UNIWERSYTET WARMIŃSKO – MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI



KATEDRA MLECZARSTWA I ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ

Rozprawa doktorska

mgr inż. Oskar Michał Brożek

WYKORZYSTANIE SKANINGOWEJ KALORYMETRII RÓŻNICOWEJ W OCENIE MLEKA I PRODUKTÓW MLECZARSKICH

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

dr hab. inż. Katarzyny Kiełczewskiej, prof. UWM

Promotor pomocniczy:

dr inż. Krzysztof Bohdziewicz

Olsztyn 2023

UNIVERSITY OF WARMIA & MAZURY IN OLSZTYN

FACULTY OF FOOD SCIENCES



DEPARTMENT OF DAIRY SCIENCE AND QUALITY MANAGEMENT

Doctoral dissertation

M.Sc. Eng. Oskar Michał Brożek

APPLICABILITY OF DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY FOR EVALUATING MILK AND DAIRY PRODUCTS

Doctoral dissertation written under the supervision of:

dr hab. eng. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM

Assistant supervisor:

dr eng. Krzysztof Bohdziewicz

Olsztyn 2023

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów 5
Streszczenie 7
Abstract 9
Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską 11
1. Wstęp 13
1.1. Skaningowa kalorymetria różnicowa – podstawowe informacje 13
1.2. Zastosowanie skaningowej kalorymetrii różnicowej w analizie żywności 14
1.3. Uzasadnienie wyboru problemu badawczego 17
2. Cel pracy 20
2.1. Cel główny, cele szczegółowe i hipotezy badawcze pracy doktorskiej 20
3. Materiał i metody 22
3.1. Organizacja badań 22
3.2. Materiał badawczy 23
3.2.1. Publikacja I 23
3.2.2. Publikacja II 23
3.2.3. Publikacja III 24
3.3. Metody badawcze 25
3.3.1. Oznaczenie podstawowego składu chemicznego 25
3.3.2. Liofilizacja i oznaczenie aktywności wody liofilizatów 25
3.3.3. Analiza mikroskopowa 26
3.3.4. Rozmiar kuleczek tłuszczowych 26
3.3.5. Oznaczenie zawartości kwasów tłuszczowych 26
3.3.6. Analiza DSC 27
3.3.7. Analiza barwy 29
3.3.8. Analiza tekstury 29
3.3.9. Ocena sensoryczna 29
3.3.10. Analiza statystyczna 30
4. Wyniki i dyskusja 31
4.1. Charakterystyka termiczna maślanki, mleka i śmietanki – Publikacja I 31
4.2. Charakterystyka termiczna mleka owczego, mleka krowiego oraz ich mieszanek – Publikacja II 36

4.3. Charakterystyka termiczna masła serwatkowego i masła ze śmietanki oraz ich tłuszczów - Publikacja III 41
5. Wnioski 46
6. Literatura 48
7. Załączniki 53

Wykaz stosowanych skrótów

ai	–	anteizo
a_w	–	aktywność wody
BCFA	–	kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu węglowym
c	–	cis
C*	–	nasycenie barwy
DSC	–	skaningowa kalorymetria różnicowa
d_v10	–	średnica, przy której 10% całego rozkładu wielkości cząstek znajduje się poniżej tej wartości
d_v50	–	średnica, przy której 50% całego rozkładu wielkości cząstek znajduje się poniżej tej wartości
d_v90	–	średnica, przy której 90% całego rozkładu wielkości cząstek znajduje się poniżej tej wartości
d_{32}	–	średnica Sautera
d_{43}	–	średnica de Brouckere'a
HMPF	–	wysokotopliwa frakcja tłuszczu mlekowego
i	–	izo
LCFA	–	długołańcuchowe kwasy tłuszczowe
LMPF	–	niskotopliwa frakcja tłuszczu mlekowego
MB	–	masło wyprodukowane ze śmietanki
MBF	–	tłuszcz masła wyprodukowanego ze śmietanki
MCFA	–	średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe
MMPF	–	średniotopliwa frakcja tłuszczu mlekowego
MUFA	–	jednonienasycone kwasy tłuszczowe
p, α	–	poziom istotności
P_e	–	koniec piku
P_{height}	–	wysokość piku
PCA	–	analiza głównych składowych
PUFA	–	wielonienasycone kwasy tłuszczowe
P_s	–	początek piku
r	–	współczynnik korelacji liniowej Pearsona
SCFA	–	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
SFA	–	nasycone kwasy tłuszczowe

SPAN – stopień jednorodności rozmiaru cząstek

t – trans

T_{max} – maksimum piku

T_{onset} – początek przemiany fazowej

WB – masło wyprodukowane ze śmietanki serwatkowej uzyskanej z serwatki po produkcji sera Gouda

WBF – tłuszcz masła wyprodukowanego ze śmietanki serwatkowej uzyskanej z serwatki po produkcji sera Gouda

WI – indeks bieli

YI – indeks zażółcenia

ΔC* – całkowita różnica nasycenia

ΔE* – całkowita różnica barwy

$\Delta T_{1/2}$ – szerokość piku w połowie jego wysokości

ΔH – entalpia

Σt – suma kwasów tłuszczowych trans

Σc – suma kwasów tłuszczowych cis

Streszczenie

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) jest jedną z technik termoanalitycznych, która wykorzystywana jest do badania żywności, w tym mleka i produktów mleczarskich. Wynikiem analizy są krzywe DSC, na których dokonuje się wyznaczenia parametrów pików przemian fazowych.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej dotyczyły wykorzystania skaningowej kalorymetrii różnicowej do oceny wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich. Polegały one na określeniu przebiegu krzywych DSC i parametrów pików, ze szczególnym uwzględnieniem przemian fazowych tłuszczu mlekowego oraz scharakteryzowaniu różnic pomiędzy właściwościami termicznymi tych produktów. Rezultaty powiązano z profilem kwasów tłuszczowych. Określono wpływ obecności wody i zawartości tłuszczu w próbce oraz historii termicznej próbki na wyniki pomiaru analizy DSC. Do badań wykorzystano mleko krowie i owcze, śmietankę, maślankę słodką, masło wyprodukowane ze śmietanki oraz masło wytworzone ze śmietanki serwatkowej i ich tłuszcze.

W toku badań opracowano szeroką analizę charakterystyki termicznej związaną z tłuszczem mlekowym wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich, co można wykorzystać w przyszłych pracach badawczych. Wykazano możliwość zastosowania wszystkich parametrów pików przemian fazowych do oceny charakterystyki termicznej, jednak największą przydatność uzyskano stosując szerokość piku w połowie jego wysokości ($\Delta T_{1/2}$) do analizy pików egzotermicznych związanych z krystalizacją tłuszczu mlekowego oraz $\Delta T_{1/2}$, entalpię i wysokość piku do badania pików endotermicznych związanych z topnieniem tłuszczu mlekowego. Przebieg krzywych DSC oraz wartości parametrów pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego są bardziej zróżnicowane w przypadku pików endotermicznych w porównaniu z pikami egzotermicznymi i są zależne od profilu kwasów tłuszczowych, obecności wody i zawartości tłuszczu w próbce oraz historii termicznej próbki. Zawartość tłuszczu oraz profil kwasów tłuszczowych determinują liczbę i wartości parametrów pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego na krzywych DSC. Zmiana wartości parametrów pików jest związana z udziałem większości kwasów tłuszczowych oraz ich grup, przy czym szczególnie wyraźne powiązania odnotowano pomiędzy stosunkiem SFA i C12:0, C14:0, C16:0 do MUFA, PUFA i LCFA i C18:1. Redukcja zawartości wody w próbce pozwala na uniknięcie nakładania się pików przemian fazowych wody na piki przemian fazowych

tłuszczu mlekowego na krzywych DSC, a kształtowanie historii termicznej pozwala na uzyskanie stabilnych form kryształów tłuszczu, co wpływa na zmniejszenie zróżnicowania wyników.

Skaningowa kalorymetria różnicowa stanowi obiektywną technikę o wysokiej czułości do oceny przemian fazowych. Wyniki badań mogą znaleźć zastosowanie w analityce laboratoryjnej mleka i produktów mleczarskich, kontroli ich jakości oraz planowaniu procesów technologicznych w mleczarstwie.

Słowa kluczowe: skaningowa kalorymetria różnicowa; przemiany fazowe; mleko i produkty mleczarskie; tłuszcz mlekowy

Abstract

Differential scanning calorimetry (DSC) is one of thermoanalytical techniques that is increasingly used to analyze foods, including milk and dairy products. The results of such analyses are used to generate DSC curves and determine the characteristic parameters of phase transition peaks.

The research conducted as part of the doctoral dissertation focused on the applicability of DSC for evaluating selected types of milk and dairy products. The course of DSC curves and peak parameters were determined, with particular emphasis on the phase transitions of milk fat, and the differences between the thermal properties of the analyzed products were described. The results were linked to the fatty acid profile. The effects of the water and fat content of the sample, and the thermal history of the sample on the results of DSC analysis were determined. Bovine and ovine milk, sweet cream, sweet buttermilk, butter made from sweet cream, butter made from whey cream and their fats were used in the study.

The thermal characteristics of milk fat from the examined milk and dairy products were thoroughly analyzed in the study, and the results can be used in future research. It was found that all parameters of phase transition peaks can be used to evaluate thermal characteristics, but peak width at half height ($\Delta T_{1/2}$) was most useful for analyzing exothermic peaks associated with milk fat crystallization, whereas $\Delta T_{1/2}$, enthalpy and peak height were most useful for analyzing endothermic peaks associated with milk fat melting. The course of DSC curves and the parameters of milk fat phase transition peaks are more diverse in the case of endothermic than exothermic peaks, and they are affected by the fatty acid profile, the water and fat content of the sample, and the thermal history of the sample. The fat content and the fatty acid profile of the sample determine the number and values of the parameters of milk fat phase transition peaks on DSC curves. Changes in the values of peak parameters result from the proportions of most fatty acids and fatty acid groups, and particularly strong relationships were noted between SFAs and C12:0, C14:0 and C16:0 vs. MUFAs, PUFAs, LCFAs and C18:1. Decreased water content of the sample prevents the overlapping of water phase transition peaks with milk fat phase transition peaks in DSC curves, and shaping the thermal history allows to obtain stable forms of fat crystals, thus reducing the variability of results.

Differential scanning calorimetry is an objective and highly sensitive technique for evaluating phase transitions. The research results can be used in laboratory

analyses of milk and dairy products, quality control, and technological process planning in the dairy industry.

Key words: differential scanning calorimetry; phase transitions; milk and dairy products; milk fat

Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską

Podstawę niniejszej pracy stanowi cykl trzech artykułów naukowych powiązanych ze sobą tematycznie w zakresie wykorzystania skaningowej kalorymetrii różnicowej w ocenie mleka i produktów mleczarskich, które zostały opublikowane w czasopismach wymienionych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 22 lipca 2021 r.:

1) Publikacja I

Brożek O., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Characterisation of selected emulsion phase parameters in milk, cream and buttermilk*. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(1), 5–15.
DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/144223

IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt

Mój udział procentowy w powstanie ***Publikacji I*** *szacuję na* ***80%****. Polegał on na opracowaniu założeń i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych oraz współuczestnictwie w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu, a także na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.*

2) Publikacja II

Brożek O. **M.**, Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures*. International Dairy Journal, 129, 105339.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339

IF_{2021} = 3,032; IF_5 = 3,122; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt

Mój udział procentowy w powstanie ***Publikacji II*** *szacuję na* ***80%****. Polegał on na opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, na uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, a także byciu autorem korespondencyjnym.*

3) Publikacja III

Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *The physicochemical and sensory properties with special emphasis on thermal characteristics of whey butter from Gouda cheese production compared to milk butter*. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(4), 407–419.
DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/155838

IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt

Mój udział procentowy w powstanie ***Publikacji III*** *szacuję na* ***80%****. Polegał on na opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, a także byciu autorem korespondencyjnym*.

Zbiór wymienionych powyżej prac wraz z załącznikami i oświadczeniami kontrybucji współautorów publikacji poprzedzają streszczenie i obszerny opis, który stanowi syntezę załączonych publikacji i zawiera uzasadnienie celowości podjętych badań, opis metodyki oraz uzyskanych wyników i ich dyskusji, a także wnioski.

Sumaryczny IF_{2021} = 8,504
Sumaryczny IF_5 = 9,200
Suma punktów $MEiN_{2021}$ = 300 pkt

1. Wstęp

1.1. Skaningowa kalorymetria różnicowa – podstawowe informacje

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) należy do technik termoanalitycznych, w której różnica przepływu ciepła pomiędzy tyglem pomiarowym zawierającym badaną próbkę a tyglem odniesienia przedstawiona jest jako funkcja temperatury i/lub czasu. Pomiar przepływu ciepła pomiędzy tyglami musi się odbywać z zachowaniem tego samego programu temperaturowego (sekwencji) oraz atmosfery, przy wykorzystaniu symetrycznego systemu pomiarowego [Islam i in., 2022; ISO 11357-1, 2023; Żontała i in., 2015b]. Wynikiem pomiaru są krzywe DSC przedstawiające przepływ ciepła w funkcji temperatury, na których w konsekwencji zajścia egzotermicznych lub endotermicznych przemian fazowych w próbce obserwowane są zmiany przebiegu linii bazowej, które mogą przybrać formę pików. Na krzywej DSC obserwuje się pik endotermiczny odpowiadający przemianie fazowej pochłaniającej ciepło, gdy przepływ ciepła jest większy do tygla z próbką niż do tygla odniesienia. Pik egzotermiczny odpowiadający przemianie fazowej uwalniającej ciepło jest notowany na krzywej DSC, gdy przepływ ciepła jest większy do tygla odniesienia niż do tygla z próbką [ISO 11357-1, 2023]. W powszechnej praktyce na osi krzywej DSC zaznacza się kierunek endotermiczny lub egzotermiczny, przy czym na osi odciętych znajduje się temperatura lub czas a na osi rzędnych znajduje się przepływ ciepła [Islam i in., 2022; ISO 11357-1, 2023]. Oznaczenie kierunku na rzędnej jest ważne ze względu na interpretacje krzywej DSC, gdzie w przypadku kierunku egzotermicznego (na krzywych DSC oznaczane jako egzo lub exo) energia uwolniona przez układ jest uważana za dodatnią (reakcje egzotermiczne), a energia pobrana przez układ za ujemną (reakcje endotermiczne), natomiast przy oznaczeniu na rzędnej kierunku endotermicznego (endo) otrzymuje się odwrotną zależność [ISO 11357-1, 2023]. Otrzymanie krzywej DSC jest możliwe na podstawie przeprowadzenia odpowiedniej sekwencji analizy, składającej się z etapów m.in. ogrzewania i chłodzenia próbki przy ustalonej szybkości zmiany temperatury, czy też przetrzymania próbki w danej temperaturze. Analiza DSC może być przeprowadzana w szerokim zakresie temperatury od -90°C do 550°C [Leyva-Porras i in., 2020].

Atutem techniki DSC jest możliwość obserwacji niskoenergetycznych przemian fazowych, co można wykorzystywać w ocenie nawet małych zmian składu chemicznego

przy zachowaniu wysokiej dokładności wyników [Almoselhy, 2020; Tomaszewska-Gras, 2016]. Przebieg krzywych DSC oraz parametry pików przemian fazowych są zależne od wielu czynników, takich jak: zastosowane urządzenia badawcze, sekwencja analizy, sposób przygotowania próbki i jej masa, szybkość zmiany temperatury, czy też rodzaj tygla pomiarowego [Tomaszewska-Gras, 2013].

Dzięki oprogramowaniu analitycznemu można dokonywać pomiarów charakterystycznych parametrów pików przemian fazowych, do których należą za Żontała i in. [2015b]:

1) $\mathbf{T_{max}}$ – **maksimum piku** - wartość temperatury, przy której szybkość przemiany jest największa, co oznacza, że badany materiał pochłania lub wydziela w tym punkcie temperaturowym najwięcej ciepła w jednostce czasu.
2) $\mathbf{T_{onset}}$ – **temperatura początku przemiany fazowej** – punkt przecięcia się stycznej do nachylenia linii bazowej ze styczną do krzywej biegnącej do środka piku przemiany fazowej. Jest to wartość temperatury oznaczająca początek przemiany, przy której rozpoczyna się wydzielanie lub pochłanianie energii. Wyznaczona przez oprogramowanie T_{onset} nie zawsze odpowiada początkowi piku, szczególnie w przypadku nakładania się na siebie kilku pików, wobec czego można określić granice piku, którym odpowiadają punkty początku ($\mathbf{P_s}$) i końca ($\mathbf{P_e}$) piku.
3) $\mathbf{P_s}$ **– temperatura początku piku oraz** $\mathbf{P_e}$ **– temperatura końca piku** – wartości temperatury oznaczające granice piku przemiany fazowej.
4) **ΔH – entalpia** - powierzchnia piku określająca całkowity efekt energetyczny; całkowita ilość energii niezbędna do zajścia przemiany termicznej.
5) $\mathbf{\Delta T_{1/2}}$ – **szerokość piku w połowie jego wysokości** – różnica temperatury pomiędzy punktami znajdującymi się w połowie wysokości piku. Jest stosowana do szacowania szybkości przemiany fazowej, przy czym im mniejsza wartość $\Delta T_{1/2}$, tym przemiana fazowa zachodzi szybciej.
6) $\mathbf{P_{height}}$ – **wysokość piku** - różnica przepływu ciepła pomiędzy początkiem przemiany fazowej a maksimum sygnału piku.

1.2. Zastosowanie skaningowej kalorymetrii różnicowej w analizie żywności

Podczas produkcji żywności stosowanych jest wiele procesów związanych ze zmianą temperatury (np. suszenie, mrożenie, pasteryzacja) z towarzyszącymi im przemianami fazowymi, do których należą przemiany fizyczne

(np. krystalizacja, topnienie, parowanie) oraz chemiczne (np. hydroliza lub utlenianie). Przemiany te mają wpływ na właściwości żywności i mogą być analizowane za pomocą DSC [Islam i in., 2022; Żontała i in., 2015a]. Do celowych manipulacji temperaturowych wykorzystywanych w przetwórstwie żywności w celu kształtowania jej odpowiednich cech można zaliczyć dojrzewanie fizyczne śmietanki, które stosuje się w produkcji masła. Śmietanka jest podgrzewana i ochładzana do określonej temperatury i przetrzymywana w danej temperaturze w wyznaczonym czasie, co wpływa na proces krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego, a w konsekwencji na uzyskanie pożądanej konsystencji i smarowności masła, pomimo sezonowych wahań profilu kwasów tłuszczowych.

Mleko i produkty mleczarskie są układami wieloskładnikowymi, które charakteryzują się występowaniem wielu przemian fazowych w zbliżonym zakresie temperaturowym, co może skutkować nakładaniem się wzajemnie na siebie pików odpowiadającym przemianom fazowym poszczególnych składników. Dotyczy to także tłuszczu mlekowego, w którym każdy z kwasów tłuszczowych posiada inną charakterystykę termiczną, ale przemiany fazowe wielu z nich występują w podobnym zakresie temperaturowym. Utrudnia to jednoznaczną identyfikację pików przemian fazowych konkretnego kwasu tłuszczowego, ze względu na wzajemne nakładanie się na nie pików przemian fazowych innych kwasów tłuszczowych. Z tego powodu piki przemian fazowych obserwowane na krzywych DSC mleka odpowiadają zazwyczaj przemianom fazowym nie jednego, lecz wielu składników, które to przemiany zachodzą w zbliżonym zakresie temperaturowym. Tłuszcz mlekowy można podzielić na trzy główne frakcje pod względem topnienia: LMPF – frakcja niskotopliwa (ang. *low melting point fraction),* MMPF – frakcja średniotopliwa (ang. *medium melting point fraction)* oraz HMPF – frakcja wysokotopliwa (ang. *heigh melting point fraction)*. Frakcje te obserwowane są na krzywych DSC topnienia tłuszczu jako piki endotermiczne i charakteryzują przemiany fazowe grup kwasów tłuszczowych o zbliżonej temperaturze topnienia, których piki topnienia nakładają się na siebie tworząc pik topnienia danej frakcji [Anankanbil i in., 2018].

Skaningową kalorymetrię różnicową wykorzystano m.in. w badaniach mięsa [Christensen i in., 2011; Kajitani i in., 2011; Secci i in., 2019], ryb i owoców morza [Chen i in., 2022; Hamzeh i in., 2019; Schubring, 2009; Xingyi i in., 2013], białek roślinnych [Ricci i in., 2018; Wei i in., 2014], skrobi [Huang i in., 2021; Li i in., 2020], miodu [Dranca i in., 2022; Tomaszewska-Gras i Kijowski, 2010], olejów roślinnych i zafałszowań ich składu [Chatziantoniou i in., 2014; Islam i in., 2022; Huang i in., 2023;

Ostrowska-Ligęza i in., 2009; Rudakov i in., 2021; van Wetten i in., 2014; Zhang i in., 2013].

Technika DSC znalazła także szereg zastosowań w mleczarstwie, szczególnie w aspektach związanych z tłuszczem mlekowym. Na wyniki analizy DSC mleka, poza czynnikami związanymi z przeprowadzeniem doświadczenia, duży wpływ mają cechy osobnicze zwierząt determinujące skład mleka, w tym gatunek [Osthoff i in., 2011; Smiddy i in., 2012] i żywienie [Avramis i in., 2003; Couvreur i in., 2006]. Osthoff i in. [2011] badali mleka pochodzące od różnych ssaków, charakteryzujące się wysoką zawartością kwasów tłuszczowych MCFA, MUFA oraz PUFA i stwierdzili, że charakterystyka termiczna tych mlek różni się od siebie, co może zostać wykorzystane do ich identyfikacji. Smiddy i in. [2012] wykorzystali DSC do rozróżnienia tłuszczów mleka krowiego, koziego, owczego, bawolego, końskiego i wielbłądziego na podstawie charakterystyki topnienia i stwierdzili, że przebieg topnienia tłuszczów mleka krowiego, bawolego, owczego i koziego był do siebie zbliżony, lecz wyraźnie różnił się od przebiegu topnienia tłuszczów mleka końskiego i wielbłądziego. Avramis i in. [2003] użyli techniki DSC w ocenie wpływu dodatku mączki rybnej ze śledzia do paszy przeznaczonej do karmienia krów na właściwości mleka, masła i sera cheddar oraz zastosowali wyniki analizy DSC do oceny właściwości reologicznych masła i sera, poprzez określenie temperatury topnienia tłuszczu mlekowego, co wykorzystali także Couvreur i in. [2006] w badaniach wpływu karmienia krów zielonkami na właściwości mleka i masła. Aktaş i Kaya [2001] zastosowali DSC do wykrycia dodatku margaryny i tłuszczu wołowego do masła na podstawie obserwacji krzywej DSC krystalizacji tłuszczu. Technika DSC została oceniona jako czulsza w ocenie zmian składu triacylogliceroli niż metody chromatograficzne przy wykrywaniu dodatku oleju palmowego do masła [Rudakov i in., 2019; Saranov i in., 2021]. Upadhyay i in. [2017] z powodzeniem użyli techniki DSC do oceny zafałszowania składu ghee (rodzaj masła klarowanego) poprzez dodatek do niego tłuszczu koziego oraz oleju z orzeszków ziemnych. Hjalmarsson [2015] analizował techniką DSC charakterystykę termiczną serów dojrzewających, w których tłuszcz mlekowy zastąpiono częściowo olejami roślinnymi. Sobti i in. [2021] oceniali na podstawie krzywych DSC autentyczność składu oraz poziom dodatku olejów roślinnych do serów domowych chami. Tomaszewska-Gras [2012] posłużyła się techniką DSC do oceny zafałszowania składu masła dodatkiem wody. Pugliese i in. [2016] wykorzystali skaningową kalorymetrię różnicową do porównania charakterystyki termicznej mleka pełnego i mleka odtłuszczonego

w proszku podczas ich ogrzewania. Urgu-Öztürk i in. [2021] oceniali charakterystykę topnienia tłuszczu mlekowego w serze w proszku o obniżonej zawartości tłuszczu. Ostrowska-Ligęza i in. [2012] użyły DSC do oceny równomierności rozłożenia składników mleka po procesie suszenia w koncentratach mlecznych przeznaczonych do karmienia niemowląt. Bryś i in. [2021] w badaniach charakterystyki termicznej mleka ludzkiego i jego zamienników wykorzystali DSC m.in. w ocenie stabilności oksydacyjnej tłuszczu, natomiast Ramel i Marangoni [2017] do badania polimorfizmu tłuszczu mlekowego w serach topionych. Brożek i Bohdziewicz [2018] wykazali przydatność analizy DSC do porównania charakterystyki termicznej twarogów o różnej zawartości tłuszczu. Skaningowa kalorymetria różnicowa znalazła także zastosowanie do analizy obróbki termicznej białek serwatkowych [Górska i in., 2012; Frydenberg i in., 2016; Fitzsimons i in., 2006]. Mushtaq i in. [2019] wykorzystali skaningową kalorymetrię różnicową w celu potwierdzenia proteolizy białek w serze himalajskim.

1.3. Uzasadnienie wyboru problemu badawczego

Skaningowa kalorymetria różnicowa jest stosowana w badaniu żywności przez naukowców na całym świecie w celu analizy przemian fazowych oraz potencjalnego ich wykorzystania zarówno w analityce laboratoryjnej np. do oceny zmian składu oraz w przemyśle np. do kontroli procesu produkcji żywności. W dostępnej literaturze przedmiotu znaleziono jednak stosunkowo nieliczne badania skoncentrowane na charakterystyce termicznej produktów mleczarskich, przy czym nie przedstawiały one wnikliwej analizy krzywych DSC oraz parametrów pików fazowych, co mogłoby być nowym podejściem w nauce. Wobec tego aktualnie w literaturze zarysowuje się brak kompleksowego opracowania charakterystyki termicznej mleka i produktów mleczarskich, które pozwoliłoby na szersze zastosowanie skaningowej kalorymetrii różnicowej w mleczarstwie. W publikacjach wchodzących w skład cyklu stanowiącego pracę doktorską nowymi elementami badań pozwalającymi na poszerzenie wiedzy na temat charakterystyki termicznej mleka i produktów mleczarskich w stosunku do dostępnej literatury są: zastosowanie rozbudowanej sekwencji analizy DSC kształtującej historię termiczną próbki, eliminacja czynników wpływających na wyniki pomiaru np. poprzez ograniczenie zawartości wody w próbce, a także pomiar innych parametrów pików przemian fazowych niż maksimum piku, początek przemiany fazowej i entalpia oraz analiza zależności pomiędzy tymi parametrami.

Badania w publikacjach wchodzących w skład cyklu zostały podzielone na etapy. Po przeprowadzeniu badań wstępnych w pierwszym etapie badań właściwych określono charakterystykę termiczną wybranych surowców stosowanych w mleczarstwie, czyli mleka, śmietanki i maślanki, które były zróżnicowane między sobą głównie zawartością tłuszczu, profilem kwasów tłuszczowych i rozmiarem kuleczek tłuszczowych (**Publikacja I**). Kolejnym etapem było przeanalizowanie mleka pozyskanego od dwóch różnych gatunków ssaków, czyli mleka krowiego i mleka owczego oraz ich mieszanek i określenie różnic w ich charakterystyce termicznej (**Publikacja II**). Po stwierdzeniu różnic pomiędzy produktami oraz ustaleniu, że charakterystyka termiczna produktów analizowanych w **Publikacji I** i w **Publikacji II** przy zastosowaniu przyjętych sekwencji analizy DSC była najbardziej zależna od przemian fazowych tłuszczu mlekowego, w następnym etapie podjęto badania mające na celu wykorzystanie DSC do analizy wysokotłuszczowych produktów mleczarskich, jakimi były masło serwatkowe i masło wyprodukowane ze śmietanki oraz ich tłuszcze (**Publikacja III**).

Zamierzeniem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było:

- określenie charakterystyki termicznej mleka, śmietanki i maślanki słodkiej zróżnicowanych pod względem zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych, rozmiaru kuleczek tłuszczowych i historii termicznej próbki;
- wykorzystanie DSC do określenia różnic pomiędzy właściwościami termicznymi mleka krowiego i owczego oraz mieszanek tych rodzajów mleka, a także powiązanie zmian wartości parametrów pików przemian fazowych ze zmianami udziału kwasów tłuszczowych w tych produktach;
- ustalenie charakterystyki termicznej masła serwatkowego, masła ze śmietanki i ich tłuszczów przy wykorzystaniu skaningowej kalorymetrii różnicowej oraz określenie wpływu czynników, takich jak obecność wody w próbce, profil kwasów tłuszczowych i historia termiczna próbki na tę charakterystykę;
- zidentyfikowanie parametrów pików przemian fazowych najbardziej odpowiednich do oceny różnic pomiędzy charakterystyką termiczną badanych produktów.

Uzyskane odpowiedzi na zaprezentowane wyżej kwestie pozwolą na uzupełnienie wiedzy w zakresie analizy mleka i produktów mleczarskich pod względem ich charakterystyki termicznej.

Ważnymi przesłankami uzasadniającymi badania mleka i produktów mleczarskich jest złożoność składu samego mleka jako surowca i jego charakterystyczne

właściwości wśród innej żywności, skutkujące trudnościami analitycznymi. Ponadto ważnym aspektem, który skłania do podjęcia badań jest duży udział mleka i wyrobów mleczarskich na rynku oraz złożoność produkcji w przemyśle spożywczym, zarówno w dużych zakładach, jak i w wytwórniach zagrodowych, gdzie można będzie zastosować otrzymane rezultaty badań.

Lepsze zrozumienie charakterystyki termicznej mleka i produktów mleczarskich poza rozwojem zastosowań DSC w analizie laboratoryjnej być może będzie miało charakter aplikacyjny w przemyśle i pozwoli na optymalizację warunków produkcji żywności poprzez obserwację i kształtowanie zachodzących przemian fazowych, a w konsekwencji osiąganiem pożądanych właściwości produktu. Ważnym kierunkiem wykorzystania wyników może być również kontrola jakości mleka i produktów mleczarskich, w tym autentyczności składu danego surowca np. do identyfikacji rodzaju zastosowanego do produkcji mleka, poprzez kompleksową charakterystykę tłuszczu mlekowego. W tym aspekcie skaningowa kalorymetria różnicowa może być stosowana jako technika uzupełniająca lub alternatywna do obecnie stosowanych technik np. chromatografii gazowej czy metod genetycznych.

2. Cel pracy

2.1. Cel główny, cele szczegółowe i hipotezy badawcze pracy doktorskiej

Celem głównym badań było wykorzystanie skaningowej kalorymetrii różnicowej do oceny wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich. Tak sformułowanemu celowi głównemu podporządkowano następujące **cele szczegółowe**:

1. Scharakteryzowanie przebiegu krzywych DSC i pomiar parametrów pików przemian fazowych, ze szczególnym uwzględnieniem przemian fazowych tłuszczu mlekowego mleka krowiego i owczego oraz produktów mleczarskich: śmietanki, maślanki, masła otrzymanego ze śmietanki, masła serwatkowego i tłuszczów tych maseł.

2. Określenie przydatności parametrów pików przemian fazowych w ocenie charakterystyki termicznej tłuszczu mlekowego wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich.

3. Ustalenie wpływu obecności wody w próbce, zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych i historii termicznej próbki na wyniki pomiarów analizy DSC badanych rodzajów mleka i produktów mleczarskich.

4. Powiązanie wyników pomiaru parametrów pików przemian fazowych określonych przy wykorzystaniu analizy DSC z profilem kwasów tłuszczowych wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich.

Realizacja badań w ramach pracy doktorskiej służyła weryfikacji następujących **hipotez badawczych**:

1. Przebieg krzywych DSC oraz wartości parametrów pików przemian fazowych są charakterystyczne dla danego rodzaju mleka i produktu mleczarskiego.

2. Na podstawie przebiegu krzywych DSC oraz wyników pomiaru parametrów pików przemian fazowych możliwa jest ocena różnic pomiędzy charakterystyką termiczną mleka krowiego, mleka owczego i ich mieszanek, śmietanki, maślanki, masła ze śmietanki i masła serwatkowego oraz tłuszczów tych maseł.

3. Wszystkie z zastosowanych w pracy parametrów pików przemian fazowych mogą być wykorzystane do analizy charakterystyki termicznej tłuszczu mlekowego wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich.

4. Obecność wody i zawartość tłuszczu w próbce oraz historia termiczna próbki determinują wyniki pomiaru analizy DSC mleka i produktów mleczarskich.

5. Charakterystyka termiczna mleka krowiego i owczego oraz ich mieszanek, śmietanki i maślanki słodkiej, a także masła wyprodukowanego ze śmietanki i masła serwatkowego oraz tłuszczów tych maseł jest związana z profilem kwasów tłuszczowych.

6. Analiza DSC pozwala na zaobserwowanie niewielkich zmian składu mieszaniny mlek pochodzących od różnych gatunków ssaków na podstawie przebiegu krzywych DSC oraz wartości parametrów pików przemian fazowych.

3. Materiał i metody

3.1. Organizacja badań

Badania właściwe zostały poprzedzone nieopublikowanymi badaniami wstępnymi związanymi z doborem odpowiednich warunków przeprowadzenia analizy DSC oraz właściwym przygotowaniem próbki. Ustalono w nich w jaki sposób kształtują się właściwości termiczne, oceniono wpływ czynników związanych z przygotowaniem próbki na wyniki pomiarów różnych rodzajów mleka oraz ustalono odpowiednią sekwencję analizy DSC w taki sposób, aby wyeksponować piki przemian fazowych związanych z tłuszczem mlekowym, co stanowiło podstawę do sprecyzowania warunków przeprowadzenia analizy i selekcji materiału przeznaczonego do badań. Organizacja badań właściwych była podzielona na 3 etapy:

Etap 1 – Określenie charakterystyki termicznej (przebieg krzywych DSC oraz parametrów pików przemian fazowych) mleka, śmietanki i maślanki, zróżnicowanych pod względem zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych i rozmiaru kuleczek tłuszczowych oraz ocena wpływu zastosowania powtarzalnych etapów grzania i chłodzenia w sekwencji analizy DSC na charakterystykę termiczną tych produktów (**Publikacja I**).

Etap 2 – Zbadanie i porównanie charakterystyki termicznej mleka owczego i mleka krowiego oraz ich mieszanek jako surowców powszechnie wykorzystywanych w mleczarstwie, a także powiązanie rezultatów analizy DSC z profilem kwasów tłuszczowych oraz zawartością grup kwasów tłuszczowych w próbce (**Publikacja II**).

Etap 3 – Przeprowadzenie analizy DSC wysokotłuszczowych produktów na przykładzie masła serwatkowego i masła wyprodukowanego ze śmietanki oraz ich tłuszczów, porównanie ich charakterystyki termicznej. Następnie zbadanie czynników mających wpływ na charakterystykę termiczną badanych produktów: obecności wody, zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych i historii termicznej oraz powiązanie pomiarów DSC z profilem kwasów tłuszczowych oraz zawartością kwasów tłuszczowych i ich grup w próbce (**Publikacja III**)

3.2. Materiał badawczy

3.2.1. Publikacja I

Przedmiotem badań było mleko krowie od krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej pozyskane zgodnie z normą ISO 707 [2008] ze Stacji Badawczo-Dydaktycznej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Olsztynie znajdującej się w Bałdach w województwie Warmińsko-Mazurskim, które zostało schłodzone po udoju. Poprzez wirowanie mleka w laboratorium Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie uzyskano śmietankę, po czym ze śmietanki w wyniku procesu ciągłego zmaślania otrzymano maślankę. Do badań laboratoryjnych skierowano następujące materiały, przy czym produkty przeznaczone do analizy DSC podkreślono:

- Mleko krowie: surowe, zliofilizowane
- Śmietanka uzyskana po odwirowaniu mleka krowiego: surowa, zliofilizowana
- Maślanka uzyskana w trakcie procesu zmaślania metodą ciągłą: surowa, zliofilizowana

3.2.2. Publikacja II

Materiał badawczy obejmowały zbiorcze próbki mleka krowiego od krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej pozyskanego zgodnie z normą ISO 707 [2008] ze Stacji Badawczo-Dydaktycznej UWM w Olsztynie, znajdującej się w Bałdach w województwie Warmińsko-Mazurskim oraz zbiorcze mleko owcze pozyskane od owiec rasy Kamienieckiej karmionych systemem TMR (ang. *total mixed ration* – całkowicie wymieszana dawka), pozyskane z gospodarstwa rolnego w Komalwach, położonego w województwie Warmińsko-Mazurskim. Po udoju mleko zostało schłodzone a następnie przetransportowane w warunkach chłodniczych do laboratorium Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie, gdzie stworzono mieszanki mleka owczego z mlekiem krowim zawierające od 10 do 90% (w stosunku objętościowym), ze wzrastającym co 10% udziałem mleka krowiego. Do badań laboratoryjnych skierowano następujące materiały, przy czym produkty przeznaczone do analizy DSC podkreślono:

- Mleko krowie pełne: surowe, zliofilizowane
- Mleko owcze pełne: surowe, zliofilizowane
- 9 mieszanek mleka owczego z mlekiem krowim w zakresie 10–90% (w stosunku objętościowym) dodatku mleka krowiego do mleka owczego ze zmianą udziału co 10%: surowe, zliofilizowane

3.2.3. Publikacja III

Materiał badawczy stanowiły wyprodukowane metodą periodyczną masło ze śmietanki (MB) oraz masło serwatkowe wytworzone ze śmietanki serwatkowej, otrzymanej w wyniku produkcji sera Gouda (WB), pozyskane jako produkty końcowe ze Spółdzielni Mleczarskiej Rospuda w Filipowie, w województwie Podlaskim. Część próbek MB i WB roztopiono w 60°C, po czym odseparowano fazę tłuszczową od fazy wodnej oraz przefiltrowano fazę tłuszczową przez sączek, na którym znajdował się bezwodny wodorosiarczan sodu wyprażony w 150°C, dzięki czemu otrzymano tłuszcz masła ze śmietanki (MBF) oraz tłuszcz masła serwatkowego (WBF), które posłużyły do zbadania wpływu obecności wody w próbkach na wyniki analizy DSC.

Do badań laboratoryjnych skierowano następujące materiały, przy czym wszystkie produkty przeznaczono do analizy DSC:

- masło uzyskane ze śmietanki otrzymanej po wirowaniu mleka krowiego
- masło serwatkowe uzyskane ze śmietanki serwatkowej otrzymanej po wirowaniu serwatki, którą pozyskano w wyniku produkcji sera Gouda
- tłuszcz masła wytworzonego ze śmietanki
- tłuszcz masła wyprodukowanego ze śmietanki serwatkowej

3.3. Metody badawcze

3.3.1. Oznaczenie podstawowego składu chemicznego

W badaniach przedstawionych w **Publikacji I** surowe mleko, maślanka i śmietanka zostały poddane oznaczeniu zawartości suchej substancji [AOAC 990.20, 33.2.44, 2007], tłuszczu metodą butyrometryczną [ISO 19662, 2018; ISO 19660, 2018], azotu ogólnego metodą Kjeldahla i białka poprzez przemnożenie azotu ogólnego przez faktor 6,38 [AOAC 991.20, 33.2.11, 2007]. Zawartość suchej masy, białka i tłuszczu w liofilizatach oznaczono instrumentalnie wykorzystując NIRS™ DS2500 [FOSS, Hillerød, Dania].

Zawartość suchej masy, suchej masy beztłuszczowej, wody, białka, tłuszczu i laktozy w produktach surowych w **Publikacji II** oznaczono instrumentalnie przy wykorzystaniu MilkoScan™ FT 1200 [FOSS, Hillerød, Dania]. Zawartość suchej masy liofilizatów oznaczono według standardu AOAC [metoda 990.20; 33.2.44; AOAC, 2007], natomiast zawartość tłuszczu w liofilizatach metodą grawimetryczną Rose-Gottlieba według standardu ISO 1211 [ISO, 2010].

W **Publikacji III** zawartość suchej masy, suchej masy beztłuszczowej oraz wody masła wyprodukowanego ze śmietanki, masła serwatkowego oraz ich tłuszczów określono przy pomocy FoodScan Dairy Analyser [FOSS, Hilleroed, Denmark]. Zawartość tłuszczu tych produktów oznaczono metodą grawimetryczną Rose-Gottlieba wg standardu ISO 1211 [ISO, 2010].

3.3.2. Liofilizacja i oznaczenie aktywności wody liofilizatów

Produkty surowe w **Publikacji I** i **Publikacji II** zamrożono do -22°C a następnie zliofilizowano je przy zastosowaniu parametrów liofilizacji 0,34 mbar i -32°C wykorzystując liofilizator Alpha 1–2 LD plus [Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany].

Aktywność wody liofilizatów została oznaczona w 25°C przy wykorzystaniu analizatora aktywności wody AquaLab 4TEV [Meter Group AG, München, Germany] z dokładnością pomiaru punktu rosy ±0,003 i ±0,3°C.

3.3.3. Analiza mikroskopowa

Surowe próbki mleka, maślanki i śmietanki w **Publikacji I** obserwowano przy wykorzystaniu mikroskopu konfokalnego Nikon Eclipse TieC 1 [Nikon, Düsseldorf, Niemcy] przy 60-krotnym powiększeniu.

Mikrostrukturę zliofilizowanego mleka owczego, mleka krowiego oraz ich mieszanek w **Publikacji II** zbadano wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowy Quanta 200 [Thermo Fisher Scientific FEI Company, Hillsboro, OR, USA] przy zastosowaniu trzech powiększeń: 200, 800 i 1600-krotnego.

