



ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Primjena ultrazvuka i visokih hidrostatskih tlakova na promjenu raspodjele veličine masnih globula i kemijski sastav kravljeg mlijeka

Application of Ultrasound and High Hydrostatic Pressures on Variation of Fat Globule Size and Chemical Composition of Cow Milk

Tomislav Bosiljkov*, Mladen Brnčić, Sven Karlović, Branko Tripalo, Damir Ježek, Filip Dujmić, Denis Vadrja

Prehrambeno – biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb

Sažetak

Nove tehnologije, danas popularno nazvane netoplinske (primjena visokog hidrostatskog tlaka, pulsirajućih električnih polja, i ultrazvuka visokog intenziteta) imaju svojstvo da tijekom obrade ne utječu na značajno povišenje temperature čime u većini ostaju nepromijenjena teksturna i senzorička svojstva uzoraka koji se obrađuju. Vrijeme obrade uzoraka traje od nekoliko sekundi do 30 minuta. Konvencionalne postupke homogenizacije mlijeka moguće je unaprijediti novim metodama obrade. Cilj rada je pokazati prednosti utjecaja ultrazvuka visokog intenziteta u diskontinuiranom (maksimalna nominalna snaga 100W) i kontinuiranom postavu (maksimalna nominalna snaga 1000W sa protočnom ćelijom) kao i utjecaj visokog hidrostatskog tlaka (do 600 MPa) na raspodjelu veličine masnih globula. Budući da je homogenizacija mlijeka provedena pri optimalnim procesnim parametrima koji statistički značajno utječu na promjenu raspodjele veličine masnih globula mlijeka (stupanj homogenizacije), ispitan je i utjecaj ultrazvuka i visokog tlaka na promjenu kemijskog sastava kravljeg mlijeka. Optimalna raspodjela veličine globula masti u intervalu 0,3 – 6 μm dobiva se u oba postava. Smanjenje vrijednosti medijana postiže se primjenom tlakova od 200MPa. Kemijska analiza provedena ultrazvukom niskih intenziteta pokazala je da diskontinuirani postav ultrazvuka i visoki hidrostatski tlak nemaju statistički značajan utjecaj na promjenu kemijskog sastava mlijeka. Ultrazvučni kontinuirani postav ima utjecaja na promjenu sastava pepela (mineralnih tvari) pri nižim vrijednostima volumnih protoka.

Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, kemijski sastav, kravlje mlijeko

Summary

Main common property of novel food processing technologies, such as high hydrostatic pressure, pulsed light and high intensity ultrasound is non-thermal treatment. Such technologies input minimal amount of heat energy in food, which is low enough to preserve bioactive compounds, textural and other organoleptic properties of processed food. High pressure processing and ultrasonics also utilize relatively short processing times, ranging from a few seconds up to 30 minutes. Main goals of this research are to improve conventional milk homogenization technology, show advantages of application of high intensity ultrasound in the batch (maximal power 100 W) and continuous setup (maximal power of 1000 W, with flow cell), as well as investigate influence of high pressure processing (up to 600 MPa) on particle size distribution of fat globules. Milk homogenization is conducted under optimal processing parameters, which have statistically significant influence on changes in the size distribution of milk fat globules (degree of homogenization). Influence of high intensity ultrasound and high pressure processing on changes in chemical composition of cow milk is also investigated. Optimal globule size distribution in interval between 0.3 and 6 μm is achieved using both setups. Median value decrease is achieved processing with 200 MPa pressure. Chemical analysis conducted with low intensity ultrasound indicate that batch ultrasound processing and high hydrostatic pressure processing of milk have minimal or no statistically significant influence on chemical composition of milk. Continuous ultrasonic processing at lower volume flows have small but statistically significant influence on ash composition.

