UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI
DZIEDZINA NAUK ROLNICZYCH
DYSCYPLINA TECHNOLOGIA ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIA

mgr inż. Anna Garczewska-Murzyn

Rozprawa doktorska

WPŁYW ZMIAN W UKŁADZIE EMULSYJNYM NA TECHNOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI MLEKA

THE IMPACT OF CHANGES IN THE EMULSION SYSTEM ON THE TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK

Praca wykonana w Katedrze Mleczarstwa i Zarządzania Jakością

Promotor: dr hab. inż. Michał Smoczyński, prof. UWM
Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, rok 2024

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do osiągnięcia przeze mnie tego miejsca, w którym teraz jestem.

Dziękuję każdej osobie, a jest ich wiele, za pomoc, wyrozumiałość, dobre słowo, które otrzymałam przy realizacji niniejszej pracy.

Największe podziękowania należą się mojemu Promotorowi – dr. hab. inż. Michałowi Smoczyńskiemu, prof. UWM za cierpliwość, wsparcie naukowe i merytoryczne, ułatwianie trudnych działań i wskazywanie optymalnych kierunków.

Ponadto dziękuję:

- dr hab. inż. Katarzynie Kiełczewskiej, prof. UWM za wiarę we mnie, wsparcie i wskazywanie drogi w trudnych, naukowych momentach,
- prof. dr hab. inż. Małgorzacie Darewicz – Dziekan Wydziału Nauki o Żywności oraz prof. dr hab. Annie Iwaniak – Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia za wsparcie administracyjne podczas pokonywania kolejnych etapów postępowania doktorskiego,
- Koleżankom i Kolegom, pracującym na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie za wszelkie uwagi, wsparcie oraz motywację,
- śp. prof. dr. hab. inż. Stefanowi Ziajce i śp. prof. dr. hab. Bogusławowi Staniewskiemu za inspirację i zachęcenie do rozpoczęcia pracy naukowej.

Mojemu kochanemu Mężowi – Krzysztofowi, wspaniałym Synom – Maciejowi i Stanisławowi dziękuję za optymizm, niekończące się wsparcie oraz… zastępowanie w obowiązkach domowych w czasie tworzenia niniejszej pracy.

Ogromne podziękowania składam również moim kochanym Rodzicom i Bratu za ukształtowanie, wychowanie, wsparcie i wiarę we mnie, bo bez nich z pewnością nie byłoby mnie tu dzisiaj.

Dziękuję moim wspaniałym Przyjaciołom za wszystko, co od nich otrzymałam.

Dziękuję!

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie 5
Streszczenie 6
Abstract 7
Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską 8
1. Wstęp 11
1.1. Układ emulsyjny mleka 11
1.2. Uzasadnienie wyboru problemu badawczego 19
2. Cel pracy 21
3. Materiał i metody 23
3.1. Organizacja badań 23
3.2. Materiał badawczy 24
3.2.1. Publikacja 2 24
3.2.2. Publikacja 3 24
3.2.3. Publikacja 4 25
3.3. Metody badań 26
3.3.1. Pomiar rozkładu wielkości cząstek 26
3.3.2. Lepkość 26
3.3.3. Stabilność koloidalna 27
3.3.4. Analiza mikroskopowa 27
3.3.5. Separacja faz 27
3.3.6. Analiza koloru 27
3.3.7. Skład chemiczny 28
3.3.8. Kwasowość 28
3.3.9. Synereza 28
3.3.10. Ekstrakcja frakcji lipidowej 28
3.3.11. Zawartość fosfolipidów 29
3.3.12. Profil kwasów tłuszczowych 29
3.3.13. Analiza statystyczna 29
4. Wyniki i dyskusja 31
4.1. Omówienie biofunkcjonalnych właściwości fosfolipidów pochodzących z otoczek kuleczek tłuszczowych mleka (publikacja 1) 31

4.2. Wpływ dodatku maślanki w proszku na stabilność fazy emulsyjnej i koloidalnej mleka homogenizowanego (publikacja 2) 33
4.3. Wpływ HPH łącznej i rozdzielnej na właściwości emulsyjne mleka (publikacja 3) 37
4.4. Wpływ dodatku maślanki i odtłuszczonego mleka w proszku na właściwości jogurtu niskotłuszczowego (publikacja 4) 41
5. Wnioski i stwierdzenia końcowe 45
6. Literatura 47
7. Spis tabel, rysunków i wykresów 58
8. Publikacje wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską i załączniki 60

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie

d_{32}	średnica Sautera
d_{43}	średnica De Brouckere'a
HP	Homogenizacja (ang. *Homogenisation Process*)
HPH	homogenizacja przeprowadzona pod wysokim ciśnieniem (ang. *High Pressure Homogenisation*)
HS	stabilność termiczna (ang. *Heat Stability*)
MBMP	mleko z dodatkiem maślanki w proszku użyte do produkcji jogurtu (ang. *Milk with Buttermilk Powder*)
MFGM	otoczka kuleczek tłuszczowych mleka (ang. *Milk Fat Globule Membrane*)
MSMP	mleko z dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku użyte do produkcji jogurtu (ang. *Milk with Skimmed Milk Powder*)
YBMP	jogurt wyprodukowany z mleka z dodatkiem maślanki w proszku (ang. *Yoghurt with Buttermilk Powder*)
YSMP	jogurt wyprodukowany z mleka z dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku (ang. *Yoghurt with Skimmed Milk Powder*)

Streszczenie

Układ emulsyjny jest istotnym aspektem jakości i stabilności mleka, stąd celem niniejszej pracy było określenie wpływu zmian w układzie emulsyjnym na technologiczne właściwości mleka. Realizację celu pracy rozpoczęto od dokonania przeglądu literatury dotyczącej biofunkcjonalnych właściwościach otoczek kuleczek tłuszczowych, w które bogata jest maślanka. W kolejnych etapach badano: wpływ dodatku maślanki w proszku oraz warunków procesu homogenizacji na stabilność układu emulsyjnego i koloidalnego mleka; wysokociśnieniowej homogenizacji (HPH) łącznej i rozdzielnej na stabilność cieplną (HS) i właściwości układu emulsyjnego mleka oraz możliwości wykorzystania maślanki w produkcji jogurtów niskotłuszczowych.

Stwierdzono wpływ HPH w zakresie temp. 4°C-60°C na zmniejszenie rozmiaru kuleczek tłuszczowych, w tym większym zakresie im wyższą temperaturę zastosowano. Zarówno HS, jak i lepkość mleka zmniejszyły się po homogenizacji, natomiast wzrosły przy dodatku maślanki w zakresie od 0,3%-1,5%.

Stwierdzono także zmniejszenie kuleczek tłuszczowych mleka wraz ze wzrostem temperatury po HPH łącznej, podczas gdy HPH rozdzielna skutkowała ich aglomeracją. Barwa mleka po HPH łącznej była o 1,5-2,0 razy wyższa od barwy mleka po HPH rozdzielnej.

Dodatek maślanki w proszku przy produkcji jogurtu nie wpływał na szybkość ukwaszenia mleka. W jogurcie z dodatkiem maślanki stwierdzono niższą zawartość fosfolipidów i nieco większą ich stratę przy przechowywaniu oraz wyższą zawartość kwasu mlekowego w porównaniu z jogurtem z dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku. Nie stwierdzono różnic pomiędzy jogurtami w zawartości i profilu kwasów tłuszczowych.

Poprzez modyfikację parametrów homogenizacji możliwa jest poprawa właściwości technologicznych wyrobów mlecznych z dodatkiem maślanki, tj. HS i lepkości. Łączna HPH, w większym stopniu niż rozdzielna, stabilizuje fazę emulsyjną mleka. Możliwe jest zastosowanie maślanki jako dodatku do poprawy stabilności układu emulsyjnego mleka oraz jako dodatku przy produkcji jogurtu o nowych cechach funkcjonalnych.

Słowa kluczowe: układ emulsyjny mleka, maślanka w proszku, homogenizacja, kuleczki tłuszczowe mleka, jogurt odtłuszczony

Abstract

The emulsion system is an important aspect of milk quality and stability, hence the purpose of this study was to determine the effect of changes in the emulsion system on the technological properties of milk. In order to achieve the aim of the study, a review of the literature on the biofunctional properties of milk fat globule membranes and buttermilk as its source was performed. In the next stages, the following were examined: the influence of buttermilk powder addition and the conditions of the homogenization process on the stability of the emulsion and colloidal milk system; the impact of full-stream and partial high-pressure homogenization (HPH) on thermal stability (HS) and the properties of the milk emulsion system, and the possibility of using buttermilk in the production of low-fat yogurt.

The effect of HPH in the temperature range of 4°C-60°C on reducing the size of fat globules was found, to a greater extent the higher the temperature used. The viscosity and HS of milk decreased after homogenization and increased after the addition of buttermilk powder in the range of 0.3%-1.5%.

Milk fat globules sizes were found to decrease with increasing temperature after full-stream HPH, while partial HPH resulted in agglomeration. The colour of the milk processed by full-stream HPH was 1.5-2.0 times higher compared to milk subjected to partial HPH treatment.

The addition of buttermilk powder in yogurt production did not affect the rate of milk acidification. Yogurt with the addition of buttermilk powder was characterized by a lower content of phospholipids and a slightly higher loss of phospholipids during storage, as well as a higher content of lactic acid compared to yogurt with skimmed milk powder. There were no differences in the content and profile of fatty acids between the analysed yogurts.

Modification of homogenization parameters may improve the technological properties of dairy products with the addition of buttermilk, i.e. HS and viscosity. Full-stream HPH stabilizes the milk emulsion phase to a greater extent than partial HPH. It is possible to use buttermilk as an additive to improve the stability of the emulsion system of milk and as an additive in the production of yogurt with new functionalities.

Keywords: milk emulsion system, buttermilk powder, homogenization, milk fat globules, skimmed yogurt

Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską

Podstawę niniejszej pracy stanowi cykl powiązanych tematycznie, czterech artykułów naukowych, dotyczących problematyki wpływu modyfikacji układu emulsyjnego mleka na jego właściwości technologiczne. Artykuły zostały opublikowane w czasopismach wymienionych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 18 lutego 2021 r., 21 grudnia 2021 r. oraz z dnia 5 stycznia 2024 r.

1. **Garczewska-Murzyn, A.**, Smoczyński, M. (2021). Biofunctional Properties of Milk Fat Globule Membrane Phospholipids. *Polish Journal of Natural Sciences*, *36* (4), 433-445. https://www.uwm.edu.pl/polish-journal/sites/default/files/issues/articles/6-garczewska-murzyn_smoczynski.pdf.

Punkty $MEiN_{luty2021}$ – **40 pkt.**
Punkty $MEiN_{styczeń2024}$ – **40 pkt.**

Mój udział procentowy w powstaniu **publikacji 1** szacuję na 80%. Praca wniesiona przeze mnie polegała na opracowaniu założeń, przeglądzie dostępnej literatury, przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu, a także na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. **Garczewska-Murzyn, A.**, Kiełczewska, K., Smoczyński, M. (2022). The Influence of Buttermilk Powder on the Stability of Emulsion and Colloidal Phases of Homogenized Milk. *European Food Research and Technology 248*, 2629-2636. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04075-y.

Punkty $MEiN_{grudzień2021}$ – **70 pkt.**
Punkty $MEiN_{styczeń2024}$ – **70 pkt.**
Journal Impact Factor – **3.3**
Liczba cytowań **– 2**

Mój udział procentowy w powstaniu **publikacji 2** szacuję na 65%. Praca wniesiona przeze mnie przy tworzeniu publikacji polegała na opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

3. Kiełczewska, K., Brożek, O., Rudkowska, P., **Garczewska-Murzyn, A.**, Smoczyński, M. (2022). The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. *International Journal of Food Science and Technology, 57*, 7167-7174. https://doi.Org/10.1111/Ijfs.16059.

Punkty $MEiN_{grudzień2021}$ – **70 pkt.**
Punkty $MEiN_{styczeń2024}$ – **70 pkt.**
Journal Impact Factor – **3.3**
Liczba cytowań – **1**

Mój udział procentowy w powstaniu **publikacji 3** szacuję na 40%. Praca wniesiona przeze mnie przy tworzeniu publikacji polegała na opracowaniu metodyki, walidacji oraz na przygotowaniu wersji oryginalnej manuskryptu.

4. **Garczewska-Murzyn, A.**, Smoczyński, M., Kotowska, N., Kiełczewska, K. (2022). Effect of Buttermilk and Skimmed Milk Powder on the Properties of Low-Fat Yoghurt. *Journal of Food Science and Technology 59*, 2160-2167. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05227-w.

Punkty $MEiN_{grudzień2021}$ – **70 pkt.**
Punkty $MEiN_{styczeń2024}$ – **70 pkt.**
Journal Impact Factor – **3.1**
Liczba cytowań – **5**

Mój udział procentowy w powstaniu **publikacji 4** szacuję na 60%. Praca wniesiona przeze mnie przy tworzeniu publikacji polegała na przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na napisaniu i korekcie manuskryptu.

Zbiór wymienionych powyżej publikacji wraz z załącznikami i oświadczeniami kontrybucji współautorów poprzedzają: streszczenie i opis stanowiący syntezę załączonych publikacji. Praca zawiera również uzasadnienie celowości podjętych badań, opis metodyki, uzyskanych wyników oraz dyskusję i wnioski.

Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej są następujące:

Suma punktów $MEiN_{luty/grudzień2021}$ = **250 pkt.**

Suma punktów $MEiN_{2024}$ = **250 pkt.**

Sumaryczny Impact Factor = **9.7**

Baza Web of Science

Liczba cytowań = **8**

Index Hirscha (Index h) = **1**

Baza SCOPUS

Liczba cytowań = **8**

Index Hirscha (Index h) = **2**

1. Wstęp

1.1. Układ emulsyjny mleka

Mleko jest modelowym produktem spożywczym, wciąż inspirującym naukowców do dalszych badań oraz źródłem wiedzy o wzajemnych powiązaniach między jego spożyciem a wpływem na ludzki organizm. Zarówno mleko, jak i jego przetwory są produktami spożywczymi o wysokiej wartości odżywczej i dietetycznej, ze względu na zawarte w nich biologicznie aktywne składniki (Korhonen, 2009). Badanie i zgłębianie wiedzy nad biologicznymi funkcjami składników mleka oraz ich technologiczną przydatnością może przyczynić się do lepszego wykorzystania ich właściwości odżywczych, a także do opracowania żywności biofunkcjonalnej, prozdrowotnej, o wyraźnych walorach terapeutycznych, przeznaczonej do zwalczania określonych chorób lub zaspokajania specyficznych potrzeb konsumentów. Na szczególną uwagę zasługują wyroby mleczne w proszku: mleko w proszku, maślanka w proszku, serwatka w proszku, koncentraty wszystkich białek mleka oraz koncentrat białek serwatkowych, które ze względu na swoje użyteczne właściwości i wartości odżywcze, mogą stanowić ciekawe dodatki do żywności (Silva & O'Mahony, 2017).

Tłuszcz mlekowy jest prawdopodobnie najbardziej złożonym i najmniej poznanym składnikiem mleka. Zawartość lipidów zależy od gatunku i waha się od 3,8% do 3,9% w mleku kobiecym i od 3,0% do 5,0% w mleku krowim (Rodríguez-Alcalá i in., 2017). Występuje on w mleku, w formie kuleczek tłuszczowych o wielkości od 0,2 μm do 15 μm, ze średnią wielkością 4 μm. Lipidy powstają w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego i są wydzielane w postaci zemulgowanej jako kuleczki tłuszczu mlekowego, pokryte trójwarstwą fosfolipidowo-białkową. Ta trójwarstwa, zwana również otoczką kuleczek tłuszczowych mleka (ang. MFGM – *Milk Fat Globule Membrane*), jest bogata w składniki o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych, funkcjonalnych oraz przydatnych technologicznie. MFGM utrzymuje natywne kuleczki tłuszczu mlekowego w formie zemulgowanej i chroni je przed flokulacją czy koalescencją oraz zapobiega utlenianiu i hydrolizie tłuszczu mlekowego, co poprawia stabilność emulsyjną i przydatność technologiczną mleka w przemyśle mleczarskim (Bourlieu & Michalski, 2015; Dewettinck i in., 2008; El-Loly, 2011; Heid & Keenan, 2005; Mather & Keenan, 1998; Singh & Gallier 2017; Smoczyński i in., 2012). Kuleczki tłuszczu mlekowego składają się z apolarnego rdzenia wewnętrznego, w skład którego wchodzą triacyloglicerole i estry cholesterolu, otoczonego trójwarstwą fosfolipidowo-białkową, o grubości od 10 nm do 20 nm. MFGM jest złożoną strukturą,

zbudowaną z różnych komponentów, głównie z białek oraz niepolarnych i polarnych lipidów (takich jak fosfolipidy i cholesterol), a ponadto zawiera cerebrozydy, glikoproteiny, enzymy, neutralne lipidy, karotenoidy, witaminę A, jony metali (żelazo, miedź) oraz inne składniki (Danthine i in., 2000; Deeth, 1997; Huppertz & Kelly, 2006; Jukkola & Rojas, 2017; Singh, 2006). Białka stanowią znaczącą część składową, bo aż 25%-60% natywnej otoczki tłuszczowej (Keenan & Mather, 2006), a według Dewettincka i in. (2008) ich udział w otoczce kuleczki tłuszczowej sięga nawet 70%. Do głównych białek otoczki zaliczyć można: mucynę 1 (skrócone nazwy: MUC 1, PAS 1), dehydrogenazę/oksydazę ksantynową (XDH/XO), mucynę 15 (MUC 15, PAS III), CD 36 (PAS IV), butyrofilinę (BTN), adipofilinę (ADPH, ADRP), laktadherynę (PAS 6/7, MFG-E8) oraz białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABP) (Dewettinck i in., 2008; Smoczyński i in., 2012). Jednym ze składników otoczki kuleczek tłuszczowych mogą być również triacyloglicerole, których zawartość wg literatury może stanowić od 20% do 80% masy otoczki. Jednak należy pamiętać, że większość triacylogliceroli może pochodzić z zanieczyszczenia rdzeniem kuleczek tłuszczowych, podczas izolacji samej otoczki. Dlatego w zależności od użytych metod do izolacji materiału, zauważono duże zróżnicowanie podawanych wartości w literaturze (Walstra, 1985).

Zawartość tłuszczu w mleku krowim zależy od wielu czynników, takich jak zdrowie krowy, jej wiek, uwarunkowania genetyczne oraz metody karmienia i skład pożywienia (Vanderghem i in., 2010). Patrząc pod kątem zarówno żywieniowym, jak i przydatności technologicznej – tłuszcz mlekowy jest uznawany za jeden z najważniejszych składników mleka, posiadający cenne właściwości odżywcze i prozdrowotne (Tokas & Punia, 2019).

Z uwagi na biologiczną aktywność fosfolipidów i białek otoczki oraz ich prozdrowotne oddziaływanie na funkcjonowanie organizmu człowieka, otoczka kuleczek tłuszczowych mleka uważana jest za nutraceutyk (Spitsberg, 2005; Dewettinck i in., 2008).

Zawartość fosfolipidów w otoczce wynosi od 40% do 75% (Deeth, 1997; Singh, 2006), a w mleku stanowi do 1% tłuszczu mleka (Sánchez-Juanes i in., 2009). Większość fosfolipidów jest wytwarzana w komórkach ssaków, w retikulum endoplazmatycznym (Singh, 2006; Smoczyński i in., 2012; Vance, 2018). W skład fosfolipidów mleka wchodzą glicerofosfolipidy i sfingolipidy. Glicerofosfolipidy zbudowane są z glicerolu zestryfikowanego kwasami tłuszczowymi w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz fosforanem z inną grupą organiczną (np. seryną, choliną) w pozycji sn-3. W przypadku sfingolipidów budowa jest zróżnicowana i opiera się na sfingozynie, czyli długołańcuchowej aminie alifatycznej, zawierającej dwie grupy hydroksylowe i jedną grupę aminową. Przyłączenie kwasu tłuszczowego do grupy aminowej powoduje powstanie ceramidu. Jeśli fosfocholina jest przyłączona do ceramidu – powstaje

sfingomielina, podczas gdy przyłączenie grupy sacharydowej prowadzi do powstania sfingoglikolipidu (Dewettinck i in., 2008).

Polarne lipidy występujące w otoczce kuleczki tłuszczowej, pomimo niewielkiej zawartości, odgrywają istotną rolę w odżywianiu i prawidłowym funkcjonowaniu komórek. Dzięki swoim unikalnym właściwościom pełnią liczne funkcje w organizmach żywych. Są głównym elementem budulcowym błon komórkowych (izolują komórkę od środowiska i oddzielają kompartmenty komórkowe). W organizmie człowieka, szczególnie wysokie stężenie fosfolipidów występuje w mózgu, gdzie wraz z długołańcuchowymi wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi omega-3 stanowią podstawowy budulec układu nerwowego. Polarne lipidy i ich pochodne są bioaktywnymi cząsteczkami biorącymi udział w pośrednictwie i rozpoznawaniu sygnałów komórkowych, oddziałują również z innymi składnikami komórki. Równocześnie, wciąż rośnie liczba doniesień udowadniających prozdrowotne właściwości lipidów mleka, a zwłaszcza dokumentujących biologiczną rolę fosfolipidów (Anto i in., 2020; Contarini & Povolo, 2013; Conway i in., 2014; Corredig & Dalgleish, 1997; Dewettinck i in., 2008; El-Loly, 2011; Fontecha i in., 2020; Nicolson & Ash, 2014).

Wiele prac badawczych dotyczy ważnej roli fosfolipidów w rozwoju chorób związanych z wiekiem i starzeniem się (np. choroba Alzheimera) (Hashioka i in., 2004; Spitsberg, 2005). Według literatury, wprowadzenie do diety fosfolipidów pochodzących z mleka ma pozytywne działanie na funkcje mózgu (pamięć), wykazuje działanie przeciwnowotworowe, zmniejsza ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, zapobiega stanom zapalnym, spowalnia starzenie się i przynosi korzystne efekty u pacjentów z chorobą Alzheimera czy Parkinsona, pomaga w leczeniu stłuszczenia wątroby, wspomaga rozwój jelit noworodków oraz pełni rolę gastroprotekcyjną (Conway i in., 2014; Dewettinck i in., 2008; Hashioka i in., 2004; Nicolson & Ash, 2014; Rodríguez-Alcalá i in., 2017). Dodatek fosfolipidów do diety wpływa na poprawę stanu zdrowia, poprzez modyfikację i regenerację składu błon komórkowych i wewnątrzkomórkowych (głównie mitochondrialnych) (Nicolson & Ash, 2014). Uszkodzenia w błonach komórkowych i wewnątrzkomórkowych są typowe przy chorobach przewlekłych (np. w chorobie nowotworowej), związanych z układem nerwowym oraz w procesach starzenia. Stąd udział fosfolipidów pochodzących z mleka w diecie może mieć wiele pozytywnych skutków dla zdrowia człowieka. Mogą być one stosowane jako suplementy wspomagające leczenie w wielu chorobach, bez żadnych toksycznych skutków dla człowieka (Nicolson & Ash, 2014; Schmelz, 2000). Źródła literaturowe wskazują na wiele prozdrowotnych właściwości lipidów polarnych pochodzących z mleka, i biorąc pod uwagę ich

właściwości technologiczne, mogą one być wykorzystane jako funkcjonalny dodatek do wzbogacania produktów mlecznych.

Zawartość lipidów polarnych w mleku surowym waha się na poziomie 9,4-40 mg/100 g mleka (Pimentel i in., 2016; Rombaut & Dewettinck, 2006). Ich zróżnicowana zawartość w różnych produktach mlecznych jest związana z zawartością tłuszczu w produkcie, a dalej z ilością otoczek kuleczek tłuszczowych, dlatego produkty wysokotłuszczowe są bogatsze w fosfolipidy. Największą koncentrację polarnych lipidów znajdziemy w serum masła (660-1250 mg/100 g produktu), jednak przydatność technologiczna tego produktu do otrzymywania lipidów polarnych jest ograniczona. Masło, ze względu na wysoką zawartość tłuszczu, można uznać za najlepsze źródło fosfolipidów, jednak podczas zmaślania otoczka kuleczki tłuszczowej zostaje przerwana i w dużej mierze migruje do fazy wodnej, czyli do maślanki, częściowo ze względu na duże powinowactwo do białek (Ambroziak & Cichosz, 2013; Yeagle, 2014). Maślanka, mimo że jest produktem niskotłuszczowym, ma wysokie stężenie fosfolipidów. Znajdziemy w niej od 4 do 5 razy więcej fosfolipidów niż w innych produktach, biorąc pod uwagę zawartość fosfolipidów w stosunku do suchej masy. Wobec powyższego, maślanka może być bardzo dobrym źródłem fosfolipidów, zwłaszcza po oczyszczeniu i zagęszczeniu, co daje możliwość uzyskania produktu o wysokiej wartości funkcjonalnej i odżywczej (Ambroziak & Cichosz, 2013; Lambert i in., 2016; Rombaut & Dewettinck, 2006). Wynika to z przejścia do maślanki otoczki kuleczek tłuszczowych podczas zmaślania śmietanki, jak również obecności w maślance niewielkiej ilości tłuszczu mlekowego w postaci dużej liczby kuleczek tłuszczowych o małych rozmiarach (Conway i in., 2014; Lambert i in., 2016).

Oprócz prozdrowotnych aspektów, maślanka bogata w otoczki kuleczek tłuszczowych charakteryzuje się funkcjonalnymi właściwościami, dzięki czemu znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, np. w cukiernictwie, piekarnictwie i przy produkcji lodów (Vanderghem i in., 2010). Maślanka w proszku zawiera przede wszystkim naturalny emulgator, jakim jest MFGM, a ponadto białka plazmy mleka, takie jak kazeina i białka serwatkowe. Ta właściwość maślanki jest istotna technologicznie, ponieważ surowce i produkty przetwarzane w przemyśle mleczarskim to niejednorodne oraz wielofazowe układy emulsyjne i koloidalne (Amador-Espejo i in., 2014).

Homogenizacja hamuje zjawisko rozwarstwiania się fazy tłuszczowej z fazą wodną podczas przechowywania płynnych produktów mlecznych, poprzez zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego, zwiększenie ich liczby i powierzchni oraz modyfikację właściwości otoczki kuleczek tłuszczowych (Hayes i in., 2005; Pereda i in., 2007).

Do mechanicznych metod tworzenia stabilnych emulsji należy homogenizacja ciśnieniowa, znajdująca powszechne zastosowanie w przemyśle mleczarskim. Homogenizacja przeprowadzona pod wysokim ciśnieniem, zwana HPH (ang. *High Pressure Homogenization*), jest dodatkowo czynnikiem wpływającym na podwyższenie temperatury i inaktywację mikroflory mleka. Zastosowanie tej technologii może wyeliminować homogenizację lub pasteryzację czy chociaż obniżyć temperaturę pasteryzacji, jednocześnie skutecznie eliminując mikroorganizmy chorobotwórcze (Hayes i in., 2005; Pereda i in., 2007; Pedras i in., 2012; Sandra & Dalgleish, 2005). Homogenizacja HPH prowadzi do dyspersji tłuszczu mlekowego i sprzyja modyfikacji białek w mleku pełnym oraz w mniejszym stopniu w mleku odtłuszczonym, wskutek ich adsorpcji na zwiększonej powierzchni kuleczek tłuszczowych (Pereda i in., 2007; Ye i in., 2008; Zamora i in., 2012). W mleku odtłuszczonym HPH nieznacznie zmniejsza wielkość miceli kazeinowych, w wyniku dysocjacji kazeiny κ, α_{s1} i α_{s2} oraz rozpadu miceli kazeinowych (Sandra & Dalgleish, 2005; Touhami i in., 2022). Proces ten prowadzi również do denaturacji białek serwatki, głównie β-laktoglobuliny i w mniejszym stopniu α-laktoalbuminy (Pereda i in., 2009). Skutkuje to również zmianą właściwości funkcjonalnych białek i wpływa na ich koagulację (Sandra & Dalgleish, 2007).

Homogenizacja sprzyja adsorpcji białek mleka na powiększonej powierzchni kuleczek tłuszczu mlekowego w mleku pełnym (Pereda i in., 2007; Ye i in., 2008). Proces ten wielokrotnie zwiększa powierzchnię kuleczek tłuszczu mlekowego, a powierzchniowo czynne składniki mleka (głównie białka mleka) są adsorbowane na nowo utworzonej granicy faz. Micele i submicele kazeinowe oraz w mniejszym stopniu białka serwatkowe są włączane w strukturę nowej otoczki kuleczki tłuszczowej (Zamora i in., 2012).

Badano wpływ zastosowania HPH na właściwości produktów mlecznych, m.in. mleka spożywczego (Hayes i in., 2005), koncentratów mlecznych (Mercan i in., 2018 a), mleka w proszku (Mercan i in., 2018 b) oraz masła (Sert & Mercan, 2020). Homogenizacja może również modyfikować właściwości odżywcze mleka i przetworów mlecznych. Liczne badania wykazały różnice w trawieniu natywnych i homogenizowanych kuleczek tłuszczu (Berton i in., 2012; Ye i in., 2010). W czasie przeprowadzania procesów technologicznych, takich jak homogenizacja, istotnym jest zachowanie, w jak największym stopniu, natywnej struktury zawartych w mleku składników bioaktywnych, dzięki czemu ich wartość odżywcza nie ulegnie pogorszeniu (Lu i in., 2021; Michalski & Januel 2006; Smoczyński i in., 2012).

Najczęściej stosowaną w przemyśle mleczarskim jest homogenizacja łączna, w czasie której homogenizowane jest mleko o standaryzowanej zawartości tłuszczu. W celu zmniejszenia zmian w budowie natywnych składników nietłuszczowych, stosuje się

homogenizację samej śmietanki, którą później normalizuje się zawartość tłuszczu w mleku odtłuszczonym. Ten proces nazywamy homogenizacją rozdzielną. Homogenizację wysokociśnieniową rozdzielną wyróżnia niższy wpływ na zmiany stabilności koloidalnej mleka, w porównaniu z procesem przeprowadzonym metodą łączną. Dzięki temu, pośredni lub końcowy produkt jest bardziej zbliżony swoimi właściwościami do mleka surowego. Przy zastosowaniu HPH rozdzielnej otrzymujemy produkt z wyższą agregacją kuleczek tłuszczowych oraz większymi rozmiarami kuleczek tłuszczowych mleka, w porównaniu z homogenizacją łączną (Ambroziak i in., 2019). W praktyce, o niestabilności emulsji świadczy występowanie śmietankowania, podczas przechowywania produktu. Kontrola stabilności emulsji przeprowadzana jest w oparciu o podstój tłuszczu, wyrażonego jako objętość śmietanki.

Dodatek składników obniżających napięcie powierzchniowe na granicy faz tłuszczu mlekowego/serum mleka, z jednoczesnym zastosowaniem homogenizacji rozdzielnej, może być jedną z metod ograniczenia zmian fazy koloidalnej. W przypadku modyfikacji fazy koloidalnej mleka pełnego i odtłuszczonego, równowaga mineralna zostaje zakłócona w wyniku dysocjacji koloidalnego fosforanu wapnia i fosforu oraz wzrostu jego zawartości w fazie rozpuszczalnej mleka (Kiełczewska i in., 2008; Zamora i in., 2007). Utrata równowagi między składnikami fazy koloidalnej, tj. białkami i składnikami mineralnymi, prowadzi do zmian przydatności technologicznej mleka. Homogenizacja wysokociśnieniowa modyfikuje właściwości funkcjonalne i technologiczne białek mleka; zwiększa wrażliwość mleka na działanie koagulantów i obniża jego stabilność termiczną (Ambroziak i in., 2019; Kiełczewska i in., 2008). Oprócz tego, zaadsorbowane białka na powierzchni homogenizowanego tłuszczu mlekowego, wpływają na jego właściwości. Takie zjawisko obniża stabilność termiczną mleka homogenizowanego, co jest istotnym parametrem przy prowadzeniu obróbki wysokotemperaturowej, przy produkcji żywności. Obniżenie pH do wartości bliskiej punktu izoelektrycznego kazeiny powoduje szybką koagulację kazeiny wraz z tłuszczem, co jest z kolei ważnym zjawiskiem wykorzystywanym w serowarstwie.