3.3.4. Rozmiar kuleczek tłuszczowych

Rozmiar kuleczek tłuszczowych surowych próbek mleka, maślanki i śmietanki w **Publikacji I** oznaczono metodą dyfrakcji laserowej przy wykorzystaniu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 3000 z przystawką Hydro EV [Malvern Instrument, Malvern, Wielka Brytania]. Pomiar przeprowadzono przy współczynniku refrakcji mleka 1,46 i wody dejonizowanej Milli-Q [Millipore, Molsheim, France] 1,33. Oznaczono d_v10, d_v50, d_v90 (średnica, przy której odpowiednio 10%, 50% i 90% całego rozkładu wielkości cząstek znajduje się poniżej tej wartości), a także:

– SPAN – stopień jednorodności rozmiaru cząstek: $SPAN = (d_v90 - d_v10)/d_v50$;
– d_{43} – średnica de Brouckere'a: $d_{43} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$,
– d_{32} – średnica Sautera: $d_{32} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$,
gdzie: n_i – liczba cząstek o średnicy d_i.

3.3.5. Oznaczenie zawartości kwasów tłuszczowych

Tłuszcz mlekowy w **Publikacji I**, **Publikacji II** oraz w **Publikacji III** ekstrahowano metodą Rose-Gottlieba [ISO 1211, 2010]. Estry kwasów tłuszczowych przygotowano zgodnie ze standardem ISO 15884 [ISO, 2002]. Profil kwasów tłuszczowych został oznaczony techniką chromatografii gazowej przy wykorzystaniu chromatografu z detekcją płomieniowo-jonizacyjną 7890 A [Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA]. Separacja była przeprowadzona na kolumnie CP-Sil 88 o długości 100m, średnicy 0,25mm, grubości filmu 0,20µm [Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA]. Parametry rozdziału: temperatura kolumny 60°C (1min) do 180°C, przyrost temperatury 5°C/min, temperatura dozownika 225°C, temperatura detektora 250°C,

gaz nośny: hel, przepływ gazu: 0,8ml/min, podział strumienia 1:100 (w **Publikacji I** i w **Publikacji II**) lub 1:50 (w **Publikacji III**), objętość próbki 1µl, liner 0,4mm. Próbkę referencyjną stanowił bezwodny tłuszcz mlekowy BCR-164 [LGC Standards, Kiełpin, Polska].

Na podstawie rezultatów pomiaru profilu kwasów tłuszczowych obliczono udział ich poszczególnych grup, przy czym wyróżniono kwasy tłuszczowe: nasycone (SFA), jednonienasycone (MUFA), wielonienasycone (PUFA), krótkołańcuchowe (SCFA: C4–C8), średniołańcuchowe (MCFA: C10–C15 w **Publikacji I** i w **Publikacji II** lub C10–C16 w **Publikacji III**), długołańcuchowe (LCFA: C17–C19 w **Publikacji I** i w **Publikacji II** lub C16–C19 w **Publikacji III**) oraz o rozgałęzionym łańcuchu węglowym (BCFA). Zależnie od przyjętej systematyki w danej publikacji kwas C16 należał do MCFA (**Publikacja I i Publikacja II**) lub do LCFA (**Publikacja III**). Na podstawie profilu kwasów tłuszczowych oraz zawartości tłuszczu w liofilizatach obliczono zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych (**Publikacja II**) oraz ich grup w g/100g liofilizatów (**Publikacja I**, **Publikacja II)**.

3.3.6. Analiza DSC

Analiza DSC w **Publikacji I**, **Publikacji II** i **Publikacji III** została przeprowadzona za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego DSC Q10 wyposażonego w zamknięty system chłodzenia RCS [TA Instruments, New Castle, DE, USA], wykalibrowanego za pomocą indu oraz kondycjonowanego w celu usunięcia wilgoci z instalacji. Komputerową obróbkę wyników wykonano przy wykorzystaniu programu Universal Analysis 2000 [TA Instruments, New Castle, DE, USA]. Wykorzystano następujące warunki analizy: rodzaj tygla pomiarowego: zamknięty aluminiowy tygiel pomiarowy; próbka referencyjna: pusty tygiel pomiarowy; gaz: azot o czystości 99,999%; przepływ gazu: 50ml/min; szybkość zmiany temperatury: 10°C/min. Masa próbki w **Publikacji I** i w **Publikacji III** wynosiła 10±1mg, natomiast w **Publikacji II** 3±1mg. Próbki ważono wykorzystując wagę laboratoryjną Mettler Toledo XS205 Dual Range [Mettler Toledo, Columbus, OH, USA].

Sekwencja analizy DSC w publikacjach składała się z następujących cykli i etapów:

a) **Publikacja I**:

Analiza DSC została podzielona na dwa cykle następujące po sobie:

Cykl I składający się z dwóch etapów:

Etap 1) chłodzenie próbki od 30°C do -40°C

Etap 2) grzanie próbki od -40°C do 95°C

Cykl II składający się z sześciu etapów:

Etapy 1, 3, 5) chłodzenie próbki od 95°C do -40°C

Etapy 2, 4, 6) grzanie próbki od -40°C do 95°C

b) **Publikacja II**:

Analiza DSC stanowiła jeden cykl i składała się z następujących po sobie trzech etapów:

Etap 1) grzanie próbki od 10°C do 95°C

Etap 2) chłodzenie próbki od 95°C do -40°C

Etap 3) grzanie próbki od -40°C do 40°C

c) **Publikacja III**:

Analiza DSC została podzielona na dwa cykle następujące po sobie:

Cykl I składający się z dwóch etapów:

Etap 1) grzanie próbki od -40°C do 95°C

Etap 2) chłodzenie próbki od 95°C do -40°C

Cykl II składający się z sześciu etapów:

Etapy 1, 3, 5) grzanie próbki od -40°C do 95°C

Etapy 2, 4, 6) chłodzenie próbki od 95°C do -40°C

W każdej opublikowanej pracy (**Publikacja I**, **Publikacja II**, **Publikacja III**) czas przetrzymania próbki w temperaturze końcowej każdego etapu wynosił 1 min. Na krzywych DSC przedstawiono na osi rzędnych kierunek egzotermiczny. Oznaczono następujące charakterystyczne parametry przemian fazowych: T_{max} (maksimum piku; °C); T_{onset} (początek przemiany fazowej; °C); $\Delta T_{1/2}$ (szerokość piku w połowie jego wysokości; °C); ΔH (entalpia; J/g); P_{height} (wysokość piku stanowiąca różnicę przepływu ciepła pomiędzy T_{max} a P_s; W/g) (**Publikacja I**, **Publikacja II** i **Publikacja III**); P_s (punkt początku formowania piku; °C) i P_e (punkt końca formowania piku; °C) (**Publikacja I** i **Publikacja III**).

3.3.7. Analiza barwy

Analiza barwy MB i WB w **Publikacji III** została przeprowadzona w systemie CIELAB i wyrażona w trzech wartościach: L*, jasność od czerni (0) do bieli (100); a*, od zielonego (-60) do czerwonego (+60); b*, od niebieskiego (-60) do żółtego (+60) przy pomocy CR-400 Chroma Meter [Konica Minolta Sensing Americas, Inc., USA]. Wyniki posłużyły do przeliczenia za Pathare i in. [2013]: nasycenia C* według wzoru $C^*=(a^{*2}+b^{*2})^{0,5}$; indeksu bieli (WI) według wzoru $WI=100-[(100-L^*)^2+(a^*)^2+(b^*)^2]^{0,5}$; indeksu zażółcenia (YI) według wzoru $YI=142,86b^*/L^*$; całkowitej różnicy nasycenia (ΔC^*) pomiędzy MB i WB według wzoru $\Delta C^*=(C_{MB}{}^{*2}-C_{WB}{}^{*2})$ oraz całkowitej różnicy barwy (ΔE^*) pomiędzy WB i MB według wzoru $\Delta E^*=[(L_{MB}{}^*-L_{WB}{}^*)^2+(a_{MB}{}^*-a_{WB}{}^*)^2+(b_{MB}{}^*-b_{WB}{}^*)^2]^{0,5}$.

3.3.8. Analiza tekstury

Analizę tekstury MB i WB w **Publikacji III** przeprowadzono przy wykorzystaniu analizatora tekstury TA.XT.plus z oprogramowaniem komputerowym Texture Exponent 32 [Stable Micro Systems, Godalming, Wielka Brytania]. Próbki masła przechowywano w warunkach chłodniczych w temperaturze 6±1°C i w takiej temperaturze dokonano pomiarów w komorze termostatycznej [Temperature Applied Sciences Ltd, West Sussex, Wielka Brytania] chłodzonej ciekłym azotem z cylindra XL-120 [Taylor-Wharton Gas Equipment Sdn. Bhd., Shah Alam, Selangor, Malezja]. Przeprowadzono test penetracji z głowicą cylindryczną P/6 przy zadanej głębokości 20mm i prędkości przesuwu głowicy 2mm/s oznaczając twardość (N), kohezyjność (N), konsystencję (N×s) oraz indeks lepkości (N×s). Twardość reprezentowana była poprzez wartość pomiaru maksymalnej siły potrzebnej do wbicia głowicy w próbkę. Kohezyjność odpowiadała maksymalnej sile potrzebnej do wyciągnięcia głowicy z próbki, podczas powrotu głowicy do stanu początkowego. Konsystencja i indeks lepkości zostały wyznaczone jako pole pod krzywą siły w funkcji czasu poprzez penetrację próbki i powrót głowicy do pozycji początkowej a ich ujemne wartości wynikały z kierunku ruchu głowicy penetrującej.

3.3.9. Ocena sensoryczna

Ocena sensoryczna masła wyprodukowanego ze śmietanki oraz masła serwatkowego została przeprowadzona według pięciostopniowej skali punktowej zgodnie z normą ISO 13299 [2016] przez zespół ośmiu panelistów wyposażonych w karty

produktu oraz punktacji, których wrażliwość smakowa została potwierdzona zgodnie z normą ISO 8586 [2014]. Do oceny sensorycznej wzięto pod uwagę deskryptory opisujące: wygląd (1 deskryptor: jednolitość barwy), zapach (4 deskryptory: orzechowy, mlekowy, pasteryzacji, serowy), konsystencja (3 deskryptory: zwięzłość, twardość, kruchość) oraz smak (4 deskryptory: orzechowy, mlekowy, pasteryzacji, serowy)

3.3.10. Analiza statystyczna

Badania realizowane w **Publikacji I**, w **Publikacji II** i w **Publikacji III** przeprowadzono w trzech równoległych pomiarach dla każdej próbki. Rozkład normalny wszystkich wyników w **Publikacji I** i w **Publikacji II** i parametrów pików przemian fazowych w **Publikacji III** zweryfikowano testem Shapiro-Wilka, po czym wykonano test istotności różnic stosując test Duncana (α=0,05) i jednoczynnikową analizę wariancji. Wyniki profilu kwasów tłuszczowych, oceny sensorycznej oraz parametrów barwy i tekstury w **Publikacji III** zostały przeanalizowane za pomocą testu *t*-Studenta ($p \leq 0,05$).

W celu określenia stopnia powiązania wartości poszczególnych zmiennych ze zmianą udziału mleka krowiego w mieszankach mleka owczego z mlekiem krowim w **Publikacji II** wykonano analizę korelacji liniowej Pearsona przy α=0,01 pomiędzy zawartością kwasów tłuszczowych i wartościami parametrów pików przemian fazowych a udziałem mleka krowiego w mieszankach mleka owczego z mlekiem krowim.

Analiza głównych składowych (PCA) została wykorzystana w **Publikacji I** do określenia zależności pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych a rodzajem próbki (mleko, maślanka i śmietanka). W **Publikacji II** analizę PCA wykorzystano do ustalenia powiązań pomiędzy wartościami parametrów pików przemian fazowych, profilem kwasów tłuszczowych, zawartością kwasów tłuszczowych i ich grup w produktach oraz zawartością tłuszczu w zależności od rodzaju produktu (mleko krowie, mleko owcze i mieszanki mleka owczego z mlekiem krowim w zakresie dodatku mleka krowiego do mleka owczego 10–90% w stosunku objętościowym, ze zmianą udziału mleka krowiego co 10%). Analiza głównych składowych w **Publikacji III** posłużyła do określenia związku pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych a parametrami pików przemian fazowych w zależności od rodzaju próbki (tłuszcz masła serwatkowego i tłuszcz masła ze śmietanki).

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu programu Statistica v. 13.1 [StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA].

4. Wyniki i dyskusja

Wykorzystując technikę DSC przeprowadzono badania tradycyjnych surowców i produktów mleczarskich zróżnicowanych pod względem charakterystyki tłuszczu mlekowego, niemodyfikowanych w żaden sposób wykraczający poza klasyczne technologie. Przyjęte sekwencje analizy DSC pozwoliły na obserwację przemian fazowych związanych z tłuszczem mlekowym. Do badania wszystkich produktów zastosowano takie same warunki przeprowadzania analizy DSC, w tym dotyczące kalibracji, kondycjonowania, wykorzystanego gazu oraz jego przepływu, rodzaju tygli pomiarowych, czy szybkości zmiany temperatury (za optymalną do przedstawienia przemian fazowych związanych z tłuszczem mlekowym ustalono 10°C/min). Główną różnicą pomiędzy przeprowadzeniem analizy DSC w poszczególnych publikacjach było zastosowanie innych sekwencji (podzielonych na cykle i etapy), aby jak najlepiej wyeksponować piki przemian fazowych związanych z tłuszczem mlekowym i wykorzystać je do osiągnięcia odpowiedzi na zadane cele w poszczególnych pracach.

4.1. Charakterystyka termiczna maślanki, mleka i śmietanki – Publikacja I

Publikacja I miała na celu kompleksowe przedstawienie parametrów fazy emulsyjnej, takich jak zawartość tłuszczu, rozmiar kuleczek tłuszczowych, profil kwasów tłuszczowych oraz właściwości termicznych mleka, śmietanki i słodkiej maślanki. Porównano przebieg krzywych DSC mleka, maślanki i śmietanki, ze szczególnym uwzględnieniem przemian fazowych tłuszczu mlekowego oraz dokonano pomiaru charakterystycznych parametrów pików przemian fazowych, a także oceniono wpływ historii termicznej próbek na kształt krzywych oraz wyniki pomiarów parametrów pików przemian fazowych. Przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) w celu określenia zależności pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych a rodzajem próbki.

Maślanka, mleko oraz śmietanka były zróżnicowane pod względem zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych, rozmiarów kuleczek tłuszczowych oraz mikrostruktury. Największa zawartość tłuszczu oraz rozmiar kuleczek tłuszczowych była w śmietance, a najmniejsza w maślance. Udział LCFA w tłuszczu maślanki, mleka i śmietanki wzrastał w następującej kolejności mleko, maślanka, śmietanka, przy czym odwrotne zależności odnotowano w zawartości MCFA. Najwięcej MUFA i PUFA kwasów tłuszczowych oznaczono w maślance, a najmniej w mleku, co wynika prawdopodobnie z wysokiej zawartości składników otoczek kuleczek tłuszczowych.

Kuleczki tłuszczowe śmietanki uległy aglomeracji, o czym świadczy wystąpienie aglomeratów, natomiast w przypadku maślanki zaobserwowano wiskolizację, czego wynikiem było występowanie drobnych łańcuchów kuleczek tłuszczowych.

Aby uniknąć wpływu obecności wody na wyniki analizy DSC próbki poddano liofilizacji i uzyskano liofilizaty o a_w=0,05–0,08 maślanki (o zawartości suchej masy 97,83%±0,47%, tłuszczu 5,70%±0,17% i białka 34,72%±0,12%), mleka (o zawartości suchej masy 97,73%±0,69%, tłuszczu 29,64%±0,33% i białka 24,79%±0,25%) oraz śmietanki (o zawartości suchej masy 97,89%±0,24%, tłuszczu 84,37%±0,30% i białka 5,08%±0,20%).

Krzywe DSC zliofilizowanych próbek maślanki, mleka i śmietanki różniły się od siebie znacząco przebiegiem oraz charakterystyką pików przemian fazowych. Te same oznaczenia literowe na krzywych DSC maślanki, mleka i śmietanki w **Publikacji I** wskazują analogiczne w stosunku do siebie piki (**Publikacja I**, Fig. 3, 4). Zawartość tłuszczu w próbce determinowała m.in. liczbę pików oraz ich wielkość reprezentowaną przez wartości ΔH oraz P_{height}, które wzrastały wraz ze zwiększeniem zawartości tłuszczu w produkcie (**Publikacja I**, Fig. 3, 4; Table 4, 5). Różnice w charakterystyce pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego (**Publikacja I**, Fig. 3, 4; Table 4, 5) były zależne od zawartości tłuszczu, która przekładała się na zawartość kwasów tłuszczowych w próbkach (**Publikacja I**, Table 3).

Podczas chłodzenia próbek od 30°C do -40°C (w cyklu I) i od 95°C do -40°C (w cyklu II) w maślance odnotowano tylko jeden pik egzotermiczny (A), w mleku zaobserwowano dwa piki egzotermiczne (A i B), natomiast w śmietance trzy piki egzotermiczne (A, B i C) (**Publikacja I**, Fig. 3). Pik A występował w zależności od próbki w zakresie temperatury od ok. 11°C do -40°C (maślanka, mleko i śmietanka), pik B był niewyraźnie rozdzielony od piku A i występował w zakresie temperatury od ok. 15°C do 11°C (mleko i śmietanka), natomiast pik C od ok. 20–22°C do ok. 15°C (tylko w śmietance) (**Publikacja I**, Fig. 3). Stwierdzono, że pik A był związany z zawartością MUFA i PUFA (szczególnie C18:1), natomiast piki B i C były związane z zawartością SFA (głównie C14:0, C16:0 i C18:0). Piki egzotermiczne A, B i C były związane z krystalizacją tłuszczu mlekowego na co wskazują dane literaturowe [Hokannen i in., 2021; Michalski i in., 2004; Tomaszewska-Gras, 2013; Truong i in., 2014].

We wszystkich próbkach podczas grzania od -40°C do 95°C (w cyklu I i w cyklu II) odnotowano dwa piki endotermiczne nazwane D i E, które według danych

literaturowych były związane z topnieniem tłuszczu mlekowego [Hokannen i in., 2021; Michalski i in., 2004] (**Publikacja I**, Fig. 4). Pik D nie posiadał wyraźnego początku piku a jego koniec znajdował się w zakresie temperatury 18–24°C. Był to pik związany z niecałkowicie rozdzielonymi od siebie pikami topnienia LMPF i MMPF. Pik E występował w zakresie temperatur od ok. 18–24°C do ok. 34–42°C i był związany z topnieniem HMPF. Tomaszewska-Gras [2013] odnotowała podobny przebieg nierozdzielonych od siebie pików związanych z topnieniem LMPF i MMPF tłuszczu mlekowego oraz wyraźnie rozdzielony od nich pik odpowiadający topnieniu HMPF.

Sekwencja analizy DSC w **Publikacji I** została podzielona na dwa cykle, aby zaobserwować różnice pomiędzy charakterystyką krzywych DSC przy łagodnej obróbce temperaturowej próbki (cykl I: etap 1 – chłodzenie od 30°C do -40°C, etap 2 – ogrzewanie od -40°C do 95°C) w stosunku do wielokrotnego grzania i chłodzenia próbki w szerokim zakresie temperatur od -40°C do 95°C (cykl II: etapy 1, 3 i 5 – ogrzewanie od -40°C do 95°C, etapy 2, 4 i 6 – chłodzenie od 95°C do -40°C). W przypadku chłodzenia, gdzie odnotowano piki krystalizacji tłuszczu, nie zaobserwowano znaczących zmian w przebiegu krzywych DSC pomiędzy cyklem I (**Publikacja I**, Fig. 3a) a cyklem II (**Publikacja I**, Fig. 3b), natomiast w przypadku topnienia tłuszczu krzywe DSC tego samego produktu różniły się od siebie w cyklu I (**Publikacja I**, Fig. 4a), jednak różnice te zanikły w cyklu II (**Publikacja I**, Fig. 4b). Przeprowadzenie cyklu II poskutkowało mniejszym zróżnicowaniem wyników (mniejsze odchylenie standardowe), szczególnie w wartościach parametrów opisujących piki endotermiczne topnienia frakcji tłuszczu mlekowego na krzywych DSC śmietanki (**Publikacja I**, Table 5). Dodatkowo pomiędzy parametrami pików endotermicznych niektóre ze statystycznie istotnych różnic odnotowano jedynie w cyklu II analizy DSC, co dotyczyło $\Delta T_{1/2}$, P_s oraz P_e ($p \leq 0{,}05$) (**Publikacja I**, Table 5). Wykazane różnice świadczą o tym, że wielokrotne chłodzenie i ogrzewanie próbki wpływa na proces krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego maślanki, mleka i śmietanki. Przebieg krzywych DSC nie zmienia się znacząco podczas stosowania dalszych etapów grzania i chłodzenia próbek po uprzednim dwukrotnym przeprowadzeniu tych etapów, co świadczy o odwracalności obserwowanych przemian. Z tego względu zastosowanie wielokrotnego grzania i chłodzenia pozwala na dokładniejszą analizę DSC mleka, maślanki i śmietanki w aspekcie porównywania tych produktów między sobą, poprzez osiągnięcie stabilnego przebiegu krzywej DSC oraz zmniejszenia zróżnicowania wyników pomiędzy powtórzeniami analizy DSC próbek tego samego

produktu, co jest korzystne z punktu widzenia analitycznego. Według danych literaturowych zmiana przebiegu krzywych DSC poprzez kształtowanie historii termicznej wynika z polimorfizmu kryształów tłuszczu, które przechodzą z niestabilnej formy heksagonalnej α w stabilne formy β i β' [Fredrick i in., 2011; Hondoh i Ueno, 2016; 2009; Staniewski i in., 2021; Viriato i in., 2019; Wiking i in., 2009].

W mleku i maślance w cyklu I odnotowano nieuformowany w pełni endotermiczny pik F o początku w ok. 40°C i o końcu poza zastosowanym w sekwencji analizy DSC zakresem temperaturowym (>95°C) (**Publikacja I**, Fig. 4a). Pik ten wystąpił jedynie w cyklu I sekwencji analizy DSC, w przeciwieństwie do pozostałych pików endotermicznych D i E. Świadczy to o zajściu w cyklu I nieodwracalnej przemiany fazowej, przez co nie odnotowano piku F w cyklu II (**Publikacja I**, Fig. 4b). Charakterystyka tego piku różniła się pomiędzy próbkami maślanki i mleka, przy czym większy pik odnotowano w maślance, co mogło wynikać z różnic w zawartości białka w liofilizatach. Pik F na krzywej DSC mleka i maślanki prawdopodobnie był związany z denaturacją białek, która jest przemianą nieodwracalną, co tłumaczyłoby nieodnotowanie piku F w cyklu II na krzywych mleka i maślanki oraz na krzywej DSC śmietanki w obu cyklach. Ostrowska-Ligęza i in. [2012] oraz Szulc i in. [2016] zaobserwowali pik związany z denaturacją białka w mleku w proszku, który zaczynał się od ok. 40°C i kończył w temperaturze ok. 140°C, przy czym maksimum tego piku wynosiło ok. 105°C.

Parametry pików egzotermicznych i endotermicznych przemian fazowych różniły się pomiędzy produktami ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 4, 5). Zarówno w cyklu I, jak i cyklu II w obu typach pików najniższe wartości $\Delta T_{1/2}$ odnotowano w śmietance ($p \leq 0,05$), co wskazuje na to, że przemiany fazowe krystalizacji i topnienia tłuszczu śmietanki przebiegały najszybciej (**Publikacja I**, Table 4, 5). Jedynym wyjątkiem był pik D w cyklu I, którego wartość $\Delta T_{1/2}$ nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy śmietanką a pozostałymi produktami ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 5). Zdecydowanie większe wartości ΔH oraz P_{height} pików egzotermicznych, a także pików endotermicznych w porównaniu z mlekiem i maślanką odnotowano w śmietance, co było związane ze znacznie większą zawartością tłuszczu oraz kwasów tłuszczowych w produkcie (**Publikacja I**, Table 4, 5). Wartości T_{max} pików egzotermicznych A i B (ze względu na brak możliwości ich odseparowania analizowanych wspólnie) były największe w przypadku śmietanki i różniły się statystycznie istotnie pomiędzy produktami ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 4). Wartość T_{max} endotermicznego piku D w cyklu II była

statystycznie istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi produktami ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 5).

Początek przemiany fazowej reprezentowany przez wartości T_{onset} różnił się pomiędzy produktami w przypadku pików egzotermicznych A i B oraz endotermicznych D i E w cyklu II, natomiast w cyklu I statystycznie istotne różnice odnotowano jedynie w przypadku pików A i B pomiędzy mlekiem a pozostałymi produktami ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 4, 5). Najwyższe wartości T_{onset} pików A i B odnotowano w mleku w przypadku obu cykli analizy DSC, co świadczy o tym, że krystalizacja tłuszczu następowała najszybciej w mleku w porównaniu z pozostałymi produktami (**Publikacja I**, Table 4). Topnienie LMPF i MMPF (reprezentowane przez pik D) oraz HMPF (pik E) śmietanki w cyklu II przebiegało w wyższej temperaturze w porównaniu z pozostałymi produktami (**Publikacja I**, Table 5). Wartość początku pików egzotermicznych A i B w obu cyklach była największa w mleku, podobnie jak wartość T_{onset}, choć nie różniła się statystycznie istotnie od wartości P_s maślanki ($p > 0,05$), natomiast P_s pików egzotermicznych A i B różniły się istotnie statystycznie pomiędzy mlekiem i maślanką a śmietanką ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 4). P_s endotermicznego piku E w cyklu II podobnie jak wartości T_{onset} były największe w śmietance, a najmniejsze w mleku. P_e endotermicznych pików D i E różniły się statystycznie istotnie jedynie w cyklu II, przy czym największe wartości P_e piku D odnotowano w śmietance a najmniejsze w mleku, natomiast największe wartości P_e piku E odnotowano w mleku, a najmniejsze w maślance ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 5).

Wartości $\Delta T_{1/2}$ pików A i B maślanki oraz C śmietanki różniły się statystycznie istotnie pomiędzy cyklem I a cyklem II ($p \leq 0,05$), co pozwoliło stwierdzić, że tłuszcz maślanki ulegał szybszej, natomiast tłuszcz śmietanki wolniejszej krystalizacji podczas wielokrotnego grzania i chłodzenia w porównaniu z pierwszym chłodzeniem próbki (**Publikacja I**, Table 4). Porównanie parametrów pików endotermicznych D i E związanych z topnieniem tłuszczu pomiędzy cyklami wykazało statystycznie istotne różnice w mleku pomiędzy T_{max} piku D, $\Delta T_{1/2}$ i ΔH pików D i E, a także P_e piku D oraz w maślance pomiędzy $\Delta T_{1/2}$ i ΔH pików D i E, T_{onset} i P_e piku D, oraz P_s i P_e piku E ($p \leq 0,05$) (**Publikacja I**, Table 5). Nie wykazano różnic pomiędzy cyklem I i cyklem II w pozostałych parametrach pików oraz w śmietance ($p > 0,05$) (**Publikacja I**, Table 4, 5).

Podsumowując maślanka, mleko i śmietanka różniły się między sobą pod względem przebiegu krzywych DSC oraz wartościami parametrów przemian fazowych krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego. Proces wielokrotnego

chłodzenia i ogrzewania próbki wpływa na mniejsze zróżnicowanie wyników analizy DSC, co można stosować w aspekcie porównywania charakterystyki termicznej mleka, maślanki i śmietanki między sobą. Zawartość tłuszczu i kwasów tłuszczowych determinuje liczbę obserwowanych pików oraz ich wielkość. W śmietance można zaobserwować dodatkowy pik egzotermiczny związany z krystalizacją tłuszczu oraz wyższe wartości entalpii przemiany fazowej i wysokości pików, w porównaniu z mlekiem i maślanką, co prawdopodobnie jest związane z większą zawartością tłuszczu i kwasów tłuszczowych w produkcie w stosunku do mleka i maślanki. Przy planowaniu dalszego zastosowania w badaniach i aplikacji w przemyśle należałoby wziąć pod uwagę T_{max}, P_{height} oraz $\Delta T_{1/2}$ pików egzotermicznych związanych z krystalizacją oraz $\Delta T_{1/2}$, P_{height} oraz ΔH pików endotermicznych związanych z topnieniem tłuszczu mlekowego maślanki, mleka i śmietanki.

4.2. Charakterystyka termiczna mleka owczego, mleka krowiego oraz ich mieszanek – Publikacja II

Publikacja II miała na celu porównanie właściwości termicznych oraz profilu kwasów tłuszczowych mleka owczego, mleka krowiego oraz mieszanek mleka owczego z mlekiem krowim o różnym udziale mleka krowiego. Oceniono wpływ różnic udziału mleka krowiego w mieszankach na zmiany składu kwasów tłuszczowych, przebieg krzywych DSC oraz wartości parametrów pików przemian fazowych, co nie było dotychczas badane w dostępnej literaturze.

Surowe mleko owcze charakteryzowało się większą zawartością kwasów tłuszczowych C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:0*i*, C15:0*ai*, C16:0*i*, C18:0, C18:1*Σt*, C18:2, C18:3 oraz PUFA, SCFA, LCFA i BCFA w stosunku do surowego mleka krowiego natomiast surowe mleko krowie charakteryzowało się większą zawartością C10:1, C11:0, C13:0, C13:0*ai*, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0 i C16:1 oraz SFA i MCFA w stosunku do surowego mleka owczego ($p \leq 0{,}05$) (**Publikacja II**, Table 1).

Opierając się na ustaleniach z **Publikacji I** do przeprowadzenia analizy DSC próbki zliofilizowano a ich podstawowy skład chemiczny oraz aktywność wody zostały przedstawione w Table 2 (**Publikacja II**). Zawartość tłuszczu w mleku owczym była wyższa niż w mleku krowim, przez co w liofilizatach zmniejszała się wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach, przy czym nie zaobserwowano podobnych zależności w przypadku zawartości suchej masy. Zawartość wszystkich grup kwasów tłuszczowych w przeliczeniu na 100g produktu wzrastała wraz z udziałem mleka

owczego w mieszankach, przy czym najwięcej statystycznie istotnych różnic pomiędzy próbkami odnotowano w zawartości SFA, a najmniej w MCFA (**Publikacja II**, Table 1).

Sekwencję analizy DSC w **Publikacji II** zaczęto od ochłodzenia próbki z 95°C do -40°C, podczas czego na krzywych DSC uzyskano piki egzotermiczne związane z krystalizacją tłuszczu, a następnie ogrzewano próbkę od -40°C do 40°C, podczas czego odnotowano piki endotermiczne związane z topnieniem tłuszczu.

Krzywe DSC mleka owczego oraz mieszanek mleka owczego z mlekiem krowim, które zawierały ≤60% mleka krowiego charakteryzowały się występowaniem jednego piku egzotermicznego (A), występujący od ok. 10–11°C do ok. -40°C (**Publikacja II**, Fig. 2). W próbkach mieszanek mleka owczego z mlekiem krowim, które zawierały ≥70% mleka krowiego oraz w próbce mleka krowiego odnotowano pik egzotermiczny (B), który nie był wyraźnie odseparowany od piku A i występował w zakresie temperatury od ok. 14,5°C do ok. 10,5°C (**Publikacja II**, Fig. 2). Podobnie jak w przypadku pików egzotermicznych w **Publikacji I** powiązano je z krystalizacją tłuszczu mlekowego. W mleku owczym oraz w mieszankach zawierających ≤60% mleka krowiego odnotowano dwa piki endotermiczne (C i F), natomiast w mieszankach zawierających ≥70% mleka krowiego oraz w próbce mleka krowiego odnotowano trzy piki endotermiczne (D, E i F) (**Publikacja II**, Fig. 4). Pik C odpowiadał nierozdzielonym od siebie pikom topnienia frakcji LMPF i MMPF (brak wyraźnego początku piku i o końcu w ok. 13–18°C), natomiast pik F odpowiadał topnieniu frakcji HMPF (od ok. 19–20°C do ok. 35–37°C). Pik F ulegał zwiększeniu wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w mieszankach (**Publikacja II**, Fig. 4). Wykształcenie się pików D (o braku wyraźnego początku i o końcu ok. 17–20°C) oraz E (od ok. 13–14°C do ok. 17–20°C) powiązano z rozdzielonymi od siebie pikami topnienia frakcji odpowiednio LMPF i MMPF, które były związane z przekształcaniem piku C następującym wraz ze zwiększaniem udziału mleka krowiego w mieszankach. Tomaszewska-Gras [2013] wykazała, że częściowe nakładanie się pików endotermicznych odpowiadającym różnym frakcjom tłuszczu jest związane ze zbliżonym zakresem temperaturowym, w którym zachodzi proces topnienia tych frakcji. Osthoff i in. [2011] w analizie DSC mleka owczego zaobserwowali jeden pik egzotermiczny i jeden pik endotermiczny w zakresie temperatur od 0°C do 20°C. Jednym z czynników wpływających na proces rozdziału połączonych ze sobą frakcji LMPF i MMPF jest szybkość zmiany temperatury. Szybkość zmiany temperatury w analizie DSC w **Publikacji II** została ustalona na 10°C/min, przez co prawdopodobnie uzyskano możliwie największe rozdzielenie się pików topnienia

frakcji LMPF i MMPF, przy założonych warunkach doświadczenia. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez innych badaczy. Szulc i in. [2016] w badaniach mleka pełnego w proszku oraz Pugliese i in. [2019] analizując liofilizowane mleko krowie otrzymali dwa piki endotermiczne związane z topnieniem tłuszczu przy zastosowaniu szybkości zmiany temperatury 5°C/min. Tomaszewska-Gras [2013] zaobserwowała, że największe rozdzielenie się pików frakcji LMPF i MMPF tłuszczu mlekowego masła można dostrzec przy szybkości grzania 10°C/min, natomiast przy prędkościach grzania 1°C/min pik związany z topnieniem frakcji LMPF na krzywej DSC niemal zanika, a przy szybkości grzania 20°C/min piki frakcji LMPF i MMPF ulegają dużemu nakładaniu się na siebie (od ok. -30°C do ok. 18°C), zaś pik HMPF jest wyraźnie od nich rozdzielony (od ok. 18°C do ok. 35°C).

Zmiana udziału mleka krowiego w próbkach wpływała na zmiany wartości parametrów pików egzotermicznych (**Publikacja II**, Table 4). Piki A i B były liczone wspólnie jako jeden pik, ze względu na ich nakładanie się na siebie. Dodatnią korelację odnotowano w przypadku T_{onset} (r=0,89), co wskazuje na zwiększanie wartości temperatury początku krystalizacji tłuszczu mlekowego wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach. Ujemną korelację otrzymano w przypadku $\Delta T_{1/2}$ (r=-0,91), co oznacza szybszą krystalizację tłuszczu mlekowego wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach. Uzyskane różnice pomiędzy próbkami były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) (**Publikacja II**, Table 4). Biorąc pod uwagę pik endotermiczny C uzyskano ujemną korelację pomiędzy zmianą udziału mleka krowiego w próbkach w przypadku T_{onset} (r=-0,96) w próbkach mleka owczego i mieszanek o udziale mleka krowiego ≤60%, co wskazuje na niższą temperaturę początku topnienia frakcji LMPF i MMPF wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach. Dodatnią korelację otrzymano w przypadku $\Delta T_{1/2}$ (r=0,99), co wskazuje na wolniejsze topnienie frakcji LMPF i MMPF wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach ($p \leq 0,05$). Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy zmianą udziału mleka krowiego w próbkach a $\Delta T_{1/2}$ piku D (r=0,96) w próbkach mleka krowiego oraz mieszanek z udziałem ≥70% mleka krowiego, co wskazuje na szybsze topnienie frakcji LMPF wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach. Dodatnie korelacje odnotowano także w przypadku T_{max} (r=0,96) oraz T_{onset} (r=0,96) piku E, a to oznacza, że wzrost udziału mleka krowiego w mieszankach powoduje zwiększenie temperatury początku topnienia MMPF. Porównując wzrost udziału mleka krowiego w próbkach ze zmianami parametrów piku F uzyskano dodatnie korelacje

w przypadku T_{max} (r=0,97) oraz $\Delta T_{1/2}$ (r=0,80), co wskazuje na wolniejsze topnienie frakcji HMPF wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach, a także ΔH (r=0,97) wskazującą na zwiększenie energetyczności topnienia frakcji HMPF oraz rozmiarów piku wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach. Ujemną korelację otrzymano natomiast w przypadku P_{height} (r=-0,96), co oznacza zwiększenie rozmiarów piku, ponieważ w przypadku piku endotermicznego rozpatruje się wartość bezwzględną tego parametru.

Wzrost udziału mleka krowiego w próbkach skutkował wykształceniem się piku egzotermicznego B (**Publikacja II**, Fig. 3) i rozdzieleniem piku endotermicznego C na piki D i E (**Publikacja II**, Fig. 4) pomimo tego, że zmniejszał się udział kwasów tłuszczowych związanych z powstawaniem endotermicznych pików topnienia frakcji LMPF, MMPF i HMPF (**Publikacja II**, Table 3).

W celu identyfikacji zmiennych, które są najbardziej zależne od zawartości mleka krowiego w próbkach przeprowadzono analizę PCA pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych w próbkach (g/100g kwasów tłuszczowych ogółem) (**Publikacja II**, Table 1), zawartością tłuszczu w liofilizatach (**Publikacja II**, Table 2), zawartością grup kwasów tłuszczowych w liofilizatach (g/100g liofilizatu) (**Publikacja II**, Table 3), parametrami piku egzotermicznego A i piku endotermicznego F (**Publikacja II**, Table 4) oraz udziałem mleka krowiego w próbkach (**Publikacja II**, Fig. 5). Rezygnacja z włączenia do analizy PCA parametrów pików C–E wynikała z tego, że wymienione piki nie zostały odnotowane we wszystkich próbkach. Otrzymano dwa skupienia silnie skorelowanych ze sobą zmiennych po obu stronach wykresu (**Publikacja II**, Fig. 5). Pierwsze skupienie obejmowało zmienne, których wartości wzrastały wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach (ΔH piku F; zawartość kwasów tłuszczowych C10:1, C13:0, C13:0*ai*, C14:0, C17:1 i MCFA w ogóle kwasów tłuszczowych; zawartość kwasów C13:0*i*, C14:1, C15:0, C16:0 i C16:1 w liofilizatach). Drugie skupienie obejmowało zmienne, których wartości malały wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbkach ($\Delta T_{1/2}$ piku A; zawartość tłuszczu; zawartość kwasów tłuszczowych C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0*i*, C15:0*ai*, C16:0*i*, C18:0, C18:1*Σt*, C18:2, C18:3, PUFA, SCFA, LCFA w ogóle kwasów tłuszczowych oraz w liofilizatach). Zależności te były zgodne z kierunkiem korelacji liniowej Pearsona (**Publikacja II**, Table 1, 4).

Biorąc pod uwagę współczynniki korelacji liniowej Pearsona (**Publikacja II**, Table 4) to kierunek zmian $\Delta T_{1/2}$ pików C i D oraz T_{max} i T_{onset} piku E wraz ze wzrostem

udziału mleka krowiego w próbkach był tożsamy z kierunkiem zmian ΔH, $\Delta T_{1/2}$, T_{max} piku F oraz T_{onset} piku A, zaś T_{onset} piku C był identyczny jak $\Delta T_{1/2}$ piku A i P_{height} piku F, więc można domniemywać podobnych zależności między tymi zmiennymi.

Wzrost wartości T_{onset} oraz spadek wartości $\Delta T_{1/2}$ piku egzotermicznego A, a także pojawienie się piku B miało związek z wyższą zawartością w mleku krowim w stosunku do mleka owczego kwasów SFA i MCFA, w szczególności C14:0 i C16:0. Truong i in. [2014] zaobserwowali dwa piki krystalizacji na krzywych DSC frakcji stearynowej mleka krowiego, która zawierała wyższą zawartość C14:0, C16:0 i C18:0 oraz niższą zawartość C18:1 w stosunku do frakcji oleinowej. Pierwszy pik wystąpił na krzywych DSC obu frakcji pomiędzy -5°C a 10°C, a znacznie mniejszych rozmiarów od pierwszego piku oraz charakteryzujący się wyższymi wartościami T_{max} i T_{onset} drugi pik wystąpił tylko na krzywej DSC frakcji stearynowej pomiędzy 10°C a 15°C.

Podsumowując, parametry pików przemian endotermicznych związanych z topnieniem były bardziej przydatne do określania różnic pomiędzy właściwościami termicznymi mleka owczego, mleka krowiego oraz ich mieszanek w stosunku do parametrów pików egzotermicznych związanych z krystalizacją tłuszczu mlekowego. Do najsilniej zależnych od siebie zmiennych, które należy brać pod uwagę porównując właściwości termiczne mleka owczego, mleka krowiego i ich mieszanek należą zawartość tłuszczu w liofilizatach, zawartość PUFA, SCFA, LCFA i wielu kwasów tłuszczowych od C6 do C18; a spośród parametrów termicznych $\Delta T_{1/2}$ i T_{onset} piku krystalizacji; $\Delta T_{1/2}$ piku topnienia LMPF; T_{max} i T_{onset} piku MMPF; ΔH, $\Delta T_{1/2}$ i P_{height} piku HMPF. Zmiany charakterystyki termicznej mleka owczego, mleka krowiego oraz ich mieszanek są możliwe do zaobserwowania już od poziomu 10% udziału mleka krowiego w mieszankach z mlekiem owczym. Wykorzystanie tej wiedzy może przysłużyć się do rozwoju analityki w zakresie badania mieszanek mlek jako uzupełniająca lub alternatywna technika wobec oznaczania profilu kwasów tłuszczowych w celu rozpoznania zmieszania różnych rodzajów mleka ze sobą, a także do zastosowania w przemyśle do optymalizacji procesu produkcyjnego na podstawie obserwacji zmian przebiegu krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego wynikających z celowego zmieszania mleka owczego z mlekiem krowim. W przyszłych badaniach należy wziąć pod uwagę analizę liofilizatów o zbliżonej zawartości tłuszczu, aby wyeliminować wpływ różnic w zawartości tłuszczu na wyniki DSC. Pozwoli to na dokładniejsze określenie zmiennych, które zależą od pochodzenia mleka od danego gatunku ssaka a nie od różnic w zawartości tłuszczu pomiędzy próbkami.