Keywords: high hydrostatic pressure, ultrasound, chemical composition, cow milk

Uvod

Homogenizacija mlijeka uglavnom se provodi tehnologijom primjene konvencionalnih homogenizatora čiji se rad zasniva na regulaciji volumnog protoka mlijeka kroz sapnicu određenog promjera pod visokim tlakovima koji najčešće ne prelaze vrijednosti od 300 bara i pri čemu se postiže 90% – tna učestalost raspodjele veličine globula u rasponu od 0,4 – 0,8

μm (Thiebaud i sur., 2003). Homogenizacijom mlijeka sprječava se nakupljanje i izdvajanje masnih globula na površinu čime se dobiva stabilniji proizvod kroz duži vremenski period. Optimalna temperatura homogenizacije je između 40 – 75 °C i ukoliko se provodi pri znatno nižim temperaturama od optimalne (< 40 °C) moguća je pojava kristalizacije masti unutar same globule čime se znatno smanjuje učinak postupka homogenizacije (Michalski i Juanel, 2006). Ista raspodjela veličine

Corresponding author: tbosilj@pbf.hr



Slika 1. Površinski sloj masne globule nakon ultrazvučne homogenizacije mlijeka
Figure 1. Surface layer of fat globule ultrasonically homogenized milk

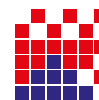
globula u navedenom intervalu moguća je i primjenom novih ne toplinskih metoda obrade koje se zasnivaju na primjeni ultrazvuka visokog intenziteta i visokog hidrostatskog tlaka. Ultrazvučnom homogenizacijom povećani unos energije postiže se povećanjem intenziteta ultrazvučnog vala kao i obradom ultrazvučnim valovima kroz duži vremenski period. Na temelju provedenog istraživanja (Bosiljkov, 2011) dokazano je da ultrazvuk visokog intenziteta u diskontinuiranom postavu procesorom maksimalne nominalne snage do 400W utječe na promjenu fizikalnih svojstva kravljeg mlijeka kao što su temperatura gustoća, prividna viskoznost, pH – vrijednost, apsorbancija i indeks stabilnosti emulzije. Analizom kovarijance dokazano je da temperatura kao izlazni parametar značajno utječe na promjenu gustoće i prividne viskoznosti. Ultrazvuk visokog intenziteta značajno utječe na parametre deskriptivne (opisne) statistike od kojih su najznačajnije vrijednosti medijana, moda, srednje vrijednosti, varijance (stupnja homogenizacije) kao i minimuma i maksimuma veličine masne globule. O uspješnosti učinkovite obrade ovisit će odabir intenziteta i vremena trajanja procesa. Učinkovitost novih tehnika dobivanja emulzija (homogenizacije) mogu se dodatno unaprijediti primjenom ekstremnijih uvjeta obrade, odnosno primjenom viših vrijednosti procesnih parametara sa osvrtom na promjenu kemijskog sastava mlijeka. Pod pojmom “ekstremniji uvjeti” prvenstveno se misli na ultrazvučne amplitude veće od 60% kao i vrijeme obrade dulje od 6 minuta neovisno o maksimalnoj nominalnoj snazi ultrazvučnog procesora. Mehanizam širenja ultrazvučnog vala kao i veliki broj implodirajućih kavitacijskih mjehurića značajno utječu na povišenje temperature u tekućem okolnom mediju pa se kontrola i optimizacija procesnih parametara smatra vrlo važnim elementom tijekom trajanja cjelokupnog procesa. (Bosiljkov i sur., 2011; Brnčić i sur., 2010; Suslick, 1998; De Castro i Capote, 2007; Cucheval i Chow, 2008; Ashokkumar, 2011; Dolatowski i sur., 2007).

Obradom mlijeka visokim hidrostatskim tlakovima zasniva se na primjeni tlakova od 100 – 1000 MPa. Ovisno o modelu, maksimalni primijenjeni tlakovi mogu doseći i vrijednosti do 1300 MPa. Unatoč velikim naprezanjima u sustavu se postiže stanje ravnoteže budući da se djelovanje visokog tlaka zasniva na Le Chatelier – Braunovom principu na temelju

kojega dolazi do smanjenja radnog volumena kako se tlak u sistemu povećava. Prednosti primjene visokih tlakova u odnosu na ostale tehnike obrade je da se visoki tlak ravnomjerno raspoređuje oko namirnice koja se obrađuje što dovodi do očuvanja fizikalno – kemijskih svojstava namirnice. prije i nakon obrade. (Bosiljkov i sur, 2010).