W słodkiej maślance, poddanej obróbce HPH, znajdują się kuleczki tłuszczu mlekowego o mniejszych rozmiarach, niższym zakresie adsorpcji białka oraz wyższym udziale procentowym składników otoczki kuleczki tłuszczowej na powierzchni homogenizowanych kuleczek tłuszczu, niż w mleku (Kiełczewska i in., 2021). Kasinos i in. (2014) wykazali, że dodatek fosfolipidów zapobiegł zwiększeniu wielkości kuleczek tłuszczowych mleka i adsorpcji białek na ich powierzchni po procesie homogenizacji.

Jogurt, jako jeden z produktów, do którego produkcji można wykorzystać maślankę w proszku, jest otrzymywany na drodze fermentacji z użyciem jogurtowych kultur

starterowych, zawierających m.in. *Lactococcus delbruecki* ssp. *bulgaricus i Streptococcus thermophilus* (Horiuchi & Sasaki 2012). Stężenie składników suchej masy jogurtu jest ważnym wyznacznikiem tekstury, składu i reologii produktu końcowego. Jedną z metod zwiększania zawartości suchej masy mleka, przeznaczonego do produkcji jogurtu, jest dodanie mleka w proszku lub białek mleka w proszku, przed jego ukwaszeniem (Jørgensen i in., 2019). Zwiększenie zawartości suchej masy przez dodatek słodkiej maślanki, zapobiega synerezie oraz poprawia strukturę i konsystencję niskotłuszczowego jogurtu (Trachoo & Mistry, 1998). Tłuszcz mlekowy jest bardzo ważnym składnikiem pod względem dyspersji, składu kwasów tłuszczowych, ale jest też nośnikiem kształtującym smak i konsystencję jogurtu. Dlatego poszukuje się zamienników, dodatków, które mogłyby być stosowane w produktach niskotłuszczowych. Dzięki zastosowaniu maślanki można zmodyfikować cechy sensoryczne niskotłuszczowych jogurtów, tak aby przypominały jogurty pełnotłuste (Zhao i in., 2018).

Maślankę w proszku, jako produkt bogaty we fragmenty otoczek kuleczek tłuszczowych, wykorzystano do produkcji jogurtów. Dodatek ten nie zakłócił fermentacji mleka przez bakterie jogurtowe, a nawet przyczynił się do wzrostu zawartości kwasu mlekowego oraz naturalnie zapobiegał synerezie serwatki i wpłynął pozytywnie na zdolność zatrzymania wody, jak i zwiększył adhezyjność skrzepu jogurtowego w czasie przechowywania (Le i in., 2011).

Zbadano również wykorzystanie maślanki w proszku na poprawę stabilności termicznej rekombinowanego mleka. W przypadku mlecznych produktów rekombinowanych, dodatek maślanki oraz śmietanki w proszku podczas procesu intensywnej obróbki cieplnej (sterylizacji), miał duży wpływ na powstrzymanie wzrastającej pod wpływem ciepła lepkości, jak również wpłynął pozytywnie na stabilizację cieplną rekombinowanych wyrobów. Naturalny dodatek śmietanki czy maślanki w proszku do produktów mlecznych rekombinowanych, poddawanych wysokiej obróbce termicznej, pozwala uniknąć dodatku substancji, takich jak lecytyna sojowa, pozytywnie wpływająca na stabilność cieplną (Kasinos i in., 2014).

Zastosowanie dodatku zawierającego lipidy polarne, pochodzące z kuleczek tłuszczowych mleka, skutkuje wzbogaceniem wyrobu o natywne składniki mleka z udowodnionymi właściwościami zdrowotnymi, jak również umożliwia wykorzystanie jego właściwości technologicznych, wysoce pożądanych w technologii mleczarskiej.

Omówione powyżej właściwości składników otoczki kuleczek tłuszczowych mleka, wskazują na możliwość wykorzystania ich w produktach mleczarskich, w celu modyfikacji określonych cech funkcjonalnych. Osiągnięcie pożądanych cech wyrobów mleczarskich, w czasie przeprowadzanych zabiegów technologicznych (np. brak podstoju śmietanki), przy pomocy naturalnie występujących składników mleka, a w tym przypadku składników otoczki

kuleczek tłuszczowych, wpisuje się w trend projektowania wyrobów o prostym składzie, z tzw. „czystą etykietą” i naturalnym pochodzeniem.

1.2. Uzasadnienie wyboru problemu badawczego

Przegląd literatury, dotyczącej biofunkcjonalnych właściwości fosfolipidów, pochodzących z otoczek kuleczek tłuszczowych mleka (**publikacja 1**), wskazuje na duże zainteresowanie badaczy właściwościami prozdrowotnymi i odżywczymi tych składników. W dostępnej literaturze znaleziono jednak stosunkowo nieliczne badania skoncentrowane na charakterystyce właściwości technologicznych ww. składników, które mogłyby pozytywnie wpłynąć na modyfikację układu emulsyjnego i koloidalnego mleka. Zmiany w układzie emulsyjnym mleka są na co dzień wykorzystywane w przemyśle mleczarskim, w celu stabilizacji układu, niedopuszczenia do podstoju śmietanki, tak aby otrzymane wyroby charakteryzowały się wysoką jakością i odpowiadały potrzebom konsumentów. W tym celu wykorzystuje się zabieg homogenizacji oraz dodatek emulgatorów. Trend czystej etykiety oraz funkcjonalności żywności, oczekiwanej przez kupujących, wymaga od przetwórców poszukiwania rozwiązań technologicznych prowadzących do otrzymania produktów o wskazanych właściwościach, z wykorzystaniem naturalnych dodatków – najlepiej natywnych składników mleka.

W celu określenia wpływu zmian w układzie emulsyjnym i koloidalnym na technologiczne właściwości mleka, na wstępie dokonano analizy stanu wiedzy na temat biofunkcjonalnych właściwości otoczek kuleczki tłuszczowej, w które bogata jest maślanka **(publikacja 1)**. Następnie podjęto badania dotyczące realizacji założonego celu pracy. Pierwszy kierunek dotyczył charakterystyki zmian we właściwościach fizykochemicznych mleka, w wyniku modyfikacji jego składu, poprzez dodatek maślanki w proszku oraz warunków przeprowadzenia procesu homogenizacji (**publikacja 2**). Drugim kierunkiem było zastosowanie homogenizacji łącznej i rozdzielnej w celu ograniczenia wpływu homogenizacji na składniki nietłuszczowe mleka (**publikacja 3**). W ramach badań określono również możliwość wykorzystania maślanki i odtłuszczonego mleka w proszku, jako dodatku do standaryzacji zawartości suchej masy mleka, w produkcji jogurtów niskotłuszczowych (**publikacja 4**).

Przegląd literatury wskazuje, że określenie wpływu odpowiednich warunków homogenizacji mleka, w celu stabilizacji układu emulsyjnego i koloidalnego mleka, było przedmiotem wielu analiz. Natomiast nieliczne badania dotyczyły możliwości zastosowania kombinacji odpowiednio dobranych warunków procesu homogenizacji z równoczesnym dodatkiem substancji wpływających na układ emulsyjny mleka. Stąd wykorzystanie dodatku maślanki, bogatej w składniki otoczki kuleczek tłuszczowych, stabilizujące układ emulsyjny, wraz z procesem mechanicznym, jakim jest HPH, może pozytywnie wpłynąć na układ

emulsyjny i koloidalny mleka. Dlatego w przeprowadzonym doświadczeniu (**publikacja 2**) podjęto się kompleksowej analizy właściwości technologicznych homogenizowanego mleka z dodatkiem maślanki w proszku. Weryfikacja wpływu temperatury, ciśnienia oraz rodzaju homogenizacji, z równoczesnym, zmiennym dodatkiem maślanki, może pozwolić na dobranie optymalnych warunków produkcji i zaprojektowanie innowacyjnych, naturalnych, równocześnie funkcjonalnych produktów mleczarskich, o nowych właściwościach sensorycznych i technologicznych. Szczegółowa analiza zmian w mleku, wywołanych przez proces homogenizacji oraz modyfikacja układu emulsyjnego mleka z wykorzystaniem homogenizacji łącznej i rozdzielnej (**publikacja 3)**, wskazuje jak ważne jest, dla otrzymania innowacyjnego produktu, dobranie właściwych warunków procesu homogenizacji (np. zastosowanego ciśnienia, temperatury). Przeprowadzono również badania nad wykorzystaniem maślanki w produkcji jogurtu, równocześnie wzbogacając go w biofunkcjonalne właściwości składników otoczek kuleczek tłuszczowych. W tym celu wykorzystano maślankę w proszku, jako dodatek do standaryzacji zawartości suchej masy mleka, do produkcji jogurtów niskotłuszczowych (**publikacja 4**). Innowacyjność przeprowadzonych badań polegała na szczegółowej analizie otrzymanego produktu pod kątem właściwości przydatnych technologicznie oraz porównaniu otrzymanych wyników ze standardowymi, obecnymi na rynku, jogurtami niskotłuszczowymi z dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku.

Uzyskane wyniki w ww. badaniach uzupełniają wiedzę w zakresie technologii mleka i wyrobów mleczarskich pod kątem modyfikacji układu emulsyjnego i koloidalnego mleka, z zachowaniem wysokiej jakości gotowych wyrobów. Dodatkowym uzasadnieniem przeprowadzonych badań jest bardzo duża złożoność składu produktów mleczarskich, który w czasie przeprowadzanych procesów technologicznych ulega dodatkowej modyfikacji, nie bez wpływu na właściwości gotowych produktów. Trend czystej etykiety i naturalnego pochodzenia składników wyrobów mleczarskich, skłania do badań dotyczących wpływu modyfikacji układu emulsyjnego mleka jako surowca, z wykorzystaniem w tym celu natywnych składników mleka, które oprócz technologicznych, wykazują również udokumentowane właściwości prozdrowotne.

2. Cel pracy

Głównym celem pracy było określenie wpływu zmian w układzie emulsyjnym mleka na jego właściwości technologiczne.

Aby zrealizować główny cel niniejszej pracy, ustanowiono następujące **pośrednie cele**:

1. analiza dostępnej literatury dotyczącej biofunkcjonalnych właściwości fosfolipidów, jako głównych składników otoczek kuleczek tłuszczowych mleka oraz potencjalnych korzyści wynikających z ich obecności w diecie człowieka,
2. określenie możliwości wykorzystania potencjalnych właściwości technologicznych maślanki w proszku, bogatej w składniki otoczek kuleczek tłuszczowych, w celu modyfikacji układu emulsyjnego mleka,
3. określenie wpływu homogenizacji nisko- i wysokociśnieniowej, w połączeniu z dodatkiem maślanki w proszku, na dyspersję kuleczek tłuszczu mlekowego oraz stabilność emulsyjną i koloidalną mleka,
4. porównanie wpływu homogenizacji dwustopniowej, przeprowadzonej metodą łączną i rozdzielną, przy zastosowaniu różnych parametrów temperatury, na stopień dyspersji tłuszczu mlekowego, stabilność emulsji, barwę oraz lepkość,
5. określenie możliwości wykorzystania maślanki, jako dodatku do standaryzacji zawartości suchej masy mleka, w produkcji jogurtów niskotłuszczowych.

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

1. składniki otoczek kuleczek tłuszczowych posiadają biofunkcjonalne, prozdrowotne właściwości, opisane w literaturze i mogą być wykorzystane jako technologiczny dodatek wpływający na właściwości mleka,
2. zastosowane warunki podczas procesu homogenizacji, w istotny sposób wpływają na układ koloidalny i emulsyjny mleka,
3. istnieje możliwość wykorzystania maślanki w proszku w celu modyfikacji lub poprawy właściwości układu emulsyjnego mleka i produktów mleczarskich,
4. zastosowanie odpowiednio dobranej techniki homogenizacji (ciśnienie, temperatura) wraz z dodatkiem maślanki, bogatej w funkcjonalne składniki otoczki kuleczki tłuszczowej, umożliwi otrzymanie produktu o wysokiej jakości, ze stabilnym układem koloidalnym i emulsyjnym,

5. wykorzystanie maślanki w proszku może pozytywnie wpłynąć na charakterystykę otrzymywanych produktów mleczarskich,
6. istnieje możliwość wykorzystania, opisanych w literaturze, prozdrowotnych i technologicznych cech maślanki w proszku, w produkcji innowacyjnych produktów mleczarskich.

3. Materiał i metody

3.1. Organizacja badań

W celu analizy wpływu zmian w układzie emulsyjnym na technologiczne właściwości mleka, prace badawcze rozpoczęto od analizy literatury dotyczącej funkcjonalnych właściwości fosfolipidów, jako składników otoczek kuleczek tłuszczu mlekowego (**publikacja 1**), które w dużej mierze odpowiadają za stabilizację całego układu emulsyjnego. Po zapoznaniu się ze źródłami naukowymi wskazującymi na biofunkcjonalne, prozdrowotne właściwości składników MFGM (**publikacja 1**), w badaniach skupiono się na możliwościach wykorzystania ich potencjalnych właściwości technologicznych (maślanki bogatej w ww. składniki). Obok homogenizacji mogą one pełnić rolę możliwego dodatku wpływającego na układ emulsyjny mleka i wzbogacającego innowacyjne, prozdrowotne wyroby mleczarskie. Część doświadczalną prac badawczych podzielono na kolejne 3 etapy:

Etap 1 – Zbadanie wpływu połączonego efektu homogenizacji oraz dodatku maślanki w proszku, jako czynników wpływających na układ emulsyjny mleka.

Badano wpływ dodatku maślanki w proszku (od 0,3% do 1,5%) na stabilność fazy emulsyjnej i koloidalnej mleka homogenizowanego z zastosowaniem różnych warunków (temperatura, ciśnienie) procesu homogenizacji. W uzyskanych próbkach mleka określono rozkład wielkości kuleczek tłuszczowych mleka, stabilność cieplną oraz lepkość (**publikacja 2**).

Etap 2 – Określenie wpływu homogenizacji łącznej i rozdzielnej na właściwości emulsyjne mleka.

Badaniom poddano próbki mleka o zawartości tłuszczu 3,5%, uzyskane po homogenizacji łącznej i rozdzielnej, i scharakteryzowano wpływ tych procesów na wielkość kuleczek tłuszczowych, proces rozdziału faz i zmiany w kolorze (**publikacja 3**).

Etap 3 – Wykorzystanie maślanki w proszku jako możliwego dodatku do standaryzacji suchej masy mleka przy produkcji jogurtu.

W tym celu wyprodukowano jogurty różniące się użytym dodatkiem produktu w proszku (maślanka i odtłuszczone mleko) do standaryzacji suchej masy mleka. Uzyskane jogurty przebadano pod kątem składu, kwasowości, synerezy, zawartości kwasów tłuszczowych i fosfolipidów (**publikacja 4**).

3.2. Materiał badawczy

3.2.1. Publikacja 2

Badając wpływ dodatku maślanki w proszku na stabilność fazy emulsyjnej i koloidalnej mleka homogenizowanego, wykorzystano mleko krowie i słodką maślankę. Mleko surowe pochodziło ze Stacji Dydaktyczno-Badawczej w Bałdach Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Maślankę słodką w proszku otrzymano jako produkt uboczny, w wyniku wyrobu masła metodą periodyczną, następnie została ona wysuszona jednoetapowo, rozpyłowo w suszarce Büchi Mini B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria). Dodatek maślanki w proszku do mleka, o standaryzowanej zawartości tłuszczu 3,5%; wynosił od 0,3% do 1,5% (w/v) i był dodawany w odstępach 0,3% (w/v). Mleko o objętości 800 ml bez dodatku oraz z dodatkiem maślanki w proszku w ww. ilościach, zostało poddane procesowi konwencjonalnej homogenizacji pod ciśnieniem 20 MPa i w temperaturze 60°C oraz wysokociśnieniowej homogenizacji (HPH) pod ciśnieniem 100 MPa i kolejno w temperaturach: 4°C, 20°C, 40°C i 60°C, w homogenizatorze PandaPlus 2000 (Gea Niro Soavi, Parma, Włochy).

Próbkę kontrolną stanowiło mleko niehomogenizowane o zawartości tłuszczu 3,5%, bez dodatku maślanki. Przeprowadzono 4 niezależne doświadczenia z wykorzystaniem czterech partii mleka surowego. Wszystkie procesy technologiczne przeprowadzono na Hali Technologicznej im. prof. Stefana Poznańskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

3.2.2. Publikacja 3

Mleko wykorzystane do przeprowadzenia badań nad określeniem wpływu HPH łącznej i rozdzielnej na właściwości emulsyjne mleka, pochodziło ze Stacji Dydaktyczno-Badawczej w Bałdach Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zostało ono zakonserwowane dodatkiem azydku sodu. Standaryzowano je do 3,5%; a śmietankę do 20% zawartości tłuszczu, po odwirowaniu w temperaturze 45°C, w wirówce ciągłej (Tetra Pak – Obram, Tomaszkowo, Polska). Mleko oraz śmietankę poddano dwustopniowej HPH w homogenizatorze Panda 2000 (GEA Niro Soavi, Parma, Włochy). W procesie wysokociśnieniowej homogenizacji rozdzielnej, śmietankę (zaw. 20% tłuszczu) użytą do standaryzacji mleka odtłuszczonego, homogenizowano pod ciśnieniem 100 MPa/20 MPa. Przy wykorzystaniu wysokociśnieniowej homogenizacji łącznej, mleko o zawartości tłuszczu 3,5% homogenizowano pod ciśnieniem 100 MPa/20 MPa. Dodatkowo zastosowano różne temperatury procesu (**publikacja 2**, fig. 1). Próbkę kontrolną stanowiło mleko niehomogenizowane o zawartości tłuszczu 3,5%. Badane

próbki mleka przechowywano w temperaturze 4°C ± 1°C, a przed analizą doprowadzano je do temperatury pokojowej.

Wszystkie procesy technologiczne odbyły się na Hali Technologicznej im. prof. Stefana Poznańskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

3.2.3. Publikacja 4

Do przeprowadzenia doświadczenia nad wpływem dodatku maślanki i odtłuszczonego mleka w proszku do mleka, na właściwości jogurtu niskotłuszczowego, wykorzystano mleko surowe, pozyskane zimą z gospodarstw województwa warmińsko-mazurskiego, a także słodką maślankę w proszku i odtłuszczone mleko w proszku, wyprodukowane w zakładzie przemysłowym. Mleko surowe było standaryzowane pod kątem zawartości tłuszczu poprzez odwirowanie w temperaturze 45°C w wirówce (Gea Westfalia Separator System GmbH, Oelde, Niemcy). Zawartość suchej masy w mleku, na poziomie 13%, otrzymano przy użyciu maślanki w proszku (BMP) i odtłuszczonego mleka w proszku (SMP), natomiast zawartość tłuszczu standaryzowano do 1,5% dodatkiem śmietanki o zawartości 30% tłuszczu. Próbki mleka poddano następnie dwuetapowemu procesowi homogenizacji w temperaturze 65ºC i ciśnieniu p1 = 15 MPa oraz p2 = 3 MPa, przy użyciu homogenizatora PandaPlus 2000 (Gea Niro Soavi, Włochy) oraz pasteryzacji w temperaturze 95°C przez 60 s, przy użyciu urządzenia Thermomix TM 31 (Vorwerk, Wuppertal, Niemcy). Do mleka, po uprzednim schłodzeniu do temperatury 45°C, dodano liofilizowaną kulturę starterową YC-X11 Yo-flex (Chr. Hansen, Hoersholm, Dania), zawierająca szczepy *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*. Próbki po wymieszaniu umieszczono w plastikowych kubkach i inkubowano w temperaturze 45°C, do osiągnięcia pH 4,6-4,7. Otrzymane jogurty schłodzono do temperatury 4°C i poddano analizom po 1 dniu, 7 i 21 dniach przechowywania.

3.3. Metody badań

3.3.1. Pomiar rozkładu wielkości cząstek

Do analizy wielkości kuleczek tłuszczowych mleka wykorzystano metodę dyfrakcji laserowej, przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 3000, wyposażonego w He-Ne laser (632,8 nm), z przystawką dyspergującą Hydro EV (Malvern Instrument, Malvern, Wielka Brytania). Współczynniki załamania światła wynosiły 1,46 – dla mleka i 1,33 – dla wody dejonizowanej, jako środka dyspergującego. Pomiarów dokonywano przy obskuracji w zakresie 10% do 12% (**publikacja 2 i 3**). Badano próbki mleka o zawartości tłuszczu 3,5%; bez i z odczynnikami dysocjującymi kazeinę, usuwającymi zaabsorbowane substancje z powierzchni kuleczek tłuszczu i zapobiegającymi agregacji kuleczek tłuszczu mlekowego (**publikacja 3**). Wielkość kuleczek tłuszczu mierzono, dodając 1 jednostkę 0,4 M cytrynianu trisodu, zawierającego 4% SDS (dodecylosiarczan sodu), na 3 jednostki mleka (**publikacja 3**). Następnie wyznaczono parametry:

$d_{32} = \Sigma d_i^3 n_i / \Sigma d_i^2 n_i$ (**publikacja 3**)

$d_{43} = \Sigma d_i^4 n_i / \Sigma d_i^3 n_i$ (**publikacja 2 i 3**)

gdzie:

d_{32} – średnica Sautera,

d_{43} – średnica De Brouckere'a,

n_i – liczba cząstek o średnicy d_i,

d_i – średnica kuleczek tłuszczowych.

Zmierzono również SSA – powierzchnię właściwą (ang. *Specific Surface Area*) kuleczek tłuszczowych (**publikacja 2**) (Huppertz i in., 2003).

3.3.2. Lepkość

Pomiar lepkości przeprowadzono w temperaturze 20°C, przy użyciu reometru rotacyjnego (Rheolab QC, Anton Paar Gmbh, Graz, Austria), z zastosowaniem układu cylindrów koncentrycznych DG42/SS i szybkości ścinania w zakresie 1-100 s^{-1}.

Wykreślono krzywe płynięcia i wyznaczono liniową zależność zmian naprężenia ścinającego w funkcji szybkości ścinania, przy współczynniku determinacji $R^2 > 0,99$. Lepkość wyrażono za pomocą współczynników kierunkowych, które są również tangensem kąta pomiędzy funkcją liniową a osią x (**publikacja 2**) (Zander i in., 2011).

3.3.3. Stabilność koloidalna

Ocenę stabilności cieplnej (HS) mleka określono na podstawie czasu cieplnej koagulacji w temperaturze 140°C, w łaźni olejowej – za pomocą subiektywnego testu oceny stabilności cieplnej mleka – test White`a i Davies'a (TewesBis, Barczewo, Poland) (**publikacja 2**) (Dumpler i in., 2020).

3.3.4. Analiza mikroskopowa

Mleko barwiono 1,0% (w/v) Nile Blue i 1,0% (w/v) Fast Green (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Próbki mleka analizowano pod mikroskopem konfokalnym Nikon Eclipse Ti-E, z oprogramowaniem kontrolnym C1 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Holandia), przy powiększeniu 100 x (**publikacja 3**) (Ye i in., 2010).

3.3.5. Separacja faz

Próbki mleka umieszczono w cylindrach miarowych o pojemności 100 ml i przechowywano w lodówce przez 192 h. Objętość warstwy górnej i dolnej mierzono co 24 godziny (Huppertz i in., 2003). Po dokładnym wymieszaniu górnej i dolnej warstwy oznaczono zawartość tłuszczu. Zawartość tłuszczu, oddzielnie w warstwie górnej i dolnej, oznaczano odpowiednio po 120 h i 192 h. W przypadku braku obserwacji wyraźnie oddzielonej warstwy śmietanki, do analizy pobierano warstwę górną, która stanowiła 10% oraz dolną, jako 90% całkowitej objętości mleka. Zawartość tłuszczu w mleku i śmietance oznaczano butyrometrem, zgodnie z normą ISO 19662:2018|IDF 238:2018 (2018) i ISO 19660:2018|IDF 237:2018 (2018) (**publikacja 3**).

3.3.6. Analiza koloru

Barwę, wymieszanych przed pomiarem próbek, analizowano bezpośrednio po homogenizacji. Analizę barwy przeprowadzono w przestrzeni CIELAB, a barwę wyrażono trzema wartościami: L* – jasność od czerni (0) do bieli (100); a* – od zielonego (–) do czerwonego (+); b* – od niebieskiego (–) do żółtego (+). Parametry barwy L*, a*, b* mierzono za pomocą miernika Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Americas, Inc., Nowy Jork, USA).

Otrzymane wyniki wykorzystano do obliczenia nasycenia C* ze wzoru:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$$

Całkowitą różnicę barwy pomiędzy mlekiem niehomogenizowanym i homogenizowanym określono za pomocą wzoru:

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0,5}$$

Pomiary wykonano zgodnie z instrukcją urządzenia (**publikacja 3**) (Dobrzańska & Cais-Sokolińska, 2014).

3.3.7. Skład chemiczny

Zawartość suchej masy ogółem (s.m.) oznaczono zgodnie z wytycznymi AOAC (AOAC International, 2007; metoda 990.20; 33.2.44). Zawartość tłuszczu oznaczono metodą Gerbera zgodnie z normą IDF 238 (ISO 19662:2018|IDF 238:2018, 2018) (**publikacja 4**).

3.3.8. Kwasowość

Wartość pH mierzono za pomocą pehametru Testo 205 (Testo, Titisee-Neustadt, Niemcy). Mleko (100 ml) miareczkowano 0,25M NaOH, przy pomocy fenoloftaleiny jako wskaźnika. Wyniki wyrażono w stopniach Soxhleta-Henkla [SH]. Zawartość kwasu mlekowego oznaczono zgodnie z wytycznymi AOAC (AOAC International, 2007; metoda 947.05; 33.2.06) (**publikacja 4**).

3.3.9. Synereza

Synerezę mierzono za pomocą testu wirówkowego (Amatayakul i in., 2006). Próbkę jogurtu mieszano cienką szpatułką 20 razy w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara i następnie 20 razy w przeciwnym. Około 20 g jogurtu przeniesiono do polipropylenowych probówek wirówkowych i pozostawiono w celu ustabilizowania się w temperaturze 4°C na 2 godziny. Następnie próbki wirowano w Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher, Waltham, USA), przy 3000 obr./min i 10°C przez 15 minut. Po odwirowaniu zważono oddzieloną serwatkę. Synerezę wyrażono jako procent oddzielonej serwatki, w stosunku do masy odwirowanej próbki (**publikacja 4**).

3.3.10. Ekstrakcja frakcji lipidowej

Tłuszcz z jogurtu wyekstrahowano metodą opisaną przez Harę i Radina (1978). Do ekstrakcji tłuszczu zastosowano mieszaninę 3 : 2 heksanu i izopropanolu. Do próbek, w kolbach stożkowych ze szlifowanego szkła, dodawano mieszaninę rozpuszczalników w ilości 18 ml na 1 g badanego materiału. Po energicznym mieszaniu próbek przez 60 s dodano wodny

roztwór siarczanu sodu (1 g soli rozpuszczonej w 15 cm^3 wody) i zmieszano w stosunku 12 : 1. Po dokładnym rozdzieleniu faz, górną warstwę zebrano do zlewek szklanych i rozpuszczalnik odparowano w temperaturze 30°C, w inkubatorze Binder BF 53 (Binder, Tuttlingen, Niemcy) (**publikacja 4**).

3.3.11. Zawartość fosfolipidów

Zawartość fosfolipidów oznaczono metodą kolorymetryczną, wg metody opisanej przez Stewarta (1980). Wyekstrahowany tłuszcz odważono do polipropylenowej probówki wirówkowej i rozpuszczono w 2 ml chloroformu. Następnie do probówki dodano 1 ml odczynnika tiocyjanianowego (27 g chlorku żelaza i 30 g tiocyjanianu amonu w 1 l wody destylowanej). Mieszaninę odwirowano przez 7 min w Heraeusie Megafuge 16 (Thermo Fisher, Waltham, USA), przy 1500 obr./min. Po usunięciu górnej, czerwonej warstwy, zmierzono absorbancję dolnej warstwy przy 488 nm, za pomocą spektrofotometru Helios Beta (Spectronic Unicam, Wielka Brytania). Zawartość fosfolipidów w 1 mg tłuszczu określono na podstawie krzywej korelacji absorbancji ze stężeniem fosfolipidów. Do wykreślenia krzywej standardowej wykorzystano standardowe roztwory fosfolipidów (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Niemcy) (**publikacja 4**).

3.3.12. Profil kwasów tłuszczowych

Ekstrakty tłuszczowe metylowano zgodnie z normą ISO 15884:2002|IDF 182:2002 (2002). Profil kwasów tłuszczowych oznaczono metodą chromatografii gazowej, przy użyciu detektora płomieniowo-jonizacyjnego (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Badanie wykonano w odpowiednich warunkach: kolumna kapilarna CP-Sil 88 (100 m; 0,25 mm; 0,20 mb) (Agilent Technologies J&W), gradient temperatury – 60ºC (1 min) do 180ºC, przy Dt = 5ºC/min; temperatury wtryskiwacza i detektora odpowiednio – 225ºC i 250ºC; gaz nośny – hel, natężenie przepływu gazu nośnego – 0,8 ml/min; podział – 1 : 100, objętość próbki – 1 l i wkładka – 0,4 mm. Materiałem odniesienia był bezwodny tłuszcz mlekowy BCR-164 (LGC Standards, Polska) (**publikacja 4**).

3.3.13. Analiza statystyczna

Wpływ homogenizacji (HP), dodatku maślanki (BM) oraz interakcji między homogenizacją a dodatkiem maślanki (HP x BM) na analizowane parametry mleka, określono metodą dwuczynnikowej ANOVA, na poziomie istotności p = 0,05. Wartości porównano testem t: z dwiema próbkami zakładającymi równe wariancje, z poprawką Bonferroniego

p/n = 0,0033, gdzie poziom istotności był na poziomie p = 0,05; a liczba testów n = 15. Obliczeń statystycznych dokonano w programie Microsoft Excel (Microsoft Office 365) (**publikacja 2**).

Aby określić istotność wpływu HPH łącznej i rozdzielnej na właściwości emulsyjne mleka, wyniki analizowano jednoczynnikową ANOVA, a istotność różnic pomiędzy średnimi określono w teście Duncana, przy p = 0,05. Dane analizowano w programie StatSoft Inc. Statistica v. 13.1 (Tulsa, Oklahoma, USA) (**publikacja 3**).

Przy badaniu wpływu dodatku maślanki i odtłuszczonego mleka w proszku na właściwości jogurtu niskotłuszczowego, uzyskane wyniki poddano dwuczynnikowej analizie wariancji z powtórzeniami. Różnice pomiędzy procesami porównano na poziomie istotności p = 0,05; stosując test post-hoc Tukeya. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. Dane analizowano w programie Microsoft Excel (Microsoft Office 365) (**publikacja 4**).

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Omówienie biofunkcjonalnych właściwości fosfolipidów pochodzących z otoczek kuleczek tłuszczowych mleka (publikacja 1)

Dokonano przeglądu literaturowego dotyczącego lipidów polarnych, pochodzących z otoczek kuleczek tłuszczowych mleka, pod kątem ich właściwości biofunkcjonalnych. W pracy przeglądowej omówiono lipidowe składniki mleka, ich zawartość w mleku oraz sposób powstawania. W tabeli 1 (**publikacja 1**, table 1) zaprezentowano udział procentowy poszczególnych grup lipidowych, występujących jako składniki MFGM. Następnie scharakteryzowano klasyfikację fosfolipidów. Kolejno omówiono fosfatydylocholinę, fosfatydyloetanoloaminę, sfingomielinę, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloserynę oraz inne fosfolipidy, tj. lizofosfatydylocholinę, laktocerebrozyd i glukocerebrozyd. Przedstawiono ich budowę chemiczną, występowanie i miejsce powstawania. Szczegółowo zaprezentowano ich oddziaływanie w organizmie, jak i funkcje jakie pełnią w otoczce kuleczki tłuszczowej mleka.

Ważnym aspektem, który został omówiony w artykule przeglądowym, były odżywcze wartości polarnych lipidów mleka. Przedstawiono wiele doniesień naukowych wskazujących na bezpośredni związek pomiędzy spożyciem składników MFGM, w tym lipidów polarnych, a profilaktyką i leczeniem chorób. Zaznaczono, że suplementacja diety składnikami otoczki kuleczek tłuszczowych mleka, przede wszystkim fosfolipidami, może mieć szereg pozytywnych skutków i została z powodzeniem stosowana w leczeniu wielu chorób przewlekłych, bez żadnych toksycznych skutków dla człowieka.