4.3. Charakterystyka termiczna masła serwatkowego i masła ze śmietanki oraz ich tłuszczów - Publikacja III

Publikacja III miała na celu scharakteryzowanie tłuszczów mlekowych masła serwatkowego wyprodukowanego z serwatki po produkcji sera Gouda (WB) oraz masła wyprodukowanego ze śmietanki (MB), a także określenie potencjalnych różnic pomiędzy nimi poprzez zbadanie profilu kwasów tłuszczowych, przebiegu krzywych DSC i pomiaru charakterystycznych parametrów pików przemian fazowych, pomiaru barwy, pomiaru tekstury oraz ocenę sensoryczną. Praca miała na celu także ustalenie wpływu rodzaju masła, profilu kwasów tłuszczowych, obecności wody i historii termicznej na charakterystykę termiczną tłuszczu.

Zawartość tłuszczu w MB i WB wynosiła 83,94–84,56%, a zawartość suchej masy beztłuszczowej 1,41–1,52%. WB charakteryzowało się większym udziałem C4:0, C15:0*i*, C15:0*ai*, C17:1, C18:0, C18:1*Σt*, C18:1*Σc*, C18:2, C18:3, C18:2*c*9*t*11, MUFA, PUFA, SCFA i LCFA, oraz mniejszym udziałem C10:0, C10:1, C12:0, C13:0i, C13:0ai, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0*i*, C16:0, C16:1, SFA i MCFA niż MB ($p \leq 0,05$) (**Publikacja III**, Table 1). WB odznaczało się większymi wartościami parametru a* oraz indeksu bieli w stosunku do MB, natomiast MB charakteryzowało się wyższymi wartościami nasycenia barwy, parametru b* oraz indeksu zażółcenia niż WB. Wyższa wartość indeksu zażółcenia wskazywała, że masło ze śmietanki miało bardziej żółty kolor niż masło serwatkowe ($p \leq 0,05$) a wartości całkowitej różnicy barwy pozwoliły stwierdzić, że różnice barwy pomiędzy MB i WB były możliwe do wykrycia nawet dla niedoświadczonego obserwatora (**Publikacja III**, Table 4). WB cechowało się mniejszą twardością niż MB ($p \leq 0,05$) (**Publikacja III**, Table 5), co wynikało z większej zawartości MUFA i PUFA (**Publikacja III**, Table 1). Masło serwatkowe charakteryzowało się mniejszą twardością, kruchością, zwięzłością oraz mniej wyczuwalnym zapachem orzechowym i mlekowym, a także mniej wyczuwalnym smakiem orzechowym w stosunku do masła ze śmietanki ($p \leq 0,05$) (Fig. 5, **Publikacja III**).

Charakterystyka krzywych DSC oraz wartości parametrów przemian fazowych różniły się w zależności od rodzaju masła (**Publikacja III**, Fig. 1), obecności wody (**Publikacja III**, Fig. 2) i historii termicznej próbki (**Publikacja III**, Fig. 3) zarówno w przypadku pików egzotermicznych (**Publikacja III**, Table 2), jak i endotermicznych (**Publikacja III**, Table 3).

Aby określić wpływ obecności wody na charakterystykę krzywych DSC pozyskano tłuszcz masła serwatkowego (WBF) oraz tłuszcz masła ze śmietanki (MBF). Krzywe DSC MB i WB miały podobną charakterystykę, lecz różniły się znacząco od krzywych DSC MBF i WBF ze względu na obecność wody w próbkach (**Publikacja III**, Fig. 1). Piki przemian fazowych wody były znacznie większe od pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego, przy czym szczególnie w przypadku pików endotermicznych występowały w podobnym zakresie temperaturowym, przez co nakładały się wzajemnie na siebie.

Na krzywych DSC wszystkich analizowanych produktów odnotowano dwa piki egzotermiczne związane z krystalizacją tłuszczu mlekowego: A (od ok. -40°C do ok. 14°C) oraz B (od ok. 10°C do ok. 15°C), które były niewyraźne od siebie rozdzielone (**Publikacja III**, Fig. 2), przez co podobnie jak w **Publikacji I** i **Publikacji II** parametry pików A i B były liczone wspólnie jako jeden pik (A).

Liczba i charakterystyka pików endotermicznych przemian fazowych na krzywych DSC produktów w **Publikacji III** była zależna od cyklu sekwencji analizy DSC, podobnie jak zostało to stwierdzone w **Publikacji I**. W cyklu I zaobserwowano dwa piki endotermiczne: pik C (będący konsekwencją nałożenia się na siebie pików topnienia frakcji LMPF i MMPF, który cechował się brakiem wyraźnego początku, zaś o końcu w ok. 16–21°C) oraz pik F (od ok. 18–24°C do ok. 34–42°C, związany z topnieniem frakcji HMPF) (**Publikacja III**, Fig. 3). Pik C w cyklu II uległ przekształceniu do piku D (który był związany z topnieniem frakcji LMPF, cechując się brakiem wyraźnego początku piku i o końcu w temperaturze ok. 13–15°C oraz do piku E (od ok. 13–14°C do ok. 18–19°C, związanego z topnieniem frakcji MMPF). Na krzywych DSC WBF zaobserwowano kolejny pik związany z topnieniem frakcji LMPF nazwany G, który był niewyraźnie oddzielony od piku D (**Publikacja III**, Fig. 3).

Porównując rodzaj tłuszczu między sobą (czyli porównując MB z WB oraz MBF z WBF) wykazano statystycznie istotne różnice w T_{max}, ΔH, $\Delta T_{1/2}$, P_{height} i P_s pomiędzy MB i WB oraz MBF i WBF, a także T_{onset} pomiędzy MB i WB oraz P_e pomiędzy MBF a WBF w przypadku pików egzotermicznych ($p \leq 0{,}05$) (**Publikacja III**, Table 2). Oznacza to, że rodzaj tłuszczu wpływa na charakterystykę krystalizacji tłuszczu mlekowego. Jedynie w przypadku początku procesu krystalizacji nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy MBF i WBF ($p > 0{,}05$) (**Publikacja III**, Table 2). Charakterystyka topnienia frakcji LMPF różniła się pomiędzy MBF a WBF (wystąpienie piku G w WBF w cyklu II) (**Publikacja III**, Table 3, Fig. 3). Odnotowano statystycznie

istotne różnice pomiędzy rodzajem tłuszczu a parametrami pików jego topnienia w P_{height} piku C, wszystkich parametrach pików D (z wyjątkiem T_{onset}), E, F w cyklu I (z wyjątkiem P_s i P_e) i F w cyklu II (z wyjątkiem $\Delta T_{1/2}$ i P_e) pomiędzy MBF i WBF, a także we wszystkich parametrach piku F w cyklu I (z wyjątkiem P_e) i cyklu II (z wyjątkiem $\Delta T_{1/2}$) pomiędzy MB a WB ($p \leq 0,05$) (**Publikacja III**, Table 3). Rodzaj tłuszczu nie wpływał statystycznie istotnie na topnienie frakcji LMPF i MMPF w cyklu I ($p > 0,05$), natomiast determinował charakterystykę topnienia frakcji LMPF (z wyjątkiem początku topnienia) i frakcji MMPF w cyklu II, a także frakcji HMPF w obu cyklach (z wyjątkiem początku i końca piku w obu cyklach oraz szybkości topnienia w cyklu II) ($p \leq 0,05$). Topnienie frakcji LMPF i MMPF WBF w cyklu I było bardziej energetycznym procesem w porównaniu z MBF, na co wskazują wyższe wartości P_{height} piku topnienia połączonych ze sobą frakcji LMPF i MMPF w cyklu I analizy DSC.

Obecność wody wpływała na statystycznie istotne różnice wartości ΔH, $\Delta T_{1/2}$, P_{height} i P_s pików egzotermicznych krystalizacji pomiędzy MB a MBF i WB i WBF oraz T_{onset} pomiędzy MB a MBF ($p \leq 0,05$) (**Publikacja III**, Table 2). Wyższe wartości ΔH i P_{height} pików MBF i WBF w stosunku do MB i WB można wyjaśnić wyższą zawartością tłuszczu w próbkach. Rozpatrując piki endotermiczne obecność wody miała największy wpływ na obserwacje pików topnienia LMPF i MMPF (piki C–E). Piki topnienia lodu nakładały się na piki C–E, co uniemożliwiło pomiar ich parametrów. Obecność wody wpływała statystycznie istotnie na T_{max} (w cyklu II), T_{onset} (w cyklu I i w cyklu II), P_s (w cyklu I) pomiędzy MB a MBF oraz WB a WBF, a także na $\Delta T_{1/2}$ i P_s (w cyklu I i w cyklu II) pomiędzy MB a MBF ($p \leq 0,05$) (**Publikacja III**, Table 3).

Podzielenie sekwencji analizy DSC na dwa cykle pozwoliło zaobserwować różnice pomiędzy jednokrotnym (cykl I) a wielokrotnym ogrzewaniem i chłodzeniem próbki (cykl II) w zakresie od -40°C do 95°C i ocenić wpływ historii termicznej próbki na charakterystykę topnienia tłuszczu. Największe różnice pomiędzy cyklem I i cyklem II odnotowano w przypadku topnienia frakcji LMPF i MMPF. W cyklu I zaobserwowano jeden pik topnienia tych nierozdzielonych od siebie frakcji, natomiast w cyklu II pik ten rozdzielił się w większym stopniu na dwa osobne piki, przy czym w przypadku piku topnienia LMPF w WBF zaobserwowano wykształcenie się dodatkowego piku topnienia tej frakcji (**Publikacja III**, Fig. 3). Tak duża zmiana charakterystyki krzywych pomiędzy cyklami sekwencji analizy DSC uniemożliwiła porównanie wartości parametrów pików odpowiadającym topnieniu frakcji LMPF i MMPF ze sobą. Charakterystyka topnienia frakcji HMPF była zależna od historii termicznej próbki tylko w przypadku T_{onset} i P_s

w MBF i WBF oraz P_e w MBF ($p \leq 0{,}05$), a pozostałe parametry nie były statystycznie istotnie zróżnicowane ($p > 0{,}05$) (**Publikacja III**, Table 3). Ważnym aspektem z punktu widzenia analitycznego było podobnie jak w **Publikacji I** odnotowanie mniejszego rozrzutu wyników pomiaru parametrów pików endotermicznych w cyklu II w porównaniu z cyklem I analizy DSC.

W celu zidentyfikowania zmiennych zależnych od danego rodzaju tłuszczu (MBF i WBF) oraz określenia ich skorelowania przeprowadzono analizę PCA, biorąc pod uwagę profil kwasów tłuszczowych (**Publikacja III**, Table 1) oraz wartości parametrów pików przemian fazowych (**Publikacja III**, Table 2, 3) (**Publikacja III**, Fig. 4). Analiza PCA wykazała dwa skupienia silnie skorelowanych ze sobą zmiennych, z czego w pierwszym skupieniu uzyskano zmienne, których wartości były większe w WBF niż w MBF, zaś w drugim skupieniu uzyskano odwrotną zależność. W celu łatwiejszego oznaczenia zmiennych obejmujących parametry pików przemian fazowych zastosowano następujący schemat opisu (X_Y-Z; z czego X – kod literowy piku, Y – numer cyklu w przypadku piku F, Z – parametr piku). Pierwsze skupienie obejmowało zmienne uporządkowane rosnąco według wartości ładunków: C15:0*ai*, C18:1Σt, D-$\Delta T_{1/2}$, F_{II}-P_{height}, C18:3, C18:2*c*9*t*11, C15:0i, MUFA, PUFA, C18:2, C18:1Σc, LCFA, E-P_{height}, A-$\Delta T_{1/2}$, C18:0, F_I-P_{height}, C-P_{height}, C4:0, SCFA, C8:0, D-P_{height}, C6:0 i F_{II}-$\Delta T_{1/2}$. Drugie skupienie obejmowało zmienne uporządkowane malejąco według wartości ładunków: C16:0, C14:1, C16:1, C14:0, F_{II}-T_{max}, C12:0, C13:0*ai*, C13:0, SFA, MCFA, A-P_{height}, F_{II}-P_s, F_{II}-ΔH, C10:0, F_{II}-T_{onset}, C10:1, A-ΔH, D-T_{max}, C15:0, E-P_e, E-ΔH, F_I-ΔH, A-P_s, E-T_{max}, F_I-T_{max}, E-T_{onset}, A-T_{max}, C13:0*i*, E-$\Delta T_{1/2}$, C16:0*i*, D-ΔH, E-P_s, D-P_e, C-P_e, C-ΔH, F_I-P_e i F_I-T_{onset} (Fig. 4, **Publikacja III**). Na podstawie rezultatów analizy PCA można stwierdzić, że krystalizacja tłuszczu WBF zachodziła szybciej, lecz z wydzieleniem mniejszej ilości energii, a także zachodziła w niższej temperaturze niż krystalizacja MBF i była zależna od zawartości kwasów MUFA, PUFA i LCFA, w tym C18:1 oraz w mniejszym stopniu od zawartości SCFA, w tym C4:0, C6:0 i C8:0. Parametry opisujące przemianę krystalizacji tłuszczu MBF były zależne od zawartości SFA i MCFA, głównie C12:0, C14:0 i C16:0. MBF w stosunku do WBF charakteryzowało się większą entalpią i maksymalną różnicą przepływu ciepła (w obu cyklach) topnienia LMPF, MMPF i HMPF, a także wyższą temperaturą początku topnienia MMPF (w cyklu II) i HMPF (w obu cyklach) oraz końca topnienia LMPF i MMPF (w obu cyklach), a topnienie MMPF (cykl II) zachodziło szybciej. Obecność dodatkowego piku topnienia frakcji LMPF w cyklu II w przypadku

WBF można przypisać wyższej zawartości kwasów MUFA, PUFA i LCFA w WBF niż w MBF.

Podsumowując krzywe DSC masła wyprodukowanego ze śmietanki serwatkowej oraz masła wytworzonego ze śmietanki różniły się od krzywych DSC tłuszczów tych maseł, co wynikało z obecności wody, która uniemożliwiła pomiar parametrów pików przemian fazowych tłuszczu ze względu na nakładanie się na nie pików przemian fazowych wody. Zaobserwowano różnice pomiędzy charakterystyką krzywych ze względu na rodzaj produktu i historię termiczną próbki, w tym w liczbie pików, ich przebiegu na krzywej DSC oraz w wartościach parametrów pików. Wykorzystując analizę PCA wykazano, że zawartość kwasów tłuszczowych oraz wartości parametrów pików przemian fazowych są ze sobą skorelowane.

5. Wnioski

1) Skaningowa kalorymetria różnicowa przy zastosowaniu odpowiednich warunków analizy jest obiektywną techniką do oceny przemian fazowych mleka i produktów mleczarskich. Przebieg krzywych DSC i wartości parametrów pików egzotermicznych związanych z krystalizacją oraz pików endotermicznych związanych z topnieniem tłuszczu mlekowego są specyficzne dla wybranych rodzajów mleka i produktów mleczarskich, przy czym większe zróżnicowanie wyników odnotowuje się w przypadku pików endotermicznych. Ograniczeniem zastosowania techniki DSC w analizie charakterystyki termicznej tłuszczu mlekowego jest utrudnienie interpretacji wyników będące skutkiem nakładania się na siebie pików przemian fazowych, szczególnie w przypadku pików endotermicznych topnienia frakcji nisko- i średniotopliwej tłuszczu mlekowego. Analiza przebiegu krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego może posłużyć do planowania procesów technologicznych w mleczarstwie lub kontroli jakości.

2) Wszystkie parametry charakteryzujące piki przemian fazowych mogą być stosowane w analizie DSC mleka i produktów mleczarskich. Najbardziej przydatnym parametrem do analizy krystalizacji tłuszczu mlekowego zbadanych produktów okazała się szerokość piku w połowie jego wysokości ($\Delta T_{1/2}$). W analizie topnienia tłuszczu mlekowego wykazano przydatność wszystkich parametrów ze szczególnym uwzględnieniem $\Delta T_{1/2}$ oraz entalpii (ΔH) i wysokości piku (P_{height}).

3) Kluczowym czynnikiem utrudniającym obserwacje pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego na krzywych DSC jest obecność wody w próbce. Redukcja ilości wody w próbce pozwala na dokładniejszą analizę tłuszczu mleka i produktów mleczarskich poprzez uniknięcie nakładania się pików przemian fazowych wody na piki przemian fazowych tłuszczu mlekowego na krzywych DSC.

4) Historia termiczna determinuje charakterystykę przemian fazowych tłuszczu mlekowego, w tym liczbę obserwowanych pików na krzywych DSC oraz wartości parametrów tych pików. Charakterystyka termiczna przebiegu topnienia tłuszczu mlekowego jest bardziej zależna od historii termicznej w stosunku do przebiegu krystalizacji. Odpowiednie kształtowanie historii termicznej próbki pozwala na otrzymanie stabilnych form kryształów tłuszczu, dzięki czemu można zmniejszyć zróżnicowanie wyników pomiaru analizy DSC pomiędzy próbkami, co jest ważne z punktu widzenia analitycznego.

5) Zawartość tłuszczu przekładająca się na zawartość kwasów tłuszczowych w próbce ma wpływ na liczbę i charakterystykę pików przemian fazowych tłuszczu mlekowego maślanki, mleka i śmietanki, gdzie wzrost zawartości tłuszczu mlekowego w próbce powodował zwiększenie liczby pików na krzywej DSC oraz wielkości pików jego przemian fazowych, co reprezentowane było przez wzrost wartości ΔH oraz P_{height}. Jednakże mimo wyższej zawartości tłuszczu w mleku owczym niż w mleku krowim większość pików związanych z przemianami fazowymi tłuszczu mlekowego była mniejsza w mleku owczym niż w mleku krowim, co świadczy o tym, że oprócz samej zawartości tłuszczu mlekowego na jego charakterystykę termiczną wpływa także jego pochodzenie od danego gatunku.

6) Charakterystyka termiczna tłuszczu mlekowego jest silnie związana z profilem kwasów tłuszczowych. Zależności pomiędzy wynikami parametrów pików przemian fazowych a profilem kwasów tłuszczowych dotyczyły niemal wszystkich oznaczonych parametrów oraz kwasów tłuszczowych i ich grup. Szczególnie mocne powiązania pomiędzy wynikami DSC a profilem kwasów tłuszczowych wynikały z różnic między stosunkiem kwasów SFA i C12:0, C14:0, C16:0 a MUFA, PUFA i LCFA i C18:1. Określenie zależności pomiędzy wynikami analizy DSC a profilem kwasów tłuszczowych pozwoliło na powiązanie technik skaningowej kalorymetrii różnicowej i chromatografii gazowej w kompleksowej ocenie tłuszczu mlekowego mleka i produktów mleczarskich.

7) Zróżnicowanie charakterystyki termicznej mleka krowiego i owczego można zaobserwować już od udziału 10% mleka krowiego w jego mieszankach z mlekiem owczym. Może to zostać wykorzystane do identyfikacji rodzaju mleka, oraz do określenia stopnia zmieszania różnych rodzajów mleka ze sobą, czy też może znaleźć zastosowanie w przemyśle do ustalenia wpływu zawartości danego rodzaju mleka w mieszankach na proces krystalizacji i topnienia tłuszczu mlekowego w celu projektowania procesu technologicznego.

6. Literatura

1. Aktaş N., Kaya M. (2001). *Detection of Beef Body Fat and Margarine in Butterfat by Differential Scanning Calorimetry*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 66, 795–801. https://doi.org/10.1023/A:1013196106365
2. Almoselhy R. I. M. (2020). *Applications of differential scanning calorimetry (DSC) in oils and fats research. A review*. American Research Journal of Agriculture, 6(1), 1–9. https://doi.org/10.21694/2378-9018.20002.
3. Anankanbil S., Larsen M. K., Weisbjerg M. R., Wiking L. (2018). *Effects of variation in fatty acids and triglyceride composition on melting behavior in milk fat*. Milk Science International, 71(2), 4–9. https://doi.org/10.25968/MSI.2018.2
4. Avramis C. A., Wang H., McBride B. W., Wright T. C., Hill A. R. (2003). *Physical and processing properties of milk, butter, and cheddar cheese from cows fed supplemental fish meal*. Journal of Diary Science, 86(8), 2568–2676. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73851-X
5. AOAC (2007). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD, AOAC International.
6. Brożek O. M., Bohdziewicz K. (2018). *DSC analysis of tvarogs depending on the fat content*. Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, 23(2), 83–90.
7. Bryś J., Górska A., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska-Wojdyła M., Bryś A., Brzezińska R., Dolatowska-Żebrowska K., Ziarno M., Obranović M., Škevin D. (2021). *Study of the Properties of Human Milk Fat Substitutes Using DSC and GC Methods*. Applied Science, 11(1), 319. https://doi.org/10.3390/app11010319
8. Chatziantoniou S., Triantafillou D., Karayannakidis P., Diamantopoulos E. (2014). *Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by Differential Scanning Calorimetry*. Thermochimica Acta, 576, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.11.014
9. Chen J., Ying X., Deng S., Li W., Peng L., Ma L. (2022). *Trehalose and alginate oligosaccharides enhance the stability of myofibrillar proteins in shrimp (Litopenaeus vannamei) muscle during frozen storage*. Journal of Food Processing and Preservation, 46(4), e16469. https://doi.org/10.1111/jfpp.16469
10. Christensen L., Bertram H. C., Aaslyng M. D., Christensen M. (2011). *Protein denaturation and water-protein interactions as affected by low temperature long time treatment of porcine Longissimus dorsi*. Meat Science, 88(4), 718–722. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.002
11. Couvreur C., Hurtaud C., Lopez L., Delaby J., Peyraud L. (2006). *The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties*. Journal of Dairy Science, 89(6), 1956–1969. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72263-9
12. Dranca F., Ropciuc S., Pauliuc D., Oroian M. (2022). *Honey adulteration detection based on composition and differential scanning calorimetry (DSC) parameters*. LWT – Food Science and Technology, 113910. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113910
13. Fitzsimons S. M., Mulvihill D. M., Morris E. R. (2006). *Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry*. Food Hydrocolloids, 21(4), 638–644. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.007
14. Fredrick E., van de Walle D., Walstra P., Zijtveld J. H., Fischer S., van der Meeren P., Dewettinck K. (2011). *Isothermal crystallization behaviour of milk fat in bulk and emulsified state*. International Dairy Journal, 21(9), 685–695.

https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.007
15. Frydenberg R. P., Hammershøj M., Andersen U., Greve M. T., Wiking L. (2016). *Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation*. Food Chemistry, 192, 415–423. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.037
16. Górska A., Ostrowska-Ligęza E., Szulc K., Wirkowska M. (2012). *A differential scanning calorimetric study of β-lactoglobulin and vitamin D3 complexes*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 110(1), 473–477. https://doi.org/10.1007/s10973-012-2322-6
17. Hamzeh S., Motamedzadegan A., Shahidi S.A., Ahmadi M., Regenstein J.M., (2019). *Effects of drying condition on physico-chemical properties of foam-mat dried shrimp powder*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 28(7), 794–805. https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1640817
18. Hjalmarsson M. (2015). *The effect of vegetable fat on cheese yield and cheese properties*. Publikation lantbruksuniversitet Institutionen för livsmedelsvetenskap, 399, 1–46.
19. Hokkanen S. P., Partanen R., Jukkola A., Frey A. D., Rojas O. J. (2021). *Partitioning of the milk fat globule membrane between buttermilk and butter serum is determined by the thermal behaviour of the fat globules*. International Dairy Journal, 112, 104863. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104863
20. Hondoh H., Ueno S. (2016). *Polymorphism of edible fat crystals*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 62(2), 398–399. https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.04.021
21. Huang S., Chao Ch., Yu J., Copeland L., Wang S. (2021). *New insight into starch retrogradation: The effect of short-range molecular order in gelatinized starch*. Food Hydrocolloids, 120, 106921. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106921
22. Huang K., Zhong P, Xu B. (2023). *Discrimination on potential adulteration of extra virgin olive oils consumed in China by differential scanning calorimeter combined with dimensionality reduction classification techniques.* Food Chemistry, 405(B), 134996. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134996
23. Islam M., Bełkowska L., Konieczny P., Fornal E., Tomaszewska-Gras J. (2022). *Differential scanning calorimetry for authentication of edible fats and oils–What can we learn from the past to face the current challenges?*. Journal of Food and Drug Analysis, 30(2), 185–201. https://doi.org/10.38212/2224-6614.3402.
24. ISO (2002). *Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters. ISO standard 15884/IDF 182:2002*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
25. ISO (2008). *Milk and milk products — Guidance on sampling. ISO standard 707/IDF 50:2008*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
26. ISO (2010). *Milk – Determination of fat content – Gravimetric method (Reference method). ISO standard 1211/IDF 1:2010*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
27. ISO (2014). *Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors*. *ISO standard 8586*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
28. ISO (2016). *Sensory analysis – Methodology – General guidance for establishing a sensory profile. ISO standard 13299*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.

29. ISO (2018). *Cream – Determination of fat content – Acido-butyrometric (Gerber method). ISO standard 19660/IDF 237:2018*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
30. ISO (2018). *Milk – Determination of fat content – Acido-butyrometric (Gerber method). ISO standard 19662/IDF 238:2018*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
31. ISO (2023). *Plastics—Differential Scanning Calorimetry—General Principles. ISO standard 11357-1*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
32. Kajitani S., Fukuoka M., Sakai N. (2011). *Kinetics of Thermal Denaturation of Protein in cured pork meat*. Japan Journal of Food Engineering, 12, 19–26. https://doi.org/10.11301/jsfe.12.19
33. Leyva–Porras C., Cruz–Alcantar P., Espinosa–Solis V., Martinez–Guerra E., Piñon–Balderrama C. I., Compean Martinez I., Saavedra–Leos M. Z. (2020). *Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries*. Polymers, 12(1), 5. https://doi.org/10.3390/polym12010005
34. Li C., Hu Y., Li E. (2020). *Effects of amylose and amylopectin chain-length distribution on the kinetics of long-term rice starch retrogradation*. Food Hydrocolloids, 111, 106239. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106239
35. Michalski M.-C., Ollivon M., Briard V., Leconte N., Lopez C. (2004). *Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior*. Chemistry and Physics of Lipids, 132(2), 247–261. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.007
36. Mushtaq M., Gani A., Masoodi F. A. (2019). *Himalayan cheese (Kalari) fermented with different probiotic strains: In vitro investigation of nutraceutical properties*. LWT – Food Science and Technology, 104, 53–60. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.024
37. Osthoff G., Hugo A., Joubert C. C., Swarts J. C. (2011). *DSC of milk fats from various animals with high levels of medium-chain, unsaturated and polysaturated fatty acids*. South African Journal of Chemistry, 64, 241–250.
38. Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M., Kowalski B. (2009). *Termokinetyczna analiza tłuszczu z kukurydzy z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 1(62), 128–139.
39. Ostrowska-Ligęza E., Górska A., Wirkowska M. (2012). *An assessment of various powdered baby formulas by conventional methods (DSC) or FT-IR spectroscopy*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 110(1), 465–471. https://doi.org/10.1007/s10973-011-2158-5
40. Pathare P. B., Opara U. L., Al-Said F. A.-J. (2013). *Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review*. Food and Bioprocess Technology, 6(1), 36–60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9
41. Pugliese A., Paciulli M., Chiavaro E. (2016). *Characterization of commercial dried milk and some of its derivatives by differential scanning calorimetry*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 123, 2583–2590. https://doi.org/10.1007/s10973-016-5243-y
42. Pugliese A., Paciulli M., Chiavaro E., Mucchetti G. (2019). *Application of differential scanning calorimetry to freeze-dried milk and milk fractions*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 137(2), 703–709. https://doi.org/10.1007/s10973-018-7971-7

43. Ramel P. R., Marangoni A. G. (2017). *Characterization of the polymorphism of milk fat within processed cheese products*. Food Structure, 12, 15–25. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.03.001
44. Ricci L., Umiltà E., Righetti M. C., Messina T., Zurlini C., Montanari A., Bronco S., Bertoldo M. (2018). *On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by DSC and TGA*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98, 5368–5377. https://doi.org/10.1002/jsfa.9078
45. Rudakov O. B., Saranov I. A, Polansky K. K. (2019). *Control of palm oil content in the mixtures with milk fat by the Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. Analitika i kontrol' (Analytics and Control), 23(1), 127–135. https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.1.010
46. Rudakov O. B., Saranov I. A., Balaeva Sh. A., Ramazanov A. Sh., Rudakov Ya. O. (2021). *Differential Scanning Calorimetry as a Method for Controlling the Authenticity of Wild Milk Thistle Oil*. Journal of Analytical Chemistry, 76, 1468–1475. https://doi.org/10.1134/S1061934821100099
47. Saranov I. A., Rudakov O. B., Polyanskiy K.K., Sergienko I. V., Vetrov A. V., Skrypnikov A. V. (2021). *Development of methodological approaches for DSC control of palm oil conten in a mixture with milk fat*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 640, 042011. https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/4/042011
48. Secci G., Ferraro G., Fratini E., Bovera F., Parisi G. (2019). *Differential scanning calorimetry as a fast method to discriminate cage or free-range rabbit meat*. Food Control, 104, 313–317. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.010
49. Schubring R. (2009). *Comparative study of DSC pattern, colour and texture of shrimps during heating*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 95(3), 749–757. https://doi.org/10.1007/s10973-008-9410-7
50. Smiddy M. A, Huppertz T., van Ruth S. M. (2012). Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. International Dairy Journal, 24(2), 64-69. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.07.001
51. Sobti B., Al Katheeri A. O., Ghnimi S., Kamal-Eldin A. (2021). *Compositional analysis of Chami cheese made from bovine milk in UAE*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 33(1), 87–92. https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i1.2393
52. Staniewski B., Ogrodowska D., Staniewska K., Kowalik J. (2021). *The effect of triacylglycerol and fatty acid composition on the rheological properties of butter*. International Dairy Journal, 114, 104913. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104913
53. Szulc K., Nazarko J., Ostrowska-Ligęza E., Lenart A. (2016). *Effect of fat replacement on flow and thermal properties of dairy powders*. LWT - Food Science and Technology, 68, 653–658. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.060
54. Tomaszewska-Gras J., Kijowski J. (2010). *Zastosowanie różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC do oceny właściwości termodynamicznych miodu pszczelego i substancji stosowanych do jego fałszowania*. Nauka Przyroda Technologie, 4(2), 1–9.
55. Tomaszewska-Gras J. (2012). *Detection of butter adulteration with water using differential scanning calorimetry*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 108, 433–438. https://doi.org/10.1007/s10973-011-1913-y
56. Tomaszewska-Gras J. (2013). *Melting and crystallization DSC profiles of milk fat depending on selected factors*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 111(1), 199–208. https://doi.org/10.1007/s10973-013-3087-2

57. Tomaszewska-Gras J. (2016). *Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique*. Food Control, 60, 629–635. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.001
58. Truong T., Bansal N., Sharma R., Palmer M., Bhandari B. (2014). *Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat*. Food Chemistry, 145, 725–735. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.072
59. Upadhyay N., Goyal A., Kumar A., Lal D. (2017). *Detection of adulteration by caprine body fat and mixtures of caprine body fat and groundnut oil in bovine and buffalo ghee using differential scanning calorimetry*. International Journal of Dairy Technology, 70(2), 297–303. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12336
60. Urgu-Öztürk M., Kaymak-Ertekin F., Koca N. (2021). *Production of reduced-fat white cheese powder: The effect of fat reduction and microparticulated protein usage on the characteristics of the cheese powder during storage*. Powder Technology, 391, 510–521. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.06.034
61. Viriato R. L. S, de Souza Queiros M., Neves M. I. L., Ribeiro A. P. B, Gigante M. L. (2019). *Improvement in the functionality of spreads based on milk fat by the addition of low melting triacylglycerols*. Food Research International, 120, 432–440. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.082
62. Wei Y., Fang Y., Li S., Zhang W., Zhang B. (2014). *DSC stud on the thermal properties of soybean protein isolates/corn starch mixture*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 115(2), 1633–1638. https://doi.org/10.1007/s10973-013-3433-4
63. van Wetten I. A., van Herwaardena A. W., Splintera R., van Ruthb S. M. (2014). *Oil Analysis by Fast DSC*. Procedia Engineering, 87, 280–283. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.11.662
64. Wiking L., De Graef V., Rasmussen M., Dewettinck K. (2009). *Relations between crystallisation mechanisms and microstructure of milk fat*. International Dairy Journal, 19(8), 424–430. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.003
65. Xingyi Y., Llave Y., Fukuoka M., Sakai N. (2014). *Estimation of color changes in fish surface at the beginning of grilling based on the degree of protein denaturation*. Journal of Food Engineering, 129, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.12.030
66. Zhang Z.-S., Li D., Zhang L.-X., Liu Y.-I., Wang X.-D. (2013). *Heating effect on the DSC melting curve of flaxseed oil*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 115(3), 2129–2135. https://doi.org/10.1007/s10973-013-3270-5
67. Żontała K., Łopacka J., Lipińska A., Sakowska A. (2015a). *Zastosowanie różnicowej kalorymetrii skaningowej w analizie żywności*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 1, 113–117.
68. Żontała K., Łopacka J., Lipińska A., Rafalska U. (2015b). *Metody termicznej analizy żywności ze szczególnym uwzględnieniem różnicowej kalorymetrii skaningowej*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2, 97–104.

Pol. J. Food Nutr. Sci., 2022, Vol. 72, No. 1, pp. 5–15
On-line ISSN: 2083-6007
Print ISSN: 1230-0322
DOI: 10.31883/pjfns/144223
http://journal.pan.olsztyn.pl

Original article
Section: Food Quality and Functionality

Characterisation of Selected Emulsion Phase Parameters in Milk, Cream and Buttermilk

Oskar Brożek, Katarzyna Kiełczewska, Krzysztof Bohdziewicz*

Department of Dairy Science and Quality Management, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego Str. 7, 10–719 Olsztyn, Poland

Key words: milk products, size of fat globules, fatty acid profile, differential scanning calorimetry curves, differential scanning calorimetry parameters

Milk fat undergoes modification during butter production, which can alter its parameters and suitability for processing. The aim of this study was to compare selected milk fat parameters, including the size of milk fat globules, fatty acid profile and thermal properties, based on the thermal history of milk, cream and sweet buttermilk obtained during continuous churning in butter production. The size of milk fat globules was measured by the laser diffraction method; the fatty acid profile of milk fat was determined by gas chromatography; and the thermal properties of freeze-dried samples were determined by differential scanning calorimetry. The analysed products were arranged in the following descending order based on the size of milk fat globules, expressed by the Sauter mean diameter: cream > raw milk > buttermilk. Buttermilk was characterised by the greatest variations in the size of milk fat globules. A microscopic analysis revealed that an increase in fat content intensified the agglomeration of milk fat globules in cream relative to milk. Chains of milk fat globules were observed in buttermilk. Buttermilk was more abundant in monoenoic and polyenoic fatty acids than raw milk and cream. A thermal analysis demonstrated significant ($p \leq 0.05$) differences in the parameters of fat crystallisation and melting peaks between raw milk, buttermilk and cream. The thermal history of the samples influenced the results. Cream was characterised by significantly greater changes in the melting and crystallisation enthalpy of milk fat and significantly higher peaks than milk and buttermilk.

INTRODUCTION

Many food products can be considered oil-in-water (o/w) or water-in-oil (w/o) emulsions. Dairy products such as milk, cream and buttermilk are examples of natural o/w emulsions in which the dispersed phase is fat in the form of globules. Milk fat globules comprise a lipid core surrounded by a stabilizing membrane with a thickness of 10–20 nm. The membrane acts as an emulsifier and promotes the dispersion of fat globules in milk. The membrane also protects fat globules against flocculation, coalescence, oxidation and hydrolysis, which improves the processing suitability of milk fat [El-Loly, 2011; Singh & Gallier, 2017; Smoczyński *et al*., 2012]. In their native form, milk fat globule membranes are complex structures with numerous components. The mass of the membrane accounts for 2–6% of the total mass of fat globules, and membrane proteins and lipids represent more than 90% of its dry mass [Jukkola & Rojas, 2017; Singh, 2006; Singh & Gallier, 2017; Smoczyński *et al*., 2012]. Polar lipids, mainly phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin, and – in smaller amounts – phosphatidylinositol, phosphatidylserine and lysophosphatidylcholine, make up 25% of the milk fat globule membrane [Conway *et al*., 2014; Dewettinck *et al*., 2008; El-Loly, 2011; Singh, 2006; Smoczyński *et al*., 2012].

Processing operations in dairy plants, including butter production, can affect the parameters of emulsions and modify the composition and properties of milk fat globule membranes [Jukkola & Rojas, 2017]. During churning, fragments of fat globule membranes are released into the hydrophilic phase of milk, which increases the content of polar lipids in the dry matter of buttermilk [Dewetinck *et al*., 2008; Lambert *et al*., 2016; Lopez *et al*., 2015].

Milk fat is characterised by a high content of palmitic acid which is a saturated fatty acid. Oleic acid is the predominant unsaturated fatty acid. The fatty acid composition of phospholipids differs from that of triacylglycerols [Jhanwar & Ward, 2014]. Phospholipids contain mainly unsaturated fatty acids whose contents are higher in the membrane than in the lipid core of milk fat globules [Fauquant *et al*., 2005; Sanchez-Juanes *et al*., 2009]. Briard *et al*. [2003] demonstrated that the composition of fatty acids was influenced by the size of milk fat globules. Small fat globules contain more lauric, myristic, palmitic and palmitoleic acids than large fat globules. In turn, larger fat globules are more abundant in oleic and linoleic acid than fat globules with a small diameter. These differences can be attributed to a relatively higher content of membrane components in fat composed of smaller globules, and a smaller content of membrane

* Corresponding Author:
Tel.: +48 89 523 32 11; Fax: +48 89 523 34 02;
E-mail: kaka@uwm.edu.pl (K. Kiełczewska)

Submitted: 16 May 2021
Accepted: 24 November 2021
Published on-line: 13 December 2021

© Copyright by Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences
© 2022 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

components in fat composed of larger globules. According to Fauquant *et al*. [2005], the size of fat globules determines the fatty acid composition of the membrane and the lipid core of a fat globule, which is consistent with the previous findings of Briard *et al*. [2003].

The melting point of milk fat ranges from -40°C to 40°C, and crystallisation occurs between 20°C and -20°C. The melting and crystallisation of milk fat are influenced by the size of milk fat globules, the composition of the emulsion and the structure of triacylglycerols, including their fatty acid profile and crystal polymorphism. These parameters of the emulsion phase are reflected in differential scanning calorimetry (DSC) curves, including the number of peaks, peak temperature and overlapping peaks, which are also affected by scan rate (heating/cooling rate) and thermal history [Hokkanen *et al*., 2021, Michalski *et al*., 2004; Tomaszewska-Gras, 2013; Truong *et al*., 2014]. The DSC peaks do not represent the crystallisation or melting of individual fatty acids, but the entire milk fat mixture. Therefore, peak temperature is determined by several factors, including the overlap between peaks (mainly simultaneous phase transitions of different fatty acids), and triacylglycerol polymorphism [Tomaszewska–Gras, 2013]. In DSC analyses, fat crystallisation is usually represented by two exothermic peaks during cooling. Melting is visualised by three endothermic peaks corresponding to low- (LMPF), middle- (MMPF) and high-melting point fractions (HMPF). Truong *et al.* [2014] observed that the fatty acid profile contributes to differences in the crystallisation curves of anhydrous milk fat, and stearin (hard fraction with a higher content of saturated fatty acids) and olein fractions (soft fraction with a higher content of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids). The cited authors also found that a decrease in crystallisation onset temperature (T_{onset}) and enthalpy change (ΔH) was associated with a decrease in the size of fat droplets. Similar relationships were reported for milk fat globules [Bugeat *et al*., 2011; Lopez *et al*., 2001, 2007].

The size of milk fat globules influences their fatty acid profile, which is partly associated with the content of fat globule membranes in the product. Processing operations during butter production, including milk centrifugation and churning, modify the fatty acid profile of skim milk, cream and buttermilk. The composition of fatty acids differs subject to their origin. Buttermilk contains fragments of milk fat globule membranes that are released during churning, which can induce changes in fatty acid composition regardless of the size of fat globules. The fatty acid profile of polar lipids in milk fat globule membranes derived from buttermilk differs from the fatty acid profile of lipids derived from whole milk [Jhanwar & Ward, 2014; Singh & Gallier, 2017]. Truong *et al*. [2014] observed that the crystallisation temperature of emulsified fats decreased with the decrease in droplet size.