Promjene na mlijeku koje izaziva obrada ultrazvukom visokog intenziteta i visokim hidrostatskim tlakovima je razaranje kazeinskih micela, denaturacije sirutkinih proteina kao i inaktivacija α – laktalbumina i β – laktoglobulina pri tlakovima od 400 – 800 MPa. Komponente mlijeka nakon obrade postaju puno rezistentnije na djelovanje visokog tlaka nego što su bile prije obrade. Dolazi do promjene u ravnoteži minerala mlijeka. Moguća je pojava kristalizacije masnih globula pri djelovanju tlakova od 100 – 300 MPa). Ukoliko se prije obrade dio masne faze nalazi u kristalnom obliku neophodna je prethodna temperaturna obrada kako bi se postojeći kristali potpuno otopili čime se osiguravaju uvjeti za obradu. Organoleptička svojstva svake emulzije definirana su veličinom globula masne faze koje su u njoj sadržane (Michalski i Juanel, 2006; Singh, 2006).

Nakon homogenizacije (Slika 1) na kazeinsku micelu promjera 180 nm adsorbirani su fragmenti kompleksa kazeinskih micela i proteina sirutke na koje se vežu fragmenti prirodne membrane masne globule tj. dijelovi membrane na koje djelovanje kavitacijskih mjehurića nije uzrokovalo vidljivo oštećenje. Bez obzira na primijenjenu metodu homogenizacije na nastajanje nakupina masnih globula najveći utjecaj ima visoki udio masti u mlijeku i mali udio proteina (Bermúdez – Aguirre i sur., 2008). Homogenizacijom mlijeka povećava se ukupna površina masnih globula. Proteini mlijeka, a posebno kazein talože se na površinu masne globule i na taj način djeluju kao prirodno emulgirajuće sredstvo radi čega se homogenizacija svake vrste mlijeka provodi bez dodataka emulgatora (Tratnik, 1998; Dickinson, 2001). U nehomogeniziranom i homogeniziranom mlijeku prisutne su i globule od 0,1 – 0,3 μm na koje postupak homogenizacije nema utjecaja zbog njihovog izuzetno malog promjera. Globule ovako malog promjera pripisuju se svojstvu prirodne homogenosti mlijeka (Bermúdez – Aguirre i sur., 2008).



Materijali i metode

Mjerenja su provedena na nehomogeniziranom kravljem mlijeku (dalje u radu oznaka: 0) slijedećeg kemijskog sastava: Masti: 4 [%]; Suha tvar (bez masti): 8,04 [%]; Laktoza: 4,42 [%]; Proteini: 2,94 [%]; Pepeo: 0,66 [%].

Ispitivanja su provedena ultrazvučnim procesorom maksimalne nominalne snage od 100 W (diskontinuirani proces) koji radi pri konstantnoj frekvenciji od 30 kHz (UP100H, Hielscher Ultrasonics, Njemačka). Volumen uzorka je 150 ml i obrađen je pri amplitudama od 60 i 100%; vremenu od 2, 6, 10 i 15 minuta; sondama promjera 7, 10 i 14 mm.

Tablica 1. *Optimalni procesni parametri ultrazvučnim procesorom (100W) sa pripadajućim intenzitetima [Wcm^{-2}].*

Table 1. *Optimal process parameters using ultrasonic processor (100W) with related intensities [Wcm^{-2}].*

Procesni parametri Process parameters			Intenziteti Intensity
A[%]	t[<i>min</i>]	d[<i>mm</i>]	I[Wcm^{-2}]
60	6	7	67
100	6	7	136
60	6	10	59
60	15	10	59
100	6	10	104
60	6	14	45
100	2	14	83
100	15	14	83

Na temelju istraživanja (Bosiljkov, 2011) idealna raspodjela veličine globula (homogenizirano mlijeko) postiže se pri kombinaciji procesnih parametara prikazanih u Tablici 1. Budući da se obradom navedenim parametrima postižu vrlo stabilne emulzije na što ukazuju vrijednosti varijance (stupanj homogenizacije) koje se kreću u intervalu od 0,2 – 0,6, pri istim procesnim parametrima napravljena je kemijska analiza mlijeka. Kontinuirana ultrazvučna obrada provedena je pomoću procesora maksimalne nominalne snage 1000W, konstantne frekvencije 20 kHz (UIP 1000 hd, Hielscher Ultrasonics, Njemačka) pri različitim volumnim protocima kroz protočnu ćeliju. Uzorci su obrađeni pri amplitudi 60% u trajanju od 6 minuta, sondom promjera 40 mm i intenzitetom od 48 Wcm^{-2} . Volumen uzorka iznosio je 1500 ml. Izračunate vrijednosti volumnih protoka proporcionalne su odgovarajućim podešenjima na regulatoru elektromotora peristaltičke pumpe (Watson – Marlow, Atex 300 hp): *Pozicija(x) – V_p [mls^{-1}] (3 – 2,11; 6 – 12,49; 7 – 15,09; 8 – 19,58; 9 – 25,83).*