Podkreślono rolę mleka i jego przetworów, jako cennego źródła bioaktywnych lipidów pochodzących z otoczki kuleczek tłuszczowych. W tabeli 2 (**publikacja 1**, table 2) przedstawiono zawartość polarnych lipidów w poszczególnych produktach mleczarskich. Maślanka, zaraz po serum masła, zawiera najwięcej lipidów polarnych, w przeliczeniu na zawartość tłuszczu, co czyni ją bardzo dobrym źródłem tych składników z możliwością wykorzystania w przemyśle mleczarskim.

Treść artykułu przeglądowego, omawiająca biofunkcjonalne właściwości fosfolipidów pochodzących z otoczek kuleczek tłuszczowych mleka, wskazała, że pojawia się coraz więcej badań dokumentujących korzyści zdrowotne, wynikające ze spożycia lipidów pochodzących z mleka. Fakt, że korzystne oddziaływanie lipidów polarnych na organizm człowieka, pojawia się już przy niewielkich ilościach, wskazuje na mleko jako ich potencjalne źródło. Prozdrowotne, biofunkcjonalne właściwości fosfolipidów mogą pomóc w zapobieganiu

i łagodzeniu wielu chorób, m.in. związanych z wiekiem i starzeniem się. Mogą okazać się przydatne w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych.

4.2. Wpływ dodatku maślanki w proszku na stabilność fazy emulsyjnej i koloidalnej mleka homogenizowanego (publikacja 2)

Przeprowadzone badania oraz uzyskane wyniki przedstawiają wpływ zastosowanego procesu homogenizacji, w różnych temperaturach i przy zmiennym dodatku maślanki w proszku, na wielkość kuleczek tłuszczowych, stabilność termiczną i lepkość homogenizowanego mleka. Doświadczenie miało na celu zbadanie wpływu ww. parametrów produkcyjnych wraz z określonym dodatkiem maślanki w proszku, na istotne technologicznie właściwości fazy emulsyjnej i koloidalnej mleka homogenizowanego.

Mleko surowe charakteryzowało się następującym składem: zawartość suchej substancji – 12,82% ± 0,10; tłuszczu – 3,81% ± 0,20; białka – 3,54% ± 0,01; kazeiny – 2,84% ± 0,1; gęstością – 1,029 g/cm^3 ± 0,002 i pH – 6,72 ± 0,04. Maślanka w proszku zawierała 7,67% tłuszczu; 34,41% białka; 8,24% popiołu i 4,05% wody.

Zbadano i przeanalizowano zmiany rozkładu wielkości cząstek w próbkach mleka z dodatkiem maślanki w proszku oraz w próbce kontrolnej bez dodatku. Próbki poddano procesowi homogenizacji konwencjonalnej i wysokociśnieniowej w różnych temperaturach.

Na rysunku 2 (**publikacja 2,** fig. 2) przedstawiono rozkład wielkości cząstek mleka niehomogenizowanego, charakteryzujący się obecnością dwóch pików. Były one również obecne w rozkładzie wielkości cząstek mleka konwencjonalnie homogenizowanego i mleka poddanego HPH w temperaturze 4°C. Podniesienie temperatury do 20°C spowodowało pojawienie się dodatkowego piku, w zakresie mniejszych rozmiarów cząstek (**publikacja 2**, fig. 2).

Obliczenia, na podstawie zastosowanej dwuczynnikowej analizy ANOVA, wykazały, że dodatek maślanki w proszku i zastosowane parametry homogenizacji oraz interakcja między tymi czynnikami, w istotny sposób wpływają na zmniejszenie średniej średnicy d_{43} (średnica De Brouckere'a) kuleczek tłuszczu mlekowego w mleku, o zawartości tłuszczu 3,5% ($p = 0,05$). Nie jest to jednak zależność liniowa (**publikacja 2**, table 1).

Konwencjonalna homogenizacja i HPH w temperaturze ≥ 40°C spowodowały zmniejszenie wartości d_{43} w mleku bez dodatku maślanki, natomiast w mleku poddanym HPH w temperaturze ≤ 20°C, nie zaobserwowano zmian wartości d_{43}. Gdy temperatura obróbki przekraczała 40°C, wartości d_{43} nie ulegały zmianie i nie różniły się statystycznie od wartości d_{43} w mleku poddanym konwencjonalnej homogenizacji. W zależności od parametrów procesu, zmiany wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego przebiegały w podobnym kierunku zarówno w mleku z dodatkiem, jak i bez dodatku maślanki. W mleku z zastosowanym procesem HPH, z dodatkiem 0,3%-1,2% maślanki w proszku, wielkość kuleczek tłuszczu zmniejszyła się już w temperaturze $\geq$ 20°C, natomiast wartość d_{43} w mleku z zastosowanym procesem HPH

w temperaturze 40°C, zmniejszyła się dopiero przy 1,5% dodatku maślanki. W mleku z dodatkiem 0,3%-1,5% maślanki wartości d_{43} zmniejszyły się po obróbce HPH w temperaturze ≥ 40°C i po konwencjonalnej homogenizacji (**publikacja 2**, table 1).

Dodatek maślanki w proszku nie spowodował istotnych zmian wartości d_{43} w mleku niehomogenizowanym. W mleku poddanym obróbce HPH w temperaturze 20°C i 40°C, wielkość kuleczek tłuszczu mlekowego zmniejszyła się po dodaniu 0,3% maślanki, jednak nie zaobserwowano istotnych zmian tego parametru, niezależnie od ilości dodanej maślanki. W mleku poddanym HPH w temperaturze 60°C średnica kuleczek tłuszczu zmniejszała się wraz ze wzrostem dodatku maślanki do 0,6%, po czym nie stwierdzono zmian tego parametru. W mleku zawierającym maślankę i poddanym konwencjonalnej homogenizacji, wielkość kuleczek tłuszczowych różniła się jedynie w próbkach z dodatkiem maślanki w ilości 0,3% i 0,6% (**publikacja 2**, table 1).

Inni autorzy w swoich badaniach także wykazali, że proces homogenizacji zmniejszył średnicę kuleczek tłuszczu mlekowego (Hayes i in., 2005; Pereda i in., 2007). Zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego wraz ze wzrostem dodatku MFGM zaobserwowali także Kanno i Kim (Kanno & Kim, 1990), którzy analizowali właściwości emulgujące izolatów MFGM oraz właściwości fizykochemiczne emulsji tłuszczu mlekowego, stabilizowane izolatami MFGM. Kiedy do mleka, poddanego obróbce HPH, dodawano maślankę bogatą we fragmenty MFGM, ulegały one adsorpcji na kuleczkach tłuszczu mlekowego, co zwiększało powierzchnię powstałych, małych kuleczek tłuszczu (El-Loly, 2011). W przedstawionym badaniu homogenizacja konwencjonalna, z zastosowanym ciśnieniem 20 MPa, spowodowała zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego, a dodatek maślanki miał niewielki wpływ na ten parametr. Zastosowanie konwencjonalnej homogenizacji prowadziło do powstawania zmniejszonej wielkości, natomiast dalsze zwiększenie ilości dodatku maślanki nie miało wpływu na wielkość kuleczek tłuszczu.

Zastosowana homogenizacja zmniejszała średnicę kuleczek tłuszczu mlekowego i wpływała na emulgację tłuszczu. W mleku o tej samej zawartości tłuszczu, zmniejszenie średnicy kuleczek tłuszczu, poprzez zastosowanie homogenizacji, wiązało się z zwiększeniem całkowitej powierzchni kuleczek. Do mleka przed homogenizacją była dodawana maślanka w proszku, bogata we fragmenty MFGM, które stabilizowały kuleczki tłuszczu i zapobiegały ich aglomeracji. Fosfolipidy, pochodzące z MFGM, są składnikami powierzchniowo czynnymi i ustawiają się, z jednej strony w kierunku polarnych cząsteczek wody, a drugą stroną do niepolarnych cząsteczek tłuszczu. W mleku homogenizowanym fosfolipidy pochodzące

z MFGM pokrywają małe kuleczki tłuszczu i zapobiegają ich agregacji w większe jednostki (El-Loly, 2011).

Stabilność cieplna (HS) oznacza stabilność białek mleka poddanych działaniu wysokiej temperatury, przy zachowaniu właściwości koloidalnych mleka. Niska wartość HS może doprowadzić do sedymentacji lub żelowania białek mleka podczas obróbki w wysokiej temperaturze. Na HS próbek mleka istotny wpływ miały parametry homogenizacji i dodatek maślanki. Z kolei nie zaobserwowano wpływu interakcji pomiędzy zastosowanymi procesami na HS badanego mleka. Brak wpływu, przy zastosowaniu obydwóch procesów równocześnie, można tłumaczyć różnym wpływem samej homogenizacji na HS, jak i dodatku maślanki. W mleku bez dodatku maślanki, poddanemu procesowi HPH w temperaturze 4°C, zaobserwowano obniżenie wartości HS, natomiast przy zastosowaniu pozostałych wariantów homogenizacji – nie zauważono istotnych zmian w stabilności cieplnej. Wartość HS mleka, z dodatkiem 0,3%-1,5% maślanki, nie uległa zmianie w wyniku homogenizacji, niezależnie od zastosowanych parametrów obróbki, ponieważ już sam dodatek maślanki istotnie zwiększał HS mleka w każdym analizowanym wariancie. Im niższa temperatura homogenizacji, tym zaobserwowano większy wzrost HS mleka, przy najniższym dodatku maślanki. Stabilność cieplna mleka poddanego obróbce HPH, w temperaturze 4°C i 20°C, wzrosła po dodaniu maślanki, w ilościach odpowiednio ≥ 0,9% i ≥ 0,6%. W mleku poddanym HPH w temperaturze 40°C i 60°C, HS wzrosła dopiero po dodaniu maślanki w ilościach odpowiednio ≥ 1,2% i 1,5%. W mleku poddanym konwencjonalnej homogenizacji HS wzrosła, gdy zastosowano dodatek maślanki w ilości ≥ 1,2%. W mleku niehomogenizowanym, dodatek maślanki w ilości 0,3%-1,5% nie powodował istotnych zmian w HS (**publikacja 2**, table 2).

Według innych źródeł naukowych zastosowanie HPH powodowało zmniejszenie stabilności etanolowej (Amador-Espejo i in., 2014) i HS mleka (Ambroziak i in., 2019; Kiełczewska i in., 2008). Na obniżenie odporności mleka homogenizowanego na czynniki koagulujące wpływają następujące czynniki: zaburzenie równowagi dynamicznej białek, w wyniku oddzielenia od kazeiny micelarnej wybranych frakcji kazeiny, w szczególności κ-kazeiny, która chroni micele kazeiny (Sandra & Dalgleish, 2005); denaturacja białek serwatkowych (Pereda, 2009); adsorpcja składników plazmy mleka na powierzchni kuleczek tłuszczowych (Zamora i in., 2012) oraz zaburzenie równowagi mineralnej, w wyniku dysocjacji koloidalnego fosforanu wapnia i jego przejścia do fazy rozpuszczalnej mleka (Kiełczewska i in., 2008; Zamora i in., 2007).

Według Singha i Tokleya (1990), którzy analizowali wpływ 10% (v/v) dodatku świeżej śmietanki na HS rekombinowanego odtłuszczonego mleka w proszku, składniki

powierzchniowo czynne maślanki, tj. fosfolipidy i lipoproteiny, wypierają białka odtłuszczonego mleka z MFGM podczas homogenizacji, co podwyższa wartość HS mleka. Badania Ellinga i Duncana (1996) wykazały, że to m.in. wartość zastosowanego ciśnienia homogenizacji decyduje o ilości fosfolipidów włączonych do odzyskanej MFGM. Kasinos i in. (2014) oraz Vanderghem i in. (2010) wskazali także, że do wzrostu stabilności koloidalnej białek mleka przyczyniają się maślanka słodka i fragmenty MFGM, podczas ekspozycji na wysoką temperaturę.

Obróbka termiczna indukuje zmiany w białkach MFGM, w tym denaturację i interakcje z białkami mleka. W mleku pełnotłustym, zarówno β-laktoglobulina (β-Lg), jak i α-laktoalbumina (α-La), podczas ogrzewania wiążą się z kuleczkami tłuszczu. Białka serwatkowe mogą wiązać się z MFGM poprzez reakcje wymiany sulfhydrylowo-disiarczkowej. Procesowi temu sprzyja rozpad MFGM podczas ogrzewania, dzięki czemu tworzy się przestrzeń dla białek serwatkowych (zdenaturowanych lub nie, na tym etapie) na nowo odsłoniętej powierzchni kuleczek tłuszczowych (Ye i in, 2004). Homogenizacja wpływa na zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego i mniejszy, w porównaniu z mlekiem, jest też ładunek białka w fazie emulsyjnej słodkiej maślanki (Kiełczewska i in., 2021). Takie zmiany, zaobserwowane w MFGM, mają prawdopodobnie istotny wpływ na właściwości funkcjonalne produktów mlecznych, np. na czas krzepnięcia przy udziale podpuszczki czy stabilność termiczną. Zwiększony dodatek maślanki w proszku, jako produktu bogatego we fragmenty MFGM, neutralizuje opisane zmiany w składnikach MFGM, co wpływa na poprawę HS mleka.

Wyniki testu ANOVA wykazały, że interakcje pomiędzy parametrami homogenizacji a dodatkiem maślanki nie mają istotnego wpływu na lepkość mleka. Jednocześnie zauważono wpływ zastosowanych parametrów homogenizacji oraz ilości dodanej maślanki na lepkość mleka. Homogenizacja nie miała wpływu na lepkość próbek mleka, z wyjątkiem obróbki HPH w temperaturze 40°C, która zwiększała lepkość mleka bez dodatku maślanki i mleka z dodatkiem 0,6% maślanki (**publikacja 2**, table 3).

Według literatury – faza emulsyjna i koloidalna mleka homogenizowanego jest stabilizowana przez dodatek maślanki, ponieważ maślanka (uzyskiwana podczas zmaślania) zawiera składniki MFGM bogate w fosfolipidy, które są cząsteczkami amfifilowymi, stabilizującymi kuleczki tłuszczu w pełnotłustym mleku, natomiast fragmenty MFGM uznawane są za bardzo skuteczne i naturalne emulgatory (Dewettinck i in., 2008).

4.3. Wpływ HPH łącznej i rozdzielnej na właściwości emulsyjne mleka (publikacja 3)

Dzięki analizie zastosowanych parametrów HPH zauważono wpływ początkowej temperatury na dalszy zakres i kierunek zmian temperatury mleka (**publikacja 3**, table 1). Zastosowanie HPH mleka, o temperaturze początkowej 20°C i 40°C, podwyższało jego temperaturę po homogenizacji, natomiast mleko o temperaturze początkowej 60°C ulegało schłodzeniu w trakcie procesu. Temperaturę mleka homogenizowanego mierzono bezpośrednio po opuszczeniu homogenizatora, który nie posiadał płaszcza termicznego, co może tłumaczyć uzyskane wyniki. Zgodnie z literaturą, wysokie ciśnienie, zastosowane w czasie homogenizacji, zwiększa temperaturę produktów poddanych procesowi HPH (Hayes i in., 2005; Pereda i in., 2007; Sandra & Dalgleish, 2005).

Analiza otrzymanych parametrów d_{32} i d_{43} wykazała wpływ zastosowania procesu łącznej HPH na zmniejszenie wielkości cząstek mleka oraz kuleczek tłuszczu mlekowego, proporcjonalnie do zastosowanej temperatury procesu (**publikacja 3**, table 2). Opisane w literaturze doświadczenia wskazują również na zmniejszanie wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego pod wpływem wzrostu temperatury zastosowanej podczas HPH (Hayes i in., 2005; Zamora i in., 2012). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wielkości cząstek pomiędzy próbkami mleka poddanego obróbce łącznej HPH z dodatkiem cytrynianu trisodu oraz SDS i bez tych dodatków.

Przy zastosowaniu procesu rozdzielnej HPH uzyskano większe wartości d_{32} i d_{43}, w porównaniu z oznaczonymi dla mleka niehomogenizowanego oraz próbek mleka poddanego łącznej HPH, przy identycznych parametrach procesu. W przypadku rozdzielnej HPH dodatek cytrynianu trisodu i SDS znacznie obniżył wartości d_{32} i d_{43}. Wskazuje to na agregację kuleczek tłuszczu mlekowego przez zaadsorbowaną na ich powierzchni kazeinę, a agregaty ulegały rozpadowi po dysocjacji kazeiny. Pomiar wielkości kuleczek po dezagregacji tłuszczu w mleku, poddanemu procesowi rozdzielnej HPH, wskazuje również na wpływ zastosowanego procesu na zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczowych mleka. Rozdzielna HPH, przeprowadzona w temperaturze 60°C, w mniejszym stopniu wpłynęła na obniżanie wartości d_{32} i d_{43}, w porównaniu z wynikami otrzymanymi przy zastosowaniu łącznej HPH, o identycznych parametrach. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w wielkości kuleczek tłuszczu mlekowego w temperaturze 20°C i 40°C, niezależnie od zastosowanej obróbki HPH (**publikacja 3**, table 2).

Analiza mikroskopowa mikrostruktury mleka poddanego rozdzielnej HPH wykazała powstanie dużych kompleksów białkowo-tłuszczowych powstałych przez agregację kuleczek

tłuszczu mlekowego. Dodatek SDS/cytrynianu trisodu, sprzyjający rozpadowi agregatów na pojedyncze kuleczki tłuszczu mleka, nie wpłynął na znaczące różnice w wielkości kuleczek, w porównaniu z mlekiem po zastosowaniu łącznej HPH (**publikacja 3**, fig. 1).

Obserwacje te wskazują, że zastosowanie rozdzielnej, dwuetapowej HPH, nieskutecznie wpływa na zachowanie integralności poszczególnych kuleczek tłuszczowych, co potwierdzają badania Ambroziak i in. (2019) nad jednoetapową, rozdzielną HPH.

W mleku, po zastosowaniu procesu łącznej HPH, nie zaobserwowano śmietankowania oraz nie oznaczono różnic w zawartości tłuszczu w górnej (10% całkowitej objętości) i dolnej warstwie próbki (90% całkowitej objętości). Inni badacze również wykazali w swoich doświadczeniach brak podstoju śmietanki w mleku po zastosowaniu łącznej homogenizacji wysokociśnieniowej (Boeneke i in., 2009; Hayes i in., 2005; Pereda i in., 2007). Mleko po rozdzielnej homogenizacji wysokociśnieniowej wyraźnie śmietankowało – zaobserwowano oddzielenie warstwy śmietanki od warstwy dolnej, o większej objętości warstwy górnej, w porównaniu z mlekiem niehomogenizowanym (**publikacja 3**, fig. 2). Już w ciągu 48 h przechowywania zauważono wyraźne rozdzielenie faz. Proces śmietankowania w mleku, poddanemu rozdzielnej HPH, wzrastał wraz z obniżeniem temperatury (60°C, 40°C i 20°C). Natomiast po upływie 72 godzin przechowywania objętość górnej fazy zmniejszała się wraz ze spadkiem temperatury obróbki. Objętość podstałej śmietanki nie uległa zmianie w przechowywanym ponad 72 h mleku, poddanemu rozdzielnej HPH w temperaturze 40°C, natomiast w próbkach mleka z zastosowaną temperaturą procesu 60°C, objętość górnej warstwy zmniejszyła się po 144 h przechowywania. W mleku poddanemu rozdzielnej homogenizacji wysokociśnieniowej w temperaturze 20°C, nie zaobserwowano istotnych różnic w rozwarstwieniu w czasie przechowywania.

W przypadku niewystarczającej ilości białka potrzebnego do pełnej stabilizacji powierzchni kuleczek tłuszczu, powstają agregaty kuleczek tłuszczowych, a cząstki lub agregaty o większym rozmiarze mogą tworzyć się poprzez zjawisko koalescencji lub flokulacji przez mostkowanie (Olson i in., 2004). Przy zastosowaniu łącznej homogenizacji wysokociśnieniowej – białka, które są zaadsorbowane na powierzchni kuleczek tłuszczu mlekowego, mają wysoki ciężar właściwy, co ogranicza lub nawet eliminuje śmietankowanie. Szybsza agregacja kuleczek tłuszczowych następuje w środowisku o wysokiej zawartości tłuszczu, z równoczesną niską zawartością związków powierzchniowo czynnych, co jest widoczne w przypadku śmietanki zawierającej mniej białka niż tłuszczu, po zastosowaniu rozdzielnej homogenizacji. W przeprowadzonym doświadczeniu w mleku poddanym rozdzielnej HPH stwierdzono, że powstałe agregaty zawierały kazeinę, ze względu na

zaobserwowaną wielkość cząstek w mleku i w mleku po dysocjacji kazeiny (**publikacja 3**, table 2). Agregaty białkowo-lipidowe o dużej wielkości i wysokim ciężarze, grawitacyjnie oddzielają się w górnej warstwie mleka – zawarte białka opóźniają rozdzielanie faz, z racji ich dużego ciężaru właściwego.

Mleko niehomogenizowane, mimo zaobserwowanej małej objętości górnej warstwy, charakteryzowało się najwyższymi różnicami w zawartościach tłuszczu w rozdzielonych fazach. W czasie przechowywania przez 120 h i 192 h nie zaobserwowano znaczących zmian w rozmieszczeniu tłuszczu mlekowego, zarówno w samej górnej, jak i dolnej warstwie mleka niehomogenizowanego (**publikacja 3**, table 3). Mleko po rozdzielnej HPH, w czasie przechowywania, wyraźnie śmietankowało – nastąpiło wyraźne rozdzielenie faz, przy czym oznaczono niższą zawartość tłuszczu w górnej warstwie tego mleka, w porównaniu z mlekiem niehomogenizowanym (**publikacja 3**, table 3). W czasie przechowywania obserwujemy rozdzielenie faz wraz ze zmniejszeniem objętości górnej warstwy oraz równoczesnym zwiększeniem zawartości w niej tłuszczu. Mleko homogenizowane w temperaturze 20°C charakteryzowało się wyższą zawartością tłuszczu w górnej warstwie próbki niż mleko poddane obróbce HPH w temperaturze ≥ 40ºC, w obu wskazanych okresach przechowywania. Po czasie 120 h przechowywania zawartość tłuszczu w dolnej warstwie była istotnie niższa dla mleka poddanego rozdzielnej HPH w temperaturze 20ºC niż w temperaturze 60ºC, natomiast po 192 h przechowywania, w mleku poddanemu rozdzielnej HPH, we wszystkich zastosowanych temperaturach, oznaczono w dolnej warstwie identyczną zawartość tłuszczu (**publikacja 3**, table 3). Zawartość tłuszczu w górnej warstwie mleka poddanego rozdzielnej obróbce HPH była podobna do tej w mleku i znacznie niższa niż w śmietance. Z tego powodu nie oznaczono rozdziału faz przez śmietankowanie. Kuleczki tłuszczowe zwiększają swoją hydrofilowość poprzez adsorpcję białek osocza, głównie kazeiny, na swojej powierzchni oraz modyfikację składu i właściwości powierzchniowych (Ye i in., 2008; Zamora i in., 2012). Częściowa aglomeracja bardzo małych kuleczek tłuszczu z zaadsorbowanymi na powierzchni białkami mleka może przyczynić się do łączenia się w większe kompleksy białkowo-lipidowe (Hayes i in., 2005). Niższy stopień rozdziału faz oraz niższa zawartość tłuszczu w górnej warstwie po przechowywaniu może być spowodowana adsorpcją białka o dużej gęstości na powierzchni kuleczek tłuszczu oraz jego obecnością w kompleksach białkowo-tłuszczowych. Jakkolwiek, to właśnie występowanie agregatów małych kuleczek tłuszczowych wpływa na ich oddzielanie.

W przeprowadzonym doświadczeniu określono kolor o najwyższej wartości jasności L* dla mleka poddanego procesowi łącznej HPH, a niższe wartości L* dla próbek mleka po

rozdzielnej obróbce HPH. Mleko niehomogenizowane charakteryzowało się niższymi wartościami jasności w porównaniu z mlekiem homogenizowanym (**publikacja 3**, table 4). Hayes i in. (2005) oraz Amador-Espejo i in. (2014) otrzymali podobne wyniki.

Zaobserwowano mniejsze różnice w wartościach L* dla mleka poddanego rozdzielnej HPH, w porównaniu z mlekiem po łącznej obróbce HPH, dla tych samych temperatur. Oznaczone parametry a* były ujemne dla wszystkich badanych próbek mleka i rosły dla mleka poddanego łącznej HPH w całym zakresie temperatur oraz dla mleka poddanego rozdzielnej HPH w temperaturze ≥ 40°C. Istotne różnice w wartościach a* zaobserwowano tylko przy zastosowaniu temperatury 40°C, zarówno przy zastosowaniu obróbki HPH rozdzielnej, jak i łącznej. Wszystkie badane próbki mleka wykazały dodatnie wartości parametru b* − barwa żółta, która wzrosła dla próbek mleka przy zastosowaniu łącznej HPH w 40°C i rozdzielnej HPH w 60°C. Tylko w temperaturze 20°C zauważono znacznie niższe wartości b* dla mleka po rozdzielnej homogenizacji, w porównaniu z mlekiem po łącznej HPH. Obniżenie nasycenia zaobserwowano również w mleku po obróbce metodą rozdzielną HPH, w temperaturze 20°C, w stosunku do zastosowanych pozostałych temperatur.

Parametry wskazujące na barwę mleka różniły się dla mleka poddanego różnym metodom homogenizacji. Różnica w wybarwieniu mleka była niższa dla próbek mleka poddanego obróbce rozdzielnej HPH niż dla próbek mleka po homogenizacji wysokociśnieniowej łącznej.

Nie zaobserwowano wpływu zastosowanej temperatury w łącznej HPH na różnicowanie całościowej barwy badanych próbek, na co z kolei wskazywały istotne zmiany wartości ΔE przy zastosowaniu rozdzielnej metody HPH.

Zmiany w barwie mleka homogenizowanego można wytłumaczyć modyfikacją składników fazy koloidalnej i emulsyjnej – zmiany wielkości agregowanych i dezagregowanych miceli kazeinowych (Pereda i in., 2007), zmiany wielkości i liczby kuleczek tłuszczu mlekowego oraz ich agregatów (Amador-Espejo i in., 2014).

4.4. Wpływ dodatku maślanki i odtłuszczonego mleka w proszku na właściwości jogurtu niskotłuszczowego (publikacja 4)

Otrzymane wyniki wskazują, że stopień ukwaszenia nie różnił się istotnie pomiędzy mlekiem z dodatkiem maślanki w proszku (MBMP) a mlekiem z dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku (MSMP) dodanego w celu standaryzacji zawartości suchej masy w mleku. Po zaszczepieniu kulturą starterową (*Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*), próbki z dodatkiem maślanki i mleka w proszku były inkubowane przez 225 min. Zaobserwowano niższe pH podczas procesu w przypadku MSMP niż w przypadku MBMP, co wskazuje na wyższy stopień ukwaszenia. Ta nieistotna statystycznie różnica była widoczna w 75. minucie zakwaszania przy pH 5,3; natomiast dalsze tempo spadku pH (< 5,3) w czasie inkubacji było niemal identyczne dla obu rodzajów mleka (**publikacja 4**, fig. 1).

Romeih ze współpracownikami (2014) opisali podobne badanie, tyle że na mleku bawolim, również wykorzystując do produkcji jogurtów dodatek maślanki w proszku. Ich badanie wykazało, że mleko wzbogacone maślanką w proszku szybciej ulegało ukwaszeniu niż mleko standaryzowane odtłuszczonym mlekiem w proszku. Autorzy tłumaczyli szybsze tempo ukwaszania MBMP wyższą zawartością niskocząsteczkowych peptydów lub aminokwasów w maślance (w porównaniu z mlekiem odtłuszczonym), które są wykorzystywane przez *Streptococcus thermophilus*. Całkowity czas ukwaszenia zanotowano na poziomie 225 min i nie zmieniał się on pomiędzy rodzajami proszku użytego do standaryzacji mleka, co również potwierdziły wyniki opisane przez Le i in. (2011) oraz Romeih i in. (2014). Według Zhao i in. (2020) dodatek maślanki obniżał pH w punkcie żelowania, skracał czas żelowania i okres fermentacji.

Na podstawie wyników z użyciem testu ANOVA wykazano statystycznie istotny wpływ rodzaju produktu, czasu przechowywania oraz interakcję z wartością kwasowości miareczkowej i zawartości kwasu mlekowego w badanych próbkach (p = 0,05; **publikacja 4**; table 1). Kwasowość (wyrażona w pH), kwasowość miareczkowa oraz zawartość kwasu mlekowego w obu rodzajach jogurtu, po 1 dniu przechowywania były na podobnym poziomie (**publikacja 4**, table 1). Długotrwałe przechowywanie prowadziło do obniżenia pH jogurtu nie powodując różnic pomiędzy badanymi wariantami jogurtu, w analogicznym czasie przechowywania w stanie schłodzonym (p = 0,05). Natomiast różnica w wartości kwasowości miareczkowej i zawartości kwasu mlekowego pomiędzy jogurtami pojawiła się po 7 i 21 dniach przechowywania (p = 0,05).

Kwasowości miareczkowe i zawartości kwasu mlekowego były wyższe dla YBMP niż dla YSMP. Różnice w zawartości kwasu mlekowego w analizowanych próbkach jogurtów były

szczególnie widoczne po 7 dniach przechowywania, ale różnica ta zmniejszyła się po 21 dniach przechowywania (**publikacja 4**, table 1). Podobne badania zostały przeprowadzone i opisane przez Bonczar i Wszołka (2002), z których wynika spadek pH i wzrost kwasowości miareczkowej na skutek działania bakterii fermentacji mlekowej, kontynuowany podczas przechowywania poprzez przemianę laktozy do kwasu mlekowego. Wzrost zawartości kwasu mlekowego był znacznie wolniejszy w temperaturze przechowywania – ok. 4ºC (**publikacja 4**, table 1), niż w temperaturze inkubacji jogurtowych kultur starterowych, na co wskazują zmiany wartości pH.

Obserwując wpływ użytego rodzaju proszku do standaryzacji mleka do produkcji jogurtu na synerezę produktu końcowego podczas przechowywania, wykryto 5% zmianę dla synerezy YSMP (wzrost) i YBMP (spadek) podczas przechowywania (**publikacja 4**, fig. 2). Synereza jogurtu jest traktowana jako wada produktu i często występuje podczas przechowywania – jej zmniejszenie poprawia jakość gotowych jogurtów, oferowanych konsumentom. Podobne wyniki potwierdzają badania opisane przez Le i in. (2011), Romeih i in. (2014), Trachoo i Mistry (1998) oraz Zhao i in. (2020), którzy wykazali niższe wartości synerezy dla jogurtu z maślanką, ze względu na składniki maślanki zapewniające lepszą zdolność zatrzymywania wody.

Biorąc pod uwagę, że mleka użyte do produkcji jogurtu miały standaryzowaną zawartość suchej masy na tym samym poziomie – niższą (nieistotnie) synerezę YBMP, w porównaniu z YSMP, wyjaśniono zwiększoną zdolnością hydratacyjną składników użytej mieszanki, w szczególności białek MFGM i fosfolipidów. Amfifilowe właściwości fosfolipidów i innych składników otoczki kuleczek tłuszczu mlekowego mogą przekładać się na większą zdolność do zatrzymywania wody przez przechowywany produkt.

Krzywą standardową zawartości fosfolipidów wykreślono na podstawie roztworów wzorcowych o określonych stężeniach fosfolipidów (**publikacja 4**, fig. 3). Wyniki uzyskane za pomocą testu ANOVA wykazały statystycznie istotny wpływ rodzaju produktu i czasu przechowywania na zawartość fosfolipidów w badanych próbkach ($p = 0,05$) (**publikacja 4**, table 2). W badaniach własnych wykazano niższą ($p = 0,05$) zawartość fosfolipidów w tłuszczu mlekowym jogurtu z dodatkiem maślanki w proszku w porównaniu z jogurtem z odtłuszczonym mlekiem w proszku. Udział fosfolipidów w tłuszczu mleka w badanych mlekach fermentowanych zmniejszał się wraz z długością czasu przechowywania ($p = 0,05$). Różnice w zawartości fosfolipidów pomiędzy produktami z dodatkiem użytych rodzajów proszków były szczególnie widoczne w jogurtach po 21 dniach przechowywania. Spadek zawartości fosfolipidów w ciągu 21 dni przechowywania zachodził szybciej w produkcie

YBMP – maksymalnie o ok. 50%, natomiast w przypadku produktu YSMP wyniósł około 20% – w odniesieniu do podobnych próbek przechowywanych przez 1 dzień. Po badanym czasie przechowywania zawartość fosfolipidów w YSMP była o 50% wyższa niż w YBMP ($p = 0,05$).