Berton *et al*. [2012] analysed the digestion of native and homogenised milk fat globules *in vitro* and evaluated the benefits of replacing homogenisation with other fractioning methods based on the size of milk fat globules, including membrane filtration [Michalski *et al.*, 2006] and centrifugation [Dhungana *et al.*, 2017]. Therefore, the applicability of milk fat with differently sized milk fat globules and different fatty acid profiles should be analysed to maximise the functional and bioactive attributes of the end product. For example, the application of milk fat derived from buttermilk increases phospholipid levels and improves the health-promoting properties of dairy products containing buttermilk [Gassi *et al.,* 2016; Hickey *et al.*, 2017].

Differential scanning calorimetry is a technique that enables the identification of phase transitions, and the obtained results deliver new knowledge and can be effectively used in dairy practice. Thermal analyses investigate the effects of temperature on milk, cream and buttermilk, and the results can be used to select the optimal process parameters and to modify the production technology of dairy products. Sweet buttermilk has attracted considerable interest as a product that is abundant in milk fat globule membrane components. The thermal properties of buttermilk can be effectively harnessed in the process of developing new dairy products and new production technologies.

The comprehensive comparison of the emulsion phase parameters, such as the size of fat globules, fatty acid profile and thermal properties of milk, cream and sweet buttermilk is insufficient in the literature. The aim of this study was to select the parameters of phase transition peaks differentiating milk, cream and sweet buttermilk, and to determine the influence of thermal history on the characteristics of DSC curves, considering the significant importance of the size of fat globules and fatty acid profile on the milk fat phase transitions.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The experimental material comprised pooled samples of cow's milk produced in the Bałdy Educational and Research Station of the University of Warmia and Mazury (UWM) in Olsztyn. Milk was cooled and transported in a refrigeration unit to the laboratory of the Faculty of Food Sciences of the UWM in Olsztyn. The raw milk, matured cream (obtained by centrifuging raw milk) and buttermilk (obtained by continuous churning of cream) were analysed. The experiment was performed in three replications.

Proximate composition of milk, cream and buttermilk

The dry matter content [AOAC International, method 990.20; 33.2.44, 2007], total nitrogen (TN) content (Kjeldahl method) [AOAC International, method 991.20; 33.2.11, 2007] and fat content (butyrometric method) [ISO 19662, 2018; ISO 19660, 2018] of the liquid samples of milk, cream and buttermilk were determined. Total protein content was calculated by multiplying the TN content of the samples by a conversion factor of 6.38.

Size of milk fat globules

The size of milk fat globules was determined in liquid samples of milk, cream and buttermilk by the laser diffraction method in the Mastersizer 3000 particle size analyser and the Hydro EV sample dispersion unit (Malvern Instrument, Malvern, United Kingdom). The refractive index of milk was determined at 1.46, and the refractive index of Milli-Q deionised water (Millipore, Molsheim, France) was 1.33.

The following parameters were determined: the diameter below which lies 10% of globules volume (d_v10); median diameter, 50% of the volume distribution is above, and 50% is below observed diameter (d_v50); the diameter below which lies 90% of globules volume (d_v90); uniformity of particles (SPAN), SPAN=$(d_v90-d_v10)/d_v50$; a volume-surface mean diameter of fat globules, Sauter Mean Diameter (d_{32}), $d_{32}=\Sigma Sd_i^3n_i/Sd_i^2n_i$; a volume-weighted mean diameter, De Brouckere Mean Diameter (d_{43}), $d_{43}=\Sigma Sd_i^4n_i/Sd_i^3n_i$, where n_i is the number of particles with diameter d_i.

Microscopic analysis

The liquid samples of milk, cream and buttermilk were analysed under the Nikon Eclipse TieC 1 microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany) at 60× magnification.

Fatty acid profile

Fat was extracted from milk, cream and buttermilk by the Rose-Gottlieb method [ISO, 2010]. Fatty acid esters were prepared according to a standard ISO 15884 method [ISO, 2002]. The fatty acid profile was determined by gas chromatography with a flame ionisation detector using the 7890 A Agilent Technologies system (Santa Clara, CA, USA). Separation was performed on the CP-Sil 88 column (100 m, 0.25 mm, 0.20 μm) (Agilent Technologies) with a temperature gradient of 60°C (1 min) to 180°C; time gradient of 5°C/min; injector temperature, 225°C; detector temperature, 250°C; carrier gas, helium; flow rate, 0.8 mL/min; split ratio, 1:100; sample volume, 1 μL; and liner, 0.4 mm. The reference material was BCR-164 anhydrous milk fat (LGC Standards, Kiełpin, Poland). The proportions of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), short-chain fatty acids (SCFAs), medium-chain fatty acids (MCFAs), long-chain fatty acids (LCFAs) and branched-chain fatty acids (BCFAs) were calculated. The proportions of SCFAs, MCFAs and LCFAs in total fatty acids were determined according to the method proposed by Jensen [2002]. The content of fatty acids was expressed in g/100 g of total fatty acids in a product and in g/100 g of the product. The following abbreviations were used in the description of fatty acid isomers: ai – *anteiso*, i – *iso*, c – *cis*, t – *trans*.

Freeze drying

Milk, cream and buttermilk samples were freeze-dried in the Alpha 1–2 LD plus freeze-dryer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) at a pressure of 0.34 mbar and a temperature of –32°C.

Analysis of freeze-dried samples

Water activity (a_w) of freeze-dried milk, cream and buttermilk was determined using the AquaLab 4TEV analyser (Meter Group AG, München, Germany). The analysis was carried out at a temperature of 25°C. Water activity was measured with an accuracy of ±0.003, and temperature was measured with an accuracy of ±0.3°C. The dry matter, fat and protein contents of freeze-dried samples were determined with the NIRS™ DS2500 analyser (FOSS, Hilleroed, Denmark).

Differential scanning calorimetry

Freeze-dried milk, cream and buttermilk (10±1 mg) were weighed on the Mettler Toledo XS205 Dual Range analytical balance (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA), placed in airtight aluminium pans, and subjected to a thermal analysis with the use of the DSC Q10 instrument with a refrigerated cooling system (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The cell was purged with dry nitrogen at 50 mL/min and calibrated for baseline in an empty oven and for temperature using standard pure indium. An empty sealed aluminium pan was used as a reference in every test. Samples were cooled or heated at a rate of 10°C/min and were held for 1 min at the endset temperature after each stage. They were analysed in triplicate in a DSC sequence composed of two cycles. Cycle I involved the following stages: 1) sample cooling from 30°C to –40°C; 2) sample heating from –40°C to 95°C. Cycle II commenced immediately after cycle I and involved sample cooling from 95°C to –40°C and sample heating from –40°C to 95°C in the following sequence: 1) cooling, 2) heating, 3) cooling, 4) heating, 5) cooling, 6) heating. Cycle II was applied to determine the effect of a sample's thermal history on the DSC curve, and to calculate the parameters of phase transition peaks. The results of the DSC analysis were processed using the Universal Analysis 2000 programme (TA Instruments). The following parameters of the identified phase transition peaks were determined: peak temperature (T_{max}; °C; determined as the peak maximum), phase transition onset temperature (T_{onset}; °C; defined by the intersection of a line tangent to the steepest section of the leading edge and the baseline of the thermogram), peak width at half height ($\Delta T_{1/2}$; °C; temperature range of the transition as peak width at half height), enthalpy change (ΔH; J/g; determined as the area limited by the curve, *i.e.* the peak and the baseline), peak height at maximum (P_{height}; W/g; determined as the heat flow range limited by T_{max} and P_s), peak onset temperature (P_s; °C; a point where a peak is formed) and peak endset temperature (P_e; °C; a point where a peak ends).

Statistical analysis

The results were analysed by one-way ANOVA, and the significance of differences between means was determined in Duncan's test at $p \leq 0.05$. The percentage content of individual fatty acids in total fatty acids in different samples was subjected to principal component analysis (PCA). Data were processed statistically in StatSoft Inc. Statistica v. 13.1 software (Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition of raw milk, cream and buttermilk

Raw milk contained 13.34±0.17 g/100 g dry matter, 3.99±0.05 g/100 g fat and 3.21±0.03 g/100 g protein. Cream contained 53.59±4.40 g/100 g dry matter, 46.38±2.55 g/100 g fat and 2.77±0.11 g/100 g protein. The content of dry matter, fat and protein in buttermilk was determined at 9.02±0.60 g/100 g, 0.56±0.01 g/100 g and 3.02±0.08 g/100 g, respectively. The composition of milk, cream and buttermilk was similar to that described by other authors [Vanderghem *et al*., 2010].

TABLE 1. Size of fat globules in milk, cream and buttermilk.

Product	d_v10 (μm)	d_v50 (μm)	d_v90 (μm)	SPAN	d_{43} (μm)	d_{32} (μm)
Milk	0.56±0.01[b]	3.69±0.18[a]	7.75±0.05	1.95±0.09[b]	3.89±0.18	1.70±0.02[b]
Cream	0.93±0.08[a]	3.87±0.19[a]	8.35±0.55	1.92±0.17[b]	5.15±0.85	2.22±0.10[a]
Buttermilk	0.38±0.01[c]	1.72±0.06[b]	8.55±2.31	4.74±1.22[a]	5.42±1.25	0.97±0.03[c]

The presented values are means ± standard deviations (n=3). Values with different superscripts (a–c) in columns differ significantly at $p \leq 0.05$. d_v10 – diameter below which lies 10% of globules volume; d_v50 – diameter below which lies 50% of globules volume; d_v90 – diameter below which lies 90% of globules volume; SPAN – uniformity of particles; d_{32} – volume-surface mean diameter of fat globules; d_{43} – volume-weighted mean diameter.

Size of milk fat globules

The size of fat globules was determined in the samples of liquid milk, cream and buttercream. The products were arranged in the following order based on the decreasing diameter of the fat globules (d_v10) and the Sauter mean diameter (d_{32}): cream > raw milk > buttermilk ($p \leq 0.05$) (Table 1). The values of d_v50 did not differ significantly between milk and cream ($p > 0.05$), but they were significantly higher than in buttermilk ($p \leq 0.05$). Buttermilk contained large fat globules or aggregates characterised by high values of d_v90 and d_{43}. The size of fat globules was comparable in buttermilk and cream, but greater variations in d_v90 and d_{43} were noted in buttermilk. Due to high standard deviation values, no significant differences in d_v90 or d_{43} values were found between the analysed samples ($p > 0.05$). Buttermilk was characterised by the highest values of SPAN ($p \leq 0.05$) denoting the size distribution of fat globules in the sample (Table 1). The microscopic analysis revealed the presence of fat globule agglomerates in cream and chains of very small fat globules in buttermilk (Figure 1).

Fatty acid profile

The fatty acid profiles of fats extracted from milk, cream and buttermilk are shown in Table 2. The percentage content of individual fatty acids in the examined samples demonstrated that their fatty acid composition was characteristic of milk fat and similar to these reported in the literature [Briard *et al*., 2003; Fauquant *et al*., 2005]. In our study, the milk, cream and buttermilk fatty acid profiles differed significantly ($p \leq 0.05$) in the content of C6:0, C12:0, C15:0 ai, C14:1, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1 Σt, C18:1 c9, C18:1 c11, C18:1 Σc, C18:2 Σt, and C18:2 c9 t11. The percentage content of most of the above fatty acids was highest in buttermilk and lowest in milk. The only exceptions were C6:0, C16:0 and C18:0 whose proportions were highest in milk and lowest in buttermilk. The percentage content of C12:0 and C16:1 was highest in buttermilk and lowest in cream, whereas the content of C17:0 was highest in cream and lowest in milk. Milk and cream were characterised by lower proportions of C10:0, C10:1, C13:0 ai, C13:0, C14:0, C15:0, C18:1 c12 and C18:2 than buttermilk. In turn, buttermilk was less abundant in C4:0 than the remaining products.

The variations in the fatty acid composition of the compared products could be attributed to differences in the fatty acid profile of phospholipids in buttermilk and milk. Buttermilk phospholipids have a lower content of C16:0 and a higher content of C18:0 and PUFAs that are found in larger quantities in membranes than inside milk fat globules [Fauquant *et al*., 2005; Garczewska-Murzyn *et al.*, 2021; Jhanwar & Ward, 2014]. The churning process induces a greater increase in phospholipid levels in buttermilk than in cream. Churning also increases the content of C18:1 and C18:2 in buttermilk relative to cream, and decreases the content of C16:0 in buttermilk phospholipids relative to cream phospholipids [Hokkanen *et al.*, 2021].

The potential relationship between the proportions of the analysed fatty acids and product type (milk, cream and buttermilk) was determined by PCA. The first two principal components (PC1 and PC2), presented in Figure 2, explained 92.45% of the total variance in input data. The first principal component (PC1) explained 71.81% of the variance in input data. A large positive score (0.60) was observed for buttermilk in the first principal direction, on the opposite side of the PC1 axis relative to milk and cream. The score for cream was very small at 0.18, whereas milk had

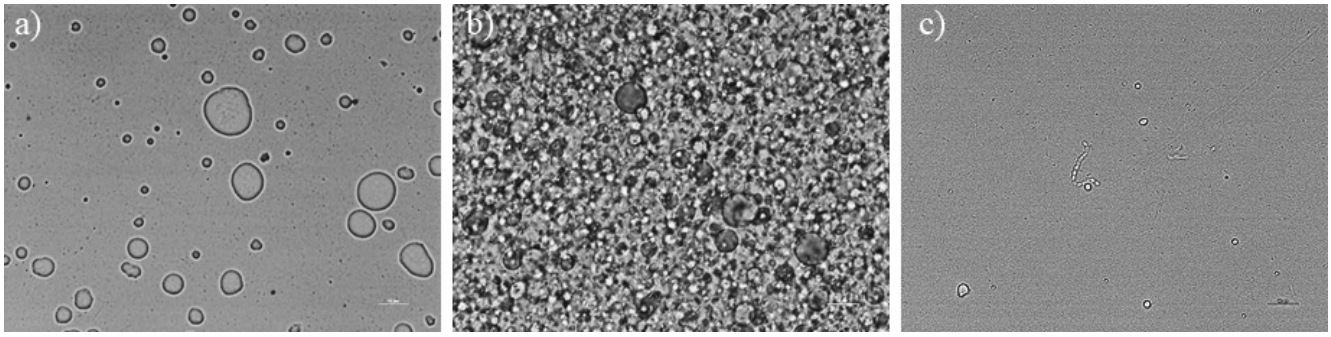


FIGURE 1. Microstructure of milk (a), cream (b) and buttermilk (c), 60× magnification.

a larger score of 0.42. Therefore, in milk and buttermilk, product type was highly related with the scalar projections for PC1. At the same time, the larger the loading for a given variable (fatty acid) relative to PC1, the greater the influence of product type (milk and buttermilk) on the percentage content of a given fatty acid. The points representing individual fatty acids and the sum of fatty acids of a given type were clustered in two groups at the opposite ends of the PC1 axis. The cluster on the left side of the plot grouped fatty acids with negative loadings in the range of -0.99 to -0.79 relative to the scalar projections for PC1. In this group, fatty acids were arranged in the following descending order based on the absolute value of the loadings relative to PC1: C16:0 i, C14:0 i, C16:0, C4:0, C6:0 and C18:0. The second group on the right side of the PC1 axis contained fatty acids with very large loadings in the range of 0.77 to 0.99. These fatty acids were arranged in the following ascending order based on the values of the loadings relative to PC1: C18:2 Σt, C18:1 c9, C15:0 i, C10:0, C12:0, C18:1 Σc, C13:0 ai, C14:0, C13:0, C10:1, C18:1 c12, C18:2, C15:0, C18:1 c11, C18:1 Σt, C15:0 ai, C14:1 and C18:2 c9 t11. The second principal component (PC2) explained 20.37% of the variance in input data. Cream had a score of 0.29, and it was represented by a point at the top of the plot. Milk had a negative loading of -0.22, and it was represented by a point in the bottom part of the plot. Therefore, in milk and cream, the relationship between the proportions of fatty acids and product type was stronger in relation to the scalar projections for PC2 than PC1. The larger the loading for a given variable (fatty acid) relative to PC2, the greater the influence of product type (milk and cream) on the percentage content of a given fatty acid. In relation to PC2, very large loadings were observed for C17:0 (0.94) at the top of the plot and C8:0 (-0.83) in the bottom part of the plot.

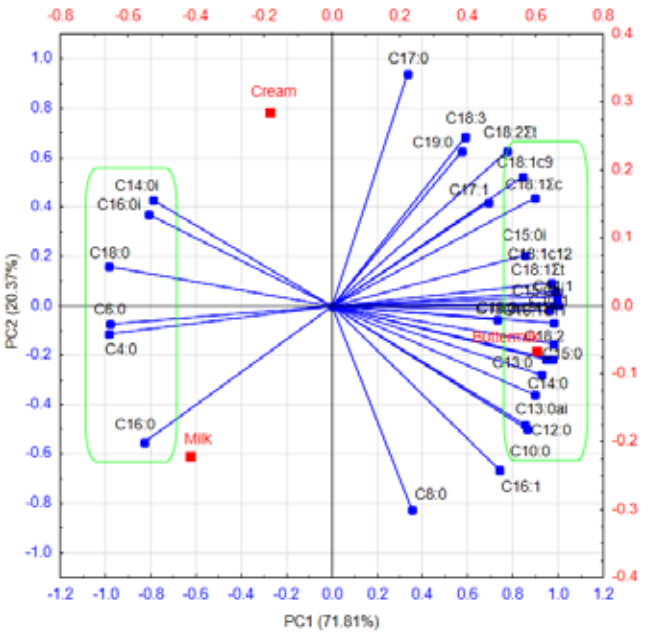


FIGURE 2. Principal component analysis (PCA) biplot of the milk, cream and buttermilk and relative content of their fatty acid to principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2).

TABLE 2. Relative content of fatty acids of milk, cream and buttermilk (g/100 g total fatty acids).

Fatty acid	Milk	Cream	Buttermilk
C4:0	2.67±0.05[a]	2.60±0.01[a]	2.44±0.01[b]
C6:0	1.80±0.00[a]	1.78±0.00[b]	1.72±0.01[c]
C8:0	1.11±0.01	1.10±0.00	1.11±0.01
C10:0	2.60±0.02[b]	2.56±0.00[b]	2.69±0.02[a]
C10:1	0.25±0.00[b]	0.26±0.00[b]	0.27±0.00[a]
C12:0	3.12±0.00[b]	3.06±0.00[c]	3.27±0.02[a]
C13:0 i	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00
C13:0 ai	0.08±0.00[b]	0.08±0.00[b]	0.09±0.00[a]
C13:0	0.09±0.00[b]	0.09±0.00[b]	0.10±0.00[a]
C14:0 i	0.12±0.00	0.13±0.00	0.12±0.00
C14:0	11.07±0.02[b]	11.06±0.00[b]	11.20±0.03[a]
C15:0 i	0.23±0.00[b]	0.23±0.00[ab]	0.24±0.00[a]
C15:0 ai	0.38±0.00[c]	0.41±0.00[b]	0.47±0.00[a]
C14:1	0.89±0.00[c]	0.91±0.00[b]	1.01±0.01[a]
C15:0	1.02±0.00[b]	1.03±0.00[b]	1.11±0.01[a]
C16:0 i	0.29±0.00	0.30±0.00	0.28±0.00
C16:0	32.84±0.09[a]	31.80±0.01[b]	31.48±0.06[c]
C16:1	1.51±0.01[b]	1.47±0.01[c]	1.55±0.00[a]
C17:0	0.40±0.00[c]	0.55±0.00[a]	0.49±0.00[b]
C17:1	0.28±0.10	0.37±0.00	0.40±0.01
C18:0	12.66±0.04[a]	12.54±0.00[b]	10.93±0.00[c]
C18:1 Σt	1.57±0.03[c]	1.68±0.04[b]	1.95±0.02[a]
C18:1 c9	22.03±0.14[c]	22.76±0.01[b]	23.03±0.03[a]
C18:1 c11	0.55±0.01[c]	0.57±0.01[b]	0.71±0.03[a]
C18:1 c12	0.19±0.01[b]	0.21±0.00[b]	0.25±0.01[a]
C18:1 Σc[1]	22.77±0.13[c]	23.54±0.00[b]	23.99±0.06[a]
C19:0	0.28±0.01	0.30±0.01	0.30±0.00
C18:2 Σt[2]	0.00±0.00[c]	0.14±0.01[b]	0.17±0.00[a]
C18:2	1.19±0.00[b]	1.19±0.00[b]	1.64±0.00[a]
C18:3	0.31±0.01[b]	0.35±0.00[a]	0.34±0.00[ab]
C18:2 c9 t11	0.38±0.00[c]	0.42±0.00[b]	0.55±0.00[a]
SFAs	70.85±0.19[a]	69.68±0.03[b]	68.13±0.09[c]
MUFAs	27.26±0.19[c]	28.22±0.04[b]	29.18±0.10[a]
PUFAs	1.88±0.01[c]	2.10±0.01[b]	2.69±0.00[a]
SCFAs	5.58±0.05[a]	5.47±0.02[b]	5.28±0.01[c]
MCFAs	54.57±0.10[a]	53.45±0.02[c]	53.96±0.09[b]
LCFAs	39.84±0.15[b]	41.08±0.03[a]	40.76±0.10[a]
BSFAs	1.17±0.01[c]	1.21±0.00[b]	1.28±0.00[a]

The presented values are means ± standard deviations (n=3). Values with different superscripts (a–c) in rows differ significantly at $p \leq 0.05$. n.d. – not detected; i – *iso*; ai – *anteiso*; c – *cis*; t – *trans*; SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; SCFAs – short-chain fatty acids, (C4–C8); MCFAs – – medium-chain fatty acids, (C10–C16); LCFAs – long-chain fatty acids, (C17–C19); BSFAs – branched-chain fatty acids (C13:0 i, C13:0 ai, C14:0 i, C15:0 i, C15:0 ai, C16:0 i).
[1]C18:1 Σc (c9, c11, c12).
[2]C18:2 Σt (t9 c12, t11 c15, c9 t12, c9 t13).

A comparison of the fatty acid groups located on opposite sides of the PC1 axis with the results of Duncan's test demonstrated that the proportions of these fatty acids (excluding C16:0 and C14:0 with loadings of 0.79 and -0.81, respectively) were significantly ($p \leq 0.05$) affected by product type. It can be assumed that the proportions of the remaining fatty acids also differed between the examined products (milk, cream and buttermilk).

The share of the main fatty acid groups, *i.e.* SFAs, MUFAs, PUFAs, SCFAs, MCFAs and BCFAs, in the total fatty acids differed significantly ($p \leq 0.05$) between the analysed products (Table 2). Whole milk fat was most abundant in SFAs and least abundant in MUFAs, PUFAs and BCFAs. The proportion of SFAs was lowest, whereas the proportions of MUFAs, PUFAs and BCFAs were highest in buttermilk fat. In terms of the length of the fatty acid chain, MCFAs (mostly C16:0 and C14:0) were the predominant fatty acids. The content of MCFAs was lowest in cream fat and highest in milk fat. Buttermilk was least abundant in SCFAs relative to the remaining products. The content of LCFAs was highest in cream, lower in buttermilk, and lowest in milk. The LCFA values in cream and buttermilk fat formed a homogeneous group ($p > 0.05$) and differed significantly ($p \leq 0.05$) from the values noted in milk. A similar content of MCFAs and LCFAs was reported by Jensen [2002]. The content of fatty acids per 100 g of the analysed product was approximately 15 times higher in cream than in buttermilk, and approximately 3 times higher in cream than in milk (Table 3).

TABLE 3. Fatty acid content of milk, cream and buttermilk (g/100 g of the product).

Fatty acids	Milk	Cream	Buttermilk
SFAs	21.00±0.23^{b}	58.79±0.21^{a}	3.88±0.12^{c}
MUFAs	8.08±0.09^{b}	23.81±0.08^{a}	1.66±0.05^{c}
PUFAs	0.56±0.01^{b}	1.77±0.01^{a}	0.15±0.01^{c}
SCFAs	1.65±0.02^{b}	4.62±0.02^{a}	0.30±0.01^{c}
MCFAs	16.17±0.18^{b}	45.10±0.16^{a}	3.08±0.09^{c}
LCFAs	11.81±0.13^{b}	34.66±0.12^{a}	2.32±0.07^{c}
BSFAs	0.35±0.01^{b}	1.02±0.01^{a}	0.07±0.01^{c}

The presented values are means ± standard deviations (n=3). Values with different superscripts (a–c) in rows differ significantly at $p \leq 0.05$. SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; SCFAs – short-chain fatty acids, (C4–C8); MCFAs – medium-chain fatty acids, (C10–C16); LCFAs – – long-chain fatty acids, (C17–C19); BSFAs – branched-chain fatty acids (C13:0 i, C13:0 ai, C14:0 i, C15:0 i, C15:0 ai, C16:0 i).

Differential scanning calorimetry

DSC involved freeze-dried samples of milk, cream and buttermilk because the presence of water could lead to the formation of unclear peaks, in particular lipid phase transition peaks. During DSC analysis, the phase transition peaks of water can overlap with the peaks of the remaining milk components, which could prevent the identification of differences between the DSC curves of milk, cream and buttermilk. Water was removed from the samples by freeze-drying which is the least invasive dehydration technique with minimum effects on milk components [Pugliese *et al.,* 2019].

Freeze-dried samples of buttermilk, milk and cream were characterised by water activity (a_w) of 0.05–0.08, dry matter content of 97.83±0.47 g/100 g, 97.73±0.69 g/100 g and 97.89±0.24 g/100 g; fat content of 5.70±0.17 g/100 g, 29.64±0.33 g/100 g and 84.37±0.30 g/100 g; and protein content of 34.72±0.12 g/100 g, 24.79±0.25 g/100 g and 5.08±0.20 g/100 g, respectively.

Differential scanning calorimetry supported the identification of exothermic (Figure 3) and endothermic (Figure 4) peaks that occurred in all samples and differed between the analysed products. Exothermic peaks were noted during cooling, and they were identified as: A – peaks that occurred in all samples within a temperature range of around 11°C to around -40°C; B – peaks that were not clearly separated from peaks A and were observed in milk and cream within a temperature range of around 15°C to around 11°C; C – peak noted only in cream within a temperature range of around 20–22°C to around 15°C. Peaks (A-C) denoting the crystallisation of the entire milk fat were not completely separated at a cooling rate of 10°C/min. Milk fat was crystallised within a temperature range of 20°C to -40°C, but clear zones denoting the crystallisation of selected milk fat fractions were also observed. The first zone ranged from 20°C to 15°C (peak C), and the second zone ranged from 10°C to -40°C (peak A). These peaks were separated by a zone where the crystallisation of selected milk fat fractions was accompanied by less pronounced thermal effects (peak B). The partial overlap between peaks A and B resulted from similar phase transition characteristics of milk fat components [Tomaszewska-Gras, 2013].

The peaks on the DSC curves of milk, cream and buttermilk in the present study (Figure 3), had similar characteristics to those reported by Truong *et al*. [2014]. A review of the literature indicates that exothermic peaks (A-C) were associated with crystallisation [Hokkanen *et al*., 2021; Michalski *et al.*, 2004; Tomaszewska-Gras, 2013; Truong *et al*., 2014]. Therefore, exothermic peaks A were probably associated with the proportions of MUFAs and PUFAs (mostly C18:1), whereas peaks B and C were influenced by the percentage content of SFAs (mostly C14:0, C16:0 and C18:0).

Endothermic peaks associated with milk fat melting were observed in the DSC curves of all samples (Figure 4) during heating within a temperature range of -40°C to 95°C. The first peak (D) did not have a clear onset temperature, and its endset temperature was determined at 18–24°C. Peak D was associated with LMPF and MMPF that were not clearly separated (they were separated at a temperature of around 14°C in the DSC curves of cream and milk). The second peak (E) began at approximately 18–24°C and ended at 34–42°C, and it was identified as HMPF.

In a study by Szulc *et al*. [2016], endothermic melting peaks in whole milk powder were identified in the temperature range of -10°C to 50°C. Endothermic peaks D and E associated with milk fat melting were reported by Hokkanen *et al*. [2021] and Michalski *et al.* [2004]. In the DSC curves of milk, cream and buttermilk, peak D representing the overlap between LMPF and MMPF was highly related with the scan rate.

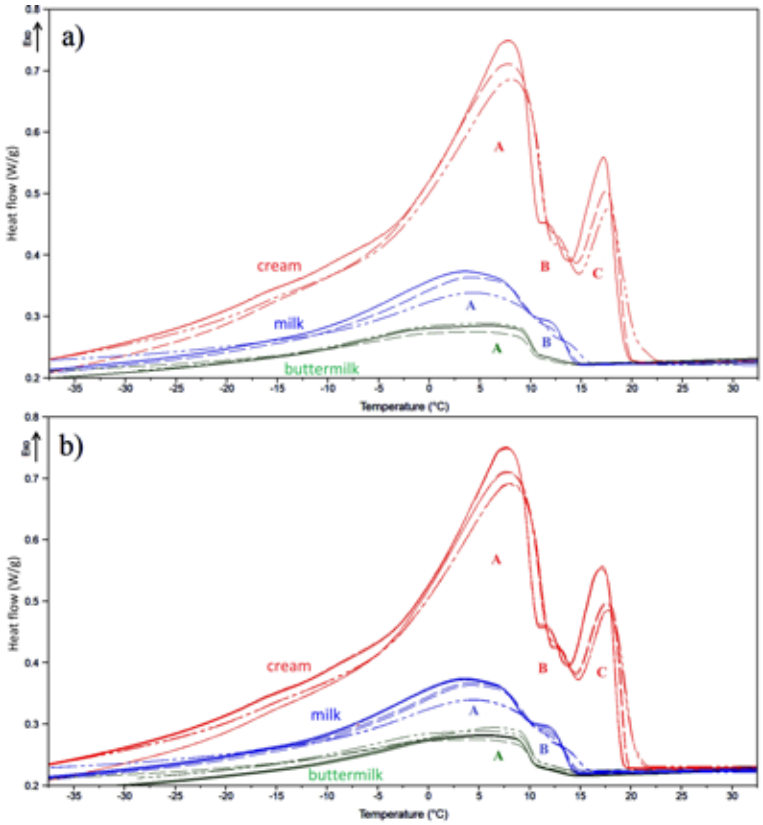


FIGURE 3. Exothermic peaks in differential scanning calorimetry (DSC) curves during freeze-dried milk, cream and buttermilk cooling in cycle I (a) and cycle II (b). Long-dash, short-dash and broken-dash lines represent replicate measurements in the same product. Different types of peaks are marked with letters A–C.

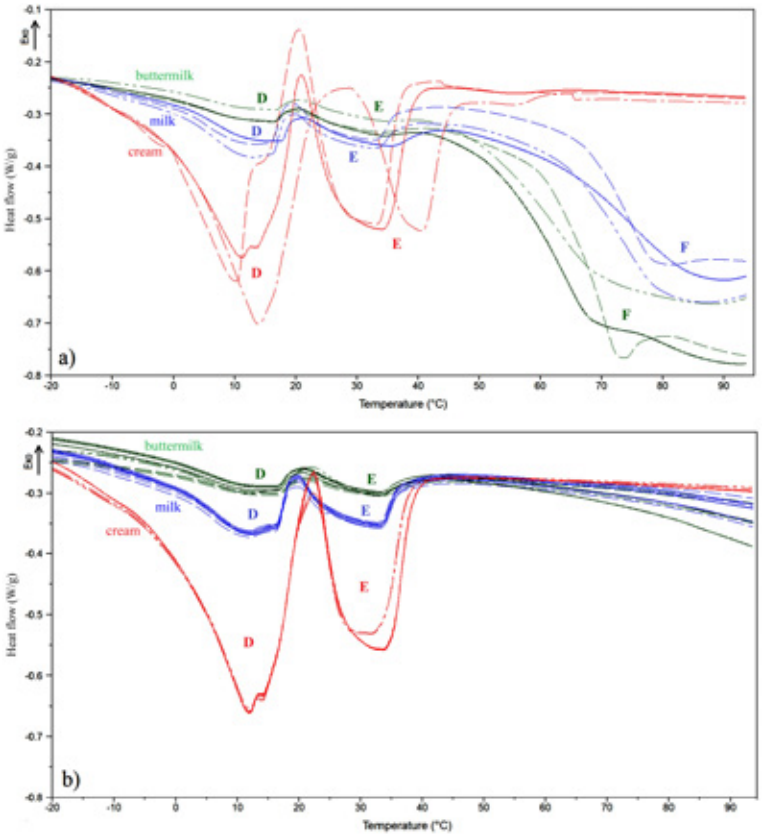


FIGURE 4. Endothermic peaks in differential scanning calorimetry (DSC) curves during freeze-dried milk, cream and buttermilk heating in cycle I (a) and cycle II (b). Long-dash, short-dash and broken-dash lines represent replicate measurements in the same product). Different types of peaks are marked with letters D–F.

TABLE 4. Parameters of exothermic phase transition peaks of freeze-dried milk, cream and buttermilk in cycle I and cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC) sequence.

Peak	Cycle	Product	T_{max} (°C)	P_{height} (W/g)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_{onset} (°C)	ΔH (J/g)	P_s (°C)	P_e (°C)
A[1]	I	Milk	3.95±0.44^{b}	0.14±0.02^{b}	18.90±0.44^{b}	14.46±0.14^{a}	18.19±2.50^{b}	16.36±0.84^{a}	n.d.*
		Cream	7.19±0.19^{a}	0.36±0.02^{a}	10.67±1.11^{c}	11.64±0.68^{b}	37.24±0.71^{a}	14.38±0.47^{b}	n.d.*
		Buttermilk	4.58±0.62^{b}	0.06±0.01^{c}	21.97±1.71^{aA}	11.47±0.88^{b}	8.93±0.98^{c}	15.56±0.24^{a}	n.d.*
	II	Milk	4.01±0.45^{c}	0.14±0.02^{b}	19.09±0.59^{b}	14.81±0.65^{a}	18.49±2.23^{b}	16.33±0.69^{a}	n.d.*
		Cream	7.30±0.37^{a}	0.36±0.02^{a}	10.65±0.97^{c}	11.64±0.65^{b}	34.21±4.49^{a}	14.33±0.45^{b}	n.d.*
		Buttermilk	4.69±0.36^{b}	0.06±0.01^{c}	19.88±0.33^{aB}	10.94±0.07^{c}	8.42±0.74^{c}	15.48±0.20^{a}	n.d.*
C	I	Cream	17.79±0.30	0.21±0.05	2.76±0.05^{B}	19.64±0.66	3.53±0.56	21.96±1.64	14.38±0.47
	II	Cream	17.99±0.33	0.22±0.04	3.01±0.09^{A}	19.50±0.53	3.71±0.57	20.79±1.11	14.33±0.45

The presented values are means ± standard deviations (n=3). Values in columns, marked with lowercase letters (a–c) in the superscript differ significantly at $p \leq 0.05$; experimental factor – three products in the same cycle. Values in columns, marked with uppercase letters (A, B) in the superscript differ significantly at $p \leq 0.05$; experimental factor – two cycles in the same product. T_{max} – peak temperature; T_{onset} – phase transition onset temperature; $\Delta T_{1/2}$ – peak width at half height, ΔH – enthalpy change; P_{height} – peak height at maximum; P_s – peak onset temperature; P_e – peak endset temperature. The peaks A and C are related to DSC curves in Figure 3.
[1]Undifferentiated peaks A and B (milk and cream) and peak A (buttermilk).
*no clear endset temperature.

Tomaszewska-Gras [2013] observed a peak corresponding to the overlap between LMPF and MMPF (-30°C to around 18°C) and a clearly separated second peak corresponding to HMPF (from around 18°C to 35°C) at the heating rate of 20°C/min. At the heating rate of 10°C/min, the peaks corresponding to LMPF and MMPF were clearly separated at a temperature of around 10°C.

Milk and buttermilk samples were also characterised by endothermic peaks F which began to form at around 40°C and extended beyond the heating threshold of 95°C (Figure 4). However, these peaks were not fully formed within the temperature range set in the experiment, and their parameters were not determined. Peaks F were associated with irreversible reactions, which is why they were not noted in cycle II of the DSC sequence. The characteristics of peaks F differed in the DSC curves of the analysed products (buttermilk, milk) (Figure 4). Taller peaks were noted in buttermilk than in milk due to differences in the protein content of these products. Therefore, peaks F were probably related to protein transitions, including denaturation or evaporation of water. In the experiments conducted by Szulc *et al*. [2016] and Ostrowska-Ligęza *et al*. [2012], peaks associated with protein denaturation in milk powders occurred within a temperature range of around 40°C to nearly 140°C, with a maximum at around 105°C.

In both cycles of the DSC sequence, peaks A-E were tallest and most clearly differentiated in cream. The peaks in the DSC curves of milk were much smaller, and the smallest peaks were observed in buttermilk. Peaks became clearly separated, and the value of ΔH and the absolute value of P_{height} increased with a rise in fat content (Table 4 and Table 5). These findings suggest that both exothermic and endothermic phase transitions promoted greater heat exchange in cream fat than in milk and buttermilk fat. The DSC curves (Figure 3 and Figure 4) and the chemical composition of milk, cream and buttermilk samples indicate that the presence of peaks in the analysed DSC sequence was influenced mainly by fat content. Higher fat content was also associated with a higher content of fatty acids in the examined samples (Table 3), and this factor played a role in the formation of peaks on DSC curves (Figure 3 and Figure 4). The effect of fat content on the DSC curves of milk, cream and buttermilk within the analysed temperature range was reported by Pugliese *et al*. [2019] who did not observe phase transition peaks in freeze-dried skim milk between -50°C and 100°C.

The parameters of phase transition peaks differed between milk, cream and buttermilk samples (Table 4 and Table 5). In most peaks, $\Delta T_{1/2}$ values were lowest in cream relative to the remaining samples ($p \leq 0.05$). The only exception was the value of $\Delta T_{1/2}$ in peak D in cycle I, which did not differ significantly between cream and the remaining products ($p > 0.05$). The lowest value of $\Delta T_{1/2}$ was noted in cycle II of the endothermic phase transition of cream ($p \leq 0.05$) (Table 5). The values of $\Delta T_{1/2}$ indicate that cream was characterised by the highest rates of crystallisation and melting. Exothermic peaks A and B in the DSC curves of cream were analysed jointly, and they were characterised by the highest maximum phase transition temperature ($p \leq 0.05$). In milk and buttermilk samples, T_{max} values were lower and did not differ significantly in cycle I ($p > 0.05$), but differed in cycle II ($p \leq 0.05$) (Table 4). In cycle II, T_{max} was lowest in peak D in the DSC curve of cream ($p \leq 0.05$). The T_{max} value of peak E did not differ between the examined products ($p > 0.05$) (Table 5). The highest value of T_{onset} denoting the beginning of a given phase transition was observed in exothermic peak A of milk in cycles I and II ($p \leq 0.05$) (Table 4) and in endothermic peak D of milk in cycle II ($p \leq 0.05$) (Table 5). The T_{onset} value of peak E was highest in cream ($p \leq 0.05$) (Table 5). An analysis of the overlap between peaks A and B in cycles I and II revealed the highest value of P_s in milk ($p \leq 0.05$) (Table 4), whereas in endothermic peaks in cycle II, the value of P_s was highest in cream ($p \leq 0.05$) (Table 5). The values

TABLE 5. Parameters of endothermic phase transition peaks of freeze-dried milk, cream and buttermilk in cycle I and cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC) sequence.

Peak	Cycle	Product	T_{max} (°C)	P_{height} (W/g)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_{onset} (°C)	ΔH (J/g)	P_s (°C)	P_e (°C)
D	I	Milk	12.94±0.47^{A}	-0.08±0.02^{b}	13.70±0.44^{B}	-1.88±1.07	7.51±1.93^{b}	n.d.*	20.16±0.90
		Cream	11.85±1.79	-0.42±0.06^{a}	14.76±1.28	-4.33±2.41	42.03±4.19^{a}	n.d.*	23.36±4.54
		Buttermilk	11.73±0.24	-0.03±0.00^{c}	14.55±0.45^{B}	-2.93±0.87^{A}	2.78±0.54^{cB}	n.d.*	20.22±0.33^{B}
	II	Milk	12.09±0.30^{aB}	-0.09±0.02^{b}	14.63±0.26^{abA}	-2.90±1.02^{a}	8.64±1.76^{b}	n.d.*	20.21±0.64^{c}
		Cream	11.62±0.49^{b}	-0.40±0.03^{c}	13.61±1.11^{b}	-3.80±0.88^{b}	38.84±1.88^{a}	n.d.*	22.58±0.36^{a}
		Buttermilk	12.07±0.37^{a}	-0.04±0.01^{a}	15.51±0.29^{aA}	-4.35±0.64^{bB}	3.81±0.72^{cA}	n.d.*	21.19±0.44^{bA}
E	I	Milk	33.46±1.20	-0.05±0.01^{b}	12.66±0.71^{A}	20.97±0.97	3.86±0.77^{b}	20.26±0.83	42.79±2.04^{B}
		Cream	34.37±5.58	-0.29±0.04^{c}	11.34±2.45	24.73±5.80	19.63±5.08^{a}	23.36±4.54	45.17±4.12
		Buttermilk	32.50±0.26	-0.02±0.00^{aA}	12.69±0.36^{A}	21.61±0.48	1.26±0.28^{cB}	20.25±0.29^{B}	40.05±0.87^{B}
	II	Milk	33.36±0.87	-0.07±0.01^{b}	11.73±0.30^{aB}	20.88±0.70^{c}	4.68±0.89^{b}	20.22±0.74^{c}	45.58±0.60^{aA}
		Cream	32.74±0.68	-0.28±0.02^{c}	10.69±1.09^{b}	23.32±0.45^{a}	17.31±2.02^{a}	22.62±0.46^{a}	43.66±0.39^{b}
		Buttermilk	32.96±0.43	-0.03±0.00^{aB}	10.98±0.14^{bB}	21.85±0.41^{b}	1.88±0.28^{cA}	21.23±0.40^{bA}	42.64±0.37^{cA}

The presented values are means ± standard deviations (n=3). Values in columns, marked with lowercase letters (a–c) in the superscript differ significantly at $p \leq 0.05$; experimental factor – three products in the same cycle. Values in columns, marked with uppercase letters (A, B) in the superscript differ significantly at $p \leq 0.05$; experimental factor – two cycles in the same product. T_{max} – peak temperature; T_{onset} – phase transition onset temperature; $\Delta T_{1/2}$ – peak width at half height, ΔH – enthalpy change; P_{height} – peak height at maximum; P_s – peak onset temperature; P_e – peak endset temperature. The peaks D and E are related to DSC curves in Figure 4.
*no clear onset temperature.

of P_e differed significantly between the samples ($p \leq 0.05$) only in endothermic peaks D and E in cycle II (Table 5).