Obrada visokim hidrostatskim tlakom provedena je pomoću uređaja (Stansted Fluid Power, Velika Britanija) koji postiže maksimalne tlakove do 1000 MPa. Mjerenja su izvršena pri tlakovima od 200, 400 i 600 MPa i vremenu obrade od 3, 6 i 9 minuta. 250 ml uzorka stavlja se u plastičnu bočicu koja se postavlja u radni cilindar volumena 2000 ml ispunjenog tlačnom tekućinom (propilen – glikol). Vrijeme obrade uzoraka

mlijeka ne uključuje vrijeme potrebno za postizanje radnog tlaka.

Nakon ultrazvučne obrade i obrade visokim hidrostatskim tlakom mjerenje raspodjele veličine masnih globula napravljeno je pomoću laserskog analizatora (Malvern Masterseizer 2000, Velika Britanija). Određivanje veličine masnih globula zasniva se na principu propuštanja uzorka kroz radnu ćeliju pomoću vanjske jedinice (Hydro 2000 S). Mjerenje se zasniva na nedestruktivnoj analizi u intervalu od 0,02 – 2000 μm . Volumen komore (150 ml) u koju se dodaje uzorak (1 – 5 ml) ispunjen je destiliranom vodom. Raspodjela veličine masnih globula opisana je slijedećim vrijednostima: $d(0,1)$ – 10% od volumena distribucije je ispod te vrijednosti [*m*]; $d(0,5)$ – medijan, 50% distribucije je iznad i 50% distribucije je ispod te vrijednosti [*m*]; $d(0,9)$ – 90% volumena distribucije je ispod te vrijednosti dok je 10% iznad te vrijednosti [*m*].

Numeričke vrijednosti raspodjele veličine globula [$d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$] definirane su “Sauterovim” srednjim promjerom [$d(3,2)$] je po definiciji sličan “Feretovom” promjeru, a definiran je kao hipotetski promjer kugle koja ima isti volumni/površinski omjer kao i globula nepravilnog oblika (1):

$$d_{3,2} = \frac{1}{f} \times \frac{M_{3,0}}{M_{2,0}} \quad (1)$$

gdje je: $d(3,2)$ – Sauterov srednji promjer [*m*]; *f* – Heywood – ov faktor (karakterističan za promatrani oblik)

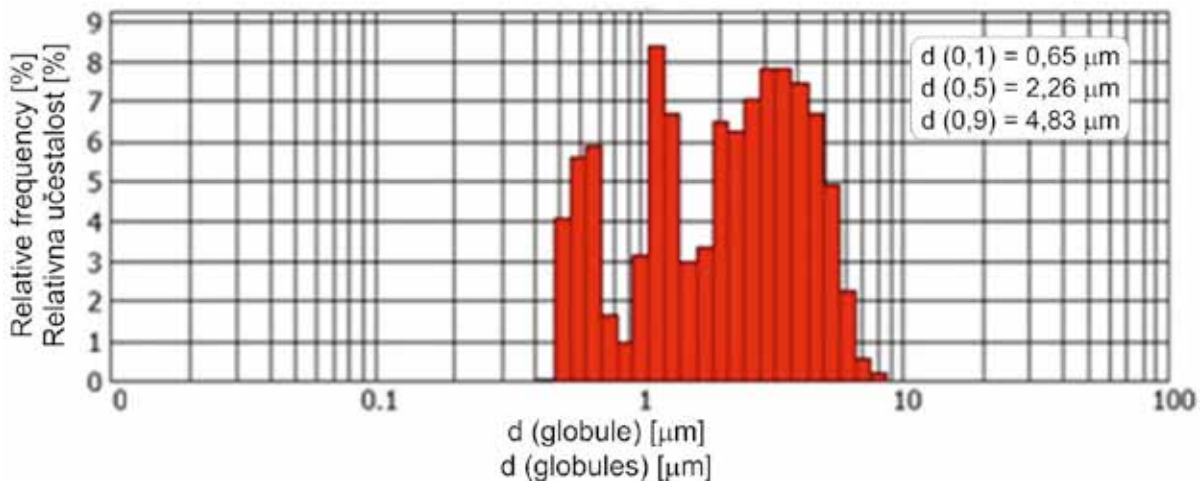
Statistički moment ($M_{k,r}$) (prosječne vrijednosti) matematički se može izraziti (2):