Wysoka zawartość fosfolipidów w YBMP wynika z uwalniania się membran kuleczek tłuszczowych do maślanki w czasie procesu zmaślania. Natomiast w przypadku YSMP jest to spowodowane dużą zawartością bardzo małych kuleczek tłuszczu, a przez to całkowitą dużą powierzchnią otoczek kuleczek tłuszczowych, w zastosowanym dodatku odtłuszczonego mleka w proszku. W obu badanych przypadkach dodatek proszków mlecznych (maślanki i mleka odtłuszczonego) spowodował, że w tłuszczu mlekowym mlek fermentowanych stwierdzono wysoką zawartość fosfolipidów (**publikacja 4**, table 2).

Występowanie małych kuleczek tłuszczu oznacza wyższą zawartość lipidów polarnych w produkcie, w porównaniu do produktów zawierających duże kuleczki tłuszczowe (Lopez, 2011). Również inni naukowcy, jak Conway i in. (2014), MacGibbon i Taylor (2006) oraz Rombaut i Dewettinck (2006) w swoich badaniach wskazali na wysoką zawartość polarnych lipidów, zarówno w maślance, jak i w mleku odtłuszczonym w stosunku do całkowitego tłuszczu. Mimo, że zawartość fosfolipidów w maślance jest 10-krotnie większa niż w mleku odtłuszczonym, to w obu produktach proporcja fosfolipidów do tłuszczu ogółem jest podobna (Conway i in., 2014; MacGibbon, 2006). Przypuszcza się, że mniejszy spadek, podczas przechowywania, zawartości fosfolipidów w YSMP, w porównaniu z YBMP, jest spowodowany wyższą podatnością na konwersję fosfolipidów pochodzących z fragmentów MFGM maślanki w proszku, w porównaniu z fosfolipidami pochodzącymi z powierzchni kuleczek tłuszczowych odtłuszczonego mleka w proszku. Konieczne są jednak dalsze badania, aby wyjaśnić, dlaczego te specyficzne zmiany w zawartości fosfolipidów zachodzą w suchej masie jogurtu wzbogaconego maślanką w proszku.

Profil kwasów tłuszczowych w badanych próbkach jogurtów nie różnił się statystycznie istotnie w zależności od użytego rodzaju proszku (**publikacja 4**, table 3). Dane literaturowe (Fauquant i in., 2005; Jhanwar & Ward, 2014; Sánchez-Juanes i in., 2009) wskazują, że skład kwasów tłuszczowych może różnić się w zależności od źródła ich pochodzenia. Profil kwasów tłuszczowych frakcji fosfolipidów pochodzących z membran kuleczek tłuszczowych maślanki różni się od profilu tłuszczu ekstrahowanego z pełnego mleka. Takie fosfolipidy mają nie tylko niższy poziom kwasu stearynowego i wyższy poziom kwasów oleinowego i linolowego, ale także zawierają bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. *Very Long Chain Fatty Acids* – VLCFA), powyżej C20 (Sánchez-Juanes i in., 2009) oraz więcej nienasyconych kwasów

tłuszczowych – w szczególności PUFA (wielonienasycone kwasy tłuszczowe, ang. *Polyunsaturated Fatty Acids*), których zawartość w otoczce jest 6 razy wyższa niż w wewnętrznym rdzeniu (Fauquant i in., 2005; Jhanwar & Ward, 2014).

Wyniki doświadczenia wskazują na brak zmiany w profilu kwasów tłuszczowych, w przypadku zastosowania maślanki w proszku do produkcji jogurtów. Przypuszczalnie powodem jest wyższa zawartość tłuszczu w mleku, w stosunku do zawartości lipidów membranowych, a także porównywalny poziom zawartości fosfolipidów w jogurtach, zarówno z dodatkiem maślanki w proszku, jak i odtłuszczonego mleka w proszku (**publikacja 4**, table 2).

5. Wnioski i stwierdzenia końcowe

1. Coraz więcej doniesień badawczych wskazuje na korzyści zdrowotne wynikające ze spożycia składników otoczek kuleczek tłuszczowych (np. fosfolipidów), pochodzących z mleka. Ze względu na swoje właściwości amfifilowe mogą być wykorzystane do poprawy cech technologicznych oraz żywieniowych mleka i jego przetworów.
2. Homogenizacja wpływała na rozkład wielkości kuleczek tłuszczowych mleka powodując zmniejszenie ich średnicy. Poprzez dodatek maślanki w proszku do mleka homogenizowanego zachodziło dalsze zmniejszanie średnicy kuleczek tłuszczu mlekowego oraz zwiększenie ich powierzchni właściwej. Dodatek maślanki podczas homogenizacji zapobiegał zmianom w otoczkach kuleczek tłuszczowych mleka, tym samym stabilizował układ emulsyjny i koloidalny mleka.
3. Dodatek maślanki pozwolił uzyskać mleko z homogenizowanymi kuleczkami tłuszczu, które przypominają nieprzetworzone kuleczki tłuszczu mleka. Dodatkowo, wpłynęło to na zwiększenie zawartości biologicznie aktywnych fosfolipidów i innych składników MFGM o właściwościach prozdrowotnych. Równocześnie możliwa była poprawa właściwości technologicznych mleka z dodatkiem maślanki w proszku, takich jak HS, poprzez dobór parametrów homogenizacji.
4. Przy homogenizacji rozdzielnej, w porównaniu z łączną, składniki mleka odtłuszczonego nie były poddawane procesowi homogenizacji, co wpłynęło na mniejsze zmiany w tych składnikach, a jednocześnie homogenizowana była mniejsza objętość produktu.
5. Przeprowadzone badania wykazały podobny wpływ, zarówno HPH łącznej, jak i rozdzielnej, o identycznych parametrach procesu, na wielkość kuleczek tłuszczowych w mleku. Niekorzystnym zjawiskiem była agregacja kuleczek tłuszczowych i tworzenie dużych kompleksów białkowo-tłuszczowych w mleku poddanym rozdzielnej HPH, co wpływało na proces śmietankowania. W badanych próbkach górna warstwa stanowiła do 70% całkowitej objętości próbki, ale wraz ze wzrostem objętości warstwy zawartość tłuszczu w górnej warstwie malała.
6. Barwa mleka w mniejszym stopniu ulegała zmianie pod wpływem rozdzielnej HPH, w porównaniu z barwą mleka homogenizowanego łącznie, z powodu mniejszych zmian w fazie koloidalnej i emulsyjnej.
7. Łączna HPH w większym stopniu stabilizowała fazę emulsyjną, ale badania nad HPH rozdzielną wskazały możliwość jej zastosowania przy produkcji mlecznych wyrobów wymagających dyspersji tłuszczu mlekowego i jak najmniejszych zmian w składnikach fazy koloidalnej.

Metoda HPH rozdzielnej stanowi interesującą alternatywę dla standardowego procesu homogenizacji, zapewniając korzyści technologiczne, praktyczne i ekonomiczne w przemyśle mleczarskim.

8. Maślanka w proszku może być wykorzystywana do zwiększania suchej masy mleka podczas produkcji jogurtów, przy jednoczesnym wzbogacaniu ich w składniki prozdrowotne. W przeprowadzonym doświadczeniu jogurty z dodatkiem maślanki w proszku charakteryzowały się prawidłowym przebiegiem fermentacji mleka, zmniejszoną synerezą, zwiększoną zawartością kwasu mlekowego oraz mniejszą zawartością fosfolipidów w porównaniu z jogurtami z dodatkiem mleka w proszku. Co wskazuje na możliwość zastosowania maślanki w proszku jako dodatku do produkcji nowego typu jogurtów o specyficznych cechach funkcjonalnych.

6. Literatura

Amador-Espejo, G.G., Suàrez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E., Trujillo, A.J. (2014). Effect of moderate inlet temperatures in ultrahigh-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science, 97* (2), 659-671. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7245.

Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, N.P. (2006). Syneresis of set yoghurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. *International Journal of Dairy Technology, 59*: 216-221. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00264.x.

Ambroziak, K., Kiełczewska, K., Mickiewicz, D., Dąbrowska, A. (2019). Advantages and Disadvantages of Partial High Pressure Homogenisation of Milk in Relation to Full-Stream Homogenisation. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 69* (3), 279-287. https://doi.org/10.31883/pjfns/109987.

Ambroziak, A.A., Cichosz, G. (2013). Fosfolipidy mleka jako nutraceutyk. *Polski Merkuriusz Lekarski, 34*, 62-66.

Anto, L., Warykas, S.W., Torres-Gonzalez, M.; Blesso, C.N. (2020). Milk Polar Lipids: Underappreciated Lipids with Emerging Health Benefits. *Nutrients, 12* (4), 1001. https://doi.org/10.3390/nu12041001.

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.

Boeneke, A., Pastorek, A., Aryana, K.J. (2009). Effect of high pressure homogenisation on milk. *Milchwissenschaft, 64*, 40-42.

Bonczar, G., Wszołek, M. (2002). Charakterystyka jogurtów z mleka owczego o normalizowanej zawartości tłuszczu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 1* (30), 111-112.

Bourlieu, C., Michalski, M.C. (2015). Structure-function relationship of the milk fat globule. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 18* (2), 118-127. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000138.

Contarini, G.; Povolo, M. (2013). Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. *International Journal of Molecular Sciences. 14* (2):2808-2831. https://doi.org/10.3390/ijms14022808.

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.

Corredig, M., Dalgleish, D.G. (1997). Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45,*4595-4600. https://doi.org/10.1021/jf970531f.

Danthine, S., Blecker, Ch., Paquot, M., Innocente, N., Deroanne, C. (2000) Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. *Lait, 80,* 209-222. https://doi.org/10.1051/lait:2000120.

Deeth, H.C. (1997). The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Australian Journal of Dairy Technology, 52* (1), 44-46.

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Trung Le, 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.

Dobrzańska, A., Cais-Sokolińska, D. (2014). Ocena przydatności systemów pomiaru barwy do badań preparatów białek mleka i serwatki. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, 19* (3), 267-272. https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-2da62740-fb6b-4c99-9c19-c2273b3b6c0b/c/Dobrzanska.pdf.

Dumpler, J., Huppertz, T., Kulozik, U. (2020). Invited review: Heat stability of milk and concentrated milk: past, present, and future research objectives. *Journal of Dairy Science 103* (12):10986-11007. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18605.

Elling, J.L., Duncan, S.E. (1996), Physical properties of 20% milk fat reformulated creams manufactured from cholesterol-reduced butteroil. *Journal of Food Science, 61,* 375-378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14197.x.

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.

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 Technolgy, 107,* 80-86. https://doi.org/10.1002/ejlt.200401063.

Fontecha, J., Brink, L., Wu, S., Pouliot, Y., Visioli, F., Jime´nez-Flores, R. (2020). Sources, production, and clinical treatments of milk fat globule membrane for infant nutrition and well-being. *Nutrients 12,* 1607. https://doi.org/10.3390/nu12061607.

Hara, A., Radin, NS. (1978). Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry 90* (1). 420-425. https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5.

Hashioka, S., Monji, A., Han, Y.H., Nakanishi, H., Kanba, S. (2004). Potentiality of phosphatidylserine (PS)-liposomes for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology, 154,* 119.

Hayes, M.G., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research, 72* (1), 25-33. https://doi.org/10.1017/S0022029904000524.

Heid, H.W., Keenan, T.W. (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology, 84* (2-3), 245-258. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.002.

Horiuchi, H., Sasaki, Y. (2012). Effect of oxygen on symbiosis between Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus. *Journal of Dairy Science, 95* (6), 201. https://doi.org/10.3168/jds.2011-5147.

Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2003). High pressure-induced changes in the creaming properties of bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 4* (4), 349-359. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00057-2.

Huppertz, T., Kelly, A.L. (2006). Physical Chemistry of Milk Fat Globules. W: Fox P.F., McSweeney P.L.H. (Red.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2: Lipids* (s. 173-212), Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_5.

ISO 15884:2002|IDF 182:2002. Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters.

ISO 19662:2018|IDF 238:2018. Milk – Determination of fat content – Acidobutyrometric (Gerber method).

ISO 19660:2018|IDF 237:2018. Cream – Determination of fat content – Acidobutyrometric method.

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.

Jørgensen, C.E., Abrahamsen, R.K., Rukke, E-O., Hoffmann, T.K., Johansen, A-G., Skeie, S.B. (2019). Processing of high-protein yoghurt – A review. *International Dairy Journal, 88*, 42-59. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002.

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.

Kanno, C., Kim, D.H. (1990). A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities, and

electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54* (11), 2845-2854, https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870405.

Kasinos, M., Tran Le, T., Van der Meeren, P. (2014). Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. *Food Hydrocolloids, 34*, 112-118. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.030.

Keenan, T.W., & Mather, I.H. (2006). Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. W: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Red.) *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*, (s. 137-171). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_4.

Kiełczewska, K., Ambroziak, K., Krzykowska, D., Aljewicz, M. (2021). The effect of high-pressure homogenization on the size of milk fat globules and MFGM composition in sweet buttermilk and milk. *International Dairy Journal 113*, 1-33. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104898.

Kiełczewska, K., Kruk, A., Czerniewicz, M., & Kopeć, M. (2008). Colloidal stability of milk with various contents of fat subjected to high-pressure homogenization. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 58*, 359-363.

Korhonen, H. (2009). Bioactive components in bovine milk. W: Park, Y.W. (Red.) *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, (s. 15-42). Wiley-Blackwell, Singapure.

Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassi, J.-Y., Cauty, C., Lopez, C., 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.

Le, T.T., van Camp, J., Pascual, P.A.L., Meesen, G., Thienpont, N., Messens, K., Dewettinck, K. (2011). Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal, 21* (10), 798-805. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.015.

Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, 16* (5), 391-404. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.05.007.

Lu, N., Wang, J., Chen, Z., Zhang, X., Chen, C., Wang, S. (2021). The effect of adding phospholipids before homogenization on the properties of milk fat globules. *LWT, 146*, 111659. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111659.

MacGibbon, A.K.H, Taylor, M.W. (2006). Composition and structure of bovine milk lipids. W: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Red.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2. Lipids.* (s. 1-42). Springer, New York. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_1.

Mather, I., & Keenan, T.W. (1998). Origin and Secretion of Milk Lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 3*. 259-273. https://doi.org/10.1023/A:1018711410270 .

Mercan, E., Sert, D., Akin, N. (2018 a). Effect of high-pressure homogenisation on viscosity, particle size and microbiological characteristics of skim and whole milk concentrates. *International Dairy Journal, 87*, 93-99. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.017.

Mercan, E., Sert, D., Akin, N. (2018 b). Determination of powder flow properties of skim milk powder produced from high-pressure homogenization treated milk concentrates during storage. *LWT, 97*, 279-288. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.002.

Michalski, M.C., Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology, 17* (8), 423-437. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.004.

Nicolson, G.L., Ash, M.E. (2014). Lipid replacement therapy: A natural medicine approach to replacing damaged lipids in cellular membranes and organelles and restoring function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1838* (6), 1657-1679, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.010.

Olson, D.W., White, C.H., Richter, R.L. (2004). Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *Journal of Dairy Science, 87*, 3217-3223. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73457-8.

Pedras, M.M., Pinho, C.R.G., Tribst, A.A.L., Franchi, M.A., Cristianini, M. (2012). MiniReview, The effect of high pressure homogenization on microorganisms in milk. International *Food Research Journal 19* (1), 1-5. http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(01)%202011/(1)IFRJ-2011-088%20Alline.pdf.

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science, 90* (3), 1081-1093. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3.

Pereda J., Ferragut V., Quevedo J.M., Guamis B., Trujillo A.J. (2009). Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids, 23* (7), 1974-1979. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.010.

Pimentel, L., Gomes, A., Pintado, M., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2016). Isolation and Analysis of Phospholipids in Dairy Foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2016*, 9827369. https://doi.org/10.1155/2016/9827369.

Rodríguez-Alcalá, L. M., Castro-Gómez, M. P., Pimentel, L. L., & Fontecha, J. (2017). Milk fat components with potential anticancer activity-a review. *Bioscience reports, 37* (6), BSR20170705. https://doi.org/10.1042/BSR20170705.

Rombaut, R., Dewettinck, K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal, 16* (11): 1362-1373. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.011.

Romeih, E.A., Abdel-Hamid, M., Awad, A.A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt *Dairy Science & Technology* 94, 302-303. https://doi.org/10.1007/s13594-014-0163-8.

Sánchez-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.

Sandra, S., Dalgleish, D.G. (2005), Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal, 15* (11), 1095-1104. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.015.

Sandra, S., Dalgleish, D.G. (2007). The effect of ultra-high pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skim milk. *International Dairy Journal, 17* (9) 1043-1052. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.005.

Schmelz, E.M. (2000). Dietary sphingomyelin and other sphingolipids in health and disease. *Nutrition Bulletin, 25*, 135-139. https://doi.org/10.1046/j.1467-3010.2000.00031.x.

Sert, D., Mercan, E. (2020). Microbiological, physicochemical, textural characteristics and oxidative stability of butter produced from high-pressure homogenisation treated cream at different pressures. *International Dairy Journal, 111*, 104825. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104825.

Silva, J.V.C., O'Mahony, J.A. (2017), Flowability and wetting behaviour of milk protein ingredients as influenced by powder composition, particle size and microstructure. *International Journal of Dairy Technology, 70*, 277-286. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12368.

Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane – a biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11* (2-3), 154-163. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.002.

Singh, H., & Tokley, R.P. (1990). Effects of preheat treatments and buttermilk addition on the seasonal variations in the heat stability of recombined evaporated milk and reconstituted concentrated milk. *Australian Journal of Dairy Technology, 45*, 10-16.

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.

Smoczyński, M., Staniewski, B., Kiełczewska, K. (2012). Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane – some nutritional and technological implications. *Food Reviews International, 28* (2):188-202. https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595024.

Spitsberg, V.L. (2005). Invited review: bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science, 88* (7), 2289-2294. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72906-4.

Stewart, J.C.M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry, 104* (1), 10-14. https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9.

Touhami, S., Marciniak, A., Doyen, A., Brisson, G. (2022). Effect of alkalinization and ultra-high-pressure homogenization on casein micelles in raw and pasteurized skim milk. *Journal of Dairy Science, 105* (4), 2815-2927. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20700.

Tokas, J., Punia, H. (2019). Milk fat globule membrane (MFGM): An ingredient of dairy products as nutraceutical. *The Trends in Peptide and Protein Sciences, 4*, 1-9.

Trachoo, N., Mistry, VV. (1998). Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of nonfat and low fat yogurts. *Journal Dairy Science 81*, 3163-3171. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75882-5.

Walstra, P. (1985). Some comments on the isolation of fat globule membrane material. *Journal of Dairy Research*, *52* (2), 309-312. https://doi.org/10.1017/S0022029900024195.

Vance, J.E. (2018). Historical perspective: phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from the 1800s to the present. *Journal of Lipid Research, 59* (6), 923-944, https://doi.org/10.1194/jlr.R084004.

Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, Ch. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 14* (3), 485-500.

Ye, A., Anema, S. G., & Singh, H. (2008). Changes in the surface protein of the fat globules during homogenization and heat treatment of concentrated milk. *Journal of Dairy Research, 75* (3), 347-353. https://doi.org/10.1017/S0022029908003464.

Ye, A., Cui, J., Singh, H. (2010). Effect of the fat globule membrane on in vitro digestion of milk fat globules with pancreatic lipase. *International Dairy Journal*, *20* (12), 822-829. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.06.007.

Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S. (2004). Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait, 84* (3), 269-283. https://doi.org/10.1051/lait:2004004.

Yeagle, P.L. (2014). Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1838* (6), 1548-1559. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.009.

Zamora, A., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2012). Changes in surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenization and conventional treatments of milk. *Food Hydrocolloids, 29* (1), 135-143, https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.012.

Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P.D., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science, 90* (1), 13-23. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72604-8.

Zander, L., Haponiuk, E., Zander, Z., Probola, G. (2011). Wpływ obróbki mechanicznej na stabilność reologiczną skrzepu jogurtowego. *Inżynieria I Aparatura Chemiczna 50,* 2, 17-18.

Zhao, L., Feng, R., Rena, F., Mao, X. (2018). Addition of milk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. *LWT, 98*, 9-17. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.029.

Zhao, L., Feng, R., Mao, X. (2020). Addition of buttermilk powder improved the rheological and storage properties of low-fat yogurt. *Food Science & Nutrution, 8* (7), 3061-3069. https://doi.org/10.1002/fsn3.1373.

7. Spis tabel, rysunków i wykresów

Lp.	Rodzaj i nr	Tytuł	Publikacja
1.	Table 1	Lipid components of the milk fat globule membrane	publikacja 1
2.	Table 2	Polar lipid content of some dairy products	publkiacja 1
3.	Figure 1	Experimental design	publikacja 2
4.	Figure 2	Examples of particle size distribution in homogenized milk samples with 0.6 and 1.2% buttermilk addition	publikacja 2
5.	Table 1	The effect of buttermilk addition and homogenization on the d_{43} diameter of milk fat globules	publikacja 2
6.	Table 2	The effect of buttermilk powder addition and homogenization on the heat stability of milk	publikacja 2
7.	Table 3	The effect of buttermilk powder addition and homogenization on milk viscosity	publikacja 2
8.	Table 1	Homogenisation parameters	publikacja 3
9.	Table 2	The influence of homogenisation on the size of milk particles and milk fat globules	publikacja 3
10.	Figure 1	Microstructure of non-homogenised milk (control sample) and milk treated by partial high-pressure homogenisation (a), partial highpressure homogenisation with the addition of trisodium citrate and SDS (b), full-stream high-pressure homogenisation (c) at a temperature of 60°C (I), 40°C (II), 20°C (III), 100× magnification, 10 μm scale	publikacja 3
11.	Figure 2	The influence of partial homogenisation temperature on the volume of the top layer (cream) expressed in mL 100 mL^{-1} of milk (n = 3)	publikacja 3
12.	Table 3	The influence of partial homogenisation on the fat content of the top and bottom layer after 120 and 192 h of storage	publikacja 3
13.	Table 4	Milk colour parameters	publikacja 3
14.	Figure 1	Acidification curves of milk with added buttermilk powder (MBMP) and milk with added skimmed milk powder (MSMP), mean values ± standard deviation (n = 2)	publikacja 4
15.	Table 1	pH, titratable acidity and lactic acid content of yoghurt during storage	publikacja 4

16.	Figure 2	Syneresis of yoghurt during storage. YBMP – yoghurt with added buttermilk powder; YSMP – yoghurt with added skimmed milk powder. Mean values ± standard deviation (n = 2), differences not significant	publikacja 4
17.	Figure 3	Absorbance of the standard phospholipid solution	publikacja 4
18.	Table 2	Phospholipid content in yoghurt	publikacja 4
19.	Table 3	Fatty acid profile of yoghurt	publikacja 4

8. Publikacje wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską i załączniki

POLISH JOURNAL OF NATURAL SCIENCES
Abbrev.: Pol. J. Natur. Sc., Vol 36(4): 433–445, Y. 2021

BIOFUNCTIONAL PROPERTIES OF MILK FAT GLOBULE MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS

***Anna Garczewska-Murzyn*[1], *Michał Smoczyński*[2]**

[1] ORCID: 0000-0002-5552-1693
[2] ORCID: 0000-0001-9042-3848
[1,2] Department of Dairy Science and Quality Management, Faculty of Food Science
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

Key words: milk, milk lipids, phospholipids, milk fat globule membrane, functional properties.

Abstract

The aim of the paper is to discuss the general properties of polar lipids present in the milk fat globule membrane (MFGM), their role in living organism and some benefits of consuming these components in the human diet.

Milk phospholipids contain glycerophospholipids and sphingolipids. These compounds perform a multitude of functions in living organisms: they serve as energy storage for the body, are a building blocks of cell membranes, they and their derivatives are bioactive molecules involved in the mediation and recognition of signals, and interact with other cell components. There has been an increasing number of reports documenting the health benefits of milk lipid consumption. Although they are present in milk in small quantities, their unique properties may help prevent and alleviate numerous diseases.

Introduction

There has been an increasing number of reports indicating that breast-feeding is vital for proper infant development (DONOVAN 2006, LEE et al. 2018). It also benefits the mother's health by reducing the risk of breast and ovarian cancers (JONES 2007). This synergistic interaction is the result of an evolutionary adaptation through which mechanisms advantageous for survival have emerged. The effects of milk on the child's health are extremely complex, and providing the infant with essential nutrients is only part of milk's functions. As such, milk continues to serve as a model food-stuff, while researches also draw upon it as an inspiration and a source of knowledge on the two-way links between humans and nutrition. Advancing

Address: Michał Smoczyński, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn, Poland, e-mail: michal.smoczynski@uwm.edu.pl

the knowledge on the biological functions of milk constituents will help better harness the prospective properties of nutrients to develop biofunctional foods with distinct therapeutic values, designed to combat specific diseases or satisfy specific consumer needs.

Though scarce in the membrane, polar lipids play an important role in nutrition and normal cell function. Due to their unique properties, polar lipids perform numerous functions in living organisms: they serve as energy storage for the body, are a building block of cell membranes (isolating the cell from the environment and separating cellular compartments), they and their derivatives are bioactive molecules involved in the mediation and recognition of signals, they also interact with other cell components (NICOLSON and ASH 2014).

There has been an increasing number of reports documenting the health benefits of milk lipids in general, and the biological role of phospholipids in particular (AMBROZIAK and CICHOSZ 2013, SMOCZYŃSKI 2017, KUCHTA et al. 2012, EL-LOLY 2011). Consequently, the aim of the present paper is to discuss the general properties of polar lipids present in the milk fat globule membrane (MFGM), their role in living organism and some benefits of consuming these components in the human diet.

Lipid components of the milk fat globule membrane (MFGM)

Milk lipids are likely the most complex and least understood group of milk constituents. Lipid content depends on the species and ranges from 3.8 to 3.9% for woman's milk, and 3 to 5% for bovine milk. In mammal bodies, the lipids are formed in the epithelial cells of the mammary gland and secreted in emulsified form as milk fat globules coated with a phospholipid/protein trilayer. Secretion of fat globules is a process unique to the mammary gland and has been a subject of many studies (HEID and KEENAN 2005, MATHER and KEENAN 1998). In structural terms, fat globules consist of an apolar inner core mostly composed of triacylglycerols and cholesterol esters, surrounded by a membrane about 10–20 nm in diameter. This milk fat globule membrane has a very defined structure, making up 2–6% of the total globule mass, and consists mainly of proteins and phospholipids. The content of phospholipids in the membrane is estimated at 40 to 75% (DEETH 1997, SINGH 2006).

Milk phospholipids contain glycerophospholipids and sphingolipids. Glycerophospholipids consist of a glycerol backbone esterified with fatty acids at two positions, and a phosphate with a different organic group

(e.g. serine, choline) at the third position. For sphingolipids, the structure varies and is based on a sphingosine, i.e., a long-chain aliphatic amine (which additionally contains two or three hydroxyl groups). The attachment of a fatty acid to the amine group results in the formation of ceramide. If phosphocholine is attached to the ceramide, sphingomyelin is formed, whereas the attachment of a saccharide group produces a sphingoglycolipid (DEWETTINCK et al. 2008, VESPER et al. 1999).

Phospholipids account for up to 1% of milk fat (SÁNCHEZ-JUANES et al. 2009). In mammal cells, the majority of such lipids are produced in the endoplasmic reticulum (VANCE 2018). Table 1 presents the composition and content of the main lipid components of the milk fat globule membrane (based on FONG et al. 2007, SINGH 2006, SMOCZYŃSKI et al. 2012). Although the main fraction are triacylglycerols, the content of which varies in the literature between 20 to 80% of the membrane weight, the majority of triacylglycerols can originate from the contamination by the core of the fat globules during isolation of the membrane. Therefore, the literature shows a wide variation depending on the methods used to isolate the material (WALSTRA 1985).

Table 1

Lipid components of the milk fat globule membrane (FONG 2007, SINGH 2006)

Lipid group	Percentage [%]
Triacylglycerols	56.0–62.0
Diacylglycerols	2.1–9.0
Monoacylglycerols	0.4
Free fatty acids	0.6–6.0
Sterols	0.2–2.0
Phospholipids	26.0–40.6
including [% of phospholipids]:	
Sphingomyelin	20–22
Phosphatidylcholine	31–36
Phosphatidylethanolamine	27–30
Phosphatidylinositol	7–11
Phosphatidylserine	4–5
Lysophospatidylcholine	2
Lactocerebroside	3.4
Glucocerebroside	0.3

Characteristics of MFGM polar lipids

Phosphatidylcholine

Phosphatidylcholine (PC, also referred to as lecithin) is a phosphoglyceride in which the phosphate group is esterified with choline, and makes up 40 to 50% of the cell membrane phospholipids. PC is a zwitterion

over a wide range of pH values, owing to the presence of a positively-charged quaternary amine group and a negatively-charged phosphate residue. PC is biosynthesized in the endoplasmic reticulum (ER) through the so-called Kennedy pathway (KENNEDY and WEISS 1956), first by phosphorylating choline to form phosphocholine, then incorporating sn-1,2-diacylglycerol into the latter. The structure of PC is subject to changes through the exchange of fatty acids within the molecule, a process known as the Lands cycle (LANDS 1958). In the liver, phosphatidylcholine can also be synthesized through methylation of phosphatidylethanolamine (VANCE and RIDGWAY 1988).

Other PC constituents include: palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linolenic acid, and arachidonic acid, with the saturated and unsaturated acids mostly occurring in the sn-1 and sn-2 positions, respectively. PC can be degraded by phospholipases, which exhibit specificity for the cleft bonds and thus can release certain metabolites important to signaling. The released choline is re-incorporated into new PC molecules (KRAHMER et al. 2011).

PC is involved in a number of important functions in the body. Together with other phospholipids, it plays a major role in lipid metabolism, being involved in the synthesis and transport of lipid-derived lipoproteins within the body. In combination with proteins and cholesterol, it forms a single-layer surrounding the hydrophobic core of lipoprotein particle composed of triacylglycerols and cholesterol esters. The essential role of PC in maintaining normal function of lipoproteins also relates to the presence of polyunsaturated carboxylic acids at the sn-2 position. The changes in the PC molecule brought about by the Lands cycle enable compounds, such as arachidonic acid, to be incorporated into the sn-2 position, modifying the biomembrane fluidity in turn (RAWICZ et al. 2000). Lower proportions of arachidonic acid in PC molecules have been shown to inhibit the synthesis and release of VLDLs (very low-density lipoproteins), leading to triacylglycerol accumulation in the liver (RONG et al. 2015). PC also indirectly regulates the synthesis and dynamics of intracytoplasmic lipid droplets. Suppressed PC biosynthesis in adipocytes leads to increased droplet size (KRAHMER et al. 2011).

Phosphatidylethanolamine

After PC, phosphatidylethanolamine (PE) is the second most abundant phospholipid in milk fat globule membranes and plant/animal cell membranes. It is mainly biosynthesized through the incorporation of cytidine diphosphate-ethanolamine into diglyceride – releasing cytidine

5`-monophosphate – or through the decarboxylation of phosphatidylserine (GIBELLINI and SMITH 2010).

Arachidonic and docosahexaenoic acids are major constituents of the PE, attached mainly at the sn-2 position, whereas saturated acids are the most common component at sn-1. In some types of cells (neurons, cells involved in the inflammatory response), a large proportion of PE (more than 50%) occurs as plasmalogen, i.e., the form containing an ether bond. By contrast, the plasmalogen form of PE is in trace amounts in the liver (HAN et al. 2001).

Unlike PC, PE – together with phosphatidylserine – occurs mainly in the inner part of the lipid bilayer, from the cell interior side. Being a polar head group, PE can form hydrogen bonds with other lipids or proteins, which stabilizes proteins within the membrane (YEAGLE 2014). The small size of the polar head can alter the curvature of the membrane surface and change the fluidity of the biomembrane (DAWALIBY et al. 2016).