The DSC sequence was divided into two cycles to analyse the impact of thermal history on the characteristics of DSC curves and the parameters of phase transition peaks in milk, buttermilk and cream samples. A comparison of cycle I and cycle II revealed minor differences in the exothermic crystallisation peaks of milk fat (Figure 3). Significant differences ($p \leq 0.05$) in $\Delta T_{1/2}$ values were found between peak A of buttermilk and peak C of cream (Table 4), which suggests that buttermilk fat was crystallised more rapidly, whereas cream fat was crystallised at a slower rate in cycle II. An analysis of endothermic peaks revealed greater differences in curve characteristics and the parameters of phase transition peaks between cycle I and cycle II (Figure 4, Table 5). The most notable difference was the absence of peaks F in milk and buttermilk samples in cycle II, which are probably associated with irreversible phase transitions of proteins in cycle I. Only endothermic peaks relating to reversible fat melting reactions were noted in cycle II. Significant differences ($p \leq 0.05$) in the parameters of melting peaks were observed between cycle I and cycle II, including in the values of T_{max} in peak D, $\Delta T_{1/2}$ and ΔH in peaks D and E, P_e in peak E in milk samples, T_{onset} and P_e in peak D, $\Delta T_{1/2}$ and ΔH in peaks D and E, and P_s and P_e in peak E in buttermilk samples (Table 5). The remaining parameters of exothermic and endothermic processes did not differ significantly ($p > 0.05$) between cycle I and cycle II (Table 4 and Table 5). In repeated analyses of the same product, greater differences in peak parameters (higher standard deviation) and curve characteristics were observed in cycle I than in cycle II, in particular in endothermic peaks in cream (Table 5, Figure 4). In endothermic peaks, significant differences ($p \leq 0.05$) in the values of $\Delta T_{1/2}$, P_s and P_e were determined only in cycle II (Table 5). The differences between DSC cycles indicate that the thermal history of the examined samples influenced curve characteristics, crystallisation rate, onset temperature, melting rate and changes in melting enthalpy. Other authors also observed that thermal history affects the shape of the DSC curves, the parameters of crystallisation and melting of milk fat, as well as microcrystal structure and nucleation rate which determine crystal polymorphism and size [Lopez *et al*., 2007; ten Grotenhuis, 1999; Tomaszewska-Gras, 2013]. Changes in temperature promote the conversion of unstable polymorphic α forms of milk fat crystals into stable β and β' forms due to thermal memory effects [Wiking *et al*., 2009]. These factors were probably responsible for the differences between cycle I and cycle II of the analysed DSC sequence, in particular in melting parameters, as well as the similarities in DSC curves representing repeated heating and cooling stages in cycle II (Figure 4).

CONCLUSIONS

The research results provide a comprehensive overview of the properties of the milk, cream and sweet buttermilk emulsion phase. The fat globules were largest in cream and smallest in buttermilk. The microscopic analysis revealed the presence of fat globule agglomerates in cream and chains of small fat globules in buttermilk. The size of fat globules was related with the fatty acid content of the examined products. The proportion of LCFAs was highest in cream and lowest in milk, whereas the reverse was noted in an

analysis of MCFAs. The content of monoenoic and polyenoic fatty acids was highest in buttermilk and lowest in milk, and it was related with the content of fat globule membrane components. The analysed products differed in the shape of DSC curves and the parameters of phase transition peaks. Unlike milk and buttermilk, cream was characterised by an additional peak on the DSC curve, as well as much higher values of crystallisation and greater changes in melting enthalpy. These differences were probably induced by fat content which was related with the fatty acid composition of each product. The study demonstrated that parameters T_{max}, P_{height} and $\Delta T_{1/2}$ of exothermic crystallisation peaks and parameters P_{height}, $\Delta T_{1/2}$ and ΔH of endothermic melting peaks were reliable indicators for comparing the thermal properties of milk, cream and buttermilk. The thermal history of the examined products, which was shaped during repeated heating and cooling stages within a temperature range of -40°C to 95°C, influenced the crystallisation and melting characteristics of milk, cream and buttermilk fat. The thermal phase transitions should be characterised in greater detail and linked with the fatty acid profile and the size of milk fat globules, which may be used to optimise the production and storage processes of dairy products and to improve and control their quality. Milk, buttermilk and cream should also be compared in terms of the contents of components other than milk fat.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Justyna Ziajka and Waldemar Brandt for technical assistance during the study.

RESEARCH FUNDING

Project financially supported by the Minister of Education and Science under the program entitled “Regional Initiative of Excellence” for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN.

CONFLICT OF INTERESTS

Authors declare no conflict of interests.

ORCID IDs

K. Bohdziewicz https://orcid.org/0000-0003-2394-0495
O. Brożek https://orcid.org/0000-0002-0133-3224
K. Kiełczewska https://orcid.org/0000-0002-5267-925X

REFERENCES

1. AOAC. 2007. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD, AOAC International.
2. Berton, A., Rouvellac, S., Robert, B., Rousseau, F., Lopez, C., Crenon, I. (2012). Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their *in vitro* digestion by the human pancreatic lipase: Native *versus* homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids, 29*(1), 123–134. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.016
3. Briard, V., Leconte, N., Michel, F., Michalski, M.-C. (2003). The fatty acid composition of small and large naturally occurring milk fat globules. *European Journal of Lipid Science and Technology, 105*(11), 677–682. https://doi.org/10.1002/ejlt.200300812
4. Bugeat, S., Briard-Bion, V., Pérez, J., Pradel, P., Martin, B., Lesieur, S., Lopez, C. (2011). Enrichment in unsaturated fatty acids and emulsion droplet size affect the crystallization behaviour of milk triacylglycerols upon storage at 4°C. *Food Research International, 44*(5), 1314–1330. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.003
5. Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers, 4*(2), 44–51. https://doi.org/10.2527/af.2014-0014
6. Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal, 18*, 436–457. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014
7. Dhungana, P., Truong, T., Palmer, M., Bansal, N., Bhandari, B. (2017). Size-based fractionation of native milk fat globules by two-stage centrifugal separation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 41*, 235–243. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.03.011
8. El-Loly, M.M. (2011). Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane: a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 61*(1), 7–32. https://doi.org/10.2478/v10222-011-0001-0
9. Fauquant, C., Briard, V., Leconte, N., Michalski, C. (2005). Differently sized native milk fat globules separated by microfiltration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core. *European Journal of Lipid Science and Technology, 107*(2), 80–86. https://doi.org/10.1002/ejlt.200401063
10. Garczewska-Murzyn, A., Smoczyński, M., Kotowska, N., Kiełczewska K. (2021). Effect of buttermilk and skimmed milk powder on the properties of low-fat yoghurt. *Journal of Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05227-w
11. Gassi, J.Y., Blot, M., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Camier, B., Rousseau, F., Bourlieu, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Lambert, S., Gesan-Guiziou, G., Lopez, C., Gaucheron, F. (2016). Preparation and characterisation of a milk polar lipids enriched ingredient from fresh industrial liquid butter serum: Combination of physico-chemical modifications and technological treatments. *International Dairy Journal, 52*, 26–34. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.012
12. Hickey, C.D., Diehl, B.W.K., Nuzzo, M., Millqvist-Feurby, A., Wilkinson, M.G., Sheehan, J.J. (2017). Influence of buttermilk powder or buttermilk addition on phospholipid content, chemical and bio-chemical composition and bacterial viability in Cheddar style-cheese. *Food Research International, 102*, 748–758. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.067
13. Hokkanen, S.P., Partanen, R., Jukkola, A., Frey, A.D., Rojas, O.J. (2021). Partitioning of the milk fat globule membrane between buttermilk and butter serum is determined by the thermal behaviour of the fat globules. *International Dairy Journal, 112*, art. no. 104863. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104863

14. ISO (2002). Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters. ISO standard 15884/IDF 182:2002.
15. ISO (2010). Milk – Determination of fat content – Gravimetric method (Reference method). ISO standard 1211/IDF 1:2010.
16. ISO (2018). Cream – Determination of fat content – Acido-butyrometric (Gerber method). ISO standard 19660/IDF 237:2018.
17. ISO (2018). Milk – Determination of fat content – Acido-butyrometric (Gerber method). ISO standard 19662/IDF 238:2018.
18. Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science, 85*(2), 295–350. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4
19. Jhanwar, A., Ward, R.E. (2014). Particle size distribution and lipid composition of skim milk lipid material. *International Dairy Journal, 36*(2), 110–117. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.010
20. Jukkola, A., Rojas, O.J. (2017). Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects. *Advances in Colloid and Interface Science, 245*, 92–101. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.010
21. Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassi, J-Y., Cauty, C., Lopez, Ch., Gésan-Guiziou, G. (2016). The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. *Food Research International, 83*, 121–130. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.002
22. Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M. (2007). Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules. *Le Lait, 87*(4–5), 459–480. https://doi.org/10.1051/lait:2007018
23. Lopez, C., Cauty, C., Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology, 95*(6), 863–893. https://doi.org/10.1007/s13594-015-0263-0
24. Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Keller, G., Ollivon, M. (2001). Thermal and structural behavior of milk fat: 2. Crystalline forms obtained by slow cooling of cream. *Journal of Colloid and Interface Science, 240*(1), 150–161. https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7664
25. Michalski, M.-C., Leconte, N., Briard-Bion, V., Fauquant, J., Maubois, J., Goudédranche, H. (2006). Microfiltration of raw whole milk to select fractions with different fat globule size distributions: Process optimization and analysis. *Journal of Dairy Science, 89*(10), 3778–3790. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72419-5
26. Michalski, M.-C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids, 132*(2), 247–261. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.007
27. Ostrowska-Ligęza, E., Górska, A., Wirkowska, M., Koczoń, P. (2012). An assessment of various powdered baby formulas by conventional methods (DSC) or FT-IR spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 110*(1), 465–471. https://doi.org/10.1007/s10973-011-2158-5
28. Pugliese, A., Paciulli, M., Chiavaro, E., Mucchetti, G. (2019). Application of differential scanning calorimetry to freeze-dried milk and milk fractions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 137*(2), 703–709. https://doi.org/10.1007/s10973-018-7971-7
29. Sanchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zancada, L., Hueso, P. (2009). Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal, 19*(5), 273–278. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.006
30. Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science, 11*(2–3), 154–163. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.002
31. Singh, H., Gallier, S. (2017). Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids, 68*, 81–89. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.011
32. Smoczyński, M., Staniewski, B., Kiełczewska, K. (2012). Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane – some nutritional and technological implications. *Food Review International, 28*(2), 188–202. https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595024
33. Szulc, K., Nazarko, J., Ostrowska-Ligęza, E., Lenart, A. (2016). Effect of fat replacement on flow and thermal properties of dairy powders. *LWT – Food Science and Technology, 68*, 653–658. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.060
34. ten Grotenhuis, E., van Aken, G.A., van Malssen, K.F., Schenk, H. (1999). Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 76*(9), 1031–1039. https://doi.org/10.1007/s11746-999-0201-5
35. Tomaszewska-Gras, J. (2013) Melting and crystallization DSC profiles of milk fat depending on selected factors. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 113*(1), 199–208. https://doi.org/10.1007/s10973-013-3087-2
36. Truong, T., Bansal, N., Sharma, R., Palmer, M., Bhandari, B. (2014). Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. *Food Chemistry, 145*, 725–735. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.072
37. Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 14*(3), 485–500.
38. Wiking, L., De Graef, V., Rasmussen, M., Dewettinck, K. (2009). Relations between crystallisation mechanisms and microstructure of milk fat. *International Dairy Journal, 19*(8), 424–430. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.003

International Dairy Journal 129 (2022) 105339

Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idairyj

Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures

Oskar Michał Brożek*, Katarzyna Kiełczewska, Krzysztof Bohdziewicz

Department of Dairy Science and Quality Management, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 7, 10–719, Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 August 2021
Received in revised form
25 January 2022
Accepted 25 January 2022
Available online 2 February 2022

ABSTRACT

The fatty acid (FA) profile and thermal characteristics of ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk (in increments of 10%) were determined. Ovine milk was characterised by higher proportions of short-chain FAs (SCFAs), long-chain FAs (LCFAs) and polyunsaturated FAs (PUFAs). The content of bovine milk in the samples affected the characteristics of DSC curves. Strong correlations were observed between fat content of milk lyophilisates, content of individual FAs in total FAs and in milk lyophilisates of PUFAs, SCFAs, LCFAs and a lot of FAs from C6 to C18, the parameters of phase transitions peaks of milk fat (crystallisation, $\Delta T_{1/2}$, T_{onset}, and melting: low-melting point, $\Delta T_{1/2}$; medium-melting point, T_{max}, T_{onset}; high-melting point, ΔH, $\Delta T_{1/2}$, P_{height}) and the bovine-to-ovine milk ratio in the mixtures.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine milk is most widely used in the dairy industry on account of its low cost and availability, but milk of other mammalian species is also collected and processed. Sheep are among the most common milk–producing mammals. Ovine milk is more abundant in dry matter than bovine milk, and it is characterised by higher proportions of milk fat, whey proteins and casein (Barłowska, Szwajkowska, Litwińczuk, & Król, 2011; Potočnik, Gantner, Kuterovas, & Cividini, 2011). Ovine milk has a higher content of saturated fatty acids (SFAs), in particular SFAs with ≤16 carbon atoms, than bovine milk (Pietrzak-Fiećko & Kamelska-Sadowska, 2020), which results in its lower iodine value (Park, Juárez, Ramos, & Haenlein, 2007). The chemical composition of milk is determined by sheep breed, season, lactation phase, and animal diets (Danków & Pikul, 2011; De La Fuente et al., 2009; Konieczny, 2009). These factors influence the fatty acid (FA) profile and results of DSC analyses (Couvreur, Hurtaud, Lopez, Delaby, & Peyraud, 2006; De La Fuente et al., 2009). However, applicability of differential scanning calorimetry (DSC) for ovine milk analysis has been rarely explored in the available literature (Osthoff, Hugo, Joubert, & Swarts, 2011).

Phase transitions of milk fat, in particular crystallisation and melting, are influenced by numerous factors, including the composition of fat emulsions, FA profile, structure of triacylglycerols, crystal polymorphism, and size of milk fat globules. As a result, phase transitions occur within a wide range of temperatures from −40 °C to 40 °C (Hokkanen, Partanen, Jukkola, Frey, & Rojas, 2021; Michalski, Ollivon, Briard, Leconte, & Lopez, 2004; Truong, Bansal, Sharma, Palmer, & Bhandari, 2014). The above factors affect the shape of DSC curves, including the number of peaks and peak overlaps, which are also influenced by scan rate (heating/cooling rate) and thermal history (Amara-Dali et al., 2007; Lopez, Lesieur, Bourgaux, & Ollivon, 2005; Tomaszewska-Gras, 2013). As reported by Tomaszewska-Gras (2013), a cooling rate below 5 °C min^{-1} contributes to a decrease in the height of milk fat crystallisation peaks, whereas a cooling rate higher than 20 °C min^{-1} inhibits peak separation and promotes peak overlapping. Moreover, an increase in cooling rate contributes to crystallisation of bovine milk fat which occurs at 21.35 °C at a cooling rate of 1 °C min^{-1}, and at 11.10 °C at a cooling rate of 20 °C min^{-1}. In DSC analyses, fat crystallisation is usually represented by two exothermic peaks during cooling. Melting is visualised by three endothermic peaks corresponding to low-, middle- and high-melting point fractions (LMPF, MMPF and HMPF, respectively).

The FA profile and the thermal properties of ovine milk, as well as changes in the above parameters in ovine and bovine milk mixtures have not been studied extensively to date. Therefore, the

* Corresponding author.
E-mail address: oskar.brozek@uwm.edu.pl (O.M. Brożek).

https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339
0958-6946/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

aim of this study was to identify changes in FA composition, characteristics of DSC curves, and parameters of phase transition peaks in ovine and bovine milk mixtures with different proportions of bovine milk, and to describe relationships between the examined parameters.

2. Materials and methods

2.1. Research material

The research material was bovine milk collected from Holstein–Friesian cows and ovine milk collected from Kamieniecka ewes. Composite milk samples were obtained in spring from cattle and sheep that were fed a total mixed ration (TMR) and were reared in the Polish voivodeship of Warmia and Mazury. Raw bovine and ovine milk as well as bovine and ovine milk mixtures containing 10–90% (v/v) of bovine milk (in 10% increments) were analysed in the study. Milk samples for the study were collected in triplicate.

2.2. Chemical composition

The proximate composition of milk, including the content of proteins, casein, lactose and dry matter, was determined with the MilkoScan™ FT 1200 milk analyser (Foss, Hillerød, Denmark).

2.3. Fatty acid profile

Milk fat was extracted by the Rose–Gottlieb method (ISO, 2011). Fatty acid esters were prepared according to standard ISO 15884. The FA profile was determined by gas chromatography with a flame ionisation detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was performed on the CP–Sil 88 column (100 m, 0.25 mm, 0.20 μm) (Agilent Technologies) with a temperature gradient of 60 °C (1 min) to 180 °C; Dt = 5 °C min^{-1}; injector temperature 225 °C; detector temperature 250 °C; carrier gas helium; flow rate 0.8 mL min^{-1}; split ratio 1:100; sample volume 1 μL; liner 0.4 mm. The reference material was BCR–164 anhydrous milk fat (LGC Standards, Kiełpin, Poland). The proportions of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), short–chain fatty acids (SCFAs), medium–chain fatty acids (MCFAs), long–chain fatty acids (LCFAs) and branched–chain fatty acids (BCFAs) were calculated. The proportions of SCFAs, MCFAs and LCFAs in total FAs were determined according to the method proposed by Jensen (2002). Content of individual FAs was expressed in grams per 100 g of total FAs in the product and in grams per 100 g of the lyophilisates based on its fat content.

2.4. Lyophilisation

Samples were frozen to a temperature of −22 °C and then lyophilised at 0.34 mbar and −32 °C using the CHRIST Alpha 1–2 LD plus freeze–drier (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany).

2.5. Characteristics of lyophilisates

Dry matter and fat content of lyophilised samples were determined according to AOAC standards (method 990.20; 33.2.44; AOAC, 2007) and the Rose-Gottlieb extraction and weighing method (ISO, 2011), respectively. Water activity in the lyophilised samples was determined at a temperature of 25 °C using the AquaLab 4TEV analyser (Meter Group AG, München, Germany), with ±0.003 accuracy of dew point measurements and ±0.3 °C accuracy of temperature measurements. Microstructure of lyophilised samples was observed and recorded with the use of the QUANTA 200 scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Proportions of FA groups in lyophilisates were expressed in grams per 100 g of the product based on its fat content.

2.6. DSC analysis

The DSC analysis was conducted with the DSC Q10 differential scanning calorimeter with a closed RCS cooling system (TA Instruments, New Castle, DE, USA) that was calibrated with indium. Lyophilised samples were ground to a fine powder and thoroughly combined to obtain homogeneous samples. Samples of 3 ± 1 mg each were analysed according to the instructions in the DSC Q10 operating manual. The samples were weighed (XS205 DualRange, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) and placed in biconvex, hermetically sealed aluminium measuring crucibles. Due to their low water content, samples of 3 ± 1 mg each were characterised by a high mass-to-volume ratio, and they completely filled the bottom of the measuring crucible. For this reason, efforts were made to ensure good contact between the sample and bottom of the crucible. An empty hermetically sealed aluminium measuring crucible was used as the reference sample. Measurements were conducted in the following sequence: (i) heating from 10 °C to 95 °C; (ii) cooling from 95 °C to −40 °C, (iii) heating from −40 °C to 40 °C. In all stages, temperature was modified at a rate of 10 °C min^{-1}, and after each stage, the samples were maintained at the final temperature for 1 min. DSC analysis was conducted in triplicate at nitrogen flow rate of 50 mL min^{-1}. Results of the DSC analysis were processed using the Universal Analysis 2000 program (TA Instruments). The following parameters to identify phase transition peaks were determined: maximum peak temperature (T_{max}), phase transition onset temperature (T_{onset}), temperature range of transition as peak width at half height ($\Delta T_{1/2}$), enthalpy (ΔH) and maximum peak height (P_{height}).

2.7. Statistical analysis

Results were analysed by one-way ANOVA, and the significance of differences between means was determined by Duncan's test at $\alpha = 0.05$. Normality of distribution was verified using the Shapiro–Wilk test. Average values of three replicates were subjected to principal component analysis (PCA). Pearson's linear correlation between FAs, thermal parameters and the bovine-to-ovine milk ratio were calculated at $\alpha = 0.01$. Data were processed statistically using StatSoft Inc. Statistica v. 13.1 software (Tulsa, Oklahoma, USA).

3. Results and discussion

Milk collected from Kamieniecka sheep had the following proximate composition: dry matter content 19.11% ± 0.09%, fat content 7.91% ± 0.06%, protein content 5.06% ± 0.03, and lactose content 5.42% ± 0.03%. Raw bovine milk contained 13.44% ± 0.08% dry matter, 4.20% ± 0.04% fat, 3.63% ± 0.02% protein, and 4.90 ± 0.02% lactose. Ovine milk was higher in all dry matter components than bovine milk. Results are consistent with those in the literature (Barłowska et al., 2011; Cinar, Serbester, Ceyhan, & Gorgulu, 2015; Park et al., 2007; Stocco, Cipolat-Gotet, Bobbo, Cecchinato, & Bittante, 2017).

3.1. Fatty acid profile

The proportions of individual FAs and FA groups in ovine and bovine milk (Table 1) point to the typical FA composition of fat in

Table 1
Fatty acid profile of ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk.[a]

Fatty acid	Ovine milk	Percentage of bovine milk in bovine and ovine milk mixtures									Bovine milk	Correlation coefficient r (*P*-value <0.001)	Regression equation
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%			
C4:0	2.58 (±0.03)^{ab}	2.62 (±0.01)^{a}	2.55 (±0.02)^{ab}	2.54 (±0.03)^{b}	2.58 (±0.07)^{ab}	2.42 (±0.04)^{cd}	2.46 (±0.01)^{c}	2.42 (±0.02)^{cd}	2.34 (±0.01)^{e}	2.46 (±0.03)^{c}	2.36 (±0.02)^{de}	−0.84	y = −0.0024x + 2.6068
C6:0	2.38 (±0.01)^{b}	2.42 (±0.01)^{a}	2.33 (±0.01)^{c}	2.30 (±0.01)^{c}	2.24 (±0.02)^{d}	2.06 (±0.04)^{f}	2.11 (±0.02)^{e}	2.05 (±0.01)^{f}	1.91 (±0.01)^{g}	1.88 (±0.01)^{g}	1.69 (±0.02)^{h}	−0.97	y = −0.0068x + 2.4623
C8:0	2.58 (±0.01)^{a}	2.60 (±0.01)^{a}	2.44 (±0.01)^{b}	2.39 (±0.01)^{b}	2.20 (±0.01)^{c}	1.95 (±0.17)^{de}	1.99 (±0.01)^{d}	1.84 (±0.01)^{e}	1.60 (±0.01)^{f}	1.42 (±0.01)^{g}	1.09 (±0.01)^{h}	−0.97	y = −0.0145x + 2.7352
C10:0	8.01 (±0.02)^{a}	8.01 (±0.01)^{a}	7.52 (±0.01)^{b}	7.35 (±0.02)^{b}	6.69 (±0.01)^{c}	5.87 (±0.67)^{de}	5.95 (±0.03)^{d}	5.42 (±0.01)^{e}	4.63 (±0.01)^{f}	3.92 (±0.01)^{g}	2.81 (±0.02)^{h}	−0.97	y = −0.0506x + 8.5475
C10:1	0.20 (±0.01)^{g}	0.22 (±0.01)^{f}	0.22 (±0.01)^{f}	0.23 (±0.01)^{ef}	0.24 (±0.01)^{e}	0.25 (±0.02)^{cd}	0.25 (±0.01)^{d}	0.26 (±0.01)^{bc}	0.27 (±0.01)^{b}	0.30 (±0.01)^{a}	0.30 (±0.01)^{a}	0.96	y = 0.0010x + 0.2014
C11:0	0.08 (±0.01)^{e}	0.08 (±0.01)^{e}	0.09 (±0.01)^{e}	0.09 (±0.01)^{e}	0.09 (±0.01)^{e}	0.09 (±0.01)^{d}	0.10 (±0.01)^{cd}	0.10 (±0.01)^{bd}	0.10 (±0.01)^{bc}	0.11 (±0.01)^{a}	0.10 (±0.01)^{ab}	0.83	y = 0.0025x + 0.0798
C12:0	4.57 (±0.01)^{ab}	4.64 (±0.01)^{a}	4.49 (±0.04)^{b}	4.53 (±0.01)^{b}	4.38 (±0.01)^{c}	4.27 (±0.13)^{d}	4.25 (±0.01)^{d}	4.19 (±0.01)^{d}	4.02 (±0.01)^{e}	3.91 (±0.01)^{f}	3.62 (±0.03)^{g}	−0.95	y = −0.0090x + 4.7084
C13:0i	0.02 (±0.01)^{f}	0.03 (±0.01)^{ef}	0.03 (±0.01)^{df}	0.04 (±0.01)^{de}	0.04 (±0.01)^{d}	0.06 (±0.01)^{c}	0.06 (±0.01)^{c}	0.06 (±0.01)^{c}	0.07 (±0.01)^{b}	0.08 (±0.01)^{b}	0.09 (±0.01)^{a}	0.98	y = 0.0007x + 0.0193
C13:0ai	0.06 (±0.01)^{g}	0.06 (±0.01)^{fg}	0.06 (±0.01)^{g}	0.07 (±0.01)^{ef}	0.07 (±0.01)^{e}	0.08 (±0.01)^{cd}	0.08 (±0.01)^{d}	0.09 (±0.01)^{bc}	0.09 (±0.01)^{b}	0.10 (±0.01)^{a}	0.11 (±0.01)^{a}	0.96	y = 0.0005x + 0.0539
C13:0	0.11 (±0.01)^{f}	0.11 (±0.01)^{f}	0.11 (±0.01)^{f}	0.12 (±0.01)^{ef}	0.12 (±0.01)^{e}	0.13 (±0.01)^{d}	0.13 (±0.01)^{d}	0.14 (±0.01)^{c}	0.14 (±0.01)^{c}	0.15 (±0.01)^{b}	0.16 (±0.01)^{a}	0.97	y = 0.0005x + 0.1050
C14:0i	0.12 (±0.01)^{a}	0.13 (±0.01)^{a}	0.12 (±0.01)^{ab}	0.12 (±0.01)^{ab}	0.12 (±0.01)^{bc}	0.11 (±0.01)^{cd}	0.11 (±0.01)^{cd}	0.11 (±0.01)^{de}	0.10 (±0.01)^{ef}	0.10 (±0.01)^{f}	0.10 (±0.01)^{f}	−0.92	y = −0.0003x + 0.1286
C14:0	10.33 (±0.01)^{h}	10.37 (±0.01)^{h}	10.45 (±0.02)^{g}	10.57 (±0.03)^{f}	10.62 (±0.01)^{f}	10.91 (±0.08)^{d}	10.80 (±0.02)^{e}	10.93 (±0.01)^{d}	11.07 (±0.04)^{c}	11.27 (±0.01)^{b}	11.37 (±0.03)^{a}	0.98	y = 0.0106x + 10.2610
C15:0ai	0.37 (±0.01)^{a}	0.37 (±0.01)^{a}	0.36 (±0.01)^{b}	0.36 (±0.01)^{b}	0.36 (±0.01)^{c}	0.35 (±0.01)^{de}	0.35 (±0.01)^{d}	0.35 (±0.01)^{de}	0.34 (±0.01)^{f}	0.34 (±0.01)^{e}	0.33 (±0.01)^{g}	−0.95	y = −0.0004x + 0.3709
C14:1	0.16 (±0.01)^{h}	0.22 (±0.01)^{gh}	0.28 (±0.01)^{g}	0.33 (±0.01)^{g}	0.46 (±0.01)^{f}	0.65 (±0.17)^{e}	0.62 (±0.01)^{e}	0.77 (±0.01)^{d}	0.91 (±0.01)^{c}	1.11 (±0.01)^{b}	1.26 (±0.01)^{a}	0.98	y = 0.0109x + 0.0723
C15:0	0.86 (±0.01)^{h}	0.86 (±0.03)^{h}	0.95 (±0.01)^{g}	0.97 (±0.01)^{fg}	1.02 (±0.01)^{f}	1.13 (±0.07)^{e}	1.10 (±0.01)^{e}	1.18 (±0.01)^{d}	1.26 (±0.01)^{c}	1.35 (±0.01)^{b}	1.44 (±0.01)^{a}	0.98	y = 0.0057x + 0.8155
C16:0i	0.34 (±0.01)^{a}	0.33 (±0.02)^{ab}	0.32 (±0.01)^{ac}	0.31 (±0.01)^{bc}	0.29 (±0.01)^{cd}	0.28 (±0.02)^{de}	0.28 (±0.01)^{de}	0.26 (±0.01)^{ef}	0.25 (±0.01)^{fg}	0.23 (±0.01)^{g}	0.20 (±0.01)^{h}	−0.96	y = −0.0013x + 0.3441
C16:0	24.06 (±0.06)^{h}	24.25 (±0.03)^{h}	25.53 (±0.01)^{g}	26.06 (±0.02)^{g}	27.72 (±0.03)^{f}	30.13 (±1.52)^{e}	29.70 (±0.01)^{e}	31.25 (±0.01)^{d}	33.37 (±0.06)^{c}	35.44 (±0.01)^{b}	38.38 (±0.13)^{a}	0.98	y = 0.1382x + 22.7120
C16:1	0.97 (±0.02)^{h}	1.06 (±0.01)^{gh}	1.12 (±0.01)^{gh}	1.19 (±0.01)^{fg}	1.35 (±0.05)^{f}	1.63 (±0.23)^{e}	1.66 (±0.02)^{de}	1.81 (±0.01)^{d}	2.00 (±0.01)^{c}	2.22 (±0.01)^{b}	2.48 (±0.01)^{a}	0.98	y = 0.0149x + 0.8450
C17:1	0.18 (±0.01)^{g}	0.19 (±0.01)^{fg}	0.20 (±0.01)^{eg}	0.20 (±0.01)^{eg}	0.21 (±0.01)^{de}	0.23 (±0.03)^{bd}	0.22 (±0.01)^{cde}	0.23 (±0.01)^{bd}	0.24 (±0.01)^{bc}	0.25 (±0.01)^{ab}	0.27 (±0.01)^{a}	0.93	y = 0.0008x + 0.1791
C18:0	12.93 (±0.06)^{a}	11.98 (±0.01)^{b}	11.99 (±0.04)^{b}	11.62 (±0.03)^{bc}	11.02 (±0.03)^{c}	10.18 (±0.94)^{d}	10.17 (±0.01)^{d}	9.45 (±0.02)^{e}	8.80 (±0.01)^{f}	7.84 (±0.03)^{g}	7.11 (±0.02)^{h}	−0.98	y = −0.0548x + 13.0240
C18:1Σt	1.82 (±0.01)^{a}	1.79 (±0.01)^{ab}	1.71 (±0.01)^{ac}	1.71 (±0.02)^{bc}	1.61 (±0.01)^{cd}	1.52 (±0.11)^{de}	1.52 (±0.01)^{de}	1.46 (±0.01)^{ef}	1.35 (±0.02)^{f}	1.08 (±0.01)^{g}	1.06 (±0.12)^{g}	−0.95	y = −0.0076x + 1.1880
C18:2	2.36 (±0.01)^{b}	2.43 (±0.02)^{a}	2.30 (±0.01)^{bc}	2.26 (±0.01)^{c}	2.15 (±0.01)^{d}	2.03 (±0.09)^{e}	2.06 (±0.01)^{e}	1.96 (±0.01)^{f}	1.84 (±0.01)^{g}	1.75 (±0.01)^{h}	1.56 (±0.01)^{i}	−0.97	y = −0.0080x + 2.4657
C18:3	0.79 (±0.10)^{a}	0.69 (±0.01)^{b}	0.63 (±0.01)^{bc}	0.62 (±0.01)^{bc}	0.57 (±0.01)^{cd}	0.53 (±0.04)^{d}	0.54 (±0.02)^{d}	0.50 (±0.01)^{de}	0.43 (±0.01)^{ef}	0.41 (±0.03)^{f}	0.38 (±0.03)^{f}	−0.95	y = −0.0037x + 0.7370
PUFA	3.94 (±0.15)^{a}	3.93 (±0.03)^{a}	3.69 (±0.05)^{b}	3.59 (±0.02)^{b}	3.36 (±0.05)^{c}	3.09 (±0.10)^{d}	3.15 (±0.04)^{d}	3.06 (±0.09)^{d}	2.81 (±0.10)^{e}	2.75 (±0.05)^{e}	2.56 (±0.13)^{f}	−0.98	y = 0.0141x + 3.9723
SCFA	7.53 (±0.05)^{a}	7.65 (±0.01)^{a}	7.32 (±0.02)^{b}	7.23 (±0.04)^{b}	7.02 (±0.10)^{c}	6.43 (±0.18)^{de}	6.57 (±0.04)^{d}	6.31 (±0.03)^{e}	5.86 (±0.01)^{f}	5.76 (±0.04)^{f}	5.14 (±0.02)^{g}	−0.97	y = 0.0238x + 7.8084
MCFA	50.47 (±0.07)^{h}	50.93 (±0.01)^{h}	51.85 (±0.08)^{g}	52.52 (±0.08)^{g}	53.77 (±0.09)^{f}	56.14 (±1.28)^{e}	55.64 (±0.04)^{e}	57.11 (±0.02)^{d}	58.83 (±0.09)^{c}	60.82 (±0.02)^{b}	62.89 (±0.19)^{a}	0.98	y = 0.0024x + 49.4620
LCFA	41.99 (±0.02)^{a}	41.42 (±0.01)^{ab}	40.83 (±0.06)^{bc}	40.25 (±0.03)^{c}	39.21 (±0.01)^{d}	37.43 (±1.09)^{e}	37.79 (±0.08)^{e}	36.58 (±0.01)^{f}	35.31 (±0.09)^{g}	33.41 (±0.05)^{h}	31.92 (±0.22)^{i}	−0.98	y = −0.0979x + 42.7270

[a] Abbreviations are: i, iso; ai, anteiso; c, cis; t, trans; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SCFA, short-chain fatty acids, (C4–C8); MCFA, medium-chain fatty acids, (C10–C16); LCFA, long-chain fatty acids, (C17–C19). Regression equation is where y is the fatty acid content and x is the bovine-to-ovine milk ratio. Values (in g 100 g^{-1} total fatty acids) are means (±SD) (n = 3); values with different superscript letters in rows differ significantly at $P \leq 0.05$. N.S. – not significant.

the analysed milks, and are consistent with results reported in the literature (De La Fuente et al., 2009; Jensen, 2002; Pietrzak-Fiećko & Kamelska-Sadowska, 2020).

The relationships between FA content and the bovine-to-ovine milk ratio in the mixtures were determined by PCA to identify FAs which were most correlated and whose content changed most significantly with an increase in bovine milk in the mixtures. The first two principal components, PC1 and PC2, explained 90% of total variance in input data, but only PC1 was considered to be statistically significant because it explained 84% of the variance (Fig. 1). Sample type was largely related to the range of PC1, and the distribution of scores on the PC1 axis from −0.69 to 0.96 indicates that the loadings were arranged in an increasing order with an increase in the bovine-to-ovine milk ratio. The loadings indicate that the variables were correlated. An acute angle indicates that variables are correlated in the same direction; an obtuse angle indicates that variables are correlated in opposite directions; and a right angle points to the absence of correlations. The points denoting selected FAs formed two distinct clusters at the extreme ends of the PC1 axis, and their loadings demonstrated that variables were strongly

Table 2
Composition and water activity of lyophilised ovine and bovine milks and their mixtures.[a]

Component	Ovine milk	Percentage of bovine milk in bovine and ovine milk mixtures									Bovine milk
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	
Fat (%)	40.10 (±0.13)^{a}	38.81 (±0.12)^{b}	37.88 (±0.12)^{c}	38.09 (±0.11)^{d}	36.61 (±0.11)^{e}	35.22 (±0.11)^{f}	34.33 (±0.12)^{g}	33.55 (±0.13)^{h}	32.70 (±0.15)^{i}	31.07 (±0.18)^{j}	29.70 (±0.21)^{k}
Dry matter (%)	96.93 (±0.31)^{b}	95.52 (±0.20)^{cde}	95.04 (±0.13)^{ef}	97.62 (±0.40)^{a}	96.00 (±0.24)^{c}	94.72 (±0.19)^{f}	94.93 (±0.16)^{f}	95.68 (±0.21)^{cd}	96.51 (±0.29)^{b}	95.27 (±0.26)^{def}	95.12 (±0.20)^{ef}
Water activity (−)	0.05 (±0.01)^{c}	0.06 (±0.01)^{bc}	0.08 (±0.00)^{b}	0.05 (±0.01)^{cd}	0.08 (±0.01)^{b}	0.09 (±0.01)^{a}	0.04 (±0.00)^{d}	0.06 (±0.02)^{c}	0.05 (±0.01)^{cd}	0.06 (±0.01)^{cd}	0.07 (±0.01)^{bc}

[a] Values are means (±SD) (n = 3); values with different superscripts in rows differ significantly at $P \leq 0.05$.

correlated. Higher the variable (FA) loading on PC1, the greater the influence of the bovine-to-ovine milk ratio on the proportion of a given FA. The first cluster on the left side of the PC plot contained points representing FAs with negative loadings on the PC1 axis in the range −0.99 to −0.95, which proportions decreased with a rise in the bovine milk content of the samples (Fig. 1). The second cluster on the right side of the PC1 axis contained points denoting FAs with highly positive loadings in the range 0.95–0.99, which increased with a rise in ovine milk content of the analysed samples (Fig. 1; Supplementary material Table S1).

Results of the PCA were used to identify 22 FAs and 4 FA groups whose proportions changed in mixtures with different bovine milk content (Table 1). The FA clusters located at the opposing ends of the PC1 axis (Fig. 1) were compared with the results of the statistical significance test (Table 1). Comparison revealed that the proportions of these FAs differed significantly ($P \leq 0.05$) across the samples.

Ovine milk was more abundant ($P \leq 0.05$) in C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:0i, C15:0ai, C16:0i, C18:0, C18:1Σt, C18:2 and C18:3 FAs, and it contained more PUFAs, SCFAs, LCFAs and BSFAs than bovine milk. In turn, bovine milk was characterised by a higher content ($P \leq 0.05$) of C10:1, C11:0, C13:0, C13:0 ai, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0 and C16:1 FAs, and it was more abundant in SFAs and MCFAs than ovine milk (Table 1). The differences in the FA profile of ovine and bovine milk led to differences in the FA profile of milk mixtures ($P \leq 0.05$) (Table 1). A linear relationship ($P < 0.001$) was observed between the bovine-to-ovine milk ratio and the proportions of most FAs (Table 1).

Observed proportions of FAs in bovine and ovine milk are partly consistent with those reported by De La Fuente et al. (2009) and

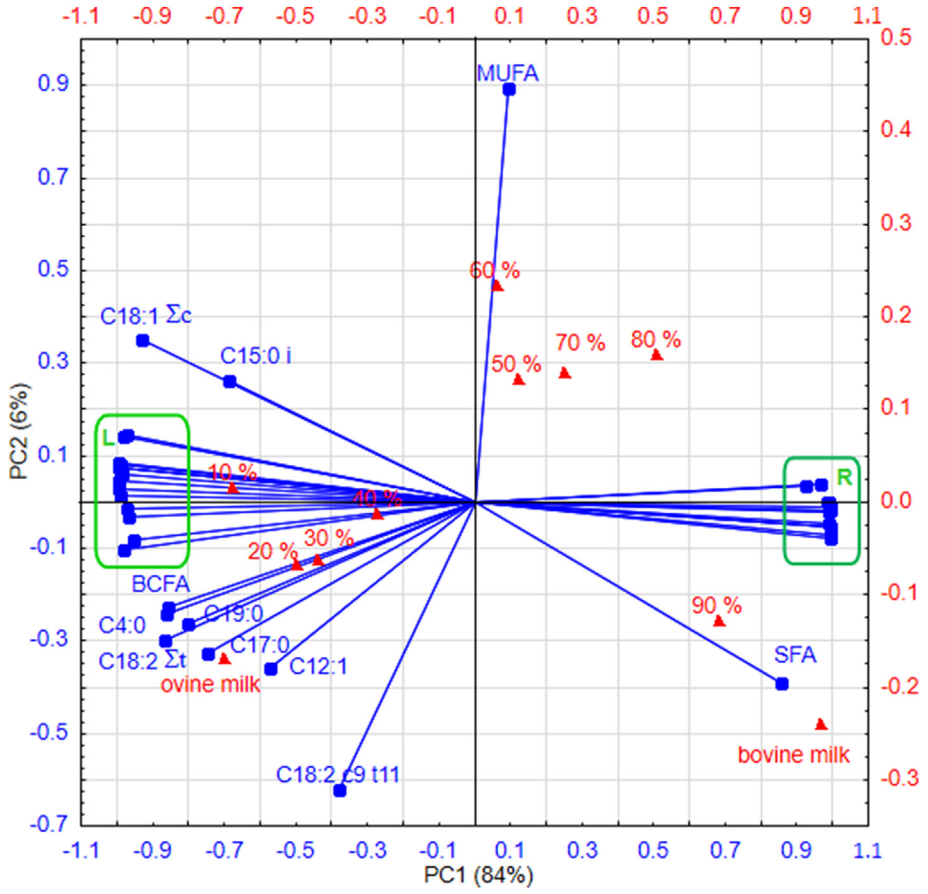


Fig. 1. PCA biplot of ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk, and the contribution of the fatty acid (FA) profile to principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). Left cluster (L) includes the following FAs: C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0i, C15:0ai, C16:0i, C18:0, C18:1Σt, C18:2, C18:3. Right cluster (R) includes the following FAs: C10:1, C11:0, C13:0, C13:0i, C13:0ai, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0, C16:1, C17:1.