$$M_{k,r} = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} x^k \times f(x) dx = \overline{x_r^k} = \frac{M_{k+r,0}}{M_{r,0}} \quad (2)$$

gdje je: *k* – eksponent promjera čestice *d*; *r* – indeks – karakteristika promatrane kategorije – broj ($r=0$), duljina ($r=1$), površina ($r=2$), volumen ($r=3$), masa ($r=3$), masa i volumen imaju isti indeks, a razlikuju se po konstanti proporcionalnosti.

Kemijski sastava mlijeka određuje se pomoću ultrazvučnog analizatora (Lactoscan SA60, Milkotronic Ltd, Bugarska). Cjelovita analiza obuhvaća mjerenja udjela masti, proteina, laktoze vode, pH – vrijednosti, gustoće, temperature, suhe tvari bez masti (proteini, laktoza), pepela (mineralne tvari – Ca i P). Mjerenje se zasniva na prolasku ultrazvučnog vala niskog intenziteta kroz tekući medij pri čemu je izmjerena brzina ultrazvuka kao posljedica protoka između dva senzora direktno proporcionalna udjelima koji definiraju kemijski sastav promatranog uzorka. Protok se ostvaruje peristaltičkom pumpom. Volumen uzorka za analizu iznosi 30 ml.

Statistička analiza zasniva se na uspoređivanju uzoraka nehomogeniziranog kravljeg mlijeka sa ultrazvučno obrađenim uzorcima kao i uzorcima obrađenim visokim hidrostatskim tlakovima. Rezultati su obrađeni pomoću programskog paketa “Statistika 9”. Statistička značajnost utjecaja procesnih parametara na parametre deskriptivne statistike određena je analizom varijance (ANOVA) i izražena je preko *p* – vrijednosti. Svi članovi koji imaju ANOVA, *p* – vrijednost nižu od 0,05 ($p < 0,05$; 95% – tna razina signifikantnosti) uzeti su u obzir i razmatranje. Razina utjecaja statistički značajnih procesnih parametara prikazana je β – standardiziranim koeficijentom



Slika 2. Log – normalna raspodjela masnih globula (60_6_10)
Figure 2. Log – normal distribution of fat globules (60_6_10)

čija pozitivna ili negativna vrijednost ukazuje na povećanje ili smanjenje promatrane veličine.

Rezultati i rasprava

Oznake uzoraka prikazanih rezultata odgovaraju parametrima procesa i interpretiraju se na slijedeći način:

Ultrazvuk: 60_6_7: Amplituda [60%]_Vrijeme obrade [6 minuta]_Promjer sonde [7 mm];

Visoki hidrostatski tlak: 200_3: Vrijednost hidrostatskog tlaka[200MPa]_Vrijeme obrade[3 minute].

Kavitacijski mjehurić izazvan i nastao utjecajem niže frekvencije većeg je promjera, ima brže gibanje u odnosu na okolni medij i kolabira silovito uzrokujući turbulencije. Promatrajući utjecaj amplitude od 60% i vremena obrade od 6 minuta na medijan dolazi do smanjenja promatrane vrijednosti kako se promjer sonde povećava (Tablica 2). Primjenom sonde većeg promjera smanjuje se ultrazvučni intenzitet, ali se istovremeno povećava utjecaj aktivnog polja jer je kavitacijska aktivnost najizraženija u području konusne projekcije ispod samog vrha sonde (Price i sur., 2010). Važan je i utjecaj temperature kao posljedica implोजije. Kombinacijom utjecaja ultrazvuka i topline (*eng. thermosonication*) pospješuje se stvaranje većeg broja globula manjeg promjera (Bermudez – Aguirre i sur., 2008). Utjecaj temperature je najizraženiji ako se postupak homogenizacije provodi pri temperaturama do 60 °C. Uzorak mlijeka 60_6_10 nakon završetka obrade postiže maksimalnu temperaturu od 45 °C sa visokom relativnom učestalosti globula malog promjera manjeg od 1µm. (Slika 2).