PE also plays a major role in lipid metabolism and the formation of cytoplasmic lipid droplets. It is particularly associated with the function and metabolism of VLDL molecules – its presence in these molecules promotes their rapid take-up and removal from circulation. This may result in the lower risk of hypercholesterolemia (VEEN et al. 2017). Biomembranes also contain smaller quantities of phosphatidylcholine derivatives, such as lysophosphatidylethanolamine – which bears only one acyl residue – or mono-/dimethyl-phosphatidylethanolamine (GIBELLINI and SMITH 2010).

Sphingomyelin

Sphingomyelin (SM) is a sphingolipid, a complex group of lipid compounds, in which the long-chain amino alcohol sphingosine comprises the backbone. Sphingomyelin is formed through the binding of a fatty acid residue with an amide bond, after which a choline phosphate group is attached to the resulting ceramide. The biosynthesis and metabolism of sphingolipids are strictly controlled, influenced by multiple factors, and include many intermediate metabolites with their respective biological activities. By contrast, SM is predominantly formed by transferring phosphocholine from PC onto the ceramide (MERRILL 2011). The group was named in reference to the sphinx, which was intended to evoke their heretofore enigmatic properties. However, the biological role of its compounds has been increasingly documented in scientific literature (MERRILL 2011).

Like PC, SM is a zwitterion. It can account for up to half of the membrane lipids in some tissues, but in most cases PC exceeds it in proportion. Also, like PC, SM occurs mainly in the outer layer of the plasma mem-

brane. The SM molecule predominantly contains long-chain saturated fatty acids (palmitic and stearic) with a small number of monounsaturated fatty acids (RAMSTEDT et al. 1999).

Sphingolipids, including sphingomyelin (SM), are involved in a number of important functions in the body. One of the main functions of SM – resulting from its unique structure – is combining with cholesterol to form domains known as lipid rafts, i.e., special areas on the surface of the membrane that are slightly tighter packed than the others (SIMONS and IKONEN 1997). These domains serve as interaction sites for certain proteins. Since SM content correlates with cholesterol levels in membranes, SM can affect the levels and metabolism of cholesterol (VESPER et al. 1999). Moreover, SM is a major source of ceramides and other metabolites that act as signal transducers for growth regulation, cell migration, adhesion, apoptosis, and inflammatory response (HANNUN and OBEID 2018).

Phosphatidylinositol

Phosphatidylinositol (PI) is a glycerophospholipid that contains carboxyl acid in ester linkage with glycerol, as well as inositol (hexahydroxycyclohexane) bonded via a phosphoric acid residue. The PI molecule is negatively charged. This phospholipid has the unique characteristic of having high levels of stearic and arachidonic acids at sn-1 and sn-2, respectively (D'SOUZA and EPAND 2014). Biosynthesis of phosphatidylinositol is mediated by phosphatidylinositol synthase, which catalyzes the bond formation between CDP-diacylglycerol and inositol.

Apart from being a constituent of biomembranes, PI also facilitates the anchoring of various proteins to the membrane, while its metabolites also play a major role in signaling. The activity of phospholipase A_2 can stimulate the release of arachidonic acid, a main substrate in the biosynthesis of eicosanoids, such as prostaglandins, whereas phospholipase C activates the release of diacylglycerol. Diacylglycerol, in turn, regulates the entire enzyme family referred to as protein kinase C, a signaling pathway involved in a multitude of cell processes, including differentiation, proliferation, metabolism, and programmed cell death (DE CRAENE et al. 2017).

Phosphatidylserine

Phosphatidylserine (PS) is an essential bioactive anionic glycerophospholipid, containing two fatty acid residues, as well as serine attached to a phosphoric acid residue.

In animals, PS is biosynthesized through a calcium-dependent reaction, in which the polar head-group of a pre-existing phospholipid (PC or PE) is exchanged. A portion of the newly-synthesized phosphatidylserine, after transfer to the mitochondrion, can be decarboxylated, producing PE. Similar to other phospholipids, the fatty acid composition of PS can be modified through the Lands cycle (LANDS 1958, VANCE 2018). PS is usually present at low levels, though its concentration may be as high as 20% of the total phospholipids in plasma membranes and the brain (VANCE 2018).

As an active phospholipid, PS plays an important role in multiple signaling pathways. Since the PS molecule is charged, it greatly affects cell membrane structure, as well as the incorporation of certain proteins and ions (PS is mostly present on the cytoplasm leaflet of the bilayer) (VANCE 2018). These interactions and the incorporation of specific proteins or enzymes, often via calcium channels, are essential to specific activity and normal signaling. It is through these mechanisms that PS is directly involved in brain signaling, incorporating signal transduction proteins in neurons, and thus activating them (KIM et al. 2014).

PS is a key regulator of apoptosis. Increased concentration of Ca^{2+} activates scramblase, an enzyme that translocates PS to the outer leaflet of the lipid bilayer. Cell surface exposure of PS most likely enables immune system cells (e.g., macrophages) to bind onto a damaged cell through the proper receptors and remove it (BEVERS and WILLIAMSON 2016). PS also plays a major role in blood clotting by stimulating the activation of prothrombin to thrombin (LENTZ 2003).

Other phospholipids

Milk fat globule membranes also include other phospholipids and their derivatives, among them lysophosphatidylcholine, lactocerebroside, and glucocerebroside.

Lysophosphatidylcholine (LPC) can be produced from PC during digestion and absorbed. It can also be synthesized from PC in the body by phospholipase A_2. Lysophosphatidylcholine contains docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and as such can deliver these acids to the brain using specific transport mechanisms (LAW et al. 2019). LPC may also exhibit antibacterial effects (RENSBURG et al. 1992).

Glucocerebroside (GluCer) and lactocerebroside (LacCer) are both sphingolipids. LacCer is produced when a galactose molecule (from the active form of UDP-galactose) is bonded onto the precursor (GluCer) by the β-galactosyltransferase enzyme. These phospholipids are important intermediates in the biosynthesis of more complex glycolipids, such as oli-

goglycosylcerebrosides or gangliosides, which incorporate additional carbohydrate residues into their structure (LINGWOOD 2011).

Glycolipids play an important role in the immune response and may induce the stabilization of lipid rafts. Glycolipids present on macrophage surfaces are involved in interactions between carbohydrate groups, facilitating the binding of bacteria and fungi and their subsequent elimination (LINGWOOD 2011). When present on the outer leaflet of the lipid bilayer, they form a structure known as a glycocalyx – a membrane coating covered with carbohydrate residues. This coating serves a protective function, but also plays a major role in intercellular communication, targeting of pathogens, and modulation of the inflammatory response (D`ANGELO et al. 2013).

Nutritional aspects of milk polar lipids

There is increasing number of scientific literature considering the health-promoting properties of the milk fat globule membrane components (TOKAS 2019). Many reports indicate a direct relationship between the consumption of membrane components, including polar lipids, and disease. Phospholipids and sphingolipids show a broad spectrum of activities as functional ingredients due to their regulatory properties, in addition to their structural functionalities. They are also effective at low concentrations (SCHMELZ 2000). The biological activity of phospholipids and their metabolites relates to such interactions as anti-carcinogenic, cognitive development, neurological diseases and aging (e.g. Parkinson, Alzheimer), reduction of cardiovascular risk and inflammation, liver recovery, neonatal gut development and gastroprotective role (DEWETTINCK et al. 2008, RODRIGUEZ-ALCALA et al. 2017, NICOLSON and ASH 2014).

DILLEHAY et al. (1994) treated mice with 1,2-dimethylhydrazine to induce colon cancer and showed that mice fed diets supplemented with milk sphingomyelin had a lower (20%) incidence of colon tumours compared with 47% in controls. These results showed that consumption of sphingomyelin affects the behaviour of colonic cells. In another study ZHANG et al. (2008) showed that dietary sphingomyelin inhibited the tumorigenesis and increased alkaline sphingomyelinase (a key enzyme responsible for sphingomyelin digestion in the gut) activity in the colon by 65%. SCHMELZ et al. (1996) reported that the administration of isolated dairy sphingomyelin in diet of CF1 mice, transformed malignant adenocarcinoma to benign adenoma.

CASTRO-GOMEZ et al (2016) investigated the in vitro effect of a concentrate of phospho- and sphingolipids obtained from buttermilk. The research

work showed antiproliferative effect on ovary cancer lines, which could be explained by the presence of sphingomyelin in the extract.

In the human body especially high concentration of phospholipids occurs in the brain, where together with long-chained polyunsaturated omega-3 fatty acids constitute the basic building blocks of the nervous system. So many research work relates to phospholipid role in the development of age-related diseases and Alzheimer's disease (SPITSBERG 2005). There are multiple studies indicating that phosphatidylserine supplementation may positively affect brain function (memory), improve health, slow ageing, and produce beneficial effects in Alzheimer's patients (DEWETTINCK et al. 2008, HASHIOKA et al. 2004). Short-term supplementation with PS was also shown to improve exercise capacity during high-intensity cycling, which might suggest an innovative application as a supplement (KINGSLEY 2006).

Phosphatidylcholine is essential for normal functioning of mitochondria, as well as protecting them against reactive oxygen species produced during ATP generation (HAILEY et al. 2010). In rodent studies, it has been proven that the introduction to the diet of milk-derived phospholipids has positive acting in the treatment of steatosis and liver enlargement (WAT et al. 2009). In addition, PC supports the regeneration of alcohol-damaged liver (KHARBANDA et al. 2006), and protects gastrointestinal cells from the harmful effects of toxins (ANAND et al. 1999).

Many studies have shown that consuming sphingomyelin, in addition to its anti-cancer effect, can have beneficial effects, including the regulation of cholesterol levels and protection against bacterial infections and mycotoxins (VESPER et al. 1999).

Dietary lipid supplementation is recommended to improve health by modifying and restoring the composition of cellular and intracellular (mainly mitochondrial) membranes (NICOLSON and ASH 2014). Defects in cell and intracellular membranes are common to all chronic conditions, including cancer and normal processes such as aging. Oxidative stress occurs when the production of reactive oxygen species (superoxide, hydroxyl radicals or hydrogen peroxide) is in excess to the cell's ability to destroy these molecules with its natural antioxidants (HALLIWELL 2006). Cellular targets of this reactive species can be nucleic acids, proteins and also lipids, and mitochondrial structures are especially sensitive to oxidative damage (WEI and LEE 2002). So phospholipid supplementation can have a number of positive effects and has been successfully used in many chronic diseases, without any toxic effects for human (NICOLSON and ASH 2014).

Milk and milk products can be a valuable source of bioactive membrane lipids (Table 2). Raw milk has a polar lipid content of 9.4–40 mg/100 g of milk (ROMBAUT and DEWETTINCK 2006). They are mainly associated with the milk fat globule membrane. Their content in various dairy products is associated with the fat content of the product, so the high-fat products are rich in phospholipids. The most polar lipids are concentrated in the butterserum, but the technological usefulness of this product for obtaining polar lipids is limited. Butter can be considered the best source of phospholipids, due to its high fat content. However, during churning, the membrane of milk fat globule is broken and largely migrates to the aqueous phase, partly due to their high affinity for proteins (YEAGLE 2014, AMBROZIAK and CICHOSZ 2013). So buttermilk is a low-fat product with high concentration of phospholipids. Considering the content of phospholipids in relation to the dry mass, buttermilk contains 4–5 times more than other products (ROMBAUT et al. 2005, AMBROZIAK and CICHOSZ 2013). Taking this into account, buttermilk can be considered as an interesting source for further purification and concentration of phospholipids to obtain a product with high functional and nutritional value.

Table 2

Polar lipid content of some dairy products (PIMENTEL et al. 2016, ROMBAUT and DEWETTINCK 2006)

Product	mg/100 g of product	g/100 g of fat
Raw milk	9–40	0.7–0.9
Cream	139–190	0.3–0.9
Butter	70–230	0.1–0.3
Buttermilk	9–160	4.5–33.1
Butterserum	660–1250	14.8–48.4
Yoghurt skimmed	18	5.5
Kefir semiskimmed	34	2.3
Ricotta	279	2.7
Cottage cheese	56–376	1.3–5.3
Cheddar	154	0.5
Emmental	110	0.4

Conclusion

The present paper describes the main groups of polar lipids found in milk. Polar lipids are not only constituents of milk fat globule membranes, but also major components of biomembranes. They serve as a barrier that isolates cell's interior from the environment – any change or damage to the structure of these lipids, caused by external factors, is the primary means of signaling a threat to the entire cell. From these basic functions, cells have evolved a variety of mechanisms of intercellular and intracellular

signaling, with specific functions activated based on the level of polar lipids and their metabolites.

There has been an increasing number of reports documenting the health benefits of milk lipid consumption. Although they are present in milk in small quantities, their unique properties may help prevent and alleviate numerous diseases. Due to their amphiphilic properties, they play a major role in lipid metabolism and may prove useful in the prophylaxis and treatment of various diseases of affluence.

Translated by Joanna Molga

Accepted for print 13.12.2021

References

Ambroziak A., Cichosz G. 2013. *Fosfolipidy mleka jako nutraceutyk*. Pol. Merk. Lek., 34: 62–66.

Anand B.S., Romero J.J., Sanduja S.K., Lichtenberger L.M. 1999. *Phospholipid association reduces the gastric mucosal toxicity of aspirin in human subjects*. Am. J. Gastroenterol., 94: 1818–1822.

Bevers E.M., Williamson P.L. 2016. *Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane*. Physiol. Rev., 96: 605–645.

Castro-Gomez P., Rodríguez-Alcalá L.M., Monteiro K.M., Ruiz A.L., Carvalho J.E., Fontecha J. 2016. *Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions isolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines*. Food Chem., 212: 695–702.

D`Angelo G.D., Capasso S., Sticco L., Russo D. 2013. *Glycosphingolipids: synthesis and functions*. Febs J., 280: 6338–6353.

Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C., Noyon C., Ruysschaert J.M., Van Antwerpen P., Govaerts C. 2016. *Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells*. J. Biol. Chem., 291: 3658–3667.

De Craene J.O., Bertazzi D.L., Bär S., Friant S. 2017. *Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways*. Int. J. Mol. Sci., 18: E634.

Deeth H.C. 1997. *The role of phospholipids in the stability of milk fat globules*. Aust. J. Dairy Technol., 52: 44–46.

Dewettinck K., Rombaut R., Thienpont N., Le T.T., Messens K., Camp J.V. 2008. *Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material*. Int. Dairy J., 18: 436–457.

Dillehay D.L., Webb S.K., Schmelz E.M., Merrill A.H. 1994. *Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice*. J. Nutr., 124: 615–620.

Donovan S.M. 2006. *Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs*. J. Pediatr., 149: 49–61.

D'Souza K., Epand R.M. 2014. *Enrichment of phosphatidylinositols with specific acyl chains*. Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1838: 1501–1508.

El-Loly M.M. 2011. *Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane – a review*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 61: 7–32.

Fong B.Y., Norris C.S., MacGibbon A.K.H. 2007. *Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane*. Int. Dairy J., 17: 275–288.

Gibellini F., Smith T.K. 2010. *The Kennedy pathway – de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine*. IUBMB Life, 62: 414–428.

Hailey D.W., Rambold A.S., Satpute-Krishnan P., Mitra K., Sougrat R., Kim P.K., Lippincott-Schwartz J. 2010. *Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation*. Cell, 141: 656–667.

HALLIWELL B. 2006. *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J. Neurochem., 97: 1634–1658.

HAN X., HOLTZMAN D.M., MCKEEL D.W. 2001. *Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry*. J. Neurochem., 77: 1168–1180.

HANNUN Y.A., OBEID L.M. 2018. *Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 19: 175–191.

HASHIOKA S., MONJI A., HAN Y.H., NAKANISHI H., KANBA S. 2004. *Potentiality of phosphatidylserine (PS)-liposomes for treatment of Alzheimer's disease*. J. Neuroimmunol., 154: 119.

HEID H.W., KEENAN T.W. 2005. *Intracellular origin and secretion of milk fat globules*. Eur. J. Cell Biol., 84: 245–258.

JONES E. 2007. *The physiology of lactation*. Paediatr. Child Healt., 17: 244–248.

KENNEDY E.P., WEISS S.B. 1956. *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids*. J. Biol. Chem., 222: 193–214.

KHARBANDA K.K., MAILLIARD M.E., BALDWIN C.R., BECKENHAUER H.C., SORRELL M.F., TUMA D.J. 2006. *Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway*. J. Hepatol., 46: 314–321.

KIM H.Y., HUANG B.X., SPECTOR A.A. 2014. *Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function*. Prog. Lipid Res., 56: 1–18.

KINGSLEY M. 2006. *Effects of phosphatidylserine supplementation on exercising humans*. Sports Med., 36: 657–669.

KRAHMER N., GUO Y., WILFLING F., HILGER M., LINGRELL S., HEGER K., NEWMAN H.W., SCHMIDT-SUPPRIAN M., VANCE D.E., MANN M., FARESE JR. R.V., WALTHER T.C. 2011. *Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase*. Cell Metab., 14: 504–515.

KUCHTA A.M., KELLY M.P., STANTON C., DEVERY R.A. 2012. *Milk fat globule membrane – a source of polar lipids for colon health? A review*. Int. J. Dairy Technol., 65: 315–333.

LANDS W.E.M. 1958. *Metabolism of glicerolipides: a comparison of lecithin and triglyceride synthesis*. J. Biol. Chem., 231: 883–888.

LAW S.H., CHAN M.L., MARATHE G.K., PARVEEN F., CHEN C.H., KE L.Y. 2019. *An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases*. Int. J. Mol. Sci., 20: 1149.

LEE H., PADHI E., HASEGAWA Y., LARKE J., PARENTI M., WANG A., HERNELL O., LÖNNERDAL B., SLUPSKY C. 2018. *Compositional dynamics of the milk fat globule and its role in infant development*. Front. Pediatr., 6: 1–21.

LENTZ B.R. 2003. *Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation*. Prog. Lipid Res., 42: 423–438.

LINGWOOD C.A. 2011. *Glycosphingolipid functions*. Cold Spring Harbor Persp. Biol., 3(7): a004788.

MATHER I.H., KEENAN T.W. 1998. *Origin and Secretion of Milk Lipids*. J. Mammary Gland Biol., 3: 259–273.

MERRILL A.H. 2011. *Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics*. Chem. Rev., 111: 6387–6422.

NICOLSON G.L., ASH M.E. 2014. *Lipid replacement therapy: A natural medicine approach to replacing damaged lipids in cellular membranes and organelles and restoring function*. Biochim. Biophys. Acta, 1838: 1657–1679.

PIMENTEL L., GOMES A., PINTADO M., RODRIGUEZ-ALCALA L.K. 2016. *Isolation and analysis of phospholipids in dairy foods*. J. Anal. Methods Chem., 2016: 9827369.

RAMSTEDT B., LEPPIMÄKI P., AXBERG M., SLOTTE J.P. 1999. *Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography*. Eur. J. Biochem., 266: 997–1002.

RAWICZ W., OLBRICH K.C., MCINTOSH T., NEEDHAM D., EVANS E. 2000. *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers*. Biophys. J., 79: 328–339.

RENSBURG VAN E.J., JOONE C.K., O'SULLIVAN J. F., ANDERSON R. 1992. *Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids*. Antimicrob. Agents Chemother., 36: 2729–2735.

RODRIGUEZ-ALCALA L.M., CASTRO-GÓMEZ M.P., PIMENTEL L.L., FONTECHA J. 2017. *Milk fat components with potential anticancer activity—a review.* Biosci. Rep., 37(6): BSR20170705.

ROMBAUT R., CAMP J. V., DEWETTINCK K. 2005. *Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method.* J. Dairy Sci. 88(2): 482–488.

ROMBAUT R., DEWETTINCK K. 2006. *Properties, analysis and purification of milk polar lipids.* Int. Dairy J., 16: 1362–1373.

RONG X., WANG B., DUNHAM M.M., HEDDE P.N., WONG J.S., GRATTON E., YOUNG S.G., FORD D.A., TONTONOZ P. 2015. *Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion.* eLife, 4: e06557.

SÁNCHEZ-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.* Int. Dairy J., 19: 273–278.

SCHMELZ E.M. 2000. *Dietary sphingomyelin and other sphingolipids in health and disease.* Brit. Nutr. Found. Bull., 25: 135–139.

SCHMELZ E.M., DILLEHAY D.L., WEBB S.K., REITER A., ADAMS J., MERRILL JR A.H. 1996. *Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1, 2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis.* Cancer Res., 56: 4936-41.

SIMONS K., IKONEN E. 1997. *Functional rafts in cell membrane.* Nature, 387: 569–572.

SINGH H. 2006. *The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications.* Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 11: 154–163.

SMOCZYŃSKI M. 2017. *Role of phospholipid flux during milk secretion in the mammary gland.* J. Mammary Gland Biol., 22: 117–129.

SMOCZYŃSKI M., STANIEWSKI B., KIEŁCZEWSKA K. 2012. *Composition and structure of the bovine milk globule membrane – some nutritional and technological implications.* Food Rev. Int., 28: 188–202.

SPITSBERG V. L. 2005. *Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical.* J. Dairy Sci., 88: 2289–2294.

TOKAS J., PUNIA H. 2019. *Milk fat globule membrane (MFGM): An ingredient of dairy products as nutraceutical.* Trends Pept. Protein Sci., 4: 1–9.

VANCE D.E., RIDGWAY N.D. 1988. *The methylation of phosphatidylethanolamine.* Prog. Lipid Res., 27: 61–79.

VANCE J.E. 2018. *Historical perspective: phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from the 1800s to the present.* J. Lipid Res., 59: 923–944.

VEEN VAN DER J.N., KENNELLY J.P., WAN S., VANCE J.E., VANCE D.E., JACOBS R.L. 2017. *The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease.* Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1859: 1558–1572.

VESPER H., SCHMELZ E.M., NIKOLOVA-KARAKASHIAN M.N., DILLEHAY D.L., LYNCH D.V., MERRILL A.H. 1999. *Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition.* J. Nutr., 129: 1239–1250.

WALSTRA P. 1985. *Some comments on the isolation of fat globule membrane material.* J. Dairy Res., 52: 309–213.

WAT E., TANDY S., KAPERA E., KAMILI A., CHUNG R.W.S., BROWN A., ROWNEY M., COHN J.S. 2009. *Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet.* Atherosclerosis, 205: 144–150.

WEI Y.H., LEE H.C. 2002. *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging.* Exp. Biol. Med., 227: 671–682.

YEAGLE P.L. 2014. *Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins.* Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1838: 1548–1559.

ZHANG P., LI B., GAO S., DUAN R.D. 2008. *Dietary sphingomyelin inhibits colonic tumorigenesis with an up-regulation of alkaline sphingomyelinase expression in ICR mice.* Anticancer Res., 28: 3631–5.

European Food Research and Technology
https://doi.org/10.1007/s00217-022-04075-y

ORIGINAL PAPER

The influence of buttermilk powder on the stability of emulsion and colloidal phases of homogenized milk

Anna Garczewska-Murzyn[1] · Katarzyna Kiełczewska[1] · Michał Smoczyński[1]

Received: 11 May 2022 / Revised: 15 June 2022 / Accepted: 18 June 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

The aim of the study was to determine the influence of homogenization and buttermilk powder addition on the dispersion of milk fat globules, viscosity and heat stability (HS) of milk. Milk was treated by high-pressure homogenization (HPH, 100 MPa, temperatures 4, 20, 40, 60 °C), as well as conventional homogenization (20 MPa, temperature 60 °C). Buttermilk powder was added to treated milk at 0.3–1.2%, at intervals of 0.3%. HPH decreased the diameter of milk fat globules, and the noted decrease was proportional to temperature, whereas the effectiveness of conventional homogenization was similar to HPH conducted at 40 °C. The addition of buttermilk promoted milk fat dispersion when HPH was conducted at a temperature of 20 °C. The HS and viscosity of milk decreased after homogenization and increased after the addition of buttermilk powder. As a result, the final product containing buttermilk powder was characterized by similar HS and viscosity to raw (baseline) milk.

Keywords Milk · Buttermilk · Homogenization · Size of milk fat globules · Heat stability · Viscosity

Introduction

Native milk fat globules are unique structures. The lipid core, an integral part of every milk fat globule, is stabilized by a membrane that protects milk fat globules against flocculation and coalescence [1, 2]. It also prevents milk fat oxidation and hydrolysis, which improves milk's suitability for processing in the dairy industry [3–5].

A native milk fat globule membrane (MFGM) is a complex structure made of various components, including nonpolar and polar lipids (such as phospholipids and cholesterol), proteins, glycoproteins, enzymes, water, carotenoids, vitamin A and metals (iron, copper) [6–9]. The MFGM is a rich source of lipids with a varied composition as well as proteins that deliver health benefits for consumers from all age groups [10, 11].

Sweet (industrial) buttermilk is a rich source of MFGM components because native MFGM fragments are transferred to buttermilk during churning. Buttermilk also contains a small amount of milk fat, i.e., a large number of small milk fat globules [2, 12–14]. In addition to MFGM, a natural emulsifier, buttermilk powder also contains milk plasma proteins such as casein and whey proteins. This is an important consideration because the raw materials and products processed in the dairy industry are non-homogenous and multiphase systems made of multiple components.

Stable emulsions can be produced with the involvement of mechanical methods, including pressure homogenization that is widely applied in the dairy industry [15]. Homogenization decreases the size of milk fat globules, increases their number and surface area and modifies MFGM properties. High-pressure homogenization (HPH) inactivates milk microorganisms and increases milk temperature. This emerging technology reduces microbial counts, and it can replace homogenization or pasteurization or decrease pasteurization temperature while effectively eliminating pathogenic microorganisms [16–19].

Homogenization leads to milk fat dispersion, and it promotes protein modification in full-fat and skim milk. In skim milk, HPH slightly decreases the size of casein micelles by promoting the dissociation of κ-, αs1- and αs2-casein and the disintegration of casein micelles [19]. This process also leads to the denaturation of whey proteins, mostly β-lactoglobulin and, to a lesser degree, α-lactoglobulin [20].

✉ Michał Smoczyński
michal.smoczynski@uwm.edu.pl

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

Published online: 05 July 2022

In full-fat milk, homogenization promotes the adsorption of milk proteins on the enlarged surface of milk fat globules [17, 21]. Homogenization increases the surface area of milk fat globules many-fold, and surface-active plasma components (milk proteins in milk without surfactants) are adsorbed at the newly formed interface. Casein micelles and submicelles, and, to a lesser degree, whey proteins are incorporated into the structure of new MFGM [22]. When the colloidal phase of full-fat and skim milk is modified, the mineral equilibrium is disrupted due to the dissociation of colloidal calcium phosphate and phosphorus, and an increase in its content in the soluble phase of milk [23, 24]. The loss of equilibrium between colloidal phase components, i.e., proteins and minerals, leads to changes in the processing suitability of milk; therefore, HPH modifies the functional and technological properties of milk proteins. High-pressure homogenization increases milk's sensitivity to coagulants and decreases its heat stability (HS) [23, 25]. The presence of casein on the surface of homogenized fat suggests that fat globules with adsorbed proteins behave similarly to large casein micelles. The above decreases the HS of homogenized milk, which is an important parameter in the production of foods that are stabilized by means of high-temperature treatment. When pH is lowered to a value approximating the isoelectric point of casein, casein is rapidly coagulated with fat, which is an important trait in cheesemaking.

The addition of ingredients that lower surface tension at the milk fat/serum interface combined with partial homogenization treatment can limit changes in the colloidal phase. Sweet buttermilk subjected to HPH treatment is characterized by smaller milk fat globules, lower protein load and a higher proportion of MFGM components on the surface of homogenized fat globules than milk [26]. Kasinos et al. [27] demonstrated that the addition of phospholipids prevented an increase in the size of emulsion droplets and their protein load.

In this study, buttermilk was added to homogenized milk as a dairy emulsifier to produce a milk emulsion with a stable colloidal phase. Therefore, the aim of the study was to evaluate the combined effects of homogenization and the addition of buttermilk powder on milk fat globule dispersion and colloidal stability of milk.

Material and methods

The experimental material comprised cow's milk and sweet buttermilk. Milk was produced in the Bałdy Educational and Research Station of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Sweet buttermilk was obtained by periodic churning of butter, and it was spray-dried in a single-step process in the Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) ($T_{inlet} = 160$ °C, $T_{outlet} = 90$ °C) in the Professor Stefan Poznański Production Hall of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Raw milk was characterized by the following parameters: dry matter content—12.82% ± 0.10, fat content—3.81% ± 0.20, protein content—3.54% ± 0.01, casein content—2.84% ± 0.1, density – 1.029 g/cm^3 ± 0.002, pH – 6.72 ± 0.04. Buttermilk powder had the following parameters: lactose 45.63%, fat content—7.67%, protein content—34.41%, ash content—8.24%, water content—4.05%.

Experimental design

Buttermilk powder was added to milk with standardized fat content (3.5%) at 0.3–1.5% (w/v), at intervals of 0.3% (w/v). Milk with and without buttermilk powder with a volume of 800 mL was subjected to conventional homogenization at a pressure of 20 MPa and a temperature of 60 °C, as well as (HPH) at a pressure of 100 MPa and temperature of 4, 20, 40 and 60 °C in the PandaPlus 2000 homogenizer (Gea Niro Soavi, Parma, Italy). The experimental design is presented in Fig. 1.

Non-homogenized milk with 3.5% fat content without the addition of buttermilk was the control. The experiment was conducted in four independent replicates involving four different batches of raw milk.

Size of milk fat globules

The size of milk fat globules was measured by laser diffraction with the Mastersizer 3000 particle size analyzer equipped with a He–Ne laser (632.8 nm) and the Hydro EV automated wet dispersion unit (Malvern Instrument, UK). The refractive index for milk fat and Milli-Q® deionized water (Millipore, Molsheim, France) was set at 1.46 and 1.33, respectively, and obscurance ranged from 10 to 12%. The following parameter was measured: De Brouckere Mean Diameter, $d43 = \Sigma d_i^4 n_i / \Sigma d_i^3 n_i$, where n_i is the number of milk fat globules with diameter d_i. The measurement was performed according to the operating instructions for the particle size analyzer.

Determinants of colloidal stability

The HS of milk was determined based on the time of heat coagulation at a temperature of 140 °C in an oil bath, according to the subjective HS assay described by White and Davies (TewesBis, Barczewo, Poland) [28].

Viscosity

Shear stress in milk samples was measured with a rotational rheometer (Rheolab QC, Anton Paar, Graz, Austria)

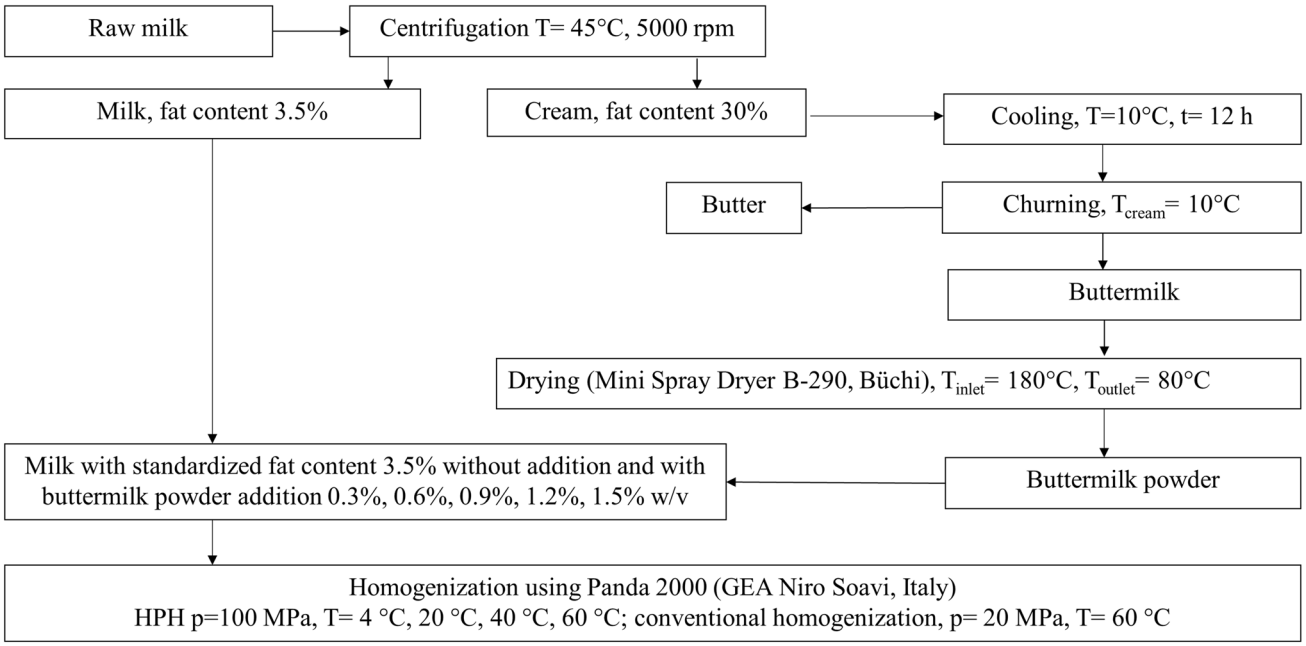


Fig. 1 Experimental design

in the DG42-SN20765 measuring system, at a temperature of 20 °C and a shear rate of 1–100 s^{-1}. Flow curves were plotted for the analyzed samples, and the linear relationship between changes in shear stress as a function of the shear rate was determined at a coefficient of determination $R^2 > 0.99$. Viscosity was expressed by direction coefficients, which are also the tangent of the angle, between the linear function and the *x*-axis.