Pietrzak-Fiećko and Kamelska-Sadowska (2020). The only difference was the high content of C14:0 and C16:0 FAs in bovine milk, which increased the proportion of SFAs in bovine milk relative to ovine milk (Table 1). In a study by Pietrzak-Fiećko and Kamelska-Sadowska (2020), SFA content was higher in ovine milk collected from Kamieniecka sheep than in bovine milk collected from Holstein-Friesian cows. In the work of De La Fuente et al. (2009), average content and range of FAs in ovine milk were determined at 71.35% (56.81–81.16%) for SFAs, 22.10% (18.85–35.73%) for MUFAs, and 6.54% (2.55–11.79%) for PUFAs.

3.2. Characteristics of lyophilisates

Despite differences in composition of bovine and ovine milk, water is the main component in both milks. The presence of water can be responsible for thermal effects that overlap the transition effects of other milk components (Pugliese, Paciulli, Chiavaro, & Mucchetti, 2019). Milk was lyophilised to eliminate the effect of water on thermal characteristics of the sample and to prevent overlap between other milk components and water.

Fat content decreased gradually with an increase in bovine-to-ovine milk ratio of the lyophilisates ($P \leq 0.05$), which was not observed with regard to dry matter content and water activity; however, their values differed significantly across the samples ($P \leq 0.05$).

Ovine milk lyophilisate was more abundant in all FA groups per 100 g of product than bovine milk lyophilisate ($P \leq 0.05$) (Table 3). As a result, the content of all FA groups decreased gradually in freeze-dried ovine and bovine milk mixtures ($P \leq 0.05$). The number of significant ($P \leq 0.05$) differences between the analysed samples was highest for SFAs and lowest for MCFAs.

The microscopic analysis revealed no clear differences in the microstructure of ovine and bovine milk samples (Fig. 2). Lyophilised ovine milk was characterised by larger pore diameters.

3.3. DSC analysis

DSC curves for bovine milk and ovine milk lyophilisates were analysed to identify peaks representing exothermic (cooling from 95 °C to −40 °C) and endothermic (heating from −40 °C to 40 °C) phase transitions (Fig. 3, Fig. 4). Pugliese et al. (2019) did not identify phase transition peaks in lyophilised skimmed bovine milk within the DSC range −50 °C–100 °C. Present findings suggest that the peaks on DSC curves denoted phase transitions of milk fat (Figs. 3 and 4).

One exothermic peak (peak A, from around 10–11 °C to around −40 °C) was identified on the DSC curves of ovine milk and mixtures containing up to ≤60% of bovine milk. The second exothermic peak (peak B, from around 14.5 °C to around 10.5 °C) that was not fully separated from peak A was identified in mixtures containing ≥70% of bovine milk (Fig. 3). A review of the literature indicates that exothermic peaks were associated with fat milk crystallisation (Hokkanen et al., 2021; Michalski et al., 2004; Tomaszewska-Gras, 2013; Truong et al., 2014).

DSC curves of samples containing ≤60% bovine milk were characterised by two endothermic phase transition peaks (C and F). DSC curves of the samples containing ≥70% of bovine milk featured three endothermic peaks (D–F), two of which were formed when peak C was separated into two individual peaks (D and E) (Fig. 4). Peaks D (no clear onset, to around 13–15 °C) and E (from around 13–14 °C to around 17–20 °C) were separated from peak C (no clear onset, to around 13–18 °C) with an increase in bovine-to-ovine milk ratio of the samples (Fig. 4).

Peak C was regarded as the phase transition peak of combined milk fat fractions LMPF and MMPF, which was separated into peaks D (LMPF) and E (MMPF) when the bovine-to-ovine milk ratio exceeded 70% (Fig. 4). Partial overlap between endothermic peaks resulted from similar phase transition characteristics of milk fat components (Tomaszewska-Gras, 2013).

The third endothermic peak (peak F, from around 19–20 °C to around 35–37 °C) was associated with milk fat fraction HMPF, and its visibility increased with a rise in the bovine-to-ovine milk ratio of the samples (Fig. 4).

Similar results were reported by Osthoff et al. (2011), where the exothermic phase transition peak during cooling, the endothermic phase transition peak during heating, and the phase transition peaks of ovine milk ranged from 0 °C to 20 °C during DSC analysis conducted within a temperature range −50 °C–85 °C, in steps of 10 °C min^{-1}. Pugliese et al. (2019) identified two endothermic peaks in lyophilised bovine milk within the temperature range 0–50 °C, modified at a rate of 5 °C min^{-1}. According to Amara-Dali et al. (2007), the temperature change rate separates peaks and affects the number of observed peaks.

Endothermic peaks (C–F) were identified as LMPF (D), MMPF (E) and HMPF (F) based on published data. In a study by Szulc, Nazarko, Ostrowska-Ligęza, and Lenart (2016), endothermic melting peaks in whole milk powder were identified in the estimated range

Table 3
Fatty acid content in milk lyophilisates.[a]

Component	Ovine milk	Percentage of bovine milk in bovine and ovine milk mixtures									Bovine milk
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	
SFA	28.32 (±0.02)^{a}	27.17 (±0.03)^{b}	26.76 (±0.02)^{c}	26.91 (±0.03)^{d}	25.92 (±0.04)^{e}	25.01 (±0.11)^{f}	24.25 (±0.02)^{g}	23.74 (±0.01)^{h}	23.24 (±0.04)^{i}	22.26 (±0.02)^{j}	21.34 (±0.05)^{k}
MUFA	10.20 (±0.04)^{a}	10.11 (±0.01)^{a}	9.72 (±0.00)^{b}	9.81 (±0.03)^{b}	9.46 (±0.06)^{c}	9.12 (±0.14)^{d}	9.00 (±0.01)^{e}	8.78 (±0.02)^{f}	8.54 (±0.03)^{g}	7.96 (±0.02)^{h}	7.60 (±0.01)^{i}
PUFA	1.58 (±0.06)^{a}	1.52 (±0.01)^{a}	1.40 (±0.02)^{b}	1.37 (±0.01)^{b}	1.23 (±0.02)^{c}	1.09 (±0.04)^{d}	1.08 (±0.02)^{d}	1.03 (±0.03)^{d}	0.92 (±0.03)^{e}	0.86 (±0.01)^{e}	0.76 (±0.04)^{f}
SCFA	3.02 (±0.02)^{a}	2.97 (±0.02)^{b}	2.77 (±0.01)^{c}	2.75 (±0.02)^{c}	2.57 (±0.04)^{d}	2.26 (±0.06)^{e}	2.25 (±0.01)^{e}	2.12 (±0.01)^{f}	1.92 (±0.00)^{g}	1.79 (±0.01)^{h}	1.53 (±0.00)^{i}
MCFA	20.24 (±0.03)^{a}	19.77 (±0.04)^{bc}	19.64 (±0.03)^{c}	20.00 (±0.03)^{ab}	19.69 (±0.03)^{bc}	19.78 (±0.45)^{bc}	19.10 (±0.01)^{de}	19.16 (±0.01)^{de}	19.24 (±0.03)^{d}	18.90 (±0.01)^{ef}	18.69 (±0.06)^{e}
LCFA	16.84 (±0.01)^{a}	16.08 (±0.01)^{b}	15.47 (±0.02)^{c}	15.33 (±0.01)^{c}	14.35 (±0.01)^{d}	13.18 (±0.39)^{e}	12.98 (±0.03)^{e}	12.27 (±0.02)^{f}	11.55 (±0.03)^{g}	10.38 (±0.02)^{h}	9.48 (±0.07)^{i}
BSFA ≤ C16	0.44 (±0.00)^{a}	0.43 (±0.01)^{b}	0.40 (±0.00)^{c}	0.41 (±0.00)^{c}	0.39 (±0.00)^{d}	0.37 (±0.01)^{e}	0.36 (±0.00)^{f}	0.35 (±0.00)^{g}	0.34 (±0.00)^{h}	0.32 (±0.00)^{i}	0.31 (±0.00)^{j}

[a] Abbreviations are: SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SCFA, short-chain fatty acids, (C4–C8); MCFA, medium-chain fatty acids, (C10–C16); LCFA, long-chain fatty acids, (C17–C19); BSFA, branched saturated fatty acids (C13:0i, C13:0ai, C14:0i, C15:0i, C15:0ai, C16:0i). Values (g 100 g^{-1} lyophilisate) are means (±SD) (n = 3); values with different superscript letters in rows differ significantly at $P \leq 0.05$.

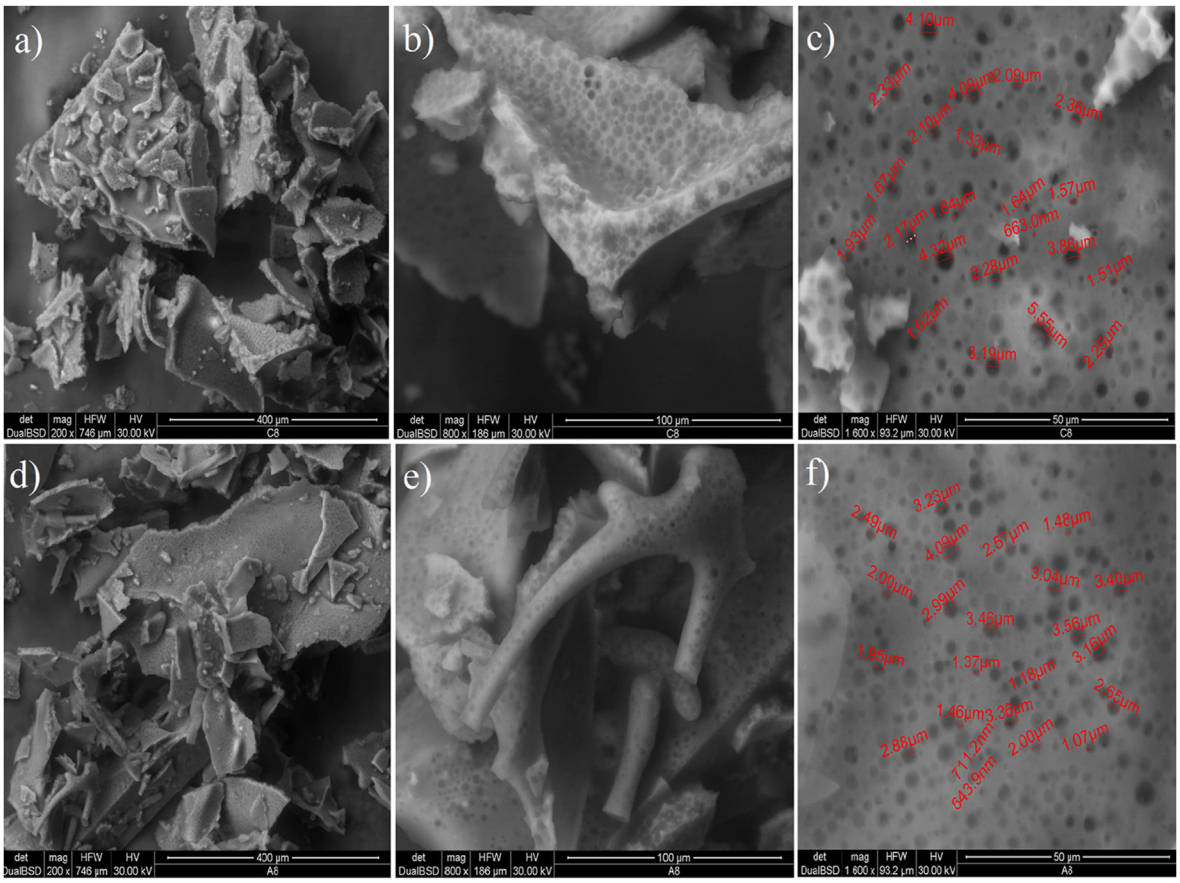


Fig. 2. Microstructure of ovine (a–c) and bovine milk (d–f) at 200 × (a, d), 800 × (b, e) and 1600 × magnification (e, f, including pore diameters).

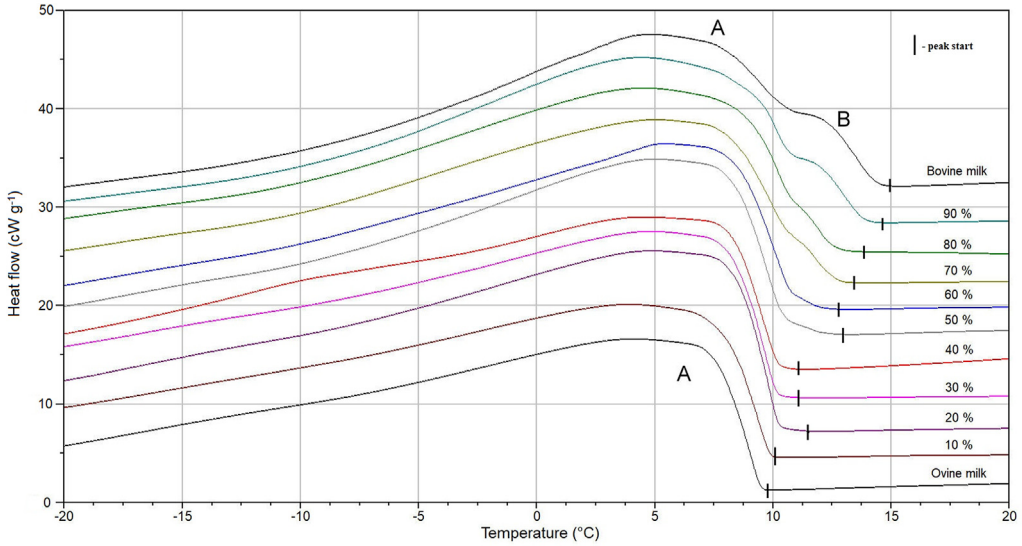


Fig. 3. Comparison of exothermic peaks A and B (cooling from 95 °C to −40 °C) of the DSC curve for ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk: peak A, from around 10–11 °C (depending on the sample) to around −40 °C; peak B, from around 14.5 °C to around 10.5 °C.

of −10 °C–50 °C. Hokkanen et al. (2021) and Michalski et al. (2004) noted endothermic peaks D–F associated with milk fat melting. On the DSC curves, peak C representing the overlap between LMPF and MMPF was highly correlated with the scan rate. Tomaszewska-Gras (2013) observed a peak corresponding to the overlap between LMPF and MMPF (−30 °C to around 18 °C) and a clearly separated second peak corresponding to HMPF (from around 18 °C–35 °C) at a heating rate of 20 °C min^{-1}.

Parameters T_{onset}, $\Delta T_{1/2}$ and ΔH of the exothermic phase transition peak differed significantly ($P \leq 0.05$) among samples

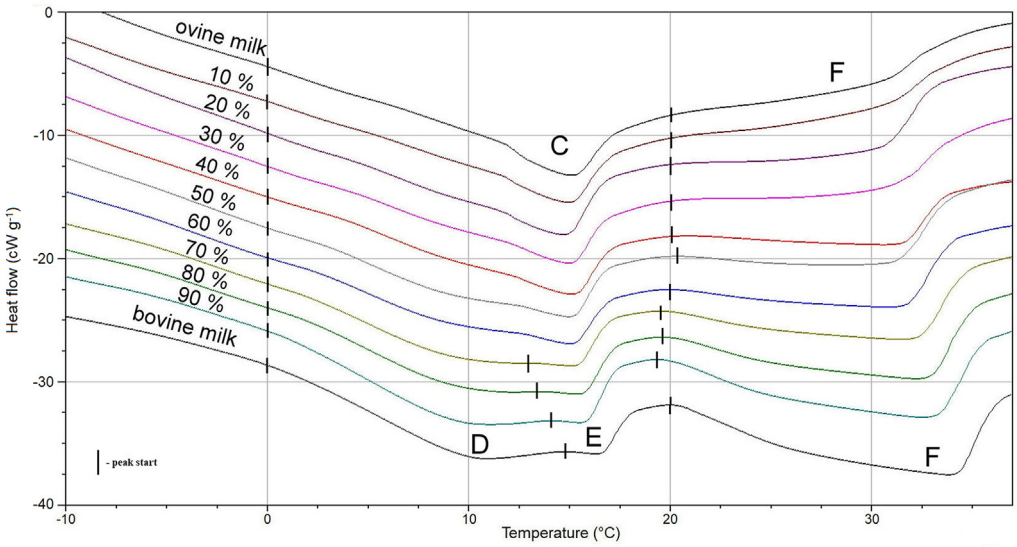


Fig. 4. Comparison of endothermic peaks C–F (heating from −40 °C to 40 °C) of the DSC curve for ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk: peak C, no clear onset, from 0 °C to around 13–18 °C (depending on the sample); peak D, no clear onset, from 0 °C to around 13–15 °C (depending on the sample); peak E, from 13 to 14 °C to around 17–20 °C (depending on the sample); peak F, from 0 °C to 19–20 °C (depending on the sample) to 35–37 °C.

(Table 4). The values of T_{onset} (r = 0.89) and $\Delta T_{1/2}$ (r = −0.91) increased with a rise in bovine-to-ovine milk ratio ($P < 0.001$). The observed increase in T_{onset} values indicates that onset of phase transitions occurred at higher temperature in samples with a higher proportion of bovine milk. Values for the $\Delta T_{1/2}$ point to the rate of phase transitions, therefore the decrease in $\Delta T_{1/2}$ with a rise in the bovine-to-ovine milk ratio indicates that milk fat was more rapidly crystallised. Parameters T_{max} ($P > 0.05$), ΔH ($P > 0.01$) and P_{height} ($P > 0.05$) were not affected by changes in the bovine-to-ovine milk ratio. Parameter ΔH decreased in bovine milk and the mixture containing 90% of bovine milk.

For exothermic peaks, significant differences ($P \leq 0.05$) were observed between bovine-to-ovine milk ratio and parameters T_{onset} and $\Delta T_{1/2}$ of peak C, parameter $\Delta T_{1/2}$ of peak D, and all parameters of peaks E and F (Table 4). The bovine-to-ovine milk ratio was correlated ($P < 0.001$) with changes in parameters T_{onset} (r = −0.96) and $\Delta T_{1/2}$ (r = 0.99) of peak C, parameter $\Delta T_{1/2}$ (r = 0.96) of peak D, parameters T_{max} (r = 0.96) and T_{onset} (r = 0.96) of peak E, and parameters T_{max} (r = 0.97), $\Delta T_{1/2}$ (r = 0.80), ΔH (r = 0.97) and P_{height} (r = −0.96) of peak F (Table 4). A positive correlation between the bovine-to-ovine milk ratio and the values of $\Delta T_{1/2}$ in peaks C and D (associated mainly with milk fat fraction LMPF) and peak F (associated with milk fat fraction HMPF) indicates that phase transitions associated with milk fat melting occurred more rapidly with an increase in bovine-to-ovine milk ratio. For peak F, a positive correlation was also noted between ΔH and bovine-to-ovine milk ratio, which indicates that energy expenditure required for endothermic transitions associated with HMPF melting increased with a rise in the bovine-to-ovine milk ratio.

Results indicate that changes in parameters describing the endothermic phase transition peaks of milk fat melting were a more reliable indicator of differences in the bovine-to-ovine milk ratio than the parameters describing the exothermic phase transition peaks of milk fat crystallisation.

An increase in bovine-to-ovine milk ratio decreased the proportions of FAs corresponding to the content of milk fat fractions LMPF, MMPF and HMPF (Table 3) and increased the number of phase transition peaks on DSC curves. The above changes promoted the formation of peak B (Fig. 3) and separation of peaks D and E from peak C (Fig. 4). Visibility of endothermic peaks (C–F) (Fig. 4) corresponding to milk fat fractions LMPF, MMPF and HMPF increased with a rise in the bovine-to-ovine milk ratio despite a decrease in the content of FA groups associated with these fractions (Table 3).

The following variables were subjected to PCA to identify variables that were most highly correlated with the content of bovine milk in the mixtures as well as variables that were bound by the strongest correlations: the FA profile of samples (g 100 g^{-1} total fatty acids) (Table 1), fat content in milk lyophilisates (Table 2), content of different FA groups in milk lyophilisates (g 100 g^{-1} lyophilisate) (Table 3), FA content in milk lyophilisates (g 100 g^{-1} lyophilisate), peak parameters (Table 4), and the bovine-to-ovine milk ratio in the mixtures. Analysis involved FAs and FA groups remaining after the reduction of the FA profile of samples by PCA (Fig. 1) as well as the parameters of exothermic peak A and endothermic peak F that were bound by a linear correlation with the bovine-to-ovine milk ratio in the mixtures. Endothermic peaks C–E were observed only in selected samples; therefore, they were not included in PCA.

The first two principal components, PC1 and PC2, explained 94% of total variance in input data, but only PC1 was considered to be statistically significant because it explained 91% of the variance (Fig. 5). Sample type was largely related to the range of PC1, and the distribution of scores on the PC1 axis from −1.29 to 1.03 indicates that loadings were arranged in an increasing order with an increase in the bovine-to-ovine milk ratio. Points denoting selected variables formed two distinct clusters at the extreme ends of the PC1 axis, and these variables were strongly correlated. Higher the variables loading on PC1, the greater the influence of the bovine-to-ovine milk ratio on the proportion of a given variable.

The first cluster on the left side of the PC plot contained points representing variables with negative loadings on the PC1 axis in the range −0.99 to −0.93 (Fig. 5). Values of these variables increased with a rise in the bovine milk content of the analysed samples. Values for T_{onset} of peak A, T_{max} and $\Delta T_{1/2}$ of peak F, C10:1 content in the total FAs and C13:0 content in milk lyophilisates also increased with a rise in bovine milk content of the samples (with loadings −0.91, −0.97, −0.82, −0.93 and −0.96, respectively), but these parameters weakly correlated with variables in the first cluster, and they were not grouped in the first cluster.

Table 4
Parameters of phase transition peaks for lyophilised bovine milk, ovine milk and their mixtures[a].

Peak	Parameter	Ovine	Percentage of bovine milk in bovine and ovine milk mixtures								Bovine*	Correlation coefficient r (*P*-value <0.001)	Regression equation
			10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%*	80%*	90%*			
Exothermic														
A	T_{max} (°C)	4.02 (±0.38)^{e}	4.10 (±0.24)^{de}	4.45 (±0.65)^{bce}	4.91 (±0.01)^{bc}	5.00 (±0.65)^{ab}	4.96 (±0.06)^{ac}	5.68 (±0.36)^{a}	4.90 (±0.14)^{bc}	4.64 (±0.07)^{bce}	4.19 (±0.30)^{ce}	4.84 (±0.07)^{bcd}	N.S.	N.S.
	T_{onset} (°C)	9.48 (±0.12)^{f}	9.92 (±0.11)^{ef}	10.19 (±0.08)^{e}	10.08 (±0.08)^{ef}	10.20 (±0.01)^{e}	10.59 (±0.07)^{de}	10.89 (±0.06)^{cd}	11.58 (±0.01)^{b}	11.48 (±0.21)^{bc}	11.74 (±0.33)^{b}	13.96 (±0.72)^{a}	0.89	y = 0.0386x + 9.1209
	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	21.41 (±0.71)^{a}	21.62 (±0.66)^{a}	21.02 (±0.59)^{a}	20.42 (±1.05)^{a}	20.06 (±1.85)^{a}	17.49 (±1.26)^{b}	17.37 (±0.83)^{b}	18.15 (±0.50)^{b}	17.97 (±0.06)^{b}	16.65 (±0.41)^{bc}	15.17 (±0.33)^{c}	−0.91	y = −0.0601x + 21.8358
	ΔH (J g^{-1})	20.06 (±0.51)^{ab}	22.08 (±0.71)^{a}	20.32 (±5.44)^{ab}	21.36 (±2.29)^{ab}	19.16 (±0.64)^{ab}	21.00 (±2.02)^{ab}	19.91 (±2.38)^{ab}	20.41 (±0.22)^{ab}	20.76 (±0.41)^{ab}	18.30 (±0.68)^{ab}	16.81 (±1.43)^{b}	N.S.	N.S.
	P_{height} (cW g^{-1})	15.24 (±0.41)	16.15 (±0.84)	15.37 (±4.17)	16.08 (±1.20)	15.03 (±0.55)	17.75 (±0.71)	17.24 (±0.61)	16.46 (±0.16)	16.78 (±0.21)	15.96 (±1.15)	16.76 (±1.20)	N.S.	N.S.
Endothermic														
C	T_{max} (°C)	14.56 (±0.30)	14.64 (±0.01)	14.38 (±0.08)	14.66 (±0.04)	14.73 (±0.01)	14.62 (±0.14)	14.66 (±0.06)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.S.	N.S.
	T_{onset} (°C)	7.78 (±0.35)^{a}	5.84 (±0.29)^{b}	4.33 (±0.41)^{c}	3.02 (±0.34)^{d}	1.13 (±0.01)^{e}	1.06 (±0.04)^{e}	1.03 (±0.06)^{e}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	−0.96	y = −0.1213x + 7.1413
	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	7.57 (±0.18)^{g}	8.43 (±0.06)^{f}	8.87 (±0.01)^{e}	9.17 (±0.01)^{d}	9.63 (±0.11)^{c}	10.59 (±0.11)^{b}	10.88 (±0.02)^{a}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.99	y = 0.0541x + 7.6731
	ΔH (J g^{-1})	3.32 (±0.18)	3.42 (±0.06)	3.14 (±0.60)	3.13 (±0.27)	2.75 (±0.67)	3.45 (±0.02)	3.26 (±0.01)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.S.	N.S.
	P_{height} (cW g^{-1})	−5.77 (±0.35)	−5.85 (±0.58)	−5.34 (±1.13)	−5.17 (±0.46)	−4.80 (±0.52)	−5.15 (±0.08)	−5.32 (±0.31)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.S.	N.S.
D	T_{max} (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10.34 (±0.21)	10.73 (±0.19)	10.37 (±0.42)	10.49 (±0.23)	N.S.	N.S.
	T_{onset} (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.85 (±0.07)	0.85 (±0.02)	0.71 (±0.13)	0.78 (±0.12)	N.S.	N.S.
	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11.59 (±0.05)^{c}	11.77 (±0.08)^{bc}	11.95 (±0.11)^{b}	12.21 (±0.10)^{a}	0.96	y = 0.0208x + 10.1085
	ΔH (J g^{-1})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.51 (±0.05)	3.88 (±0.03)	4.15 (±0.41)	4.17 (±0.36)	N.S.	N.S.
	P_{height} (cW g^{-1})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	−4.99 (±0.09)	−5.44 (±0.11)	−5.87 (±0.71)	−5.95 (±0.52)	N.S.	N.S.
E	T_{max} (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15.38 (±0.02)^{c}	15.66 (±0.02)^{c}	16.00 (±0.30)^{b}	16.65 (±0.11)^{a}	0.96	y = 0.0435x + 12.2356
	T_{onset} (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13.51 (±0.01)^{c}	13.56 (±0.01)^{c}	14.31 (±0.30)^{b}	15.02 (±0.01)^{a}	0.96	y = 0.0550x + 9.4391
	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.60 (±0.01)^{b}	1.76 (±0.04)^{a}	1.50 (±0.02)^{c}	1.46 (±0.04)^{c}	N.S.	N.S.
	ΔH (J g^{-1})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 (±0.01)^{b}	0.08 (±0.02)^{a}	0.02 (±0.01)^{b}	0.04 (±0.02)^{b}	N.S.	N.S.
	P_{height} (cW g^{-1})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	−1.45 (±0.04)^{ab}	−1.69 (±0.05)^{b}	−1.44 (±0.27)^{ab}	−1.30 (±0.06)^{a}	N.S.	N.S.
F	T_{max} (°C)	29.89 (±0.21)^{g}	30.09 (±0.21)^{fg}	30.25 (±0.06)^{fg}	30.30 (±0.11)^{f}	31.06 (±0.39)^{de}	30.93 (±0.07)^{e}	31.40 (±0.06)^{d}	32.06 (±0.11)^{c}	32.51 (±0.08)^{b}	32.87 (±0.23)^{b}	33.78 (±0.09)^{a}	0.97	y = 0.0392x + 29.4872
	T_{onset} (°C)	20.65 (±0.12)^{a}	20.49 (±0.01)^{abc}	20.44 (±0.19)^{abc}	20.57 (±0.01)^{ab}	20.57 (±0.06)^{ab}	20.30 (±0.03)^{bc}	20.25 (±0.05)^{bc}	20.19 (±0.01)^{c}	20.27 (±0.03)^{bc}	20.57 (±0.42)^{ab}	20.51 (±0.04)^{abc}	N.S.	N.S.
	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	7.75 (±0.19)^{f}	8.35 (±0.20)^{e}	7.74 (±0.16)^{f}	8.28 (±0.12)^{e}	7.27 (±0.06)^{g}	7.91 (±0.06)^{f}	7.86 (±0.06)^{f}	8.76 (±0.06)^{d}	9.28 (±0.18)^{c}	10.01 (±0.14)^{b}	10.49 (±0.05)^{a}	0.80	y = 0.0261x + 7.2884
	ΔH (J g^{-1})	0.81 (±0.07)^{f}	1.07 (±0.20)^{ef}	1.18 (±0.43)^{ef}	1.41 (±0.18)^{e}	1.48 (±0.06)^{e}	2.06 (±0.03)^{d}	2.27 (±0.04)^{cd}	2.66 (±0.09)^{bc}	3.16 (±0.09)^{b}	3.12 (±0.69)^{b}	3.97 (±0.21)^{a}	0.97	y = 0.0285x + 0.6623
	P_{height} (cW g^{-1})	−1.86 (±0.15)^{a}	−2.26 (±0.44)^{ab}	−2.69 (±1.11)^{ab}	−2.86 (±0.31)^{ab}	−3.36 (±0.27)^{bc}	−4.39 (±0.13)^{cd}	−4.89 (±0.08)^{de}	−5.01 (±0.44)^{de}	−5.94 (±0.08)^{ef}	−5.53 (±1.20)^{de}	−6.73 (±0.36)^{f}	−0.96	y = −0.0445x - 1.8399

[a] Abbreviations are: T_{max}, maximum peak; T_{onset}, onset point; $\Delta T_{1/2}$, peak width at half-height; ΔH, enthalpy of phase transition; P_{height}, maximum peak height; N.S. – not significant; N.D. – not detected. Regression equation is where y is the parameter value and x is the bovine-to-ovine milk ratio. An asterisk indicates that the parameters of peak B were not identified. Values are means (±SD) (n = 3); values with different superscripts in rows differ significantly at $P \leq 0.05$.

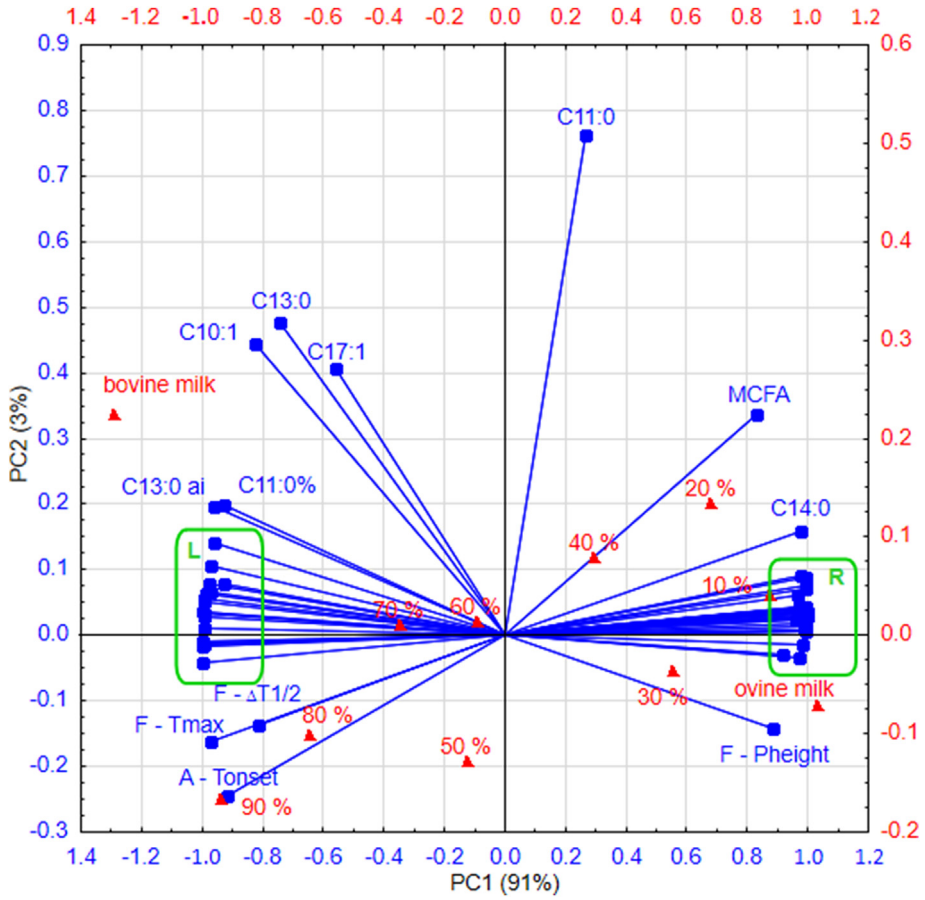


Fig. 5. PCA biplot of ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk, and the contribution of the parameters of peaks A and F, the fat content, the content of individual fatty acids in g 100 g^{-1} total fatty acids (FAs with "%") and the fatty acid content of milk lyophilisates (FAs without "%") to principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). Left cluster (L) includes: ΔH of peak F; FAs content in total FAs of C10:1, C13:0, C13:0 ai, C14:0, C17:1 and MCFAs; FAs content in milk lyophilisates of C13:0 i, C14:1, C15:0, C16:0 and C16:1. Right cluster (R) includes: $\Delta T_{1/2}$ of peak A; fat content; FA content in total FAs and in milk lyophilisates of C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 i, C15:0 ai, C16:0 i, C18:0, C18:1 Σt, C18:2, C18:3, PUFAs, SCFAs, LCFAs.

The second cluster on the right side of the PC1 axis contained points denoting variables with highly positive loadings in the range of 0.92–0.99 (Fig. 5). Values of these variables decreased with a rise in the bovine milk content of analysed samples. Values for P_{height} of peak F and C14:0 content in milk lyophilisates also decreased with a rise in the bovine milk content of analysed samples (with loadings 0.89 and 0.98, respectively), but these parameters were weakly correlated with variables in the second cluster, and they were not grouped in the second cluster.

Regardless of whether the content of individual FAs was analysed in total FAs or in milk lyophilisates, these variables were bound by similar correlations, excluding C10:1, C13:0, C13:0 ai, C14:0, C17:1 and MCFAs.

The direction of the correlations observed in PCA was consistent with the direction of linear function of variables that were correlated with the bovine-to-ovine milk ratio (Tables 1 and 4). The calculated values of correlation coefficients (Table 4) indicate that direction of changes in $\Delta T_{1/2}$ of peaks C and D, and T_{max} and T_{onset} of peak E was identical to ΔH, $\Delta T_{1/2}$, T_{max} of peak F and T_{onset} of peak A, whereas the direction of changes in T_{onset} of peak C was identical to $\Delta T_{1/2}$ of peak A and P_{height} of peak F, which may point to similar correlations between these variables.

Higher content of SFAs and MCFAs, especially C14:0 and C16:0 in bovine milk than in ovine milk affected an increase in T_{onset} and a decrease in $\Delta T_{1/2}$ of the first crystallisation peak (peak A), as well as the occurrence of the second crystallisation peak (peak B). Truong et al. (2014) observed that the FA profile is responsible for differences in the crystallisation curves of anhydrous bovine milk fat fractions: stearin (hard fraction with a higher content of C14:0, C16:0, C18:0) and olein (soft fraction with a higher content C18:1). Truong et al. (2014) also noted a peak of crystallisation in the temperature range from −5 °C to 10 °C, which was characterised by a smaller size and the higher values of T_{max} and T_{onset} in the stearin fraction compared with olein fraction. An additional crystallisation peak was observed only in the stearin fraction in the temperature range 10 °C–15 °C, which was significantly smaller than the peak in the temperature range 0 °C–10 °C.

4. Conclusions

Bovine-to-ovine milk ratio influences the shape of DSC curves and is correlated with the parameters of phase transition peaks. Changes in the content of bovine milk in the examined samples affected the number of observed peaks. In samples containing ≤60% of bovine milk, the endothermic peaks corresponding to the melting of LMPF and MMPF overlap and form a single peak. Ovine milk is characterised by higher proportions of SCFAs, LCFAs and PUFAs, whereas bovine milk is more abundant in MCFAs and SFAs, and these differences affect the FA profile of ovine and bovine milk mixtures. Changes in the FA profile, shape of DSC curves and parameters describing phase transitions were observed in mixtures containing 10% and more bovine milk. The following parameters

were strongly correlated: fat content of milk lyophilisates; content of PUFAs, SCFAs, LCFAs and a lot of FAs from C6 to C18; the parameters of crystallisation peaks – $\Delta T_{1/2}$ and T_{onset}, and melting peaks: LMPF – $\Delta T_{1/2}$, MMPF – T_{max}, T_{onset}, HMPF – ΔH, and $\Delta T_{1/2}$, P_{height}. In the future, lyophilisates with identical fat content should be analysed to identify variables that are independent of fat content, and the size of milk fat globules should also be considered.

CRediT authorship contribution statement

Oskar Brożek: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. Katarzyna Kiełczewska: Methodology, Writing – review & editing. Krzysztof Bohdziewicz: Conceptualization, Methodology.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339.

References

Amara-Dali, W. B., Lesieur, P., Artzner, F., Karray, N., Attla, H., & Ollivon, M. (2007). Anhydrous goat's milk fat: Thermal and structural behaviors studied by coupled differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. 2. Influence of cooling rate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 4741–4751.

AOAC. (2007). *Official methods of analysis* (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.

Barłowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., & Król, J. (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10*, 291–302.

Cinar, M., Serbester, U., Ceyhan, A., & Gorgulu, M. (2015). Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. *Italian Journal of Animal Science, 14*, 105–108.

Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., & Peyraud, J. L. (2006). The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty composition, and butter properties. *Journal of Diary Science, 89*, 1956–1969.

Danków, R., & Pikul, J. (2011). *Technological suitability of sheep milk for processing* (Vol. 5, pp. 2–9). Nauka Przyroda Technologie.

De La Fuente, L. F., Barbosa, E., Carriedo, J. A., Gonzalo, C., Arenas, R., Fresno, J. M., et al. (2009). Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *Journal of Dairy Science, 92*, 3791–3799.

Hokkanen, S. P., Partanen, R., Jukkola, A., Frey, A. D., & Rojas, O. J. (2021). Partitioning of the milk fat globule membrane between buttermilk and butter serum is determined by the thermal behaviour of the fat globules. *International Dairy Journal, 112*, Article 104863.

ISO. (2011). *Milk-determination of fat content-gravimetric method (reference method) ISO. PN-EN ISO 1211:2011*. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.

Jensen, R. (2002). The composition of bovine milk lipids. *Journal of Dairy Science, 85*, 295–350.

Konieczny, M. (2009). Effect of stage of lactation on chemical composition and physicochemical parameters of milk from polish mountain sheep in an organic production system. *Roczniki Naukowe Zootechniki, 36*, 25–30.

Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., & Ollivon, M. (2005). Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. *Journal of Dairy Science, 88*, 511–526.

Michalski, M.-C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., & Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: Thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids, 132*, 247–261.

Osthoff, G., Hugo, A., Joubert, C. C., & Swarts, J. C. (2011). DSC of milk fats from various animals with high levels of medium-chain, unsaturated and polyunsaturated fatty acids. *South African Journal of Chemistry, 64*, 241–250.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research, 68*, 88–113.

Pietrzak-Fiećko, R., & Kamelska-Sadowska, A. M. (2020). The comparison of nutritional value of human milk with other mammals' milk. *Nutrients, 12*, Article 1404.

Potočnik, K., Gantner, V., Kuterovas, K., & Cividini, A. (2011). Mare's milk: Composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo, 61*, 107–113.

Pugliese, A., Paciulli, M., Chiavaro, E., & Mucchetti, G. (2019). Application of differential scanning calorimetry to freeze-dried milk and milk fractions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 137*, 703–709.

Stocco, G., Cipolat-Gotet, C., Bobbo, T., Cecchinato, A., & Bittante, G. (2017). Breed of cow and herd productivity affect milk composition and modeling of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science, 100*, 129–145.

Szulc, K., Nazarko, J., Ostrowska–Ligęza, E., & Lenart, A. (2016). Effect of fat replacement on flow and thermal properties of dairy powders. *LWT, 68*, 653–658.