Slična raspodjela veličine globula dobiva se primjenom procesora 1000W gdje veća ulazna snaga primjenom sonde većeg promjera rezultira istim vrijednostima (intervalom) intenziteta procesora od 100W. Primjena protočne čelije (kontinuirani postav) pri manjim volumnim protocima (pozicija 3) pokazuje utjecaj na povećanje vrijednosti medijana sa 2,26 na 3,61µm u odnosu na diskontinuirani postav (Slika 3). Nakon ultrazvučne obrade bez protočne čelije Log – N raspodjela ukazuje na pojavu više od jednog pika (bimodalna, tj. multimodalna funkcija), (Slika 2) što pokazuje da promatrani

uzorak možda i nije u potpunosti homogen (Svarovsky, 2000). Ipak, važno je napomenuti da svi ultrazvučno obrađeni uzorci pri svim promatranim procesnim parametrima tvore stabilne emulzije koje se smatraju izrazito prihvatljivima.

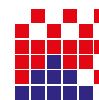
Tablica 2. Utjecaj ultrazvuka (100W) na prosječnu veličinu globula

Table 2. Influence of ultrasound (100W) on mean particle diameter

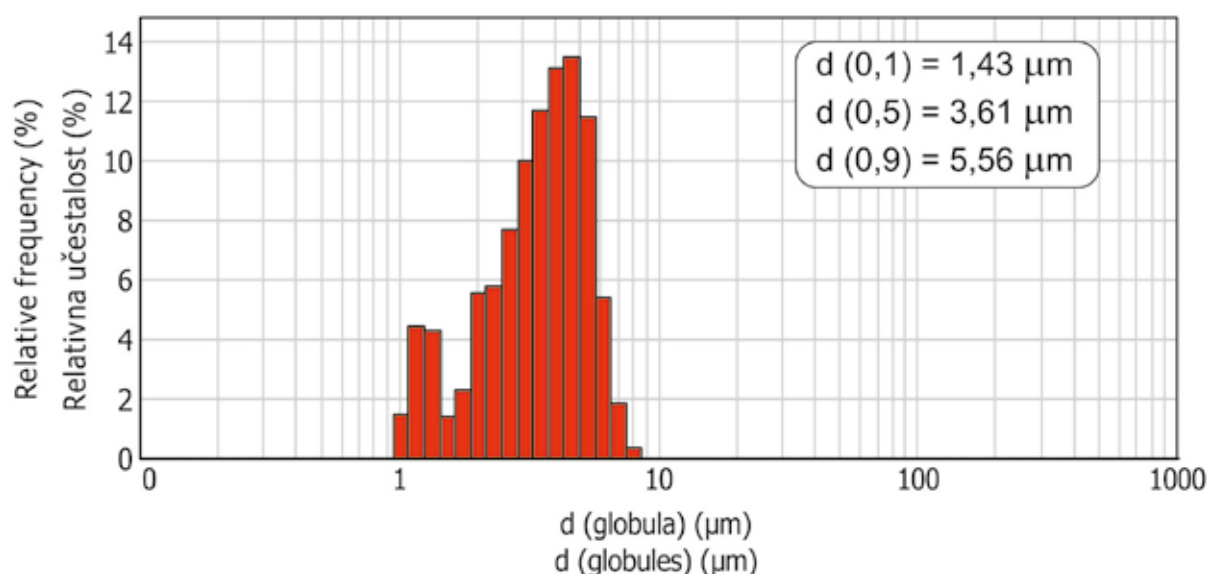
Procesni parametri <i>Process parameters</i>			Prosječna veličina globula [µm] <i>Mean particle diameter [µm]</i>		
A[%]	t[min]	d[mm]	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
60	6	7	2,881	4,364	6,094
100	6	7	2,809	4,289	5,907
60	6	10	0,652	2,257	4,826
60	15	10	0,567	0,708	1,340
100	6	10	0,550	0,888	2,021
60	6	14	0,464	1,653	4,365
100	2	14	0,646	1,514	3,921
100	15	14	0,723	1,341	3,216
0	0	0	0,119	2,909	6,339

Budući da je homogenizacija mlijeka provedena pri procesnim parametrima koji učinkovito djeluju na promjenu fizikalnih svojstava mlijeka (kao i homogenizaciju), promatran je utjecaj netoplinskih tehnika homogenizacije na promjenu kemijskog sastava mlijeka.