Statistical analysis

The influence of homogenization (HP), buttermilk addition (BM) and the interaction between homogenization and buttermilk addition (HP × BM) on the analyzed milk parameters was determined by two-way ANOVA at a significance level of $P < 0.05$. When the effect of a given factor was observed, post hoc tests were performed. The values were compared with paired *t* tests on the assumption of equal variance, with the Bonferroni correction, at a significance level of $P < 0.05$ ($n = 15$). Data were processed statistically in Microsoft Excel.

Results and discussion

The obtained results focus on the effect of the homogenization process carried out at different temperatures and the variable addition of buttermilk powder on the size of fat globules, thermal stability and viscosity of homogenized milk. The aim of the research was to expand the scientific and application knowledge in the field of optimization of production parameters and properties of unfermented milk drinks, important from the technological point of view. The addition of buttermilk may also improve the nutritional properties of the product.

Size and surface area of milk fat globules

The particle size distribution was examined in the samples of milk without addition and with the addition of buttermilk powder. Examples of particle size distribution are shown in Fig. 2. Two peaks were observed in the particle size distribution of non-homogenized milk. These peaks were still present in conventionally homogenized milk and in HPH milk at 4 °C. Increasing the temperature to 20 °C resulted in the appearance of one peak in the range of small particles.

Two-way ANOVA revealed that the addition of buttermilk powder, the applied homogenization parameters and the interaction between these factors significantly decreased the mean diameter (d43) of milk fat globules in milk with 3.5% fat content ($P < 0.05$) (Table 1). Conventional homogenization and HPH at a temperature of ≥ 40 °C decreased d43 values in milk without buttermilk addition, whereas no changes in d43 values were noted in HPH-treated milk at ≤ 20 °C. When treatment temperature exceeded 40 °C, d43 values did not change and formed a statistically homogeneous group with d43 values in milk treated by conventional homogenization.

Depending on process parameters, the changes in the size of milk fat globules proceeded in a similar direction

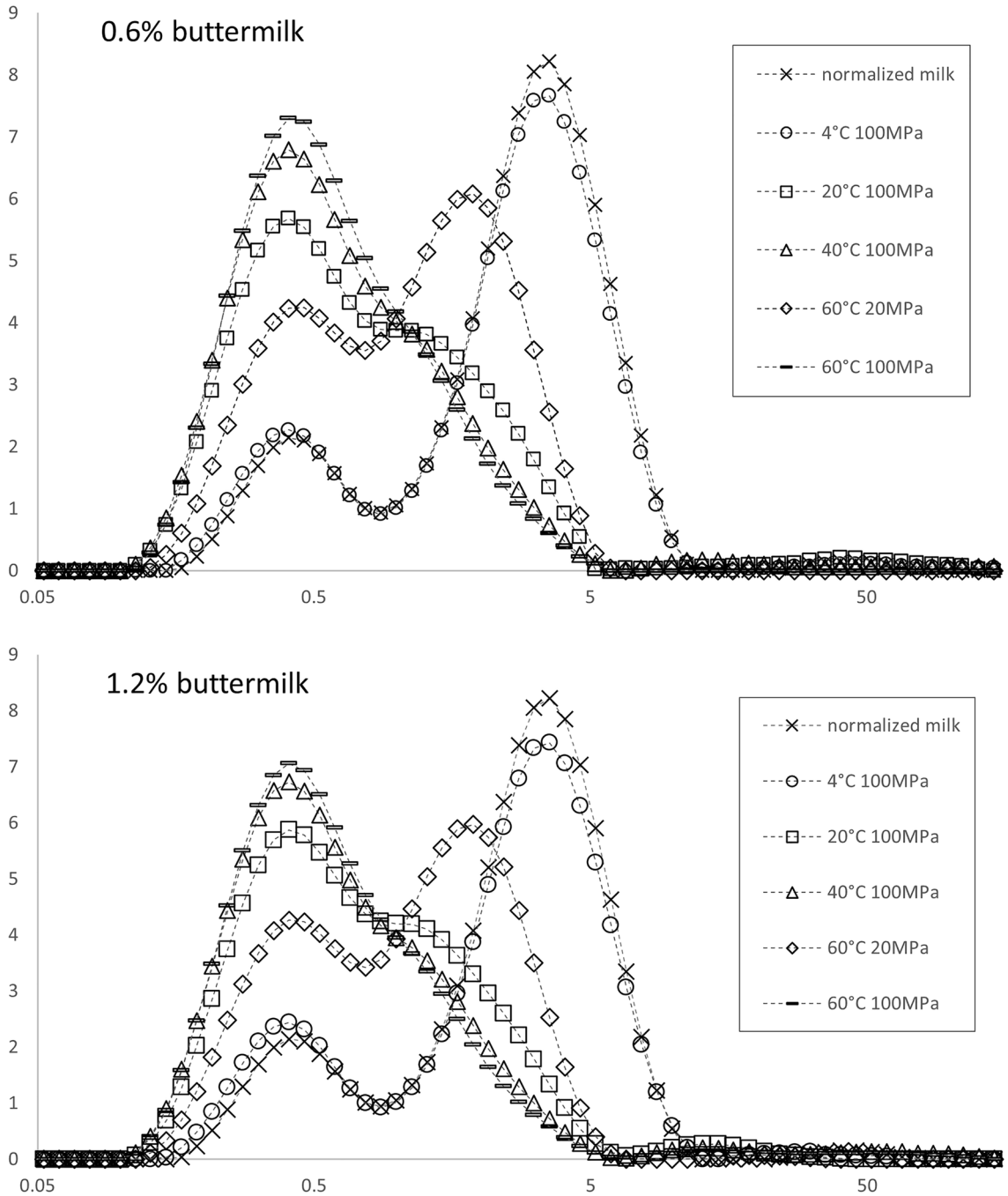


Fig. 2 Examples of particle size distribution in homogenized milk samples with 0.6 and 1.2% buttermilk addition

in milk with and without buttermilk. In HPH-treated milk with 0.3–1.2% buttermilk addition, the size of fat globules decreased already at a temperature of ≥ 20 °C, whereas d43 values in HPH-treated milk at 40 °C decreased only after 1.5% addition of buttermilk. In milk with 0.3–1.5% buttermilk addition, d43 values decreased after HPH treatment at ≥ 40 °C and after conventional homogenization. The addition of buttermilk powder did not induce significant changes in d43 values in non-homogenized milk.

In milk subjected to HPH treatment at a temperature of 20 and 40 °C, the size of milk fat globules decreased after 0.3% buttermilk addition, but significant changes in this parameter were not observed regardless of the amount of added buttermilk. In HPH-treated milk at 60 °C, the diameter of

Table 1 The effect of buttermilk addition and homogenization on the d43 diameter of milk fat globules

Milk homogenization	d43 [μm]					
	Buttermilk addition [%]					
	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Non-homogenized milk	4.85 ± 0.29^{aA}	4.78 ± 0.33^{aA}	4.51 ± 0.12^{aA}	4.74 ± 0.35^{aA}	4.54 ± 0.32^{aA}	4.93 ± 0.18^{aA}
100 MPa/4° C	4.42 ± 0.42^{aABC}	4.62 ± 0.46^{aABC}	4.69 ± 0.19^{aA}	4.68 ± 0.24^{aAB}	4.47 ± 0.31^{aABC}	3.61 ± 0.29^{bC}
100 MPa/20° C	4.53 ± 0.37^{aA}	3.26 ± 0.23^{bBC}	3.71 ± 0.23^{bAD}	3.02 ± 0.26^{bBCD}	3.60 ± 0.28^{aACD}	2.79 ± 0.28^{bcBC}
100 MPa/40° C	3.34 ± 0.20^{bA}	2.43 ± 0.14^{cB}	2.30 ± 0.16^{cB}	2.54 ± 0.15^{bB}	2.43 ± 0.13^{bB}	2.58 ± 0.15^{cB}
100 MPa/60° C	3.23 ± 0.15^{bA}	2.48 ± 0.07^{cB}	1.64 ± 0.12^{dC}	1.51 ± 0.13^{cC}	1.47 ± 0.13^{cC}	1.67 ± 0.13^{dC}
20 MPa/60° C	3.40 ± 0.17^{bA}	2.67 ± 0.17^{cBb}	2.04 ± 0.16^{cdC}	2.34 ± 0.16^{bBC}	2.50 ± 0.22^{bBC}	2.28 ± 0.19^{cBC}
Significance (P value)						
Homogenization (HP)	0.00					
Buttermilk addition (BM)	0.00					
HP × BM interaction	0.00					

The presented values are means ± SD ($n = 4$). Values that are not marked by letters in the superscript are not significant. Values marked by lowercase letters in the superscript differ significantly ($P < 0.05$) relative to the homogenization variant. Values marked by uppercase letters in the superscript differ significantly ($P < 0.05$) relative to buttermilk addition

fat globules decreased with a rise in buttermilk addition to 0.6%, after which no changes in this parameter were noted. In milk containing buttermilk and subjected to conventional homogenization, the size of fat globules differed only in samples with 0.3 and 0.6% buttermilk addition (Table 1).

Homogenization treatment also reduced the diameter of milk fat globules in other studies [16, 17]. A decrease in the size of milk fat globules with a rise in MFGM addition was also observed by Kanno and Kim [29] who analyzed the emulsifying properties of MFGM isolates and the physicochemical properties of milk fat emulsions stabilized with MFGM isolates. When buttermilk abundant in MFGM fragments is added to HPH-treated milk, MFGM fragments are deposited on milk fat globules, which increases the surface area of the resulting small milk fat globules [3].

In the present study, conventional homogenization at 20 MPa decreased the size of milk fat globules, whereas buttermilk addition had a minor effect on this parameter (Table 1). After conventional homogenization, milk was abundant in substances that could be deposited on the surface of the newly formed fat globules with reduced size; therefore, additional supply of MFGM fragments had no effect on globule size.

Homogenization decreases the diameter of milk fat globules, promotes fat emulsification and removes excess fat from dairy products. In milk with the same fat content, the homogenization-induced decrease in fat globule diameter increases total globule area. Buttermilk containing MFGM fragments from the churning process is added to homogenized milk to stabilize fat globules and prevent their agglomeration. Buttermilk is abundant in MFGM phospholipids which are surface-active ingredients that orient their tails toward polar molecules in water and their heads toward non polar molecules in fat. In homogenized milk, MFGM phospholipids coat small fat globules and prevent their aggregation into larger units [3].

Heat stability

Heat stability, namely the stability of milk proteins exposed to high temperature, preserves the colloidal properties of milk. Low HS can lead to the sedimentation or gelation of milk proteins during high-temperature treatment.

The HS of milk samples was significantly affected by homogenization parameters and buttermilk addition, but the interaction between these factors had no effect on the HS of milk. The above can be attributed to the fact that homogenization and buttermilk addition exerted different effects on HS. In milk without buttermilk, HPH treatment at 4 °C decreased HS, whereas the remaining homogenization variants did not induce significant changes in HS. The HS of milk with 0.3–1.5% buttermilk addition was not altered by homogenization, regardless of the applied treatment parameters, because buttermilk addition significantly increased the HS of homogenized milk in every analyzed variant. The lower the homogenization temperature, the greater the increase in the HS of milk with the lowest buttermilk addition. The HS of HPH-treated milk at 4 and 20 °C increased after the addition of buttermilk at ≥ 0.9 and ≥ 0.6%, respectively. In milk subjected to HPH at 40 and 60 °C, HS increased only after the addition of buttermilk at ≥ 1.2 and 1.5%, respectively. In milk subjected to conventional homogenization, HS increased when buttermilk was added at ≥ 1.2%. In non-homogenized milk, the addition of buttermilk at 0.3–1.5% did not induce significant changes in HS (Table 2).

Table 2 The effect of buttermilk powder addition and homogenization on the heat stability of milk

Milk homogenization	Heat stability [min]					
	Buttermilk addition [%]					
	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Non-homogenized milk	6.53 ± 0.32^{a}	6.52 ± 0.49^{a}	6.58 ± 0.49	6.92 ± 0.55	6.97 ± 0.64	7.39 ± 0.47
100 MPa/4° C	5.08 ± 0.36^{bA}	5.65 ± 0.31^{AB}	6.09 ± 0.51^{ABC}	7.06 ± 0.74^{BC}	7.01 ± 0.26^{C}	7.33 ± 0.48^{C}
100 MPa/20° C	5.48 ± 0.45^{abA}	6.17 ± 0.50^{AB}	6.49 ± 0.54^{BC}	7.42 ± 0.66^{C}	7.43 ± 0.55^{C}	7.71 ± 0.63^{C}
100 MPa/40° C	5.86 ± 0.49^{abA}	6.19 ± 0.66^{AB}	6.62 ± 0.58^{AB}	7.01 ± 0.47^{AB}	7.96 ± 0.61^{B}	8.04 ± 0.60^{B}
100 MPa/60° C	5.75 ± 0.62^{abA}	6.44 ± 0.40^{A}	6.55 ± 0.60^{A}	6.58 ± 0.62^{A}	7.67 ± 0.54^{AB}	8.56 ± 0.57^{B}
20 MPa/60° C	5.74 ± 0.61^{abA}	6.52 ± 0.48^{AB}	6.90 ± 0.32^{AB}	6.62 ± 0.43^{AB}	7.57 ± 0.35^{BC}	8.51 ± 0.55^{C}
Significance (P value)						
Homogenization (HP)	0.00					
Buttermilk addition (BM)	0.00					
HP × BM interaction	0.21					

The presented values are means ± SD ($n = 4$). Values that are not marked by letters in the superscript are not significant. Values marked by lowercase letters in the superscript differ significantly ($P < 0.05$) relative to the homogenization variant. Values marked by uppercase letters in the superscript differ significantly ($P < 0.05$) relative to buttermilk addition

According to the literature, HPH decreases ethanol stability [15] and HS of milk [23, 25]. The following factors compromise homogenized milk's resistance to coagulation agents: disruptions in the dynamic balance of proteins when selected casein fractions, in particular κ-casein that protects casein micelles, are dissociated from micellar casein [19], whey protein denaturation [20], adsorption of milk plasma components on the interface surface [22], and disruptions in mineral balance resulting from the dissociation of colloidal calcium phosphate and its transfer to the soluble phase of milk [23, 24].

Singh and Tokley [30] analyzed the effect of 10% (v/v) fresh cream addition on the HS of recombined skim milk powder. They suggested that surface-active ingredients in buttermilk, i.e., phospholipids and lipoproteins, displace skim milk proteins from MFGM during homogenization, thus increasing the HS of milk. Elling and Duncan [31] found that the amount of phospholipids incorporated into recovered MFGM is determined by, among others, homogenization pressure. Kasinos et al. [27] and Vanderghem et al. [12] also noted that sweet buttermilk and MFGM fragments contribute to an increase in the colloidal stability of milk proteins during exposure to high temperature.

Thermal treatment induces changes in MFGM proteins, including denaturation and interactions with milk proteins that involve sulfhydryl-disulfide interchange reactions. In full-fat milk, both β-lactoglobulin (β-Lg) and α-lactoglobulin (α-La) bind with fat globules during heating. Lactoglobulins could bind with MFGM via sulfhydryl-disulfide interchange reactions or when primary MFGM components are displaced by whey proteins. This process is facilitated by direct competition or the disintegration of MFGM during heating, which creates space for the absorption of whey proteins (denatured or not denatured at this stage) on the newly exposed surface of fat globules [32]. Homogenization decreases the size of milk fat globules and the protein load in the emulsion phase of sweet buttermilk relative to milk [26].

The observed changes in MFGM components probably exert a significant effect on the functional properties of dairy products, including their HS and rennet coagulation time. Increased addition of buttermilk powder, a product abundant in MFGM fragments, neutralizes the described changes in MFGM components, which improves the HS of milk.

Viscosity

The results of two-way ANOVA revealed that the interactions between homogenization parameters and buttermilk addition had no significant effect on milk viscosity. At the same time, milk viscosity was affected by homogenization parameters as well as the amount of added buttermilk. Homogenization did not affect the viscosity of milk samples, excluding HPH treatment at 40 °C which increased the viscosity of milk without buttermilk addition and milk with the 0.6% addition of buttermilk (Table 3).

According to the literature, the addition of buttermilk stabilizes the emulsion and colloidal phases of homogenized milk because buttermilk (obtained during churning) contains MFGM components that are rich in phospholipids. Phospholipids are amphiphilic molecules that stabilize fat globules in full-fat milk, and MFGM fragments are regarded as effective natural emulsifying agents [2].

Table 3 The effect of buttermilk powder addition and homogenization on milk viscosity

Milk homogenization	Viscosity [mPa·s]					
	Buttermilk addition [%]					
	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Non-homogenized milk	2.20 ± 0.03^{a}	2.45 ± 0.03^{ab}	2.45 ± 0.02^{a}	2.65 ± 0.02^{ab}	2.70 ± 0.06^{ab}	2.70 ± 0.02^{ab}
100 MPa/4° C	2.35 ± 0.03^{ab}	2.38 ± 0.01^{a}	2.43 ± 0.01^{a}	2.43 ± 0.01^{a}	2.55 ± 0.02^{ab}	2.60 ± 0.01^{a}
100 MPa/20° C	2.60 ± 0.05^{ab}	2.83 ± 0.01^{b}	2.88 ± 0.07^{ab}	2.95 ± 0.08^{ab}	3.05 ± 0.03^{a}	3.28 ± 0.05^{b}
100 MPa/40° C	2.73 ± 0.01^{b}	2.78 ± 0.01^{b}	2.88 ± 0.01^{b}	2.88 ± 0.02^{b}	2.88 ± 0.01^{a}	2.85 ± 0.02^{ab}
100 MPa/60° C	2.33 ± 0.00^{a}	2.33 ± 0.02^{a}	2.38 ± 0.02^{a}	2.48 ± 0.04^{ab}	2.48 ± 0.02^{b}	2.60 ± 0.05^{ab}
20 MPa/60° C	2.25 ± 0.00^{a}	2.30 ± 0.05^{a}	2.28 ± 0.02^{a}	2.28 ± 0.02^{a}	2.38 ± 0.03^{b}	2.48 ± 0.02^{a}
Significance (*P* value)						
Homogenization (HP)	0.00					
Buttermilk addition (BM)	0.00					
HP × BM interaction	0.34					

The presented values are means ± SD ($n = 4$). Values that are not marked by letters in the superscript are not significant. Values marked by lowercase letters in the superscript differ significantly ($P < 0.05$) relative to the homogenization variant

Conclusions

Homogenization increases the number of fat globules in milk, decreases fat globule diameter and increases the surface area of milk fat globules. The addition of buttermilk powder to homogenized milk induces a further decrease in fat globule diameter and an increase in globule surface area. Sweet buttermilk contains MFGM fragments that increase the colloidal stability of milk proteins, which is why buttermilk is added to dairy products, in particular non-fermented milks whose shelf life is prolonged by thermal treatment. Buttermilk powder is added to milk because MFGM fragments reverse changes in MFGM composition. Sweet buttermilk powder, which contains MFGM fragments, stabilizes the emulsion and colloidal phases of homogenized milk. MFGM components have emulsifying properties, and the addition of buttermilk produces milk with homogenized fat globules whose surface properties in the interface area resemble unprocessed milk fat globules.

Dairy products based on milk and buttermilk powder contain biologically active phospholipids and MFGM components that deliver health benefits. The technological characteristics of milk-based products containing buttermilk, such as HS, can also be improved by optimizing homogenization parameters.

Acknowledgements This work was financially supported by Minister of Education and Science in the range of 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.

Declarations

Conflict of 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.

Compliance with ethics requirements The research did not involve human participants and/or animals, and no informed consent was necessary.

References

1. Bourlieu C, Michalski MC (2015) Structure–function relationship of the milk fat globule. Curr Opin Clin Nutr 18(2):118–127. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000138
2. Dewettinck K, Rombaut R, Thienpont N, Le Trung T, Messens K, Van Camp J (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. Int Dairy J 18:436–457. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014
3. El-Loly MM (2011) Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane: a review. Pol J Food Nutr Sci 61:7–32. https://doi.org/10.2478/v10222-011-0001-0
4. Singh H, Gallier S (2017) Nature's complex emulsion: the fat globules of milk. Food Hydrocoll 68:81–89. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.011
5. Smoczyński M, Staniewski B, Kiełczewska K (2012) Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane—some nutritional and technological implications. Food Rev Int 28(2):188–202. https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595024
6. Danthine S, Blecker C, Paquot M, Innocente N, Deroanne C (2000) Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. Lait 80:209–222. https://doi.org/10.1051/lait:2000120
7. Huppertz T, Kelly AL (2006) Physical chemistry of milk fat globules. In: Fox PF, McSweeney PLH (eds) Advanced dairy chemistry volume 2 lipids. Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_5

8. Jukkola A, Rojas OJ (2017) Milk fat globules and associated membranes: colloidal properties and processing effects. Adv Colloid Interf 245:92–101. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.010
9. Singh H (2006) The milk fat globule membrane—a biophysical system for food applications. Curr Opin Colloid In 11:154–163. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.002
10. Ortega-Anaya J, Marciniak A, Jimenez-Flores R (2020) Milk lipids/milk fat globule membrane. In: McSweeney PLH, McNamara JP (eds) Encyclopedia of dairy sciences, 3rd edn. Academic Press, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00007-6
11. Keenan TW, Mather IH (2006) Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In: Fox PF, McSweeney PLH (eds) Advanced dairy chemistry volume 2 lipids. Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_4
12. Vanderghem C, Bodson P, Danthine S, Paquot M, Deroanne C, Blecker C (2010) Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. Biotechnol Agron Soc Environ 14:485–500
13. Conway V, Gauthier SF, Pouliot Y (2014) Buttermilk: much more than a source of milk phospholipids. Anim Front 4(2):44–51. https://doi.org/10.2527/af.2014-0014
14. Lambert S, Leconte N, Blot M, Rousseau F, Robert B, Camier B, Gassi JY, Cauty C, Lopez C, Gésan-Guiziou G (2016) The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. Food Res Int 83:121–130. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.002
15. Amador-Espejo GG, Suàrez-Berencia A, Juan B, Bárcenas ME, Trujillo AJ (2014) Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. J Dairy Sci 97:659–671. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7245
16. Hayes MG, Fox PF, Kelly AL (2005) Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. J Dairy Res 72:25–33. https://doi.org/10.1017/s0022029904000524
17. Pereda J, Ferragut V, Quevedo JM, Guamis B, Trujillo AJ (2007) Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. J Dairy Sci 90:1081–1093. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3
18. Pedras MM, Pinho CRG, Tribst AAL, Franchi MA, Cristianini M (2012) The effect of high pressure homogenization on microorganisms in milk. Int Food Res J 19(1):1–5
19. Sandra S, Dalgleish DG (2005) Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. Int Dairy J 15:1095–1104. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.015
20. Pereda J, Ferragut V, Quevedo JM, Guamis B, Trujillo AJ (2009) Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. Food Hydrocoll 23:1974–1979. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.010
21. Ye A, Anema SG, Singh H (2008) Change in surface protein of the fat globules during homogenization and heat treatment of concentrated milk. J Dairy Res 75:347–353. https://doi.org/10.1017/S0022029908003464
22. Zamora A, Ferragut V, Guamis B, Trujillo AJ (2012) Changes in surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenization and conventional treatments of milk. Food Hydrocoll 29:135–143. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.012
23. Kiełczewska K, Kruk A, Czerniewicz M, Kopeć M (2008) Colloidal stability of milk with various content of fat subjected to high-pressure homogenization. Pol J Food Nutr Sci 58(3):359–363
24. Zamora A, Ferragut V, Jaramillo PD, Guamis B, Trujillo AJ (2007) Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. J Dairy Sci 90(1):13–23. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72604-8
25. Ambroziak K, Kiełczewska K, Mickiewicz D, Dąbrowska A (2019) Advantages and disadvantages of partial high pressure homogenisation of milk in relation to full-stream homogenisation. Pol J Food Nutr Sci 69(3):279–287. https://doi.org/10.31883/pjfns/109987
26. Kiełczewska K, Ambroziak K, Krzykowska D, Aljewicz M (2021) The effect of high-pressure homogenization on the size of milk fat globules and MFGM composition in sweet buttermilk and milk. Int Dairy J 113:1–33. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104898
27. Kasinos M, Le Tran T, Van der Meeren P (2014) Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by products. Food Hydrocoll 34:112–118. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.030
28. Dumpler J, Huppertz T, Kulozik U (2020) Invited review: Heat stability of milk and concentrated milk: past, present, and future research objectives. J Dairy Sci 103(12):10986–11007. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18605
29. Kanno C, Kim DH (1990) A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities, and electrophoretic properties with those prepared by other methods. Agric Biol Chem 54:2845–2854. https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870405
30. Singh H, Tokley RP (1990) Effects of preheat treatments and buttermilk addition on the seasonal variations in the heat stability of recombined evaporated milk and reconstituted concentrated milk. Aust J Dairy Technol 45:10–16
31. Elling JL, Duncan SE (1996) Physical properties of 20% milk fat reformulated creams manufactured from cholesterol-reduced butteroil. J Food Sci 61:375–378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14197.x
32. Ye A, Singh H, Taylor MW, Anema S (2004) Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. Lait 84:269–283. https://doi.org/10.1051/lait:2004004

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

International Journal of Food Science +Technology

Institute of Food Science +Technology ifst

Original article

The effects of full-stream and partial high-pressure homogenisation on the properties of milk emulsion

Katarzyna Kiełczewska, Oskar Brożek, Paulina Rudkowska, Anna Garczewska-Murzyn & Michał Smoczyński*

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

(Received 3 June 2022; Accepted in revised form 30 August 2022)

Summary The study evaluated the effects of full-stream and partial high-pressure homogenisation (HPH) on the properties of milk with 3.5% fat content. During full-stream HPH, the size of particles decreased with an increase in temperature. Fat globules were smaller in milk treated by full-stream than partial HPH at 60°C. Creaming was not observed in milk subjected to full-stream HPH. In milk treated by partial HPH, the phase separation rate during ≤48 h of storage increased in samples processed at 60°C, 40°C and 20°C. Despite high top layer volume in milk that was HPH-treated at a temperature of ≥40°C, its fat content was lower than in milk homogenised at 20°C. The total difference in colour was approximately 1.5–2.0-fold higher in full-stream homogenised milk. Partial HPH can be applied in dairy products requiring milk fat dispersion with minimal changes in the components of the colloidal and soluble phases.

Keywords colour, fat globule size, high-pressure homogenisation, milk, phase separation.

Introduction

Homogenisation inhibits creaming during storage of liquid dairy products by a decrease in the size of milk fat globules. High-pressure homogenisation (HPH) inhibits microbial growth (Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007), but affects protein adsorption on the surface of homogenised fat globules (Ye *et al.*, 2008; Zamora *et al.*, 2012), whey protein denaturation (Hayes *et al.*, 2005), and it modifies the structural properties of casein micelles (Sandra & Dalgleish, 2005; Touhami *et al.*, 2022), which alters the functional properties of proteins and their coagulation (Sandra & Dalgleish, 2007). Research studies examining the influence of HPH on the properties of dairy products were carried out on drinking milk (Hayes *et al.*, 2005), milk concentrates (Mercan *et al.*, 2018a), milk powder (Mercan *et al.*, 2018b) and butter (Sert & Mercan, 2020). Homogenisation may also affect the nutritional properties of milk and milk products. Numerous studies have revealed differences in the digestion of native and homogenised fat globules (Ye *et al.*, 2010; Berton *et al.*, 2012). Milk also contains many bioactive ingredients whose native structure should be preserved to enhance the nutritional value of milk (Michalski & Januel, 2006; Smoczyński *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2021).

Full-stream homogenisation is the most common form of homogenisation in the dairy industry which is applied to process milk with a standardised fat content. In partial homogenisation, milk is centrifuged to separate skimmed milk from cream, and the obtained cream is homogenised. Homogenised cream is combined with skimmed milk to standardise the fat content of milk. Partial HPH enables the use of homogenisers with significantly lower processing capacity than the capacity of the entire processing line. Partial HPH does not involve skimmed milk and induces smaller changes in the colloidal stability of milk than full-stream homogenisation. However, partial HPH leads to the aggregation of milk fat globules and increases particle size relative to full-stream HPH; therefore, this treatment is less effective than full-stream homogenisation (Ambroziak *et al.*, 2019). Emulsion instability leads to creaming during product storage, but fat clusters formed during homogenisation can be broken up in the second stage of the process. The aim of this study was to compare the effects of two-stage full-stream and partial HPH conducted at different temperatures on selected properties of milk with 3.5% fat content, including milk fat

*Correspondent: Fax: (+48-89) 523 3402;
e-mail: michal.smoczynski@uwm.edu.pl

doi:10.1111/ijfs.16059

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

dispersion, the presence of clusters, emulsion stability and colour.

Materials and methods

Research material

Milk for the experiment was produced in the Bagdy Educational and Research Station of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. Milk was preserved through the addition of sodium azide to inhibit microbial growth. Milk was centrifuged at a temperature of 45°C in a continuous centrifuge (Tetra Pak - Obram, Tomaszkowo, Poland) and standardised to 3.5% fat content. Cream was standardised to 20% fat content.

Experimental design

Milk with 3.5% fat content and cream with 20% fat content were subjected to two-stage HPH in the Panda 2000 homogeniser (GEA Niro Soavi, Parma, Italy). In the partial high-pressure homogenisation process, cream (20% fat) was homogenised at 100/20 MPa and used to standardise skimmed milk and obtain milk with 3.5% fat content. In the full-stream homogenisation process, milk with 3.5% fat was homogenised at 100/20 MPa.

The homogenisation parameters (pressure and temperature) are presented in Table 1. Non-homogenised milk with 3.5% fat content was the control sample.

During the analysis, samples were refrigerated at a temperature of 4 ± 1°C. Milk samples were brought to room temperature before analysis. The samples were left to stand for approximately 1 h before the experiment to stabilise milk components.

Determination of the size of milk fat globules

The size of milk fat globules was measured by laser diffraction with the Mastersizer 3000 particle size analyser equipped with a He-Ne laser (632.8 nm) and Hydro EV automated wet dispersion unit (Malvern Instrument, Malvern, United Kingdom). The measurements were performed in the Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). The refractive index was determined at 1.46 in milk and 1.33 in deionised water as the dispersing agent, and obscurance ranged from 10% to 12%. The measurements involved samples of milk with 3.5% fat content with and without reagents that dissociate casein, removes absorbed materials from the surface of fat globules and prevent the aggregation of milk fat globules. The size of fat globules was measured by adding 1 unit of 0.4 M trisodium citrate containing 4% SDS per 3 units of milk (Huppertz *et al.*, 2003). The following parameters were determined:

$$D3,2 = \frac{\sum d_i^3 n_i}{\sum d_i^2 n_i}$$

$$D4,3 = \frac{\sum d_i^4 n_i}{\sum d_i^3 n_i}$$

where: $D3,2$ is the surface-weighted mean diameter (Sauter Mean Diameter), $D4,3$ is the volume-weighted mean diameter (De Brouckere Mean Diameter), and n_i is the number of particles with diameter d_i.