Tomaszewska-Gras, J. (2013). Melting and crystallization DSC profiles of milk fat depending on selected factors. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 111*, 199–208.

Truong, T., Bansal, N., Sharma, R., Palmer, M., & Bhandari, B. (2014). Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. *Food Chemistry, 145*, 725–735.

Supplementary data – Publikacja II - Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures*. International Dairy Journal, 129, 105339.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339

Table S1

Fatty acid profile of ovine milk, bovine milk, and ovine and bovine milk mixtures containing 10–90% of bovine milk, eliminated after the original data set was reduced by principle component analysis. [a]

Fatty acid	Ovine milk	Percentage of bovine milk in bovine and ovine milk mixtures									Bovine milk	Correlation coefficient r (*P*-value <0.001)	Regression equation
		10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %			
C4:0	2.58 (±0.03)^{ab}	2.62 (±0.01)^{a}	2.55 (±0.02)^{ab}	2.54 (±0.03)^{b}	2.58 (±0.07)^{ab}	2.42 (±0.04)^{cd}	2.46 (±0.01)^{c}	2.42 (±0.02)^{cd}	2.34 (±0.01)^{e}	2.46 (±0.03)^{c}	2.36 (±0.02)^{de}	-0.84	y = -0.0024x + 2.6068
C12:1	0.02 (±0.01)^{ab}	0.02 (±0.01)^{ac}	0.02 (±0.01)^{c}	0.02 (±0.01)^{a}	0.02 (±0.01)^{ab}	0.03 (±0.01)^{bc}	0.02 (±0.01)^{c}	0.02 (±0.01)^{c}	0.02 (±0.01)^{c}	0.02 (±0.01)^{c}	0.02 (±0.01)^{c}	N.S.	N.S.
C15:0i	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.18 (±0.01)^{a}	0.18 (±0.01)^{a}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{b}	0.17 (±0.01)^{ab}	0.17 (±0.01)^{c}	N.S.	N.S.
C17:0	0.57 (±0.01)^{b}	0.59 (±0.02)^{b}	0.60 (±0.01)^{b}	0.62 (±0.02)^{a}	0.63 (±0.01)^{a}	0.52 (±0.01)^{cd}	0.52 (±0.01)^{cd}	0.51 (±0.01)^{d}	0.52 (±0.01)^{cd}	0.54 (±0.01)^{c}	0.51 (±0.01)^{d}	-0.69	y = -0.0010x + 0.6061
C18:1Σc	22.09 (±0.08)^{b}	22.55 (±0.02)^{a}	22.11 (±0.01)^{b}	22.07 (±0.06)^{bc}	21.97 (±0.10)^{cd}	21.59 (±0.08)^{e}	21.91 (±0.01)^{d}	21.63 (±0.04)^{e}	21.34 (±0.03)^{f}	20.64 (±0.01)^{g}	20.22 (±0.07)^{h}	-0.89	y = -0.0185x + 22.5740
C19:0	0.45 (±0.01)^{ab}	0.38 (±0.02)^{bcde}	0.54 (±0.06)^{a}	0.43 (±0.11)^{ac}	0.41 (±0.09)^{ad}	0.30 (±0.04)^{def}	0.30 (±0.06)^{def}	0.24 (±0.06)^{f}	0.26 (±0.01)^{ef}	0.31 (±0.01)^{cdf}	0.18 (±0.02)^{f}	-0.79	y = -0.0027x + 0.4796
C18:2Σt	0.33 (±0.02)^{a}	0.32 (±0.03)^{a}	0.32 (±0.01)^{a}	0.30 (±0.05)^{ab}	0.26 (±0.03)^{b}	0.21 (±0.02)^{c}	0.22 (±0.01)^{bc}	0.21 (±0.02)^{c}	0.22 (±0.04)^{bc}	0.21 (±0.02)^{c}	0.20 (±0.03)^{c}	-0.87	y = -0.0017x + 0.3343
C18:2c9t11	0.46 (±0.05)^{ab}	0.48 (±0.02)^{a}	0.44 (±0.03)^{ab}	0.42 (±0.07)^{ac}	0.38 (±0.03)^{ad}	0.33 (±0.01)^{d}	0.33 (±0.05)^{cd}	0.40 (±0.05)^{ad}	0.36 (±0.06)^{bcd}	0.40 (±0.03)^{ad}	0.43 (±0.05)^{ac}	N.S.	N.S.
SFA	70.61 (±0.04)^{d}	70.02 (±0.01)^{e}	70.65 (±0.04)^{d}	70.65 (±0.09)^{d}	70.79 (±0.12)^{bcd}	71.01 (±0.30)^{bc}	70.64 (±0.05)^{d}	70.76 (±0.04)^{cd}	71.06 (±0.12)^{b}	71.63 (±0.05)^{a}	71.81 (±0.15)^{a}	0.81	y = 0.0127x + 70.2450
MUFA	25.45 (±0.11)^{e}	26.05 (±0.03)^{abc}	25.66 (±0.01)^{de}	25.75 (±0.07)^{cde}	25.85 (±0.16)^{bd}	25.90 (±0.41)^{ad}	26.21 (±0.01)^{a}	26.18 (±0.05)^{ab}	26.13 (±0.01)^{ab}	25.61 (±0.01)^{de}	25.58 (±0.04)^{de}	N.S.	N.S.
BSFA≤C16	1.09 (±0.01)^{ab}	1.10 (±0.02)^{a}	1.07 (±0.01)^{bd}	1.08 (±0.01)^{bc}	1.06 (±0.01)^{cde}	1.06 (±0.02)^{cde}	1.05 (±0.01)^{de}	1.04 (±0.01)^{ef}	1.03 (±0.01)^{f}	1.03 (±0.01)^{f}	1.00 (±0.01)^{g}	-0.92	y = -0.0008x + 1.0939

[a] For principle component analysis, see Fig. 1. Abbreviations are: i, iso; ai, anteiso; c, cis; t, trans; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; BSFA, branched saturated fatty acids (C13:0i, C13:0ai, C14:0i, C15:0i, C15:0ai, C16:0i). Regression equation is where y is the fatty acid content and x is the bovine-to-ovine milk ratio. Values (g 100 g^{-1} total fatty acids) are means (±SD) (n = 3); values with different superscripts in rows differ significantly at $P \leq 0.05$. N.S., not significant.

Pol. J. Food Nutr. Sci., 2022, Vol. 72, No. 4, pp. 407–419
On-line ISSN: 2083-6007
Print ISSN: 1230-0322
DOI: 10.31883/pjfns/155838
http://journal.pan.olsztyn.pl

Original article
Section: Food Quality and Functionality

Physicochemical and Sensory Properties with Special Emphasis on Thermal Characteristics of Whey Butter from Gouda Cheese Production Compared to Milk Butter

Oskar Michał Brożek, Katarzyna Kiełczewska, Krzysztof Bohdziewicz*

Department of Dairy Science and Quality Management, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego Str. 7, 10–719 Olsztyn, Poland

Key words: whey butter, milk butter, differential scanning calorimetry, fatty acid profile, sensory attributes

The aim of this study was to characterise milk fat from whey butter and to identify potential differences between whey butter (WB) and sweet cream butter (milk butter – MB). The fatty acid (FA) profile, thermal properties, colour parameters, texture properties, and sensory attributes of MB and WB were compared. The values of texture properties (firmness, brittleness, and cohesiveness) and colour parameters (values of b^* and the yellowness index) of WB were lower than MB. The sensory analysis showed lower values of consistency descriptors (firmness, brittleness, cohesiveness), a less intense nutty and milky aroma, and a more intense cheesy aroma and taste in WB than in MB. WB was more abundant in monounsaturated, polyunsaturated, and long-chain FAs, including C18:0, C18:1 Σ*t*, C18:1 Σ*c*, C18:2, C18:3, and C18:2 *c*9, *t*11, and it was less abundant in saturated and medium-chain FAs, including C10:0, C12:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0, and C16:1, relative to MB. Water content (MB *vs* WB and the corresponding fats) and thermal history (single *vs* repeated heating and cooling treatments) affected differential scanning calorimetry curves and phase transition peaks. The principal component analysis revealed that the FA profile influenced the crystallisation and melting peaks of MB fat (MBF) and WB fat (WBF). WBF crystallisation occurred at a lower temperature, was characterised by lower enthalpy, and proceeded more rapidly than MBF crystallisation. Various fat fractions had different melting characteristics, and most WBF fractions were characterised by lower melting enthalpy and a smaller maximum difference in heat flow than MBF. Whey butter and milk butter differed in physicochemical properties and sensory attributes, and their thermal profiles depended on the FA profile, water content, and thermal history.

INTRODUCTION

The coagulation of milk proteins in cheesemaking leads to the separation of milk components into two phases: curd and whey. Around 8 to 9 kg of whey is generated in the production of 1 kg of cheese. The global production of whey is estimated at 165 million tons, and it continues to increase by 1–2% every year [Panghal *et al.*, 2018]. Whey obtained during cheesemaking is utilised in 75% in Europe and in less than 50% on other continents [Macwan *et al.*, 2016]. Different types of whey are obtained in various cheese production technologies. Sweet whey is the by-product of rennet coagulation of milk, whereas acid whey is obtained during acid coagulation of milk. Sweet and acid whey differ in composition and parameters that determine their suitability for further processing [Nishanthi *et al.*, 2017]. Depending on the cheesemaking technology, 50–60% of milk solids are transferred to whey. Some of the separated solids have very high nutritional value. When whey is further processed (into whey protein concentrate, lactose, lactic acid), residual fat is separated from other components [Kasapcopur *et al.*, 2021; Macwan *et al.*, 2016]. Some fat is transferred to whey during cheesemaking. Concentrated whey fat in the form of whey cream can be processed into various products, such as whey butter [Jinjarak *et al.*, 2006; Panghal *et al.*, 2018].

The composition of milk fat is influenced by numerous factors, including seasonal variations, animal nutrition, lactation phase, and technology of dairy products. Differences in milk fat composition affect the physicochemical properties of butter [Amal, 2009; Anankanbil *et al.*, 2018; Couvreur *et al.*, 2006].

The phase transitions of milk fat, especially crystallisation and melting (which occur within a temperature range of –40°C to 40°C), are mainly affected by the physicochemical properties of fat, including the fatty acid (FA) profile, fat crystal structure, and the size of fat globules [Hokkanen *et al.*, 2021; Michalski *et al.*, 2004; Truong *et al.*, 2014]. The crystallisation of anhydrous milk fat was reported to differ between the hard (with a higher content of C14:0, C16:0, C18:0) and soft (with a higher content C18:1) milk fat fractions [Truong *et al.*, 2014]. Milk fat can be divided into three fractions based on melting temperature: the low-melting point

* Corresponding Author:
Tel.: +48 89 523 32 11; Fax: +48 89 523 34 02
E-mail: oskar.brozek@uwm.edu.pl (O. Brożek)

Submitted: 20 July 2022
Accepted: 18 October 2022
Published on-line: 14 November 2022

© Copyright by Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences
© 2022 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

fraction (LMPF) with a melting temperature below 10°C, the middle-melting point fraction (MMPF) with a melting temperature of 10–25°C, and the high-melting point fraction (HMPF) with a melting temperature higher than 25°C. The melting process of each fraction is represented by distinct endothermic peaks on differential scanning calorimetry (DSC) curves [Anankanbil *et al.*, 2018; Brożek *et al.*, 2022a, b; Hokkanen *et al.*, 2021]. The FA profile of milk fat, in particular the triacylglycerol (TAG) profile, determines the melting temperature of LMPF, MMPF, and HMPF, and influences the rheological properties of butter [Omar *et al.*, 2017]. According to Anankanbil *et al.* [2018], a high content of C14:0 and C16:0 increased the melting temperature of MMPF and HMPF, whereas a high content of C18:0, C18:1, and C18:2 decreased melting temperature. A higher C16:0/C18:1 ratio significantly increased the melting temperature of milk fat and butter firmness [Couvreur *et al.*, 2006]. Milk fat melting is a complex process due to the presence of three polymorphic crystal forms of fat with different properties and crystalline structure. The hexagonal α form (the least stable form that undergoes reversible crystallisation during rapid cooling) can be irreversibly transformed to a β' (more stable orthorhombic form) and β form (the most stable triclinic form) [Fredrick *et al.*, 2011; Hondoh & Ueno, 2016; Lopez & Ollivon, 2009; Staniewski *et al.*, 2021; Viriato *et al.*, 2019]. The thermal history of milk fat, which is determined during successive heating and cooling treatments, illustrates changes in the polymorphic structure of crystals and can be used to determine differences in melting behaviour relative to fat that was not subjected to thermal treatment. The thermal history of dairy products is recorded during thermal treatments, such as cream aging in butter production. Thermal history affects the ratio of solid to liquid fat phases, thus influencing the rheological properties of butter [Jukkola & Rojas, 2017; Staniewski *et al.*, 2021].

Milk and dairy products are complex matrices, where each component is characterised by unique phase transformations. In the results of DSC analysis, the phase transition peaks of different components can overlap if they occur within a similar temperature range. The above influences the identification of phase transition peaks in DSC curves and the corresponding peak parameters [Amara-Dali *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2005; Tomaszewska-Gras, 2013]. Examples of overlapping phase transition peaks include fat crystallisation and melting peaks, and water freezing and ice melting peaks. Therefore, the presence of water in butter can significantly affect the observed phase transition peaks of butter fat in DSC curves. In DSC analyses, more complex thermal properties of milk fat can be observed in butter samples that do not contain water or have reduced water content than in butter samples with standard water content.

The aim of this study was to characterise milk fat from butter made from whey which was obtained from Gouda cheese production, and to identify potential differences between whey butter (WB) and sweet cream butter (milk butter – MB). The following research hypotheses were formulated: 1) MB and WB do not differ in selected physicochemical properties or sensory attributes; 2) the thermal profile of butter is not influenced by the type of butter, FA profile, presence of water or thermal history (DSC analysis of single *vs* multiple heating and cooling treatments). The research hypotheses were validated by measuring the FA profile, thermal properties, colour parameters, texture properties, and sensory attributes of MB and WB.

MATERIALS AND METHODS

Research materials

MB and WB were obtained from a dairy plant (Spółdzielnia Mleczarska Rospuda in Filipów, Warmia and Mazury voivodeship, Poland) as the final products of periodic churning performed under the same industrial conditions. WB was produced from whey obtained from Gouda cheese production. MB was produced from sweet milk cream. MB and WB were collected in triplicate during the week from different batches in the amount of 1 kg ($n=3$).

Water was removed from MB and WB to determine its influence on the thermal characteristics of fat. Butters were clarified at 60°C; the fat phase was separated from the aqueous phase, and the fat phase was filtered through filter paper containing anhydrous sodium bisulphate roasted at a temperature of 150°C. The above procedure was applied to obtain milk butter fat (MBF) and whey butter fat (WBF). The samples of MBF and WBF were obtained from one clarification process for each sample.

Samples of MB and WB were analysed for chemical composition, FA profile, colour parameters, texture properties, and sensory attributes. Samples of MB, WB, MBF, and WBF were used in the DSC analysis.

Chemical composition analysis

The content of total solids, solids-non-fat, and water of WB and MB was determined with the FoodScan Dairy Analyser (Foss, Hillerøed, Denmark). Fat content was determined with the gravimetric method by Rose-Gottlieb according to ISO 1211 [ISO, 2010].

Fatty acid profile analysis

Extraction of milk fat was conducted by the Rose-Gottlieb method [ISO, 2010]. Fatty acid esters were prepared according to ISO 15884 [ISO, 2002]. The 7890A gas chromatograph with a flame ionisation detection (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to determine the FA profile on the CP-Sil 88 column (100 m × 0.25 mm, 0.20 μm; Agilent Technologies) with a thermal gradient from 60°C (1 min) to 180°C at 5°C/min; injector and detector temperature, 225°C and 250°C, respectively; flow rate of carrier gas (helium), 0.8 mL/min; split ratio, 1:50; injection volume, 1 μL; liner, 0.4 mm. The reference material was BCR-164 anhydrous milk fat (LGC Standards, Kiełpin, Poland). The proportions of fatty acids were calculated and divided into the following groups: saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), short-chain fatty acids (SCFAs; C4–C8), medium-chain fatty acids (MCFAs; C10–C15), long-chain fatty acids (LCFAs; C16–C19), and branched-chain fatty acids (BCFAs; C13:0 *i*, C13:0 *ai*, C14:0 *i*, C15:0 *i*, C15:0 *ai*, C16:0 *i*). The following abbreviations were used in the description of fatty acid isomers: *ai – anteiso*, *i – iso*, *c – cis*, *t – trans*.

Differential scanning calorimetry analysis

The Q10 DSC analyser with a closed refrigerated cooling system (TA Instruments, New Castle, DE, USA) was calibrated with indium. The DSC analysis (sample weight: 10±1 mg; type of measuring crucibles: biconvex hermetically sealed aluminium crucible; gas: nitrogen; flow rate: 50 mL/min, reference sample: empty crucible) was divided into two consecutive and uninterrupted cycles to determine the influence of the thermal history of butter and butter fat on the melting behaviour of milk fat. In the first cycle, measurements were conducted in the following sequence: I – heating from –40°C to 95°C, II – cooling from 95°C to –40°C. The sequences from the first cycle were repeated three times in the second cycle. In each stage, temperature was changed at a rate of 10°C/min, and at the end of each stage, the samples were maintained at the final temperature for 1 min. The results of the DSC analysis were processed in the Universal Analysis 2000 program (TA Instruments). The following parameters of the identified phase transition peaks were determined according to Brożek *et al.* [2022b]: maximum peak temperature (T_{max}), phase transition onset temperature (T_{onset}), transition temperature range as peak width at half height ($\Delta T_{1/2}$), enthalpy (ΔH), peak height at maximum (P_{height}), starting (P_s) and ending (P_e) points of the peak.

Colour analysis

The colour analysis was performed in the CIELab space. Three colour parameters were measured: L^*, lightness from black (0) to white (100); a^*, greenness (–) to redness (+); b^*, blueness (–) to yellowness (+) with the CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Sensing Americas, Inc., Ramsey, NJ, USA) calibrated against a white plate (L^*=95.42; a^*=4.89 and b^*=–2.43). The results were used to calculate chromaticity (C^*), the whiteness index (WI), and the yellowness index (YI) according to equations (1), (2), and (3), respectively.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (2)$$

$$YI = 142.86\, b^*/L^* \quad (3)$$

The total difference in colour chroma (ΔC^*) between MB and WB was calculated with the use of formula (4), and the total difference in colour (ΔE) between MB and WB was calculated with the use of formula (5).

$$\Delta C^* = {C_{MB}}^{*2} - {C_{WB}}^{*2} \quad (4)$$

$$\Delta E = [({L_{MB}}^* - {L_{WB}}^*)^2 + ({a_{MB}}^* - {a_{WB}}^*)^2 + ({b_{MB}}^* - {b_{WB}}^*)^2]^{1/2} \quad (5)$$

All parameters were calculated according to Pathare *et al.* [2013].

Texture analysis

Instrumental texture analyses were conducted with the use of the TA.XT.plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, United Kingdom) with Texture Exponent 32 software. Butter samples were stored in a refrigerator at 6±1°C, and texture analyses were conducted at the same temperature in the micro thermostatic chamber (Temperature Applied Sciences Ltd, West Sussex, United Kingdom) cooled with liquid nitrogen from the XL-120 cylinder (Taylor-Wharton Gas Equipment Sdn. Bhd., Shah Alam, Selangor, Malaysia). The sample was positioned centrally under a P/6 cylindrical flat probe. Butter firmness (N), consistency (N×s), cohesiveness (N), and the viscosity index (N×s) were determined in a penetration test (speed: 2 mm/s; distance: 20 mm). Firmness was measured as the maximum force needed to press the probe into the sample. Cohesiveness was described as the maximum force needed to overcome the resistance of the sample when the probe returns to its initial position. Consistency and the viscosity index were expressed by the area under the force *vs* time curve when the probe penetrated the sample and returned to its initial position, respectively. Butter cohesiveness and the viscosity index were described by negative values, and they were related to the direction of probe movement [Sánchez & Pérez, 2012; Tarapata *et al.*, 2021].

Sensory evaluation

The sensory profiles of MB and WB were determined on a descriptive scale according to ISO 13299 [ISO, 2016]. The evaluation was conducted by a panel of eight trained specialists with confirmed taste sensitivity according to ISO 8586 [ISO, 2014]. The descriptors were selected by the panel. Each panellist received a product sheet and a score sheet. The following quality descriptors were considered in the evaluation: appearance (1 descriptor – colour uniformity), aroma (4 descriptors – milky, pasteurisation, nutty and cheesy aroma), consistency (3 descriptors – firmness, cohesiveness, brittleness), and taste (4 descriptors – milky, pasteurisation, nutty and cheesy). Sensory attributes were evaluated on a five-point descriptive scale (1 to 5 points). The intensity of each sensory attribute was determined (1 – absence of descriptor, 5 – very intense).

Statistical analysis

The results of fatty acid profile, colour parameters, texture properties, and sensory attributes for MB and WB were analysed with the Student's *t*-test ($p \leq 0.05$). One-way ANOVA (normal distribution was verified using the Shapiro-Wilk test) was performed for the results of thermal properties, and the significance of differences between means was determined in Duncan's test at α=0.05. The relationship between the percentage content of individual FAs in total FAs in each sample and parameters of phase transition peaks was determined by principal component analysis (PCA). Data were processed statistically in StatSoft Inc. Statistica v. 13.1 software (Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In MB, the content of total solids was 85.20±0.03 g/100 g, solids-non-fat – 1.41±0.16 g/100 g, fat – 83.94±0.06 g/100 g, and water – 14.93±0.08 g/100 g. In WB, the content of total solids was 85.87±0.08 g/100 g,

solids-non-fat – 1.52±0.09 g/100 g, fat – 84.56±0.06 g/100 g, and water – 14.27±0.09 g/100 g. The obtained results were consistent with the values of Food and Agriculture Organization/World Health Organization standard [FAO/WHO, 2018] and the values given in the literature [Kasapcopur *et al.*, 2021; Nadeem *et al.*, 2014].

Fatty acid profile

An analysis of the FA profile revealed that C14:0, C16:0, C18:0, and C18:1 Σ*c* FAs dominated and accounted for 75.44 and 78.25 g/100 g of total FAs in WB and MB, respectively (Table 1). The remaining FAs were detected in smaller quantities. Samples of MB and WB differed significantly ($p \leq 0.05$) in the proportions of most FAs. Whey butter was significantly ($p \leq 0.05$) more abundant in C4:0, C15:0 *i*, C15:0 *ai*, C17:1, C18:0, C18:1 Σ*t*, C18:1 Σ*c*, C18:2, C18:3, C18:2 *c*9, *t*11, MUFAs, PUFAs, SCFAs, and LCFAs, but less abundant in C10:0, C10:1, C12:0, C13:0 *i*, C13:0 *ai*, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0 *i*, C16:0, C16:1, SFAs, and MC -FAs than MB. The FA profiles of both products were typical of MB and WB [Gómez-Mascaraque *et al.*, 2020; Nadeem *et al.*, 2014; Staniewski *et al.*, 2021].

The observed differences in the FA profiles of WB and MB probably resulted from the whey origin or whey cream production technology. The production of whey cream involves a larger number of processing operations than the production of milk cream, which promotes changes in milk fat globules (MFG) and milk fat globule membrane (MFGM) components in whey cream [Brighenti *et al.*, 2021; Jukkola & Rojas, 2017]. The FA profiles of whey depend on the cheese from which whey originates. WB was obtained from the whey of Gouda cheese, which is commonly produced in Europe. The available literature provides only reports from the studies of whey butter produced from the whey of regional cheeses or experimental products; therefore, some differences could be noticed between the FA profile of WB in the present study and the works of other authors. Çetinkaya [2021] found a higher percentage of unsaturated fatty acids (UFAs) in whey fat (from Kashar cheese) than in milk fat, but Kasapcopur *et al.* [2021] found no differences between whey fat (a mixture of whey from rennet-coagulated White-brined and Kashar and acid-coagulated Lor cheeses) and milk fat in the content of UFAs. Brighenti *et al.* [2021] reported greater differences in the size of MFG and a higher content of phospholipids in whey cream from soft cheese (Munster) than in milk cream. They observed that MFGM could be damaged during cheesemaking and whey processing operations, which can promote the formation of larger MFG aggregates. The FA profile of the MFG core differs from the FA profile of MFGM. The FA composition of MFGM phospholipids is characterised by a higher content of UFAs than the FA composition of core TAGs [Jhanwar & Ward, 2014]. According to Fauquant *et al.* [2005], MFGM are more abundant in UFAs, in particular PUFAs whose content is approximately six times higher than in the MFG core. Based on these studies, it can be assumed that the higher content of UFAs-rich phospholipids in WB compared to MB was responsible for the different FA profile in MB and WB, but this requires further studies.

TABLE 1. Fatty acid profile of milk butter and whey butter (g/100 g total fatty acids).

Fatty acid	Milk butter	Whey butter
C4:0	2.14±0.07^{b}	2.78±0.12^{a}
C6:0	1.72±0.08^{a}	1.81±0.02^{a}
C8:0	1.11±0.01^{a}	1.13±0.02^{a}
C10:0	2.65±0.04^{a}	2.56±0.03^{b}
C10:1	0.33±0.02^{a}	0.28±0.01^{b}
C11:0	0.02±0.01^{a}	0.02±0.01^{a}
C12:0	3.31±0.07^{a}	3.06±0.05^{b}
C12:1	0.05±0.01^{a}	0.02±0.01^{a}
C13:0 *i*	0.11±0.01^{a}	0.04±0.01^{b}
C13:0 *ai*	0.10±0.01^{a}	0.08±0.01^{b}
C13:0	0.11±0.01^{a}	0.09±0.01^{b}
C14:0 *i*	0.15±0.02^{a}	0.14±0.01^{a}
C14:0	12.03±0.17^{a}	10.79±0.14^{b}
C14:1	1.31±0.03^{a}	0.93±0.01^{b}
C15:0 *i*	0.28±0.01^{b}	0.33±0.01^{a}
C15:0 *ai*	0.46±0.01^{b}	0.57±0.02^{a}
C15:0	1.36±0.05^{a}	1.19±0.02^{b}
C16:0 *i*	0.29±0.01^{a}	0.28±0.01^{b}
C 16:0	36.20±0.53^{a}	30.61±0.92^{b}
C16:1	2.11±0.07^{a}	1.67±0.05^{b}
C17:0	0.61±0.06^{a}	0.64±0.02^{a}
C17:1	0.14±0.02^{b}	0.25±0.02^{a}
C18:0	9.71±0.32^{b}	11.33±0.44^{a}
C18:1 Σ*t*	1.13±0.16^{b}	3.31±0.14^{a}
C18:1 Σ*c*	20.31±0.34^{b}	22.71±0.69^{a}
C18:2 Σ*t*	0.11±0.03^{a}	0.07±0.01^{a}
C18:2	1.16±0.03^{b}	1.23±0.09^{a}
C18:2 *c*9, *t*11	0.38±0.03^{b}	1.08±0.04^{a}
C18:3	0.50±0.02^{b}	0.88±0.02^{a}
C19:0	0.12±0.02^{a}	0.11±0.04^{a}
SFA	72.48±0.45^{a}	67.57±0.78^{b}
MUFA	25.37±0.22^{b}	28.18±0.37^{a}
PUFA	2.27±0.07^{b}	4.38±0.12^{a}
SCFA	4.97±0.21^{b}	5.72±0.08^{a}
MCFA	22.26±0.23^{a}	20.10±0.11^{b}
LCFA	72.89±0.29^{b}	74.30±0.44^{a}
BSFA≤C16	1.39±0.02^{a}	1.44±0.03^{a}

Values are means ± standard deviations ($n=3$); values with different superscripts in row differ significantly at $p \leq 0.05$. *i*– *iso*; *ai* – *anteiso*; *c* – *cis*; *t* – *trans*; SFA – saturated fatty acids; MUFA – monounsaturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids; SCFA – short-chain fatty acids (C4–C8); MCFA – medium-chain fatty acids (C10–C15); LCFA – long-chain fatty acids, (C16–C19); BSFA – branched saturated fatty acids (C13:0 *i*, C13:0 *ai*, C14:0 *i*, C15:0 *i*, C15:0 *ai*, C16:0 *i*).

Differential scanning calorimetry (DSC)

The shape of DSC curves differed subject to butter type, water content, and the sample's thermal history (Figure 1, Figure 2, Figure 3). These differences affected the parameters of phase transition peaks describing both exothermic (Table 2) and endothermic (Table 3) transitions. Butter samples and the corresponding fat samples were compared to determine which phase transition peaks correspond to changes in milk fat and water. MBF and WBF were also used in the analysis to minimise differences in the fat content of samples which could have influenced the shape of DSC curves and the parameters of phase transition peaks.

The DSC curves plotted for MBF and WBF had a similar shape, but differed from the curves generated for MB and WB due to the presence of water in the analysed samples (Figure 1). The phase transitions of water in the butter samples (water freezing, ice melting, evaporation) induced much greater changes in heat flow than the phase transitions of fat. Phase transitions of water were visualised by large peaks in DSC curves (Figure 1, Figure 2, Figure 3). These peaks overlapped the peaks representing the phase transitions of milk fat, in particular endothermic peaks associated with fat melting (Figure 2). The parameters of crystallisation and ice melting peaks are consistent with those given in the literature [Tomaszewska-Gras, 2012].

Two exothermic peaks were observed in DSC curves in the range of –40°C to 16.5°C during cooling from 95°C to –40°C. A first peak (A) occurred in all samples between around –40°C to around 14°C, and a second peak (B) occurred between around 10°C to around 15°C (Figure 2).

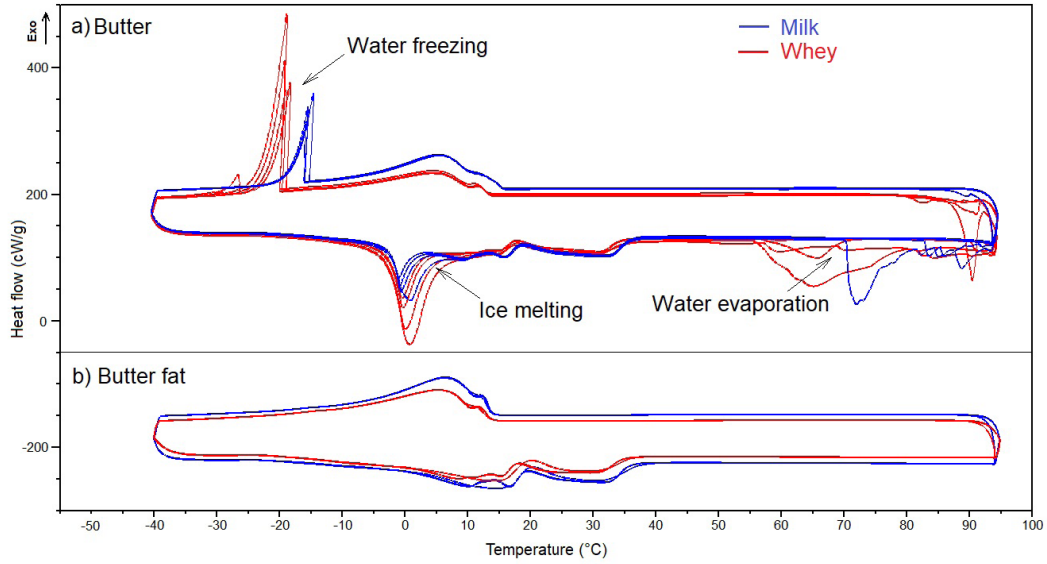


FIGURE 1. Differential scanning calorimetry (DSC) curves of milk butter and whey butter (a) and the corresponding fats (b) with an indication of the phase transitions of water, obtained in both cycles of the DSC analysis.

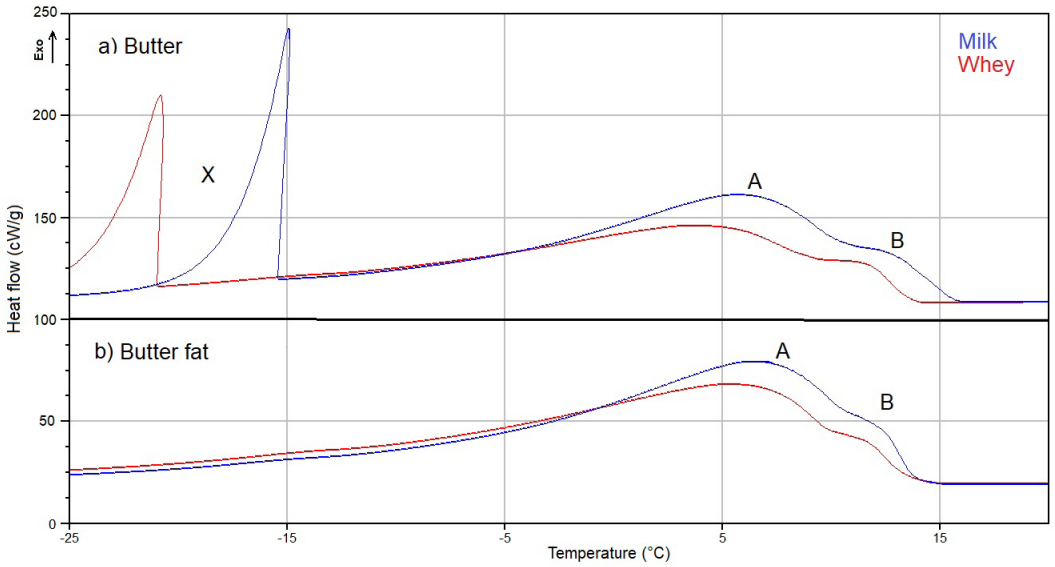


FIGURE 2. Exothermic peaks of fat crystallisation (A, B) and water freezing (X) in milk butter and whey butter (a) and the corresponding fats (b).

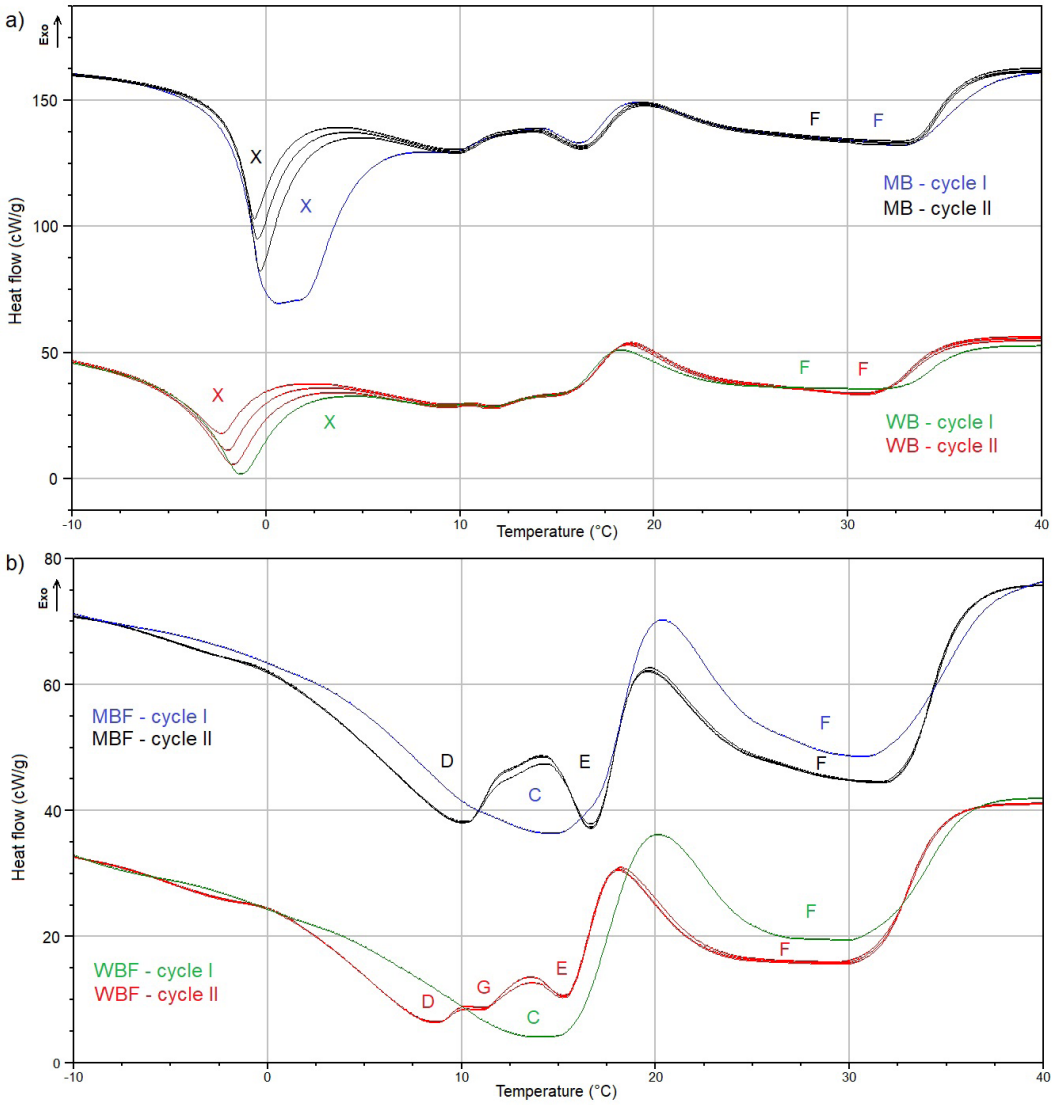


FIGURE 3. Melting curves of milk butter (MB), whey butter (WB) (a) and the corresponding fats (MBF and WBF, respectively) (b) in cycle I and cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC) analysis. Endothermic peaks represent: C – low-melting point fraction (LMPF) and middle--melting point fraction (MMPF) melting; D and G – LMPF melting; E – MMPF melting; F – high-melting point fraction (HMPF) melting. Peaks X denote ice melting (a).

Peak B was not completely separated from peak A at a cooling rate of 10°C/min, therefore peaks A and B were determined jointly as a single exothermic peak (undifferentiated peaks A and B) (Table 2). Exothermic peaks (Figure 2) had similar characteristics to those reported by Smet *et al.* [2010]. In a mentioned study, onset temperature was determined at 15.35°C in the first crystallisation peak and at 12.07°C in the second crystallisation peak. Exothermic peaks (A–B) were associated with crystallisation that occurs within a temperature range of –40°C to 20°C [Brożek *et al.*, 2022a, b; Hokkanen *et al.*, 2021; Smet *et al.*, 2010]. Truong *et al.* [2014] noted two peaks between 0°C to 15°C in hard milk fat fraction. A first peak within the temperature range of 0°C to 10°C and a second additional smaller peak between 10°C to 15°C.

An analysis of the exothermic peaks of milk fat crystallisation demonstrated that water removal had no significant ($p>0.05$) effect on T_{max} values in MB samples or T_{max} and T_{onset} values in WB samples (Table 2). The remaining parameters of the exothermic peaks of fat crystallisation differed significantly ($p\leq0.05$) between MB and MBF as well as between WB and WBF. T_{onset} was the only parameter that did not differ significantly ($p>0.05$) between MBF and WBF. Values of parameters ΔH and P_{height} were higher in the crystallisation peaks of MBF and WBF than in the crystallisation peaks of MB and WB, respectively, due to a higher content of milk fat.

Endothermic peaks were observed in DSC curves in the range of –40°C to 40°C, especially in the range of –10°C to 40°C, during heating within a temperature range of –40°C to 95°C (Figure 3). The DSC curves presenting fat melting parameters differed across DSC cycles. Two endothermic peaks (C and F) were noted in cycle I, whereas four endothermic peaks (D–G) that did not change in successive heating and cooling treatments were observed in cycle II. The first peak (C) with an unclear onset temperature and its endset at 16–21°C was observed only in cycle I. Peak C was associated with unseparated LMPF and MMPF. In cycle II of the DSC

TABLE 2. Parameters of exothermic phase transition peaks – undifferentiated peaks A and B in cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC) analysis of milk butter (MB), milk butter fat (MBF), whey butter (WB) and whey butter fat (WBF).

Sample	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	ΔH (J/g)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	P_{height} (cW/g)	P_s (°C)	P_e (°C)
MB	6.10±0.05[a]	15.75±0.12[a]	42.49±0.92[c]	13.42±0.08[c]	47.82±0.28[b]	16.24±0.19[a]	*
MBF	6.03±0.04[a]	14.02±0.14[b]	64.31±0.27[a]	15.33±0.18[b]	59.04±0.08[a]	15.68±0.05[b]	–37.55±0.49[a]
WB	4.93±0.04[b]	13.89±0.06[b]	36.11±0.17[d]	15.53±0.19[b]	36.87±0.07[c]	14.74±0.21[c]	*
WBF	5.05±0.03[b]	13.70±0.21[b]	59.17±0.29[b]	17.54±0.05[a]	48.38±0.30[b]	14.12±0.10[d]	–38.53±0.18[b]

The values are means ± standard deviations (n=3); values with different superscripts (a–d) in column differ significantly at $p \leq 0.05$. T_{max} – maximum peak temperature; T_{onset} – phase transition onset temperature; ΔH – enthalpy; $\Delta T_{1/2}$ – transition temperature range as peak width at half height; P_{height} – peak height at maximum; P_s – starting point of the peak; P_e – ending point of the peak.