Utjecaj ultrazvuka procesorom 100W pokazuje da niti jedan ultrazvučni parametar nema statistički značajan utjecaj na kemijski sastav mlijeka (Tablica 3), ($p > 0,05$). Nakon obrade i uspješne homogenizacije mlijeko ostaje u potpunosti u svom izvornom obliku, nepromijenjenog kemijskog sastava.

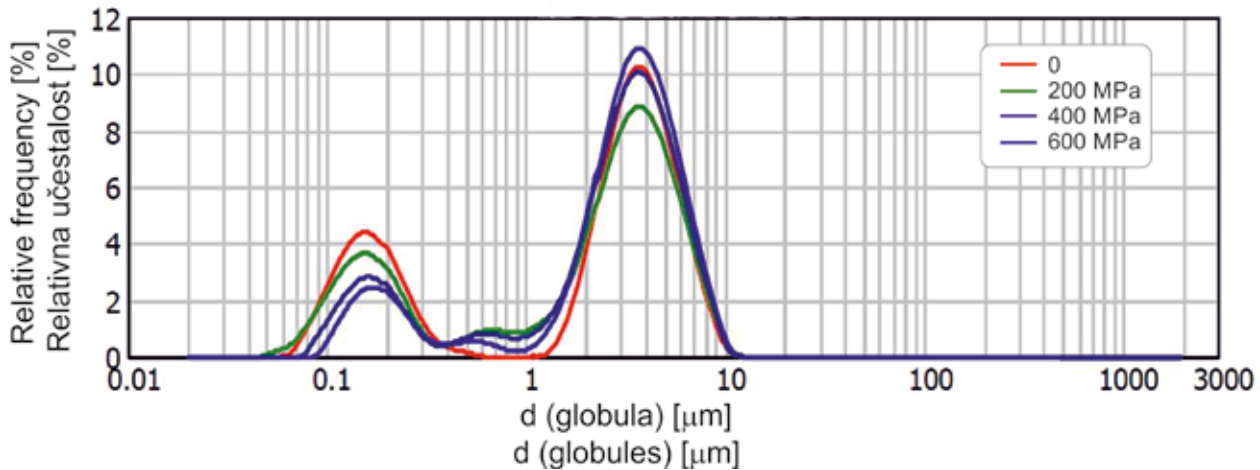
**Tablica 3.** Utjecaj ultrazvuka (100W) na kemijski sastav [%] kravljeg mlijeka.**Table 3.** Influence of ultrasound (100W) on chemical composition [%] of cow milk.

Oznaka uzorka Sample code	60_6_7	100_6_7	60_6_10	60_15_10	100_6_10	60_6_14	100_2_14	100_15_14
Masti Fat	3,67	3,72	3,69	3,76	3,74	3,72	3,7	3,8
Suha tvar (bez masti) Solids non fat	8,99	8,95	8,97	8,68	8,59	8,87	8,96	8,59
Laktoza Lactose	4,94	4,92	4,93	4,77	4,72	4,88	4,92	4,72
Pepeo Solids(Ca,P)	0,74	0,73	0,73	0,71	0,70	0,73	0,73	0,7
Proteini Proteins	3,29	3,28	3,29	3,18	3,15	3,25	3,28	3,15

**Slika 3.** Log – normalna raspodjela masnih globula, regulator pumpe podešen je na poziciju – 3.**Figure 3.** Log – normal distribution of fat globules, pump regulator settings, position – 3.**Tablica 4.** Utjecaj ultrazvuka (1000W) na kemijski sastav [%] kravljeg mlijeka**Table 4.** Influence of ultrasound on chemical composition [%] of cow milk.

Podešenje regulatora pumpe Pump regulator setting	3	6	7	8	9
Masti Fat	3,3	3,37	4,02	4,2	4,2
Suha tvar (bez masti) Solids non fat	6,70	6,45	6,37	6,17	6,19
Laktoza Lactose	9,15	8,75	3,83	3,44	3,39
Pepeo Solids(Ca,P)	1,38	0,71	0,57	0,52	0,51
Proteini Proteins	6,1	5,83	2,55	2,29	2,27