Table 1 Homogenisation parameters.

Homogenisation	Pressure (MPa)	T_1 (°C)[1]	T_2 (°C)[2]	ΔT (°C)[3]
Milk	p_1 = 100;	T = 60.0	T = 53.0 ± 1.0	−7.0 ± 0.8
(full-stream	p_2 = 20	T = 40.0	T = 45.7 ± 1.5	5.7 ± 1.3
homogenisation)		T = 20.0	T = 38.3 ± 6.4	18.3 ± 5.9
Cream	p_1 = 100;	T = 60.0	T = 56.0 ± 3.8	−4.0 ± 3.5
(partial	p_2 = 20	T = 40.0	T = 50.3 ± 4.0	10.3 ± 3.5
homogenisation)		T = 20.0	T = 43.3 ± 2.0	23.3 ± 1.5

[1]Initial temperature measured before homogenisation.
[2]Final temperature measured immediately after milk/cream homogenisation.
[3]$\Delta T = (T_2 - T_1)$.

Microscopic analysis

Milk was stained with 1.0% (w/v) Nile Blue and 1.0% (w/v) Fast Green (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) (Ye *et al.*, 2010). Milk samples were analysed under the Nikon Eclipse Ti-E confocal microscope with C1 control software (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands) at 100× magnification.

Phase separation

Milk samples were placed in 100 mL graduated cylinders and refrigerated for 192 h. The volume of the top and bottom layers was measured every 24 h (Huppertz *et al.*, 2003). The top and bottom layers were thoroughly stirred and used to determine fat content. The fat content of the top and bottom layers was determined after 120 and 192 h. If visible creaming was not observed, the top and bottom layers that accounted for 10% and 90% of total milk volume, respectively, were collected for analysis. The fat content of milk and cream was determined with a butyrometer according to standards ISO 19662:2018a (IDF 238) and **ISO** 19660:2018b (IDF 237), respectively.

Colour analysis

Colour was analysed immediately after homogenisation, and the samples were stirred before the

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

measurements. The colour analysis was performed in CIELAB space, and colour was expressed by three values: L*, lightness from black (0) to white (100); a*, from green (−) to red (+); b*, from blue (−) to yellow (+). Colour parameters L*, a*, b* were measured with the CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Sensing Americas, Inc., New York, USA). The results were used to calculate saturation C* with formula $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$, and the total difference in colour between non-homogenised and homogenised milk was determined with the use of formula $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0.5}$. Measurements were carried out in accordance with the device manual.

Statistical analysis

The experiment was performed in triplicate. The results were analysed by one-way ANOVA, and the significance of differences between means was determined in Duncan's test at $\alpha = 0.05$. Data were processed statistically in StatSoft Inc. Statistica v. 13.1 software (Tulsa, Oklahoma, USA).

Results and discussion

An analysis of HPH parameters revealed that the range and direction of changes in milk temperature were influenced by initial milk temperature (Table 1). Homogenisation increased the temperature of milk with an initial temperature of 20 and 40°C, whereas milk with an initial temperature of 60°C was cooled during the process. Temperature was measured after milk had left the homogeniser, and the homogeniser was not equipped with a thermal jacket. The above can probably explain the observed differences in milk temperature after homogenisation, despite the fact that the same pressure was applied in all treatments. The application of high pressure increases the temperature of HPH-treated products (Hayes *et al.,* 2005; Sandra & Dalgleish, 2005; Pereda *et al.,* 2007).

The effect of homogenisation on the size of milk fat globules

The values of parameters *D*3,2 and *D*4,3 revealed that full-stream HPH decreased the size of milk particles and milk fat globules, and the noted decrease was proportional to processing temperature (Table 2). In other studies, an increase in temperature during HPH treatment also reduced the size of milk fat globules (Hayes *et al.,* 2005; Zamora *et al.,* 2012). No significant differences in particle size were found between samples of full-stream HPH-treated milk with and without the addition of trisodium citrate and SDS.

Partial HPH increased the values of *D*3,2 and *D*4,3 relative to non-homogenised milk and samples subjected to full-stream HPH with identical process parameters. A significant decrease in the values of *D*3,2 and *D*4,3 was noted after the addition of trisodium citrate and SDS, which indicates that milk fat globules were aggregated by casein adsorbed on their surface, and that aggregates were disintegrated after casein dissociation. The size of non-aggregated fat globules (after disaggregation) in milk processed by partial HPH indicates that this treatment also decreased the size of milk fat globules. Partial HPH conducted at a temperature of 60°C was less effective in decreasing the values of *D*3,2 and *D*4,3 than full-stream HPH with identical parameters. No significant differences in the size of milk fat globules were observed at a temperature of 20 and 40°C, regardless of the applied HPH treatment (Table 2).

In milk treated by partial HPH, the aggregation of milk fat globules contributed to the formation of large protein and fat complexes (Fig. 1a). The application of a SDS/trisodium citrate that promotes the disintegration of aggregates into individual milk fat globules (Fig. 1b) did not induce significant differences in the size of milk fat globules relative to full-stream HPH (Fig. 1c).

In conclusion, two-stage partial HPH was not effective in preserving the integrity of individual fat globules, and similar results were obtained in a previous study investigating single-stage partial HPH (Ambroziak *et al.,* 2019).

Effect of homogenisation on creaming

Visible signs of creaming as well as differences in the fat content of the top and bottom layers that accounted for 10% and 90% of total milk volume were not observed in milk samples subjected to full-stream HPH (data not shown).

High-pressure homogenisation also eliminated creaming in other studies (Hayes *et al.,* 2005; Pereda *et al.,* 2007; Boeneke *et al.,* 2009). Partial HPH clearly separated the emulsion phase (top layer) from bottom layer, and the volume of the top layer was higher than in non-homogenised milk in all cases (Fig. 2). Clear phase separation occurred already in the first 48 h of storage, after which the creaming rate increased in an ascending order in milk that was treated at 60, 40 and 20°C. After 72 h of storage the top layer volume was reduced with a decrease in processing temperature. The volume of the top layer did not change in milk treated at 40°C when milk was stored for more than 72 h, whereas in milk samples treated at 60°C, top layer volume decreased after 144 h of storage. In milk processed by partial HPH at a temperature of 20°C, no significant differences in top layer stratification were noted throughout storage.

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

Table 2 The influence of homogenisation on the size of milk particles and milk fat globules.

Homogenisation	Pressure	Temperature	*D*4,3 of milk particles (μm)	*D*4,3 of fat globules in milk containing trisodium citrate and SDS (μm)	*D*3,2 of milk particles μm)	*D*3,2 of fat globules in milk containing trisodium citrate and SDS (μm)
–	–	–	$3.66 \pm 0.47^{a\ C}$	$3.61 \pm 0.08^{a\ A}$	$1.94 \pm 0.16^{a\ C}$	$2.29 \pm 0.13^{a\ A}$
Full-stream	p_1 = 100 MPa, p_2 = 20 MPa	t = 60°C	$0.40 \pm 0.06^{c\ y}$	$0.41 \pm 0.04^{c\ y}$	$0.32 \pm 0.04^{b\ y}$	$0.28 \pm 0.02^{c\ y}$
		t = 40°C	$0.89 \pm 0.17^{b\ y}$	$0.62 \pm 0.13^{c\ x}$	$0.38 \pm 0.02^{b\ y}$	$0.35 \pm 0.03^{c\ x}$
		t = 20°C	$1.14 \pm 0.14^{b\ y}$	$1.21 \pm 0.17^{b\ x}$	$0.49 \pm 0.06^{b\ y}$	$0.54 \pm 0.08^{b\ x}$
Partial	p_1 = 100 MPa, p_2 = 20 MPa	t = 60°C	$9.66 \pm 0.83^{B\ x\ X}$	$0.93 \pm 0.11^{BC\ x\ Y}$	$2.55 \pm 0.12^{B\ x\ X}$	$0.39 \pm 0.01^{B\ x\ Y}$
		t = 40°C	$12.17 \pm 1.19^{B\ x\ X}$	$0.68 \pm 0.21^{C\ x\ Y}$	$2.93 \pm 0.14^{B\ x\ X}$	$0.41 \pm 0.02^{B\ x\ Y}$
		t = 20°C	$39.40 \pm 4.48^{A\ x\ X}$	$1.09 \pm 0.11^{B\ x\ Y}$	$4.62 \pm 0.42^{A\ x\ X}$	$0.47 \pm 0.01^{B\ x\ Y}$

Note: The presented values are means ± standard deviation (n = 3). Values with different superscripts are significant at $P \leq 0.05$; values without superscripts are not significant.
Values with different lowercase letters (a–c) denote differences between the full-stream homogenisation variant and the control sample.
Values with different uppercase letters (A–C) denote differences between the partial homogenisation variant and the control sample.
Values with different lowercase letters (x, y) denote differences between homogenisation methods (full-stream *vs.* partial) with identical process parameters.
Values with different uppercase letters (X, Y) denote differences in particle size in milk and in milk containing trisodium citrate and SDS.

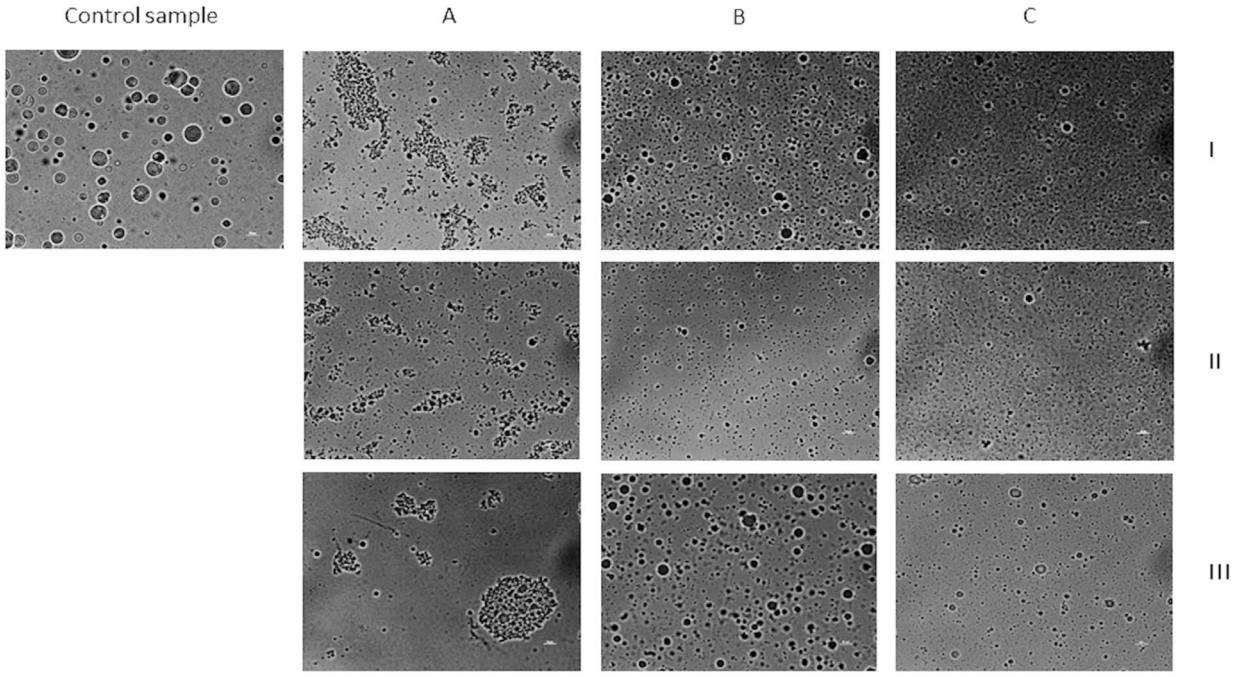


Figure 1 Microstructure of non-homogenised milk (control sample) and milk treated by partial high-pressure homogenisation (a), partial high-pressure homogenisation with the addition of trisodium citrate and SDS (b), full-stream high-pressure homogenisation (c) at a temperature of 60°C (I), 40°C (II), 20°C (III), 100× magnification, 10 μm scale.

Milk fat globule aggregates are formed when protein is not sufficient to fully stabilise the fat globules interface, and larger particles or aggregates may be formed as a result of coalescence or bridging flocculation (Olson *et al.*, 2004). Proteins adsorbed on the surface of milk fat globules have high specific weight, which limits or eliminates creaming. The above is observed during full-stream homogenisation. Milk fat globules aggregate more rapidly in products with increased fat content, which are deficient in surface-active

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

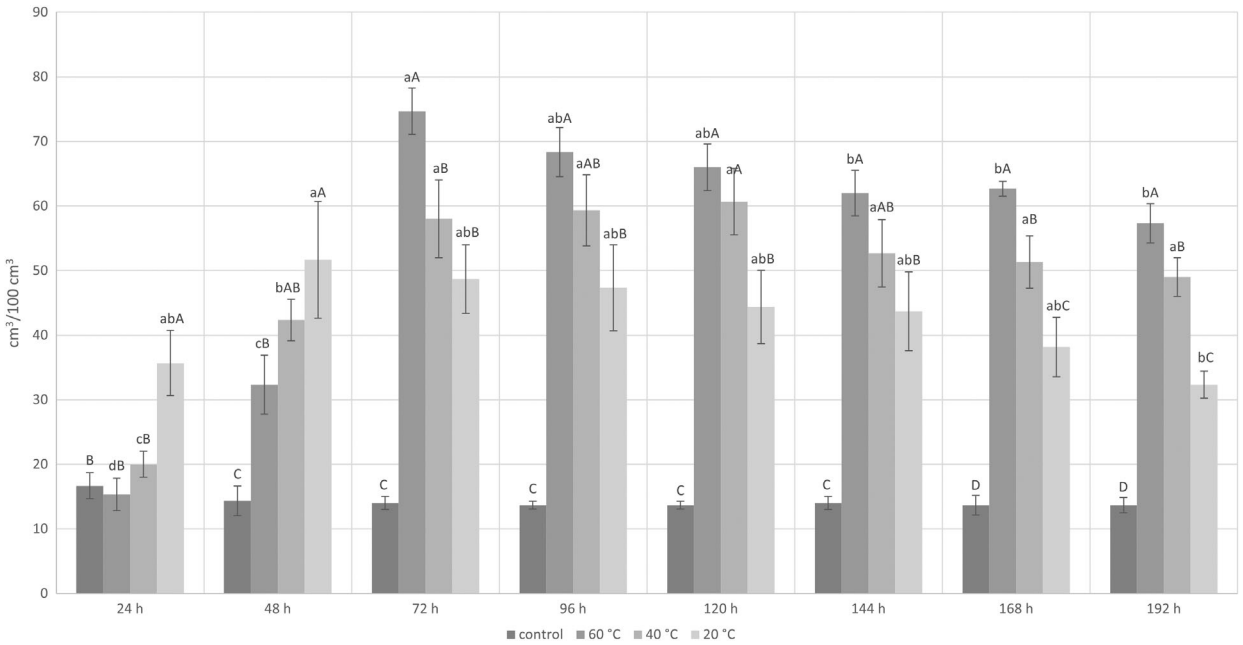


Figure 2 The influence of partial homogenisation temperature on the volume of the top layer (cream) expressed in mL 100 mL^{-1} of milk ($n = 3$). Values with different lowercase letters (a–d) in the superscript differ significantly at $P \leq 0.05$ subject to storage time. Values with different uppercase letters (A–D) in the superscript differ significantly at $P \leq 0.05$ subject to the partial homogenisation variant (after 24–192 h, every 24 h).

compounds, and the above was observed during partial homogenisation of cream which contains less protein than fat. In the present study, in milk treated by partial HPH, the resulting aggregates contained casein, as evidenced by the size of particles in milk and in milk after casein dissociation (Table 2, Fig. 1). Large and heavy aggregates of fat and protein tend to gravitationally separate in the top layer, but they contain proteins which delay phase separation due to their high specific weight.

The greatest differences in the fat content of the separated phases were noted in non-homogenised milk despite the low volume of the top layer. No significant changes in milk fat distribution in the top and bottom layers of non-homogenised milk were observed during 120 and 192 h of storage (Table 3).

In milk subjected to partial HPH, visible phase separation was observed during storage (Fig. 2), but the fat content of the top layer was lower than in non-homogenised milk (Table 3). Phase separation takes place during storage, and it decreases the volume of the top layer and increases its fat content. The fat content of the top layer was significantly higher in milk that was HPH-treated at 20°C than at ≥40°C in both

Table 3 The influence of partial homogenisation on the fat content of the top and bottom layer after 120 and 192 h of storage.

			Fat content of top layer (%)		Fat content of bottom layer (%)	
Homogenisation	**Pressure**	**Temperature**	**120 h**	**192 h**	**120 h**	**192 h**
–	–	–	12.85 ± 3.42^{a}	13.43 ± 2.20^{a}	2.02 ± 0.47^{ab}	1.97 ± 0.31^{a}
Partial	p_1 = 100 MPa, p_2 = 20 MPa	60°C	$4.23 \pm 0.06^{c\ A}$	$5.19 \pm 0.51^{c\ B}$	2.15 ± 0.33^{a}	1.45 ± 0.51^{b}
		40°C	$4.81 \pm 0.19^{c\ A}$	$5.99 \pm 0.20^{c\ B}$	1.53 ± 0.31^{ab}	1.26 ± 0.20^{b}
		20°C	$7.30 \pm 0.56^{b\ A}$	$8.81 \pm 0.41^{b\ B}$	1.44 ± 0.16^{b}	1.30 ± 0.41^{b}

Note: The presented values are means ± standard deviation ($n = 3$). Values with different superscripts are significant at $P \leq 0.05$; values without superscripts are not significant.
Values with different lowercase letters (a–c) denote differences between the partial homogenisation variant and the control sample.
Values with different uppercase letters (A, B) denote differences in storage time.

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

periods of storage. After 120 h of storage, the fat content of the bottom layer was lower in milk subjected to partial HPH at 20°C than at 60°C. After 192 h of storage, the fat content of the bottom layer was identical in milk samples subjected to partial HPH at different temperatures (Table 3).

The fat content in the upper layer of partial HPH-treated milk was similar to that of milk and much lower than that of cream. This was the reason why phase separation was not determined by creaming. Adsorption of plasma proteins, mainly casein, on the surface of fat globules and modification of the composition and surface properties of fat globules contribute to their higher hydrophilicity (Ye *et al.,* 2008; Zamora *et al.,* 2012). In addition, partial agglomeration of very small fat globules coated with milk proteins can lead to the formation of protein–fat complexes (Hayes *et al.,* 2005). Given the high density of the protein, its adsorption on the surface of the fat globules as well as its presence in protein–fat complexes may result in a lower rate of phase separation and a lower fat content in the upper layer separated after storage. On the other hand, the presence of small fat globules aggregates may result in their faster separation rate compared to the separation of individual fat globules.

Effect of homogenisation on milk colour

The results of the colour analysis revealed the highest lightness values (L*) in milk processed by full-stream HPH and lower values of L* in samples subjected to partial HPH treatment. Lightness values were lower in non-homogenised milk than in milk homogenised at different temperature and pressure (Table 4). Similar results were reported by Hayes *et al.* (2005) and Amador-Espejo *et al.* (2014). Smaller differences in the values of L* were noted in milk treated by partial HPH than in samples subjected to full-stream HPH at the same temperature. The values of parameter a* were negative in all milk samples, and they increased in milk treated by full-stream HPH within the entire temperature range and in milk subjected to partial HPH at ≥40°C. In both full-stream and partial HPH, differences in the value of a* were observed only at a temperature of 40°C, and the remaining temperatures did not induce changes in parameter a* regardless of the HPH method. Positive values of parameter b* (yellow colour) were noted in all milk samples. The value of b* increased after full-stream HPH at 40°C and partial HPH at 60°C. Parameter b* was lower in milk treated by partial HPH than in milk subjected to full-stream HPH only at the processing temperature of 20°C. Saturation decreased after partial HPH at 20°C relative to partial HPH at the remaining temperatures, and it was significantly lower than after full-stream HPH conducted at the same temperature (20°C).

The increase in the values of colour parameters differed between the tested homogenisation methods, and total colour difference was lower in milk subjected to partial HPH than in samples processed by full-stream HPH.

Total colour difference was not affected by temperature during full-stream HPH, but significant changes in the values of ΔE were noted after partial HPH. Changes in the colour descriptors of homogenised milk can be attributed to the modification of colloidal and emulsion-phase components, namely changes in the size of casein micelles that undergo disaggregation and aggregation (Pereda *et al.,* 2007), as well as changes in the number and size of milk fat globules and their aggregates (Amador-Espejo *et al.,* 2014).

Conclusions

The use of partial homogenisation is economically justified. In contrast to full-stream homogenisation, it

Table 4 Milk colour parameters.

Homogenisation	Pressure	Temperature	L*	a*	b*	C*	ΔE
–	–	–	$83.73 \pm 0.04^{b\ C}$	$-3.16 \pm 0.04^{b\ B}$	$4.51 \pm 0.29^{b\ BC}$	5.51 ± 0.22^{AB}	–
Full-stream	p_1 = 100 MPa, p_2 = 20 MPa	60°C	$88.90 \pm 0.42^{a\ x}$	-2.74 ± 0.07^{a}	4.79 ± 0.07^{ab}	5.52 ± 0.07	5.19 ± 0.41^{x}
		40°C	$88.79 \pm 0.35^{a\ x}$	$-2.75 \pm 0.05^{a\ x}$	4.84 ± 0.06^{a}	5.57 ± 0.06	5.09 ± 0.39^{x}
		20°C	$88.75 \pm 0.38^{a\ x}$	-2.81 ± 0.07^{a}	$4.81 \pm 0.08^{ab\ x}$	5.57 ± 0.09^{x}	5.03 ± 0.36^{x}
Partial	p_1 = 100 MPa, p_2 = 20 MPa	60°C	$87.24 \pm 0.26^{A\ y}$	-2.85 ± 0.12^{A}	4.93 ± 0.08^{A}	5.70 ± 0.12^{A}	$3.56 \pm 0.27^{A\ y}$
		40°C	$86.19 \pm 0.35^{B\ y}$	$-2.91 \pm 0.04^{A\ y}$	4.84 ± 0.17^{AB}	5.65 ± 0.14^{A}	$2.49 \pm 041^{B\ y}$
		20°C	$86.07 \pm 0.62^{B\ y}$	$-3.02 \pm 0.12^{A\ B}$	$4.41 \pm 0.12^{C\ y}$	$5.35 \pm 0.03^{B\ y}$	$2.34 \pm 0.63^{B\ y}$

Note: The presented values are means ± standard deviation (n = 3). Values with different superscripts are significant at $P \leq 0.05$; values without superscripts are not significant.
Values with different lowercase letters (a, b) denote differences between the full-stream homogenisation variant and the control sample.
Values with different uppercase letters (A–C) denote differences between the partial homogenisation variant and the control sample.
Values with different lowercase letters (x, y) denote differences between homogenisation methods (full-stream *vs.* partial) with identical process parameters.

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

allows the installation of homogenisers with a capacity lower than the capacity of the entire technological line. An additional benefit of partial homogenisation is that the components of skimmed milk are not homogenised.

In this study, a similar decrease in the size of milk fat globules was observed in milk subjected to partial and full-stream HPH with identical process parameters, but in milk treated by partial HPH, fat globules aggregated and formed large protein and fat complexes. These processes led to the separation of a top layer with a higher fat content and a bottom layer with a lower fat content. The volume of the top layer accounted for up to 70% of total sample volume. However, the fat content of the top layer decreased with an increase in layer volume.

The colour parameters of milk were less affected by partial HPH than by full-stream HPH, and they were influenced by the extent and direction of changes occurring in colloidal and emulsion phases.

Taking into account the stable emulsion phase, partial HPH will not replace full-stream HPH, however, it can be applied in dairy products requiring milk fat dispersion and minimal changes in the components of the colloidal phase. Partial homogenisation is also beneficial for dairy plants from an economic point of view as less product volume is homogenised. Partial HPH can be applied in the production of dairy products where phase separation processes are less pronounced than in non-homogenised milk and occur gradually in the entire product volume, whereas the separation can be eliminated by stirring before consumption. Partial HPH can be also recommended for products with higher viscosity, such as non-fermented milks with modified protein content and composition. Colloidal and soluble phases are modified only in cream, whereas most skimmed milk components are not modified; therefore, partial HPH can also be applied in the production of selected types of ripened cheese. The partial homogenisation method can provide an interesting alternative to the standard homogenisation process with technological, practical and economic advantages in many dairy applications.

Author contributions

Katarzyna Kieøczewska: Conceptualization (lead); supervision (lead). **Oskar Michaø Brożek:** Investigation (lead); methodology (equal). **Paulina Rudkowska:** Investigation (supporting); methodology (equal). **Anna Garczewska-Murzyn:** Methodology (equal); validation (equal); writing – original draft (equal). **Michaø Smoczyński:** Formal analysis (equal); supervision (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal).

Acknowledgments

The authors would like to thank Arkadiusz Rosiak for assistance during the study.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Ethical approval

Ethics approval was not required for this research.

Peer review

The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1111/ijfs.16059.

Data availability statement

Research data are not shared.

References

Amador-Espejo, G.G., Suàrez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E. & Trujillo, A.J. (2014). Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenisation treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science*, **97**, 659–671.

Ambroziak, K., Kieøczewska, K., Mickiewicz, D. & Dąbrowska, A. (2019). Advantages and disadvantages of partial high pressure homogenisation of milk in relation to full-stream homogenisation. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **69**, 279–287.

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**, 123–134.

Boeneke, A., Pastorek, A. & Aryana, K.J. (2009). Effect of high pressure homogenisation on milk. *Milchwissenschaft*, **64**, 40–42.

Hayes, M.G., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, **72**, 25–33.

Huppertz, T., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2003). High pressure-induced changes in the creaming properties of bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **4**, 349–359.

ISO/IDF. (2018a). Milk - Determination of fat content - Acido-butyrometric (Gerber *method)*. 19662, IDF 238.

ISO/IDF.(2018b). **C***ream - Determination of fat content* - Acido-butyrometric method. 19660**,** IDF 237.

Lu, N., Wang, J., Chen, Z., Zhang, X., Chen, C. & Wang, S. (2021). The effect of adding phospholipids before homogenization on the properties of milk fat globules. *LWT*, **146**, 111659.

Mercan, E., Sert, D. & Akin, N. (2018a). Effect of high-pressure homogenisation on viscosity, particle size and microbiological characteristics of skim and whole milk concentrates. *International Dairy Journal*, **87**, 93–99.

Mercan, E., Sert, D. & Akin, N. (2018b). Determination of powder flow properties of skim milk powder produced from high-pressure homogenization treated milk concentrates during storage. *LWT*, **97**, 279–288.

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

Michalski, M.C. & Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 423–437.

Olson, D.W., White, C.H. & Richter, R.L. (2004). Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *Journal of Dairy Science*, **87**, 3217–3223.

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenisation on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, **90**, 1081–1093.

Sandra, S. & Dalgleish, D.G. (2005). Effects of ultra-high-pressure homogenisation and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*, **15**, 1095–1104.

Sandra, S. & Dalgleish, D.G. (2007). The effect of ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skim milk. *International Dairy Journal*, **15**, 1043–1052.

Sert, D. & Mercan, E. (2020). Microbiological, physicochemical, textural characteristics and oxidative stability of butter produced from high-pressure homogenisation treated cream at different pressures. *International Dairy Journal*, **111**, 104825.

Smoczyński, M., Staniewski, B. & Kieøczewska, K. (2012). Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane—some nutritional and technological implications. *Food Reviews International*, **28**, 188–202.

Touhami, S., Marciniak, A., Doyen, A. & Brisson, G. (2022). Effect of alkalinization and ultra-high-pressure homogenization on casein micelles in raw and pasteurized skim milk. *Journal of Dairy Science*, **105**, 2815–2927.

Ye, A., Cui, J. & Singh, H. (2010). Effect of the fat globule membrane on in vitro digestion of milk fat globules with pancreatic lipase. *International Dairy Journal*, **20**, 822–829.

Ye, S., Anema, G. & Singh, H. (2008). Change in surface protein of the fat globules during homogenisation and heat treatment of concentrated milk. *Journal of Dairy Research*, **75**, 347–353.

Zamora, A., Ferragut, V., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2012). Changes in surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenisation and conventional treatments of milk. *Food Hydrocolloids*, **29**, 135–143.

© 2022 Institute of Food, Science and Technology (IFSTTF).

J Food Sci Technol (June 2022) 59(6):2160–2167
https://doi.org/10.1007/s13197-021-05227-w

ORIGINAL ARTICLE

Effect of buttermilk and skimmed milk powder on the properties of low-fat yoghurt

Anna Garczewska-Murzyn[1] · Michał Smoczyński[1] · Natalia Kotowska[1] · Katarzyna Kiełczewska[1]

Revised: 27 July 2021 / Accepted: 30 July 2021 / Published online: 12 August 2021
© The Author(s) 2021

Abstract The aim of the study was to determine the potential of using buttermilk and skimmed milk powders as additives to standardize the dry matter content of milk in the production of low-fat yoghurt. A batch of yoghurt was produced using a starter culture of *Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. The rates of milk acidification and pH levels were similar for both variants of yoghurt. After chilled storage (21 days), the yoghurt produced from milk supplemented with buttermilk powder was found to contain higher ($P \leq 0.05$) levels of lactic acid (1.179%) than that supplemented with skimmed milk (1.154%). The use of buttermilk powder allowed reducing (not significantly, $P > 0.05$) syneresis in the stored yoghurt. The milk fat in the buttermilk–supplemented yoghurt showed lower ($P \leq 0.05$) phospholipids content and exhibited slightly higher phospholipids loss during storage than the yoghurt produced from milk with addition of milk powder. No differences were found between the profile of fatty acids between the yoghurts enriched with skimmed milk powder and those enriched with buttermilk powder. Buttermilk can be used as an additive to produce a novel yoghurt type with modified functional features.

Research Highlights The use of buttermilk powder did not affect fermentation process, however increased lactic acid content and water-holding capacity of yoghurt. The yoghurts with added buttermilk contained less phospholipids when compared with yoghurts supplemented with milk powder.

Buttermilk powder can be incorporated as an ingredient in production of novel yoghurt type with improved functional features.

Keywords Yoghurt · Buttermilk powder · Phospholipids · Acidity · Syneresis

Abbreviations

MFGM	Milk fat globule membrane
BMP	Buttermilk powder
SMP	Skimmed milk powder
MBMP	Milk with buttermilk powder
MSMP	Milk with skimmed milk powder
YBMP	Yoghurt made from milk with buttermilk powder
YSMP	Yoghurt made from milk with skimmed milk powder

Introduction

Both milk and dairy products are food items of high nutritional and dietary value due to their biologically active ingredients (Korhonen 2009). Particularly noteworthy are powdered milk products—powdered milk, powdered buttermilk, powdered whey, concentrates of all milk proteins and whey protein concentrate—which can serve as interesting food additives due to their useful properties and nutritional values, mainly due to their proteins (Silva and O'Mahony 2017). Buttermilk as a powdered product can potentially boost the nutritional and health-promoting properties of foodstuffs, as well as modify their structure and consistency. Buttermilk contains all of the water-

✉ Katarzyna Kiełczewska
kaka@uwm.edu.pl

[1] 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

soluble milk constituents, including milk proteins, lactose and minerals, as well as large quantities of milk fat globule membranes (MFGM) (Smoczyński et al. 2012). During the churning process, fragments of the membranes are released into the milk plasma, resulting in higher levels of polar lipids in the dry matter of buttermilk (Dewettinck et al. 2008; Vanderghem et al. 2010) and in the milk fat (Contarini and Povolo 2013; Rombaut and Dewettinck 2006) when compared with whole milk, cream or butter. It can serve as valuable raw material for extracting MFGM components, whose functional and health-promoting properties have been noted by many researchers. The components of the membrane, including polar lipids and MFGM proteins, support the healthy functioning of the body, and may thus be added to food products to enrich their composition and improve their nutritional and biological values (Anto et al. 2020; Conway et al. 2014; Contarini and Povolo 2013; Corredig and Dalgleish 1997; Dewettinck et al. 2008; Fontecha et al. 2020; Spitsberg 2005; Vanderghem et al. 2010). Given their functional features, i.e. their structure-forming, emulsifying and water-binding properties, buttermilk and MFGMs can be utilized in cheesemaking, yoghurt-production, and other technological processes (Dewettinck et al. 2008; Vanderghem et al. 2010).