*No clear endset temperature (the water crystallisation peak was not considered in the identification of the end of peak A).

analysis, peak C was transformed to peaks D and E. Peak D was identified as LMPF; it did not have a clear onset temperature, and its endset temperature was determined at 13–15°C. Peak G that was not clearly separated from peak D was observed only on WBF curves within a temperature range of 10–13°C. Peaks G and D represented LMPF melting; therefore, they were considered jointly as a single peak D during the determination of endothermic phase transition peaks (Table 3). Peak E (from 13–14°C to 18–19°C) was identified as MMPF and peak F (from 18–24°C to 34–42°C) was identified as HMPF. Endothermic peaks (C–F) were identified as overlapping LMPF and MMPF peaks (C), and as separate LMPF (D and G), MMPF (E), and HMPF peaks (F) based on published data [Brożek *et al.*, 2022a; Hokkanen *et al.*, 2021; Kasapcopur *et al.*, 2021; Smet *et al.*, 2010; Staniewski *et al.*, 2021]. Our previous study demonstrated that the characteristics of the crystallisation and melting peaks of fat from freeze-dried milk, cream and buttermilk were affected by the content of fat and FAs in samples [Brożek *et al*., 2022a]. Two fat crystallisation peaks in the DSC curves of buttermilk and milk, and three crystallisation peaks in the DSC curve of cream were reported due to a higher concentration of SFAs in cream than in buttermilk and milk. Małkowska *et al.* [2021] also observed three crystallisation peaks of the solid fraction of milk fat with a high content of SFAs.

The presence of water in MB and WB had a greater influence on the parameters describing the melting peaks of LMPF and MMPF than HMPF (Table 3) due to the presence of ice melting peaks overlapping LMPF and MMPF melting peaks in DSC curves (Figure 3). Ice melting peaks overlapped milk fat melting peaks C–E in the DSC curves of MB and WB; therefore, the corresponding parameters could not be determined. For this reason, only the parameters of endothermic peaks denoting HMPF melting (peak F) could be compared between cycle I and cycle II. The identification of peaks D and E in DSC curves depended on the size of the ice melting peak. Due to the higher water content in WB than in MB, ice melting peaks were larger on the DSC curve of WB, and they showed greater overlap with peaks C–E than on the DSC curve of MB (Figure 1). Tomaszewska-Gras [2012] found that ΔH of the ice melting peak and the water freezing peak were dependent on the water content of butter.

The parameters of endothermic peaks (C–F) (Figure 3) are presented in Table 3. A comparison of all products and products within each group (MB and MBF; WB and WBF) revealed that the parameters of the endothermic peaks (C–F) of butters and the corresponding fats differed significantly ($p \leq 0.05$) in most cases. In cycle I of the DSC analysis, the P_{height} of peak C differed between MBF and WBF ($p \leq 0.05$). In peak C, lower values of P_{height} indicate that the phase transition of MBF components was a less energy-intensive process than the phase transition of WBF components. In cycle I of the DSC analysis, the parameters describing peak F differed significantly ($p \leq 0.05$) across products (excluding P_e). In cycle I, differences ($p \leq 0.05$) in T_{onset} and P_s values were noted between MB and MBF and between WB and WBF, whereas no differences ($p > 0.05$) in the values of P_e were observed between MB and WB, or in the values of P_s and P_e between MBF and WBF. The above indicates that fat type did not determine the beginning and end of HMPF melting in cycle I, unlike water which influenced the beginning of HMPF melting in cycle I.

In cycle II, peak C was transformed to LMPF (D) and MMPF peaks (E) (Figure 3). A comparison of MBF and WBF did not reveal significant ($p > 0.05$) differences in the T_{onset} and P_s values of peak D (Table 3), which indicates that the type of butter fat had no effect on the onset of LMPF melting. In turn, MBF and WBF differed significantly ($p \leq 0.05$) in all parameters of peak E, which indicates that the type of butter fat determined the melting characteristics of MMPF. In cycle II of the DSC analysis, the parameters describing peak F differed ($p \leq 0.05$) between MBF and WBF (except for $\Delta T_{1/2}$ and P_e). The differences ($p > 0.05$) were found between MB and MBF (T_{max}, T_{onset} and P_s) and between WB and WBF (T_{max} and T_{onset}), which indicates that water content influenced the mentioned parameters of the HMPF peak in cycle II.

The thermal history of butters and the corresponding fats affected DSC curves showing their melting behaviour (Figure 3) and the parameters of endothermic peaks (Table 3). The greatest differences were noted between LMPF and MMPF. After the first stage of heating, cooling and reheating, the overlapping melting peaks of LMPF and MMPF (peak C) split into separate LMPF (peak D) and MMPF (peak E) peaks. Peak C was completely transformed to peak D (peaks D and G in WBF) and peak E; therefore, the corresponding parameters could not be accurately compared between cycle I and cycle II, and only a general change trend was confirmed. The applied thermal processing regime also influenced HMPF melting parameters (peak F). The endothermic peaks of MBF

TABLE 3. Parameters of endothermic phase transition peaks in cycle I and cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC) analysis of milk butter (MB), milk butter fat (MBF), whey butter (WB) and whey butter fat (WBF).

Peak	Cycle	Sample	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	ΔH (J/g)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	P_{height} (cW/g)	P_s (°C)	P_e (°C)
C	I	MB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		MBF	15.25±0.58^{a}	2.88±1.16^{a}	19.66±1.63^{a}	10.97±0.57^{a}	–31.01±1.15^{b}	*	20.68±0.51^{a}
		WB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		WBF	15.05±0.65^{a}	2.43±2.37^{a}	15.91±2.40^{a}	10.27±1.34^{a}	–27.48±1.52^{a}	*	20.14±0.14^{a}
D	II	MB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		MBF	9.41±0.08^{a}	1.48±0.33^{a}	5.51±0.49^{a}	6.33±0.21^{b}	–12.22±0.71^{b}	0.12±0.41^{a}	14.42±0.10^{a}
		WB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		WBF	7.90±0.28^{b}	1.36±0.34^{a}	4.12±0.68^{b}	7.71±0.25^{a}	–9.93±1.58^{a}	0.02±0.32^{a}	13.82±0.36^{b}
E	II	MB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		MBF	17.17±0.03^{a}	14.98±0.08^{a}	2.22±0.14^{a}	2.43±0.13^{a}	–16.13±0.90^{b}	14.47±0.11^{a}	19.90±0.07^{a}
		WB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		WBF	16.22±0.04^{b}	14.26±0.05^{b}	0.81±0.19^{b}	2.07±0.16^{b}	–7.02±0.85^{a}	13.91±0.06^{b}	18.46±0.04^{b}
F	I	MB	32.46±0.51^{aA}	19.71±0.47^{cA}	15.62±1.04^{aA}	11.32±0.45^{bA}	–25.26±1.61^{bA}	19.18±0.13^{bA}	41.84±2.32^{aA}
		MBF	31.64±0.61^{aA}	21.66±0.32^{aA}	15.76±0.82^{aA}	10.85±0.40^{cA}	–25.59±1.37^{bA}	21.11±0.81^{aA}	41.99±0.91^{aA}
		WB	30.21±0.80^{bA}	18.72±0.09^{dA}	12.52±0.91^{bA}	11.81±0.65^{aA}	–19.54±1.86^{aA}	18.25±0.08^{cA}	39.78±1.95^{aA}
		WBF	30.33±0.37^{bA}	20.90±0.32^{bA}	12.68±0.79^{bA}	11.76±0.42^{aA}	–19.73±1.59^{aA}	20.43±0.52^{aA}	39.97±1.07^{aA}
	II	MB	32.67±0.33^{aA}	19.96±0.26^{bA}	15.19±0.72^{aA}	11.52±0.21^{aA}	–26.48±0.69^{bA}	19.48±0.26^{bA}	41.25±0.91^{aA}
		MBF	32.04±0.21^{bA}	20.46±0.13^{aB}	15.56±0.37^{aA}	11.40±0.19^{aA}	–25.79±0.41^{bA}	19.95±0.17^{aB}	39.96±0.50^{abB}
		WB	31.05±0.35^{bA}	18.78±0.31^{cA}	13.36±0.62^{bA}	12.09±0.30^{aA}	–21.95±1.18^{aA}	18.35±0.24^{cA}	38.50±1.29^{bA}
		WBF	30.49±0.24^{cA}	19.30±0.20^{bB}	13.57±0.26^{bA}	11.63±0.15^{aA}	–21.35±0.47^{aA}	18.53±0.11^{cB}	40.11±0.17^{abA}

The values are means ± standard deviations (n=3); values with different lowercase letters (a–d) in superscripts in column separately for each peak and cycle differ significantly at $p \leq 0.05$; values with different uppercase letters (A–B) in superscripts for individual product in cycle I and cycle II of peak F differ significantly at $p \leq 0.05$. T_{max} – maximum peak temperature; T_{onset} – phase transition onset temperature; ΔH – enthalpy; $\Delta T_{1/2}$ – transition temperature range as peak width at half height; P_{height} – peak height at maximum; P_s – starting point of the peak; P_e – ending point of the peak; n.d. – not detected (the water freezing peak overlapped fat melting peaks).

and WBF differed in T_{onset} and P_s values, and the endothermic peak of MBF differed ($p \leq 0.05$) in the value of P_e between cycle I and cycle II (Table 3). In the DSC analysis, the peak parameters of all products were less scattered in cycle II than in cycle I, which indicates that the milk fat melting process was more stable in cycle II. The transition of peak C to peaks D and E (Figure 3) and the smaller scatter of results in cycle II than in cycle I (Table 3) could be explained by the transition of fat crystals from the polymorphic form α to forms β' and β. According to the literature, the hexagonal α form is irreversibly transformed to the more stable orthorhombic β' and triclinic β forms during thermal processing [Fredrick *et al.*, 2011; Hondoh & Ueno, 2016; Lopez & Ollivon, 2009; Staniewski *et al.*, 2021; Viriato *et al.*, 2019]. Our previous study demonstrated that thermal history influenced the parameters of phase transition peaks and fat melting peaks of cream, milk, and buttermilk [Brożek *et al.*, 2022b]. In turn, Staniewski *et al.* [2020] found that thermal history affected the melting process of anhydrous milk fat.

The following variables were subjected to PCA to identify variables that were most highly correlated with MBF and WBF, as well as variables that were bound by the strongest correlations: the FA profile of samples (g/100 g total FAs) (Table 1) and the peak parameters (Table 2 and Table 3). The first two principal components, PC1 and PC2, explained 80.50% of total variance in input data, but only PC1 explained 69.78% of the variance, whereas PC2 explained only 10.72% of the variance (Figure 4). Two clusters of variables (left and right) were formed at the ends of the PC1 axis. The variables from each cluster were strongly correlated with each other.

The loading vectors indicate that the variables were correlated. The greater the acute angle, the stronger the correlation between the variables in a given direction, whereas an obtuse angle points to an inverse correlation, and a straight angle indicates an absence of a correlation between variables. To facilitate the description of variables, peaks were marked with letters A and C–F, and the symbols I and II in the subscript denote cycles I and II, respectively. The cluster on the left side of the PC plot contains points representing variables with negative loadings on the PC1 axis in the range of –0.99 to –0.75 (Figure 4). These variables were higher in WBF than

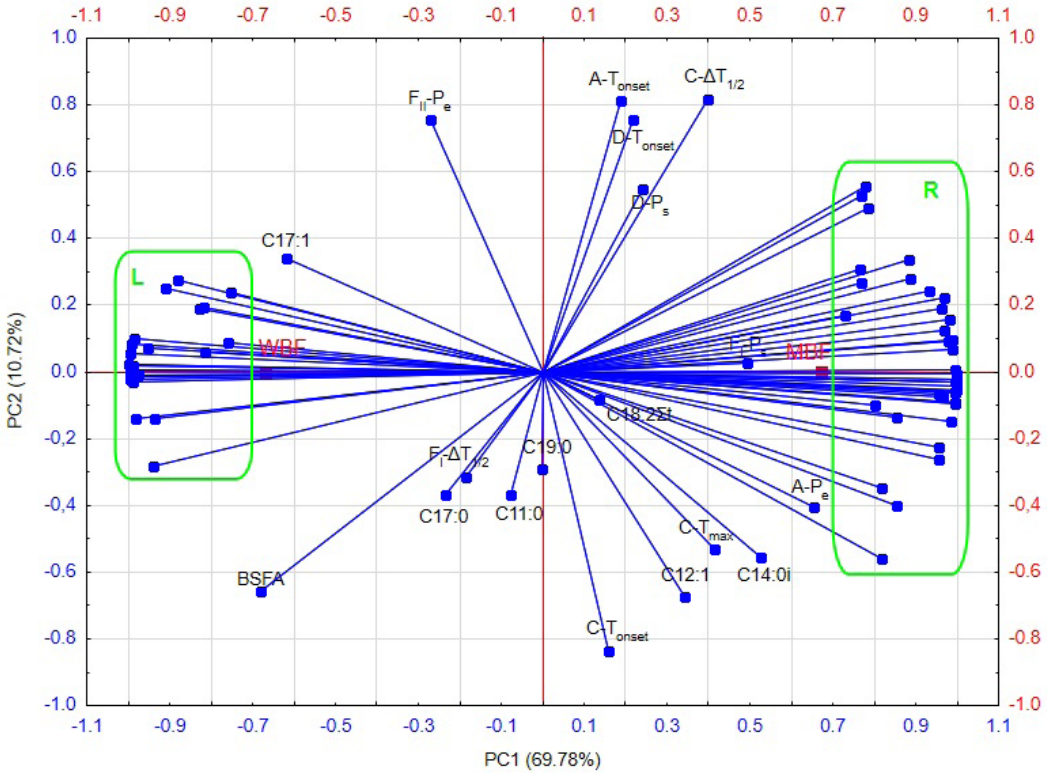


FIGURE 4. Principal component analysis biplot of milk butter fat (MBF) and whey butter fat (WBF), and the contribution of the parameters of peaks C and F in cycle I and peaks A, D, E and F in cycle II of the differential scanning calorimetry (DSC), and the content fatty acids (g/100 g total fatty acids) to principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). The variables were arranged in ascending (cluster left, L) and descending (cluster right, R) order based on loadings. The L cluster contains C15:0 *ai*, C18:1 Σ*t*, D-$\Delta T_{1/2}$, F_{II}-P_{height}, C18:3, C18:2 *c*9, *t*11, C15:0 *i*, MUFA, PUFA, C18:2, C18:1 Σ*c*, LCFA, E-P_{height}, A-$\Delta T_{1/2}$, C18:0, F_I-P_{height}, C-P_{height}, C4:0, SCFA, C8:0, D-P_{height}, C6:0, F_{II}-$\Delta T_{1/2}$. The R cluster contains C16:0, C14:1, C16:1, C14:0, F_{II}-T_{max}, C12:0, C13:0 *ai*, C13:0, SFA, MCFA, A-P_{height}, F_{II}-P_s, F_{II}-ΔH, C10:0, F_{II}-T_{onset}, C10:1, A-ΔH, D-T_{max}, C15:0, E-P_e, E-ΔH, F_I-ΔH, A-P_s, E-T_{max}, F_I-T_{max}, E-T_{onset}, A-T_{max}, C13:0 *i*, E-$\Delta T_{1/2}$, C16:0 *i*, D-ΔH, E-P_s, D-P_e, C-P_e, C-ΔH, F_I-P_e and F_I-T_{onset}. Symbols I, II in the subscript of peak F denote cycles I and II of the DSC analytical sequence, respectively.

in MBF. The left cluster includes the following variables: C15:0 *ai*, C18:1 Σ*t*, D-$\Delta T_{1/2}$, F_{II}-P_{height}, C18:3, C18:2 *c*9, *t*11, C15:0 *i*, MUFA, PUFA, C18:2, C18:1 Σ*c*, LCFA, E-P_{height}, A-$\Delta T_{1/2}$, C18:0, F_I-P_{height}, C-P_{height}, C4:0, SCFA, C8:0, D-P_{height}, C6:0, and F_{II}-$\Delta T_{1/2}$, which were arranged in an ascending order based on the loadings. The cluster on the right side of the PC1 axis contains points denoting variables that were bound by inverse correlations relative to the left cluster and were characterised by highly positive loadings in the range of 0.73 to 0.99. The values of these variables were higher in MBF than in WBF. The right cluster includes following variables: C16:0, C14:1, C16:1, C14:0, F_{II}-T_{max}, C12:0, C13:0 *ai*, C13:0, SFA, MCFA, A-P_{height}, F_{II}-P_s, F_{II}-ΔH, C10:0, F_{II}-T_{onset}, C10:1, A-ΔH, D-T_{max}, C15:0, E-P_e, E-ΔH, F_I-ΔH, A-P_s, E-T_{max}, F_I-T_{max}, E-T_{onset}, A-T_{max}, C13:0 *i*, E-$\Delta T_{1/2}$, C16:0 *i*, D-ΔH, E-P_s, D-P_e, C-P_e, C-ΔH, F_I-P_e, and F_I-T_{onset}, which were arranged in a descending order based on the loadings.

A higher content of SFAs and MCFAs, especially C12:0, C14:0 and C16:0, in MBF than in WBF increased the values of T_{max}, ΔH and P_s and decreased the value of $\Delta T_{1/2}$ in crystallisation peak A (which indicates that MBF crystallisation was characterised by higher enthalpy, occurred at a higher temperature, and proceeded less rapidly than WBF crystallisation), whereas an increase in the content of MUFAs, PUFAs, and LCFAs, including C18:1, and, to a much lesser degree, an increase in the content of SCFAs, including C4:0, C6:0 and C8:0, induced a reverse trend (which indicates that WBF crystallisation was characterised by lower enthalpy, occurred at a lower temperature, and proceeded more rapidly than MBF crystallisation). In our previous study, we found that T_{onset} increased, whereas $\Delta T_{1/2}$ decreased with a rise in the content of SFAs and MCFAs, in particular C14:0 and C16:0, in freeze-dried milk [Brożek *et al.*, 2022b]. In turn, Truong *et al.* [2014] reported that anhydrous milk fat had a crystallisation peak in the temperature range from –5°C to 10°C. The observed peak was smaller and characterised by higher values of T_{max} and T_{onset} in the hard fraction compared to soft fraction of milk fat.

The content of SFAs and MCFAs, especially C12:0, C14:0 and C16:0, influenced the value of P_e of the melting peak corresponding to the merged LMPF and MMPF peaks (peak C); the values of T_{max}, ΔH and P_e of the LMPF peak (peak D); the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH, $\Delta T_{1/2}$, P_s and P_e of the MMPF peak (peak E); the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH and P_e in cycle I; and the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH and P_s in cycle II of the HMPF melting peak (peak F). The above implies that the maximum difference in heat flow in all endothermic peaks (based on the absolute values in cycles I and II), the enthalpy of LMPF, MMPF and HMPF (in cycles I and II), and the melting rate of MMPF were lower in WBF than MBF, whereas the beginning

TABLE 4. Colour parameters of milk butter (MB) and whey butter (WB).

Sample	L^*	a^*	b^*	C^*	WI	YI	ΔC^*	ΔE
MB	89.13±0.43[a]	–3.41±0.03[a]	32.08±0.11[a]	32.26±0.11[a]	65.96±0.15[b]	51.42±0.25[a]	2.25±0.11	2.33±0.27
WB	88.96±0.58[a]	–3.17±0.06[b]	29.84±0.23[b]	30.01±0.23[b]	68.02±0.02[a]	47.92±0.05[b]		

Values are means ± standard deviations (n=3); values with different superscripts in column differ significant at $p \leq 0.05$. L^* – lightness; a^* – position between redness and greenness; b* – position between blueness and yellowness; C^* – chromaticity; WI – whiteness index; YI – yellowness index; ΔE – total colour difference; ΔC^* – difference in saturation.

of MMPF (peak E) and HMPF (cycles I and II, peak F) melting and the end of melting in the overlapping peaks of LMPF and MMPF (peak C), LMPF (peak D) and MMPF (peak E) occurred at a lower temperature in WBF than MBF. The content of MUFAs, PUFAs, and LCFAs, including C18:0, and to a much smaller extent, the content of SCFAs, including C4:0, C6:0 and C8:0, induced a drop in the above parameters, but increased P_{height} values of all endothermic peaks, and $\Delta T_{1/2}$ values of LMPF and HMPF (cycle II) melting peaks. The above implies that LMPF and HMPF (cycle II) melted more rapidly in WBF than MBF. The presence of peak G can probably be attributed to a higher content of MUFAs, PUFAs, and LCFAs, including C18:0, in WBF than in MBF. According to Staniewski *et al.* [2021], the FA profile of TAGs can affect the melting behaviour of milk fat, in particular the value of P_s, and it can influence the textural properties of butter. Anankanblil *et al.* [2018] demonstrated that the P_s value of MMPF and HMPF crystallisation and melting peaks decreased with a rise in the content of C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3, and increased with a rise in the content of C14:0 and C16:0. Larsen *et al*. [2014] and Smet *et al*. [2010] made similar observations also in the P_s value of the LMPF peak. The saturated FA C18:0 decreased the P_s values of milk fat crystallisation and melting peaks despite the fact that it has a higher melting temperature than C18:1, C18:2, and C18:3. The above could be attributed to mammary desaturase activity which transforms C18:0 into C18:1, thus lowering melting temperature [Anankanblil *et al.*, 2018; Larsen *et al.*, 2014]. Buldo *et al.* [2013] reported a correlation between the melting temperature (P_s) of MMPF and the content of C14:1, C16:0, C18:1 Σ*c*, C18:1 Σ*t*, and C18:2 *c*9, *t*11. In a PCA conducted in our previous study, the content of many FAs was correlated with the parameters of crystallisation and melting peaks of fat from freeze-dried milk, including the values of T_{onset} of the crystallisation peak, $\Delta T_{1/2}$ of the LMPF melting peak, and T_{max} and T_{onset} of the MMPF peak [Brożek *et al.,* 2022b]. These variables were inversely corelated with the $\Delta T_{1/2}$ of the crystallisation peak and the content of LCFAs, MUFAs, and PUFAs, including C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3.

TABLE 5. Textural properties of milk butter (MB) and whey butter (WB).

Sample	Firmness (N)	Consistency (N×s)	Cohesiveness (N)	Viscosity (N×s)
MB	1.80±0.05[a]	30.90±0.74[a]	–0.86±0.07[b]	–1.54±0.19[a]
WB	1.68±0.06[b]	30.67±1.59[a]	–0.67±0.08[a]	–1.30±0.03[a]

Values are means ± standard deviation (n=3); values with different superscripts in column differ significantly at $p \leq 0.05$.

Colour

Samples of MB and WB differed significantly ($p \leq 0.05$) in the colour parameters a^*, b^*, C^*, WI and YI, but not in parameter L^* ($p > 0.05$) (Table 4). The values of b^* and YI were higher in MB, which indicates that it was more yellow in colour than WB. Colour chroma was also higher in MB, whereas the values of parameter a^* and the whiteness index were higher in WB.

The values of L^*, a^* and b^* in MB were similar to those given in the literature [Gómez-Mascaraque *et al.*, 2020]. In turn, WB was characterised by similar lightness, a higher contribution of greenness, and a significantly higher contribution of yellowness relative to other studies [Jinjarak *et al.*, 2006; Kasapcopur *et al.*, 2021]. The total colour difference between MB and WB reached 2.33 (Table 4). The detection of colour difference could be easily possible even by an inexperienced observer if the ΔE=2.0–3.5 [Dobrzańska & Cais-Sokolińska, 2014].

Texture

The textural properties of MB and WB are presented in Table 5. Milk butter and whey butter differed significantly ($p \leq 0.05$) in firmness. Internal stickiness (described by cohesiveness values) was significantly ($p \leq 0.05$) higher in MB than WB. The examined products did not differ significantly ($p > 0.05$) in consistency or viscosity. The obtained lower values of firmness and cohesiveness for WB compared to MB are in agreement with the fatty acid profiles of the samples. In turn WB was more abundant in MUFAs and PUFAs (Table 1) which contribute to butter softness. Amal [2009] and Jinjarak *et al.* [2006] reported lower hardness and cohesiveness in whey butter than in sweet cream butter. In the work of Staniewski *et al.* [2021], the rheological properties of butter were correlated with the composition of TAGs in the fat phase, and butter firmness decreased with a rise in the content of C18:1, C18:2, and C18:3 PUFAs in TAGs.

Sensory evaluation

The sensory evaluation revealed that MB and WB differed significantly ($p \leq 0.05$) in the values of consistency descriptors: firmness, brittleness, and cohesiveness (Figure 5) as well as in the intensity of milky and nutty aroma, and cheesy taste ($p \leq 0.05$). The remaining descriptors of taste, aroma, and colour uniformity did not differ significantly ($p > 0.05$) between the compared butters.

In a study by Mallia *et al.* [2008], butter enriched with UFAs was characterised by higher spreadability and a somewhat less intense milky taste and pasteurisation aroma than

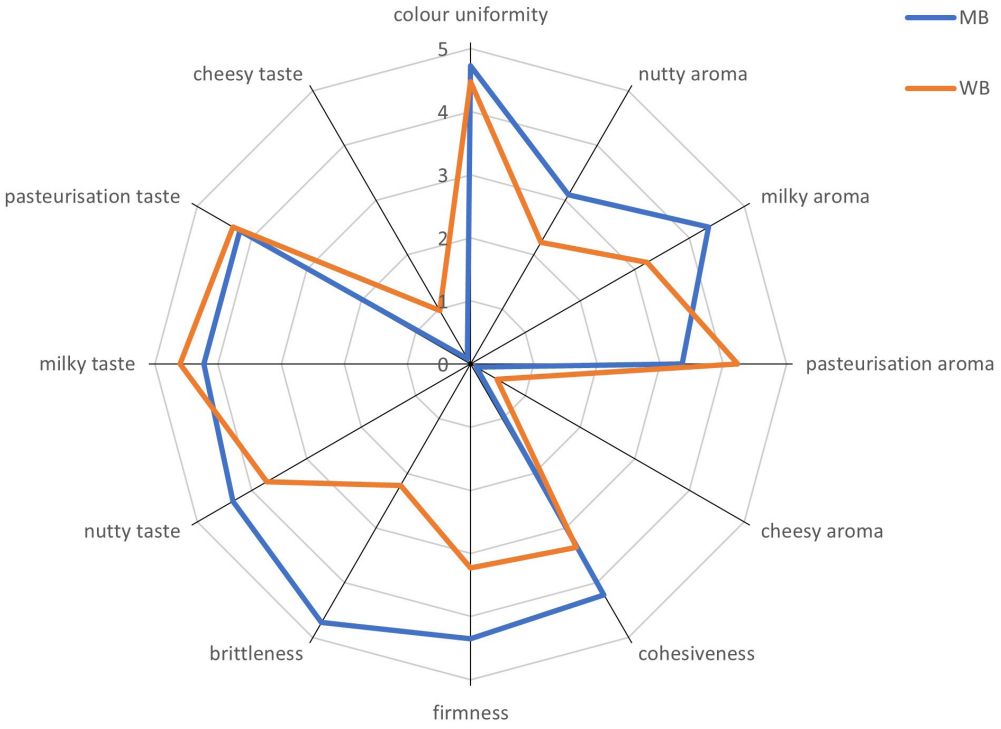


FIGURE 5. Sensory profile of milk butter (MB) and whey butter (WB).

conventional butter after 1 week of storage at 6°C. After 8 weeks of storage at 6°C, these differences, excluding spreadability, were levelled out between the samples. Jinjarak *et al.* [2006] found that sweet cream butter and whey butter differed significantly only in yellowness, shininess, porosity, melting rate, cardboard odour, and nutty flavour.

CONCLUSIONS

Whey butter had comparable sensory attributes to MB, but it was less yellow in colour. Whey butter was softer than MB due to a higher content of MUFAs, PUFAs, and LCFAs, leading to lower crystallisation onset temperature and higher melting onset temperature of fat. The thermal properties of butter were determined by butter type, FA profile, presence of water, and thermal history. Due to relatively high water content, the DSC curves of butter differed considerably from the DSC curves of butter fat. Water freezing and ice melting peaks overlapped fat crystallisation and melting peaks, which hindered their observations in DSC curves and affected their parameters. The phase transition peaks of milk fat and water, peak overlaps, and the extent to which water affected the parameters of milk fat phase transition peaks were determined based on an analysis of the DSC curves of butters and their fats. Thermal history influenced butter melting behaviour by inducing changes in DSC curves, including the number of peaks and peak parameters. The PCA revealed that a rise in the content of SFAs and MCFAs, especially C12:0, C14:0 and C16:0; increased the values of T_{max}, ΔH and P_s; decreased the value of $\Delta T_{1/2}$ of the crystallisation peak; increased the value of P_e of the merged melting peak of LMPF and MMPF; increased the values of T_{max}, ΔH and P_e of the LMPF peak; increased the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH, $\Delta T_{1/2}$, P_s and P_e of the MMPF peak; increased the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH and P_e in cycle I; and increased the values of T_{max}, T_{onset}, ΔH and P_s in cycle I of the HMPF peak. Reverse trends were observed with a rise in the content of MUFAs, PUFAs, and LCFAs, including C18:0, and to a smaller extent, with an increase in the content of SCFAs, in particular C4:0. These results were used to determine the influence of butter type on the crystallisation and melting characteristics of WBF and MBF. WBF crystallisation was characterised by lower enthalpy; it occurred at a lower temperature, and proceeded more rapidly than MBF crystallisation. In turn, LMPF and HMPF (cycle II) melted more rapidly in WBF than MBF, whereas the absolute maximum difference in heat flow in all fractions (cycles I and II), the enthalpy of LMPF, MMPF and HMPF (cycles I and II), the melting rate of MMPF, and the values at the beginning (MMPF and HMPF in cycles I and II) and the end of melting (overlapping LMPF and MMPF peaks in cycle I; separate LMPF and MMPF peaks in cycle II) were lower in WBF than MBF. Whey butter and milk butter differed in physicochemical properties and sensory attributes, and their thermal profiles depended on the FA profile, water content, and thermal history.

RESEARCH FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ORCID IDs

K. Bohdziewicz https://orcid.org/0000-0003-2394-0495
O.M. Brożek https://orcid.org/0000-0002-0133-3224
K. Kiełczewska https://orcid.org/0000-0002-5267-925X

REFERENCES

1. Amal, A.H. (2009). Fatty acid composition, textural and organoleptic properties of whey butter. *Journal of Food and Dairy Sciences*, *34*(4), 3081–3094. https://doi.org/10.21608/JFDS.2009.11343
2. Amara-Dali, W.B, Lesieur, P., Artzner, F., Karray, N., Attia, H., Ollivon, M. (2007). Anhydrous goat's milk fat: thermal and structural behaviors studied by coupled differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. 2. Influence of cooling rate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4741–4751. https://doi.org/10.1021/jf063210p
3. Anankanbil, S., Larsen, M.K., Weisbjerg, M.R., Wiking, L. (2018). Effects of variation in fatty acids and triglyceride composition on melting behavior in milk fat. *Milk Science International*, *71*(2), 4–9. https://doi.org/10.25968/MSI.2018.2
4. Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Johnson, M.E., Lucey, J.A. (2021). Effect of substituting whey cream for sweet cream on the textural and rheological properties of cream cheese. *Journal of Dairy Science*, *104*(10), 10500–10512. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20338
5. Brożek, O.M., Kiełczewska, K., Bohdziewicz, K. (2022a). Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures. *International Dairy Journal*, *129*, art. no. 105339. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339
6. Brożek, O.M., Kiełczewska, K., Bohdziewicz, K. (2022b). Characterisation of selected emulsion phase parameters in milk, cream and buttermilk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *72*(1), 5–15. https://doi.org/10.31883/pjfns/144223
7. Buldo, P., Larsen, M.K., Wiking, L. (2013). Multivariate data analysis for finding the relevant fatty acids contributing to the melting fractions of cream. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(7), 1620–1625. https://doi.org/10.1002/jsfa.5934
8. Çetinkaya, A. (2021). A research on determination of some properties of butter made from creams extracted from whey and milk. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, *3*(4), 19–24. https://doi.org/10.24018/ejfood.2021.3.4.321
9. Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J.L. (2006). The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science*, *89*(6), 1956–1969. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72263-9
10. Dobrzańska, A., Cais-Sokolińska, D. (2014). Measuring the brightness and coordinate trichromaticity milk protein preparations. *Aparatura Badawcza i Dydaktycza*, *19*(3), 267–272 (in Polish; English abstract).
11. Fauquant, C., Briard, V., Leconte, N., Michalski, M.-C. (2005). Differently sized native milk fat globules separated by microfiltration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*(2), 80–86. https://doi.org/10.1002/ejlt.200401063
12. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. (2018). *Codex Alimentarius: Standard for butter, CXS 279-1971. Amended in 2018.* Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy.
13. Fredrick, E., Van de Walle, D., Walstra, P., Zijtveld, J.H., Fischer, S., Van der Meeren, P., Dewettinck, K. (2011). Isothermal crystallization behaviour of milk fat in bulk and emulsified state. *International Dairy Journal*, *21*(9), 685–695. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.007
14. Gómez-Mascaraque, L.G., Kilcawley, K., Hennessy, D., Tobin, J.T., O'Callaghan, T.F. (2020). Raman spectroscopy: A rapid method to assess the effects of pasture feeding on the nutritional quality of butter. *Journal of Dairy Science*, *103*(10), 8721–8731. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18716
15. Hokkanen, S.P., Partanen, R., Jukkola, A., Frey, A.D., Rojas, O.J. (2021). Partitioning of the milk fat globule membrane between buttermilk and butter serum is determined by the thermal behaviour of the fat globules. *International Dairy Journal*, *112*, art. no. 104863. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104863
16. Hondoh, H., Ueno, S. (2016). Polymorphism of edible fat crystals. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, *62*(2), 398–399. https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.04.021
17. International Organization for Standardization. (2002). *Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters* (ISO Standard No. 15884).
18. International Organization for Standardization. (2010). *Milk – Determination of fat content – Gravimetric method (Reference method)* (ISO Standard No. 1211).
19. International Organization for Standardization. (2014). *Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors* (ISO Standard No. 8586).
20. International Organization for Standardization. (2016). *Sensory analysis – Methodology – General guidance for establishing a sensory profile* (ISO Standard No. 13299).
21. Jhanwar, A., Ward, R.E. (2014). Particle size distribution and lipid composition of skim milk lipid material. *International Dairy Journal*, *36*(2), 110–117. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.010
22. Jinjarak, S., Olabi, A., Jiménez-Flores, R., Walker, J.H. (2006). Sensory, functional, and analytical comparisons of whey butter with other butters. *Journal of Dairy Science*, *89*(7), 2428–2440. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72316-5
23. Jukkola, A., Rojas, O.J. (2017). Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects. *Advances in Colloid and Interface Science*, *245*, 92–101. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.010

24. Kasapcopur, E., Mohammed, A.M., Colakoglu, A.S. (2021). Effects of differences in whey composition on the physicochemical properties of whey butter. *International Journal of Dairy Technology*, *74*(3), 535–546. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12782
25. Larsen, M.K., Andersen, K.K., Kaufmann, N., Wiking, L. (2014). Seasonal variation in the composition and melting behavior of milk fat. *Journal of Dairy Science*, *97*(8), 4703–4712. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7858
26. Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M. (2005). Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. *Journal of Dairy Science*, *88*(2), 511–526. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72713-2
27. Lopez, C., Ollivon, M. (2009). Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat: 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, *159*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.02.009
28. Macwan, S.R., Dabhi, B.K, Parmar, S.C., Aparnathi, K.D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*(8), 134–155. http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016
29. Mallia, S., Escher, F., Schlichtherle-Cerny, H. (2008). Aroma-active compounds of butter: a review. *European Food Research and Technology*, *226*, 315–325. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0555-y
30. Małkowska, M., Staniewski, B., Ziajka, J. (2021). Analyses of milk fat crystallization and milk fat fractions. *International Journal of Food Properties*, *24*(1), 325–336. https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1878217
31. Michalski, M.-C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, *132*(2), 247–261. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.007
32. Nadeem, M., Mahud, A., Imran, M., Khalique, A. (2014). Enhancement of the oxidative stability of whey butter through almond (*Prunus dulcis*) peel extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, *39*(6), 591–598. https://doi.org/10.1111/jfpp.12265
33. Nishanthi, M., Vasiljevic, T., Chandrapala, J. (2017). Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, *66*, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.009
34. Omar, K.A., Gounga, M.E., Liu, R., Mwinyi, W., Aboshora, W., Ramadhan, A.H., Sheha, K.A., Wang, X. (2017). Triacylglycerol composition, melting and crystallization profiles of lipase catalysed anhydrous milk fats hydrolysed. *International Journal of Food Properties*, *20*(sup2), 1230–1245. https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1301954
35. Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S.K., Gat, Y., Sindhu, N. (2018). Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. *Nutrition and Food Science*, *48*(3), 520–535. https://doi.org/10.1108/nfs-01-2018-0017
36. Pathare, P.B., Opara, U.L., Al-Said, F.A.-J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 36–60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9
37. Sánchez, L., Pérez, M.D. (2012). Physical properties of dairy products. In I. Arana (Ed.), *Physical Properties of Foods: Novel Measurement Techniques and Applications*, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 355–398. https://doi.org/10.1201/b11542
38. Smet, K., Coudijzer, K., Fredrick, E., De Campeneere, S., De Block, J., Wouters, J, Raes, K., Dewettinck, K. (2010). Crystallization behavior of milk fat obtained from linseed-fed cows. *Journal of Dairy Science*, *93*(2), 495–505. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2588
39. Staniewski, B., Smoczyński, M., Żulewska, J., Wiśniewska, K., Baranowska, M. (2020). Effect of model heat treatment conditions on selected properties of milk fat. *International Journal of Dairy Technology*, *73*(3), 532–541. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12697
40. Staniewski, B., Ogrodowska, D., Staniewska, K., Kowalik, J. (2021). The effect of triacylglycerol and fatty acid composition on the rheological properties of butter. *International Dairy Journal*, *114*, art. no. 104913. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104913
41. Tarapata, J., Łobacz, A., Żulewska, J. (2021). Physicochemical properties of skim milk gels obtained by combined bacterial fermentation and renneting: Effect of incubation temperature at constant inoculum level. *International Dairy Journal*, *123*, art. no. 105167. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105167
42. Tomaszewska-Gras, J. (2012). Detection of butter adulteration with water using differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *108*, 433–438. https://doi.org/10.1007/s10973-011-1913-y
43. Tomaszewska-Gras, J. (2013). Melting and crystallization DSC profiles of milk fat depending on selected factors. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *113*, 199–208. https://doi.org/10.1007/s10973-013-3087-2
44. Truong, T., Bansal, N., Sharma, R., Palmer, M., Bhandari, B. (2014). Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. *Food Chemistry*, *145*, 725–735. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.072
45. Viriato, R.L.S, de Souza Queirós, M., Neves, M.I.L., Ribeiro, A.P.B, Gigante, M.L. (2019). Improvement in the functionality of spreads based on milk fat by the addition of low melting triacylglycerols. *Food Research International*, *120*, 432–440. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.082

dr hab. inż. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM
Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 29.05.2023 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w powstaniu niżej wymienionych artykułów:

1. Brożek O., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Characterisation of selected emulsion phase parameters in milk, cream and buttermilk*. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(1), 5–15 (IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt). DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/144223

Mój udział stanowił 15% i polegał na pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, finansowaniu badań oraz na wsparciu merytorycznym w opracowaniu koncepcji doświadczenia, zaplanowaniu metodyk, interpretacji wyników badań, przygotowaniu publikacji i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures*. International Dairy Journal, 129, 105339 (IF_{2021} = 3,032; IF_5 = 3,122; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt).
DOI: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339

Mój udział stanowił 10% i polegał na finansowaniu badań oraz wsparciu merytorycznym w opracowaniu metodologii, zestawieniu i interpretacji wyników badań, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, redagowaniu i edycji tekstu manuskryptu.

3. Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *The physicochemical and sensory properties with special emphasis on thermal characteristics of whey butter from Gouda cheese production compared to milk butter*. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(4), 407–419 (IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt). DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/155838

Mój udział stanowił 10% i polegał na wsparciu merytorycznym w opracowaniu koncepcji doświadczenia, zestawieniu i interpretacji wyników badań, przygotowaniu publikacji oraz na finansowaniu badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymienione prace były wykorzystane w przewodzie doktorskim mgr inż. Oskara Michała Brożka.

Katarzyna Kiełczewska

dr inż. Krzysztof Bohdziewicz

Olsztyn, 29.05.2023 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w powstaniu niżej wymienionych artykułów:

1. Brożek O., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Characterisation of selected emulsion phase parameters in milk, cream and buttermilk.* Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(1), 5–15 (IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt). DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/144223

Mój udział stanowił 5% i polegał na wsparciu merytorycznym w interpretacji wyników badań oraz w przygotowaniu publikacji.

2. Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *Fatty acid profile and thermal characteristics of ovine and bovine milk and their mixtures.* International Dairy Journal, 129, 105339 (IF_{2021} = 3,032; IF_5 = 3,122; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt). DOI: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105339

Mój udział stanowił 10% i polegał na wsparciu merytorycznym w opracowaniu w opracowaniu koncepcji doświadczenia, projektu i metodologii badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

3. Brożek O. M., Kiełczewska K., Bohdziewicz K. (2022). *The physicochemical and sensory properties with special emphasis on thermal characteristics of whey butter from Gouda cheese production compared to milk butter.* Polish Journal of Food and Nutrition Science, 72(4), 407–419 (IF_{2021} = 2,736; IF_5 = 3,039; $MEiN_{2021}$ = 100 pkt). DOI: https://doi.org/10.31883/pjfns/155838

Mój udział stanowił 10% i polegał na wsparciu merytorycznym w opracowaniu koncepcji doświadczenia, zestawieniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymienione prace były wykorzystane w przewodzie doktorskim mgr inż. Oskara Michała Brożka.

.....

(podpis współautora)