McCreedy R.W.: Acidification of high pressure treated milk: The role of whey protein denaturation. *Milchwissenschaft*, 2002, **57**, 605-608.
- [27] Johnston D.E., Rutherford J.A., McCreedy R.W.: Ethanol stability and chymosin-induced coagulation behaviour of high pressure treated milk. *Milchwissenschaft*, 2002, **57**, 363-366.
- [28] Kim H.Y., Kim S.H., Choi M.J., Min S.G., Kwak H.S.: The effect of high pressure-low temperature treatment on physicochemical properties in milk. *J. Dairy Sci.*, 2008, **91**, 4176-4182.
- [29] Krasnowska G., Salejda A.: Czynniki wpływające na wybór mlecznych napojów fermentowanych przez studentów Wrocławia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **3 (58)**, 33-46.
- [30] Lanciotti R., Vannini L., Pittia P., Guerzoni M.E.: Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 753-760.
- [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] Lucey J.A.: Acid and Acid/Heat Coagulated Cheese. In: *Encyclopedia of dairy science*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox. Academic Press, London, UK, 2002, pp. 350-356.
- [35] Mackey B.M., Forestiere K., Isaacs N.: Factors Affecting the Resistance of *Listeria monocytogenes* to High Hydrostatic Pressure. *Food Biotechnol.*, 1995, **9**, 1-11.
- [36] Marszałek K., Mitek M., Skąpska S.: Zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych (UHP) do utrwalania soków i nektarów truskawkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **1 (74)**, 112-123.
- [37] McClements J.M.J., Patterson M.F., Linton M.: The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J. Food Protect.*, 2001, **64 (4)**, 514-522.
- [38] Molina E., Alvarez M.D., Ramos M., Olano A., Lopez-Fandino R.: Use of high-pressure treated milk for the production of reduced-fat cheese. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 467-475.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Patterson M.F.: Microbiology of pressure-treated foods. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1400-1409.

- [42] Pereda J., Ferragut V., Quevedo J.M., Guamis B., Trujillo A.J.: Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Am. Dairy Sci. Assoc.*, 2007, **3**, 1081-1093.
- [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., Kessler H.G.: High pressure inactivation of microorganisms and enzymes in milk and milk products. In: *High Pressure Bio-Science and Biotechnology*. K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Belgium, 1997, pp. 291-293.
- [46] Raynal K., Remeuf F.: The effect of heating on physicochemical and renneting properties of milk: A comparison between caprine, ovine and bovine milk. *Int. Dairy J.*, 1998, **8**, 695-706.
- [47] Sáiz A.H., Mingo S.T., Balda F.P., Samson C.T.: Advances in design for successful commercial high pressure food processing. *Food Aust.*, 2008, **60 (4)**, 154-156.
- [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] Serra M., Trujillo A.J., Jaramillo P.D., Guamis B., Ferragut V.: Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: Impact on acid coagulation properties. *J. Dairy Res.*, 2008, **75**, 69-75.
- [51] Skąpska S., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M., Niezgodna J., Chotkiewicz M., Dekowska A.: Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **3 (82)**, 187-196.
- [52] Trujillo A.J., 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.
- [53] Udabage P., Augustin M.A., Versteeg C., Puvanenthiran A., Yoo J.A., Allen N., McKinnon I, Smiddy M., Kelly A.L.: Properties of low-fat stirred yoghurts made from high-pressure-processed skim milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2010, **11**, 32-38.
- [54] Yaldagard M., Seyed Ali Mortazavi S.A., Tabatabaie F.: The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *Afr. J. Biotechnol.*, 2008, **7 (16)**, 2739-2767.
- [55] Zobrist M.R., Huppertz T., Uniacke T., Fox P.F., Kelly A.L.: High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 655-662.
- [56] 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 MICROORGANISMS PRESENT IN MILK AND ON MILK PROPERTIES

### Summary

The technique of high hydrostatic pressures (UHP), an up-to-date technology of preserving and forming sensory characteristics of food, may be an alternative to heat treatment of many food products, including milk.

The paper presents the current state of knowledge as regards the effect of high hydrostatic pressure on micro-organisms contained in milk and on the major properties of milk. Vegetative forms of yeasts and moulds, and their spores are destroyed by a 200 to 400 MPa pressure, vegetative forms of bacteria (including pathogenic) by a 300 to 600 MPa pressure, while spores by a pressure higher than 1000 MPa. Viruses have very different resistance levels to pressure. High-pressure treatment that causes changes in mineral components of milk increases its pH. Casein micelles break down into small particles; this, in turn, reduces turbidity and clarity of milk, and increases its viscosity. Appropriately selected pressurization parameters affect technological properties of milk. The effect of pressure between 100 and 300 MPa is: enhancement of the rennet coagulation properties of milk and reduction in the coagulation and gelation time. When applying a pressure between 200 and 400 MPa, it is possible to obtain a harder coagulum. During acid coagulation, the application of high pressure increases the rate of acidification, which results in obtaining a coagulum of a higher firmness, strength, and resistance to syneresis.

**Key words:** micro-organisms, colour, viscosity, rennet coagulation, acid coagulation, pressurization ☒