Yoghurt is a dairy product obtained through fermentation with starter cultures containing *Lactococcus delbruecki ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* bacteria (Horiuchi and Sasaki 2012). It belongs to the group of concentrated fermented milks. The concentration of yoghurt dry matter components is an important determinant of the texture, composition, and rheology of the final product. One of the methods used to increase the concentration of milk dry matter components is to add powdered milk or powdered milk proteins prior to the acidification (Jørgensen et al. 2019). Fortification of the dry matter content through the addition of sweet buttermilk prevents syneresis and improves the structure and texture of low-fat yoghurt (Trachoo and Mistry 1998). Milk fat, both in terms of its dispersion and fatty acid composition, plays an important role in developing the taste and consistency of yoghurt. For this reason, yoghurt substitutes that could be used in low-fat products are sought these days. Through the use of buttermilk, sensory attributes of low-fat yoghurts can be modified to resemble those of full-fat yoghurt (Zhao et al. 2018).

Due to the beneficial effects of buttermilk in fermented milk technology, the aim of the present study was to determine the potential of using buttermilk and skimmed milk powders as additives in the production of low-fat yoghurt.

Materials and methods

Research material

The research material encompassed bulk milk obtained during winter from farms in Warmia-Mazury Voivodeship, as well as sweet buttermilk powder and skimmed milk powder produced in an industrial facility.

Study design

Raw milk was centrifuged at 45 °C in a skimming separator (Gea Westfalia Separator System GmbH, Oelde, Germany) to skim the milk and standardize its fat content. The dry matter content of milk was standardized to 13% using buttermilk powder (BMP) and skimmed milk powder (SMP). Then, the cream with 30% content of fat was added to the milk with buttermilk powder and milk with skimmed milk powder to standardize their fat content to 1.5%. The prepared milk samples were subjected to a two-step homogenization process at a temperature of 65 °C and pressures of p_1 = 15 MPa, p_2 = 3 MPa using a PandaPlus 2000 homogenizer (Gea Niro Soavi, Italy), as well as to a pasteurization process at 95 °C for 60 s using a Thermomix TM 31 (Vorwerk, Wuppertal, Germany). After the milk was chilled to 45 °C, a freeze-dried YC-X11 Yo-flex starter culture (Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark) containing *Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* species was added as an inoculum. The samples were then thoroughly mixed, placed into plastic cups and incubated at 45 °C until pH of 4.6–4.7 was reached. After attaining target pH, the yoghurt was chilled to 4 °C and stored for 21 days. The tested samples included the milk with buttermilk powder (MBMP) and the milk with skimmed milk powder (MSMP) used for standardization, as well yoghurts produced from these sources: yoghurt made from milk with buttermilk powder (YBMP) and yoghurt made from milk with skimmed milk powder (YSMP), that were chill-stored for 1 day, 7 days and 21 days.

Chemical composition

The content of total solids was determined according to AOAC guidelines (AOAC International, 2007; method 990.20; 33.2.44). Fat content was determined with the Gerber method according to standard IDF 238 (ISO 19662, 2018).

Acidity

The pH value was measured using a Testo 205 pH-meter (Testo, Titisee-Neustadt, Germany). Milk (100 mL) was titrated with 0.25 M NaOH using phenolphthalein as the indicator. The results were expressed as Soxhlet-Henkel degrees (°SH). Lactic acid content were determined according to AOAC guidelines (AOAC International, 2007; method 947.05; 33.2.06).

Syneresis

Syneresis was measured by centrifuge testing (Amatayakul et al. 2006). The yoghurt sample was stirred 20 times in the clockwise and counterclockwise direction with a thin spatula. Ca. 20 g of yoghurt were transferred into polypropylene centrifuge tubes and left at 4 °C for 2 h to stabilize. Afterward, the samples were spun in a Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher, Waltham, USA) at 3000 rpm and 10 °C for 15 min. After centrifugation, the separated whey was weighed. The syneresis was expressed as the percentage of the separated whey relative to the weight of the centrifuged sample.

Extraction of the lipid fraction

Fat was extracted from the yoghurt using the method described by Hara and Radin (1978). A 3:2 mixture of hexane and isopropanol was used for fat extraction. The samples were measured out into ground-glass conical flasks, after which 18 mL of a solvent mixture was added per 1 g of the test material. The samples were then vigorously stirred for 60 s. An aqueous solution of sodium sulphate (1 g of salt dissolved in 15 cm^3 of water) was mixed at a 12:1 ratio. After thorough phase separation, the upper layer was collected into glass beakers and the solvent was evaporated at 30 °C in a Binder BF 53 incubator (Binder, Tuttlingen, Germany).

Phospholipids content

The phospholipids content was established using the colorimetric method, after Stewart (1980). The extracted fat was weighed out into a polypropylene centrifuge tube and dissolved in 2 mL of chloroform. Next, 1 mL of a thiocyanate reagent (27 g of ferric chloride and 30 g of ammonium thiocyanate in 1 L of distilled water) was added to the tube. The mixture was spun in a Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher, Waltham, USA) at 1500 rpm for 7 min. After removing the upper red layer, the absorbance of the lower layer was measured at 488 nm using a Helios Beta spectrophotometer (Spectronic Unicam, United Kingdom). The content of phospholipids in 1 mg of fat was established based on the curves of absorbance correlation with the phospholipids concentration. Standard solutions of phospholipids (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) were used to plot the standard curve.

Fatty acid profile

The fat extracts were methylated in accordance with ISO 15884 (2002). The fatty acid profile was determined via gas chromatography using a flame ionization detector (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Experimental conditions were as follows: CP-Sil 88 capillary column (100 m, 0.25 mm, 0.20 µm) (Agilent Technologies J&W), temperature gradient: 60 °C (1 min) to 180 °C at Dt = 5 °C/min, injector and detector temperatures: 225 and 250 °C respectively, carrier gas—helium, carrier gas flow rate: 0.8 mL min^{-1}, split: 1:100, sample volume: 1 µL, and liner—0.4 mm. BCR-164 anhydrous milk fat (LGC Standards, Poland) served as the reference material.

Statistical analysis

Two experiments were performed. The obtained results were subjected to a 2-way analysis of variance with replications. Differences between all treatment means were compared at the 5% level of significance using Tuckey's post-hoc test. Results were presented as a mean values ± standard variation. Data were processed statistically in Microsoft Excel (Microsoft Office 365).

Results and discussion

The MBMP and MSMP samples for yoghurt production had a dry matter content of 13% ± 0.1% and milk fat content of 1.5% ± 0.06%.

Rates of acidification

The rates of acidification did not differ significantly between the milk with buttermilk powder (MBMP) and the milk with skimmed milk powder (MSMP) added for standardization of dry matter content of the milk (Fig. 1). After inoculation with the starter culture (*Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus)*, the time of acidification was 225 min and was the same for the two powder additives. In contrast, the changes in pH during the process indicated that the acidification rate was slightly higher for MSMP than for MBMP. This negligible difference was evident at minute 75 of acidification at pH 5.3. However, further rates of pH

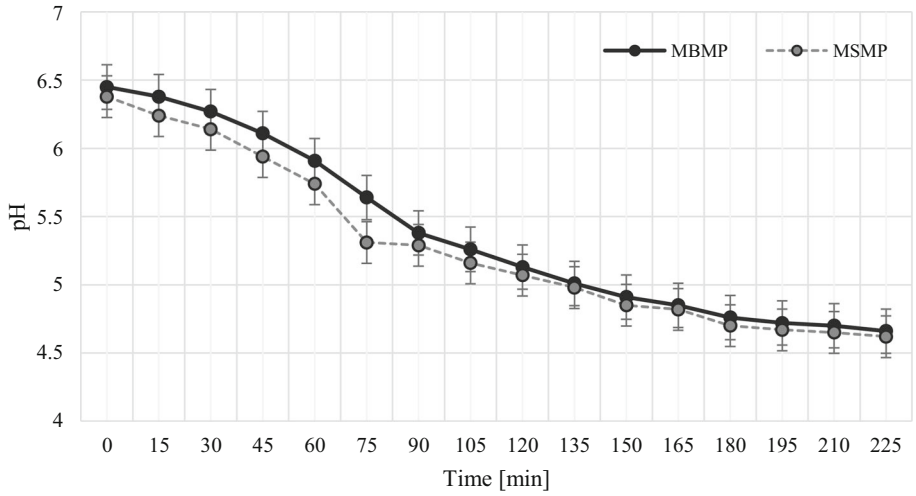


Fig. 1 Acidification curves of milk with added buttermilk powder (MBMP) and milk with added skimmed milk powder (MSMP), mean values ± standard deviation (n = 2)

decrease (< 5.3) across acidification time were almost identical for both types of milk (Fig. 1).

Romeih et al. (2014) conducted a similar study on the use of buttermilk powder additives in yoghurt production, which differed from the present study due to the use of skimmed buffalo milk. Their study did show that milk supplemented with buttermilk powder was quicker to acidify than the milk supplemented with skimmed milk powder. The authors attributed the faster acidification rates of MBMP to the higher content of peptides or amino acids of lower molecular weight (used by *Streptococcus thermophilus*) in buttermilk in comparison with skimmed milk. The total time to acidification was recorded at 225 min (Fig. 1) and did not change between the types of powder used to standardize the milk, which corroborated the results of Le et al. (2011) and Romeih et al. (2014). According to Zhao et al. (2020) addition of buttermilk decreased the pH at the gelation point, shortened the gelation time and the fermentation period.

During the analysis of the results, 2-way ANOVA showed a statistically significant influence of the type of product, storage time and the interaction on titratable acidity and lactic acid content in the tested samples ($P \leq 0.05$, Table 1). The acidity (expressed in pH), titratable acidity, and lactic acid content of both yoghurts were on similar level after 1 day of storage (Table 1). Prolonged storage led to a decrease in the yoghurt pH, but caused no differences between the yoghurt variants across the analogous chilled storage time ($P > 0.05$). In contrast, differences between the yoghurt variants in terms of titratable acidity and lactic acid content did emerge after 7- and 21-day storage ($P \leq 0.05$). The titratable acidity and lactic acid content values were higher for YBMP compared with YSMP. The differences in lactic acid content in the analyzed samples were particularly evident after 7 days of storage, though the gap lessened after 21 days of storage (Table 1). Similar studies were conducted by Bonczar and Wszołek (2002), demonstrating a decrease in pH and an increase in titratable acidity caused by the activity of lactic fermentation bacteria, which continue the conversion of lactose to lactic acid during storage.

The increase in lactic acid content was much slower at the chilled storage temperature (about 4 °C) (Table 1) than at the typical ripening temperature for yoghurt starter cultures, as indicated by changes in pH values (Fig. 1).

Yoghurt syneresis

Figure 2 shows the effect of the type of powder used in the yoghurt production mixture on the syneresis of the final product throughout storage.

A change of approximately 5% was detected for YSMP (increase) and YBMP (decrease) syneresis during storage. Yoghurt syneresis often occurs during storage and constitutes a serious defect. As such, reducing whey separation represents an improvement for the consumer. The results are corroborated by studies of Le et al. (2011), Romeih et al. (2014), Trachoo and Mistry (1998) and Zhao et al. (2020) who demonstrated lower values of syneresis for the yoghurt with buttermilk, as buttermilk constituents provide better water holding capacity.

Given that the dry matter content of both yoghurts was the same, the reduced (not significantly) syneresis of YBMP compared with YSMP (Fig. 2) was explained by

Table 1 pH, titratable acidity and lactic acid content of yoghurt during storage

Days of storage at 4 °C		pH		Titratable acidity [°SH]		Lactic acid [%]	
		YBMP	YSMP	YBMP	YSMP	YBMP	YSMP
1		4.45 ± 0.01[a]	4.46 ± 0.03[a]	45.1 ± 0.1[a]	45.0 ± 0.3[a]	1.015 ± 0.002[a]	1.013 ± 0.002[a]
7		4.37 ± 0.01[b]	4.37 ± 0.01[b]	51.4 ± 0.6[b]	47.6 ± 0.6[b]	1.157 ± 0.009[b]	1.071 ± 0.009[b]
21		4.26 ± 0.01[c]	4.27 ± 0.01[c]	52.4 ± 0.6[c]	51.3 ± 0.1[c]	1.179 ± 0.009[c]	1.154 ± 0.002[c]
Significance (*P* value)	Product	not significant		0.000		0.000	
	Storage	0.000		0.000		0.000	
	Interaction	not significant		0.002		0.002	

Values are means ± standard deviation (n = 2); YBMP—yoghurt with added buttermilk powder; YSMP—yoghurt with added skimmed milk powder

Mean values in columns (for the same product) with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$); experimental factor: days of storage

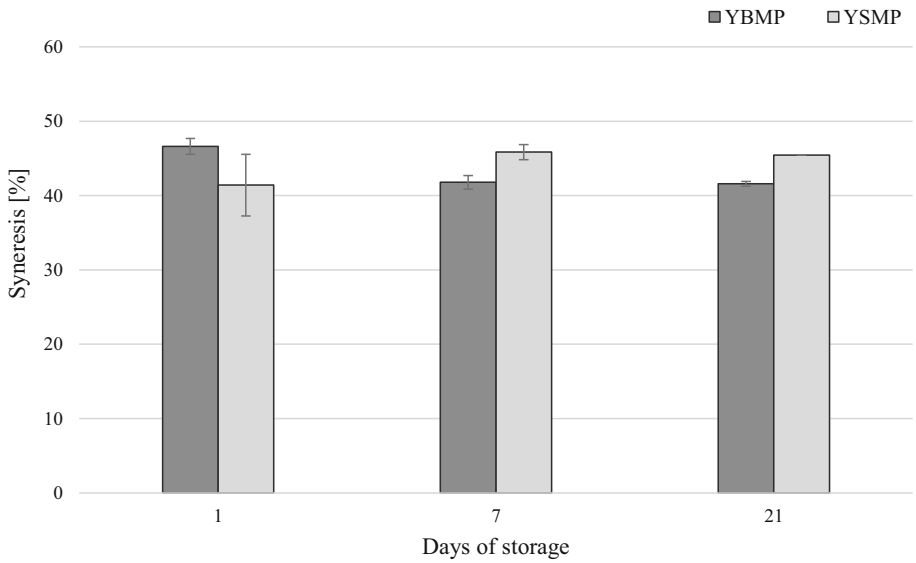


Fig. 2 Syneresis of yoghurt during storage. YBMP—yoghurt with added buttermilk powder; YSMP—yoghurt with added skimmed milk powder. Mean values ± standard deviation (n = 2), differences not significant

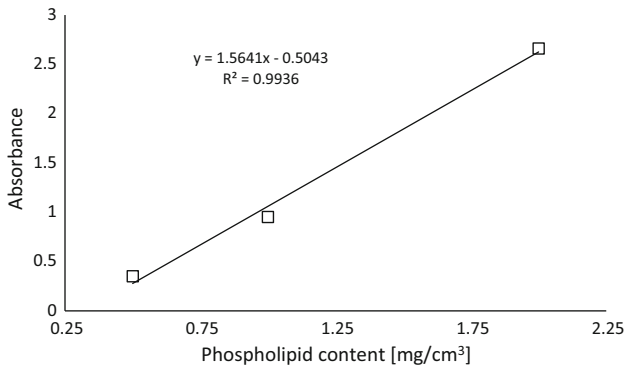


Fig. 3 Absorbance of the standard phospholipid solution

the increased hydration capacity of its constituents, in particular MFGM proteins and phospholipids. The amphiphilic properties of phospholipids and other constituents of milk fat globule membranes may translate into a higher capacity for water retention.

Phospholipids in yoghurt

The standard curve was plotted based on standard solutions with defined phospholipids concentrations (Fig. 3). The high coefficient of determination for the linear relationship between absorbance and phospholipids concentration points to the validity of the employed method.

During the analysis of the results, 2-way ANOVA showed a statistically significant influence of the type of

product and storage time on phospholipid content in the tested samples ($P \leq 0.05$, Table 2). The present study demonstrated lower ($P \leq 0.05$) phospholipids contents in the milk fat from the yoghurt supplemented with buttermilk powder, as compared with the yoghurt with skimmed milk powder. The proportion of phospholipids in milk fat in the fermented products decreased during storage ($P \leq 0.05$). The variation in phospholipids content between the two types of powder was particularly evident in yoghurt after 21 days of storage. Throughout the 21-day storage, the phospholipids content decreased faster in YBMP, maximally by ca. 50%, whereas the decrease in YSMP amounted to about 20% compared to the similar samples stored for 1 day. After storage, the phospholipids content in YSMP was 50% higher than in YBMP ($P \leq 0.05$).

The high phospholipids content in YBMP results from the fat globule membranes being released into the buttermilk during the churning process, whereas in the case of YSMP, it is caused by the high content of very small fat globules, as well as the extensive interface surface of the skimmed milk. In both cases, the addition of the powder products resulted in a high proportion of phospholipids in milk fat (Table 2).

The presence of small fat globules results in a higher content of polar lipids in the product compared to the large fat globules (Lopez 2011). Conway et al. (2014), Mac Gibbon (2006), and Rombaut and Dewettinck (2006) reported that the content of polar lipids was high in both buttermilk and skimmed milk relative to total fat. Although the phospholipids content of buttermilk is 10 times higher than that of skimmed milk, the proportion of phospholipids to total fat is similar in both products (Conway et al. 2014; Mac Gibbon 2006).

The fact that the phospholipids content changes less radically in YSMP compared to YBMP during storage can most likely be explained by the phospholipids from buttermilk-powder MFGM fragments being more susceptible to conversion than the phospholipids present on the surface of fat globules in skimmed milk powder. Further research is, however, needed to explain why those specific changes in the phospholipids content occur in the dry matter of yoghurt fortified with buttermilk powder.

Fatty acid profile

The fatty acid profile of yoghurts did not vary depending on the composition of the production mixture (Table 3).

The literature data (Fauquant et al. 2005; Jhanwar and Ward 2014; Sanchez-Juanes et al. 2009) indicates that the composition of fatty acids can differ depending on their source of origin. The fatty acid profile of phospholipids from buttermilk fat globule membranes differs from that of fat extracted from whole milk. Such phospholipids not only have lower levels of stearic acid and higher levels of oleic and linoleic acids, but also contain very long chain fatty acids (VLCFA), larger than C20 (Sanchez-Juanes et al. 2009), and more unsaturated fatty acids—in particular PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids), whose levels are 6 times higher on the membrane than in the inner core of the globule (Fauquant et al. 2005; Jhanwar and Ward 2014).

Table 2 Phospholipid content in yoghurt

Days of storage at 4 °C	Type of yoghurt	Phospholipid content [mg/g of fat]
1	YBMP	99.6 ± 2.9[a]
	YSMP	127.4 ± 0.4[a]
7	YBMP	98.0 ± 4.2[a]
	YSMP	118.8 ± 2.5[a]
21	YBMP	67.6 ± 2.6[b]
	YSMP	104.8 ± 7.9[b]
Significance (*P* value)	Product	0.000
	Storage	0.000
	Interaction	not significant

Values are means ± standard deviation ($n = 2$); YBMP—yoghurt with added buttermilk powder; YSMP—yoghurt with added skimmed milk powder

Mean values in columns (for the same product) with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$); experimental factor: days of storage

Table 3 Fatty acid profile of yoghurt

Fatty acid g 100 g^{-1} total fatty acids	YBMP	YSMP
C 4:0	2.82 ± 0.06	2.75 ± 0.09
C 6:0	1.96 ± 0.10	1.92 ± 0.05
C 8:0	1.25 ± 0.02	1.23 ± 0.05
C 10:0	3.03 ± 0.06	2.99 ± 0.07
C 12:0	3.73 ± 0.18	3.69 ± 0.12
C 14:0	12.89 ± 0.27	12.79 ± 0.18
C 14:1	1.06 ± 0.02	1.09 ± 0.09
C 15:0	1.13 ± 0.09	1.16 ± 0.08
C 16:0	36.48 ± 0.28	36.45 ± 0.42
C 16:1	1.84 ± 0.09	1.89 ± 0.06
C 18:0	11.02 ± 0.18	11.02 ± 0.16
C 18:1 t9	1.43 ± 0.13	1.39 ± 0.10
C18:1 c9	20.20 ± 0.93	20.42 ± 0.89
C18:2 c6	1.17 ± 0.07	1.22 ± 0.08

Values are means ± standard deviation ($n = 2$); YBMP—yoghurt with added buttermilk powder; YSMP—yoghurt with added skimmed milk powder. Differences not significant

In the present study, the use of buttermilk powder in yoghurt production caused no changes in the respective fatty acid profile (Table 3). This is most likely due to the milk fat content being higher relative to the membrane lipids, as well as to the similar phospholipids content in yoghurts with added buttermilk powder and yoghurts with added skimmed milk powder (Table 2).

Conclusion

The boosted wholesomeness of food is mostly determined by the presence of bioactive substances. In this regard, naturally fermented milk beverages produced using sweet buttermilk can be considered beneficial to human health. The yoghurts with added buttermilk contained less phospholipids when compared with the yoghurts supplemented with milk powder. No differences were found in fatty acid profiles of the two yoghurts with different powders used as additives. The use of buttermilk powder in yoghurt production did not disrupt the milk fermentation process. It did, however, contribute to the increased lactic acid content and a higher water-holding capacity of the stored yoghurt. The reduction in yoghurt syneresis after buttermilk powder addition can be considered as an improvement in product quality, particularly from the consumers' perspective. Thus, we can conclude that buttermilk can be used as an additive to produce a novel yoghurt type with functional features.

Acknowledgements The authors would like to thank Justyna Ziajka for technical assistance during the study.

Author contributions All authors have contributed equally to this manuscript. Anna Garczewska-Murzyn—performing analyses, writing a manuscript, revision of manuscript. Michał Smoczyński – concept of research, writing a manuscript, management of research. Natalia Kotowska—performing analyses, data analysis. Katarzyna Kiełczewska – data analysis, writing a manuscript, proof reading of manuscript.

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

Availability of data and material All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Conflict of interest Authors declare that the work has not been published before and it is not under consideration for publication elsewhere.

Ethics approval This author declare that there is no conflict of interest.

Consent to participate Submission to Journal of Food Science and Technology publication has been approved by all authors as well as the responsible authorities at the institute where the work has been carried out.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

Amatayakul T, Sherkat F, Shah NP (2006) Syneresis of set yoghurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. Int J Dairy Technol 59:216–221. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00264.x

Anto L, Warykas SW, Torres-Gonzalez M, Blesso ChN (2020) Milk polar lipids: underappreciated lipids with emerging health benefits. Review Nutrients. https://doi.org/10.3390/nu12041001

Bonczar G, Wszołek M (2002) Charakterystyka jogurtów z mleka owczego o normalizowanej zawartości tłuszczu. ZYWN-NAUK TECHNOL JA 1(30):111–112

Contarini G, Povolo M (2013) Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. Int J Mol Sci 14:2808–2831. https://doi.org/10.3390/ijms14022808

Conway V, Gauthier SF, Pouliot Y (2014) Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. Anim Front 4(2):44–51. https://doi.org/10.2527/af.2014-0014

Corredig M, Dalgleish DG (1997) Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. J Agric Food Chem 45:4595–4600. https://doi.org/10.1021/jf970531f

Dewettinck K, Rombaut R, Thienpont N, Le TT, Messens K, Van Camp J (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. Int Dairy J 18:436–457. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014

Fauquant C, Briard V, Leconte N, Michalski C (2005) Differently sized native milk fat globules separated by microfilftration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core. Eur J Lipid Sci Technol 107:80–86. https://doi.org/10.1002/ejlt.200401063

Fontecha J, Brink L, Wu S, Pouliot Y, Visioli F, Jiménez-Flores R (2020) Sources, production, and clinical treatments of milk fat globule membrane for infant nutrition and well-being. Nutrients 12:1607. https://doi.org/10.3390/nu12061607

Hara A, Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. Anal Biochem 90:420–425. https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5

Horiuchi H, Sasaki Y (2012) Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J Dairy Sci 95:2904–2909. https://doi.org/10.3168/jds.2011-5147

ISO 15884:2002. IDF 182:2002. Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters

ISO 19662:2018. IDF 238. Milk – Determination of fat content – Acido-butyrometric (Gerber method)

Jhanwar A, Ward RE (2014) Particle size distribution and lipid composition of skim milk lipid material. Int Dairy J 36:110–117. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.010

Jørgensen CE, Abrahamsen RK, Rukke E-O, Hoffmann TK, Johansen A-G, Skeie SB (2019) Processing of high-protein yoghurt – A review. Int Dairy J 88:42–59. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002

Korhenen H (2009) Bioactive components in bovine milk. In: Park YW (ed) Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Wiley-Blackwell, Singapure, pp 15–42

Le TT, van Camp J, Pascual PAL, Meesen G, Thienpont N, Messens K, Dewettinck K (2011) Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material. Int Dairy J 21:798–805. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.015

Lopez C (2011) Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. Curr Opin Colloid Interface Sci 16:391–404. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.05.007

MacGibbon AKH, Taylor MW (2006) Composition and structure of bovine milk lipids. In: Fox PF, McSweeney PLH (eds) Advanced Dairy Chemistry, vol 2. Lipids. Springer, New York, pp 1–43

Rombaut R, Dewettinck K (2006) Properties, analysis and purification of milk polar lipids. Int Dairy J 16:1362–1373. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.011

Romeih EA, Abdel-Hamid M, Awad AA (2014) The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. Dairy Sci Technol 94:302–303. https://doi.org/10.1007/s13594-014-0163-8

Sanchez-Juanes F, Alonso JM, Zancada L, Hueso P (2009) Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. Int Dairy J 19:273–278. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.006

Silva JVC, O'Mahony JA (2017) Flowability and wetting behaviour of milk protein ingredients as influenced by powder composition, particle size and microstructure. Int J Dairy Technol 70(2):277–286. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12368

Smoczyński M, Staniewski B, Kiełczewska K (2012) Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane – some nutritional and technological implications. Food Rev Int 28(2):188–202. https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595024

Spitsberg VL (2005) Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. J Dairy Sci 88(7):2289–2294. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4

Stewart JCM (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal Biochem 104:10–14. https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9

Trachoo N, Mistry VV (1998) Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of nonfat and low fat yogurts. J Dairy Sci 81:3163–3171. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75882-5

Vanderghem C, Bodson P, Danthine S, Paquot M, Deroanne C, Blecker Ch (2010) Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. Biotechnol Agron Soc Environ 14(3):485–500

Zhao L, Feng R, Rena F, Mao X (2018) Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. LWT 98:9–17. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.029

Zhao L, Feng R, Mao X (2020) Addition of buttermilk powder improved the rheological and storage properties of low-fat yogurt. Food Sci Nutr 8(7):3061–3069. https://doi.org/10.1002/fsn3.1373

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 30.04.2024r
(miejscowość, data)

Mgr inż. Anna Garczewska-Murzyn
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2021. Biofunctional Properties Of Milk Fat Globule Membrane Phospholipids. Polish Journal of Natural Sciences. Vol 36(4): 433-445, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu założeń, przeglądzie dostępnej literatury, w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu, a także na przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

.....
(podpis kandydata)

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 30.04.2024 r
(miejscowość, data)

Mgr inż. Anna Garczewska-Murzyn
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Garczewska-Murzyn A., Kiełczewska K., Smoczyński M. 2022. The Influence of Buttermilk Powder on the Stability of Emulsion and Colloidal Phases of Homogenized Milk. European Food Research And Technology 248, 2629-2636. Mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał 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.

.....
(podpis kandydata)

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 30.04.2024 r
(miejscowość, data)

Mgr inż. Anna Garczewska-Murzyn
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Kiełczewska K., Brożek O., Rudkowska P., Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2022. The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. International Journal Food Science and Technology, 57: 7167-7174 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu metodyki, walidacji oraz na uczestniczeniu w przygotowaniu wersji oryginalnej manuskryptu.

.....
(podpis kandydata)

Załącznik nr4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 30.09.2024 r.
(miejscowość, data)

Mgr inż. Anna Garczewska-Murzyn
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M., Kotowska N., Kiełczewska K. 2022. Effect of Buttermilk and Skimmed Milk Powder on the Properties of Low-fat Yoghurt. Journal of Food Science and Technology 59, 2160-2167 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: na przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na napisaniu i korekcie manuskryptu.

.....
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 29.04.2024
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Michał Smoczyński, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy: Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2021. Biofunctional Properties Of Milk Fat Globule Membrane Phospholipids, Polish Journal of Natural Sciences. Vol 36(4): 433-445, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, wsparciu merytorycznym w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: opracowaniu koncepcji pracy w oparciu o przegląd dostępnej literatury, współuczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 29.04.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Michał Smoczyński, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Garczewska-Murzyn A., Kiełczewska K., Smoczyński M. 2022, The Influence of Buttermilk Powder on the Stability of Emulsion and Colloidal Phases of Homogenized Milk. European Food Research And Technology 248, 2629-2636, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, finansowaniu badań, jak i wsparciu merytorycznym w: opracowaniu koncepcji i wyborze metodyki, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 29.04.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Michał Smoczyński, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy: Kiełczewska K., Brożek O., Rudkowska P., Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2022, The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. International Journal Food Science and Technology, 57: 7167-7174, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego, analizie formalnej, nadzorze, pisaniu wersji oryginalnej, pisaniu manuskryptu po recenzji i redakcji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: opracowaniu metodologii, walidacji, napisaniu wersji oryginalnej.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 29.04.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Michał Smoczyński, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy: Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M., Kotowska N., Kiełczewska K. 2022, Effect of Buttermilk and Skimmed Milk Powder on the Properties of Low-fat Yoghurt. Journal of Food Science and Technology 59, 2160-2167, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, napisaniu manuskryptu i zarządzaniu badaniami.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: wykonaniu analiz, napisaniu manuskryptu, korekcie manuskryptu.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 04.04. 2024 r.
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy: Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M., Kotowska N., Kiełczewska K. 2022, Effect of Buttermilk and Skimmed Milk Powder on the Properties of Low-fat Yoghurt. Journal of Food Science and Technology 59, 2160-2167, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: analizie danych, napisaniu manuskryptu i jego korekcie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: wykonaniu analiz, napisaniu manuskryptu, korekcie manuskryptu.

Katarzyna Kiełczewska
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 04.04. 2024 r.
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy Kiełczewska K., Brożek O., Rudkowska P., Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2022, The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. International Journal Food Science and Technology, 57: 7167-7174, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na konceptualizacji i nadzorze.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: opracowaniu metodologii, walidacji, napisaniu wersji oryginalnej.

Katarzyna Kiełczewska
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 04.04. 2024 r.
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Garczewska-Murzyn A., Kiełczewska K., Smoczyński M. 2022, The Influence of Buttermilk Powder on the Stability of Emulsion and Colloidal Phases of Homogenized Milk. European Food Research And Technology 248, 2629-2636, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: wsparciu merytorycznym w opracowaniu koncepcji i wyborze metodyki, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu metodyki i przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, na uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Katarzyna Kiełczewska
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Wrocław, 26.02.2024
(miejscowość, data)

Dr inż. Oskar Brożek
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy Kiełczewska K., Brożek O., Rudkowska P., Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M., 2022. The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. International Journal Food Science and Technology, 57: 7167-7174, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na wykonywaniu badań i opracowaniu metodologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: opracowaniu metodologii, walidacji, napisaniu wersji oryginalnej.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 2024/02/26
(miejscowość, data)

Mgr inż. Paulina Rudkowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy Kiełczewska K., Brożek O., Rudkowska P., Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M. 2022, The Effects of Full-Stream and Partial High-Pressure Homogenisation on the Properties of Milk Emulsion. International Journal Food Science and Technology, 57: 7167-7174, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na pomocy w wykonywaniu badań i opracowaniu metodologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn, polegający na opracowaniu metodologii, walidacji, napisaniu wersji oryginalnej.

Rudkowska

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 11.03.2024
(miejscowość, data)

Mgr inż. Natalia Kotowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy: Garczewska-Murzyn A., Smoczyński M., Kotowska N., Kiełczewska K. 2022, Effect of Buttermilk and Skimmed Milk Powder on the Properties of Low-fat Yoghurt. Journal of Food Science and Technology 59, 2160-2167, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: wykonywaniu analiz i analizie danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Annę Garczewską-Murzyn jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Anny Garczewskiej-Murzyn polegający na: wykonaniu analiz, napisaniu manuskryptu, korekcie manuskryptu.

Kotowska Natalia
podpis