Statistički značajan utjecaj na promjenu kemijskog sastava mlijeka pokazala je primjena kontinuiranog postupka homogenizacije. Promjena podešenja regulatora pumpe tj. vrijednosti volumnih protoka kroz protočnu ćeliju ukazuje na statističku značajnu promjenu vrijednosti pepela ($p < 0,035704$) (Tablica 4). Pepeo u svom osnovnom sastavu osim mineralnih tvari (Ca,P) sadržava i serum mlijeka koji se u najvećem dijelu sastoji od laktoze, kazeina i proteina sirutke. Promjenom protoka, odnosno njegovim smanjenjem dolazi i do promjena na udjelu laktoze i proteina mlijeka. Volumni protoci (pozicija regulatora 3 i 6) omogućuju intenzivniji utjecaj kavitacijskog mehanizma unutar sustava protočne ćelije što dovodi do izraženijeg prijenosa topline i njegovog utjecaja na kemijski sastav kao posljedica ultrazvučne obrade. Nakon obrade, membrana masne globule vidljivo je oštećena, ali ostaje adsorbirana na površinu globule i zadržava svoju funkciju zaštitnog sloja. Površinski sloj globule nakon homogenizacije sadržava 10 – 30% dijelova membrane prije homogenizacije. Novonastali površinski sloj u najvećem djelu sastoji se od micela kazeina kao i preostalih proteina seruma mlijeka. Kazeinske micelle sastoje se od nakupina manjih podjedinica tzv. “submicela” koje na-

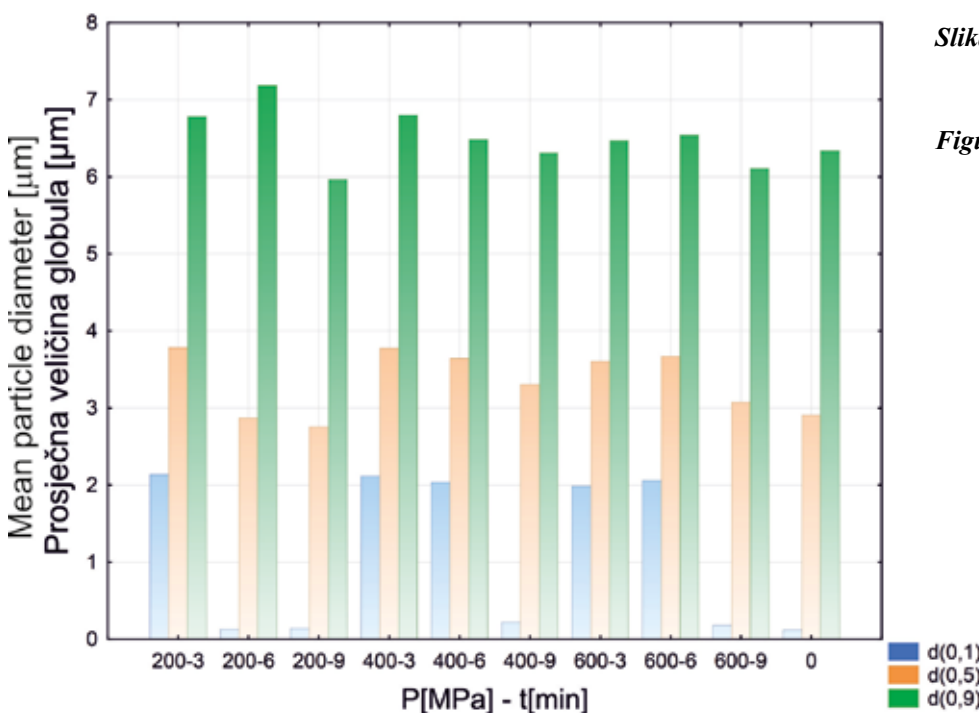


Slika 4. Log – normalna raspodjela masnih globula nakon 9 minuta obrade
Figure 4. Log – normal distribution of fat globules after 9 minutes of treatment

staju agregacijom kazeinskih frakcija. Velike micelle kazeina adsorbirane su preko manjih dok se proteini bolje adsorbiraju na globule manjeg promjera (Dickinson, 2001). Nakupine masnih globula tzv. “grozdova” zadržavaju vodenu fazu u međuprostoru masnih globula pri čemu dolazi do povećanja volumnog udjela globula u mlijeku. Grozdovi nastaju zbog vezivanja kazeinskih micela na površinu masne globule pri čemu dolazi do vezivanja submicela preko *mono* – kristala *Ca – fosfata*. Dolazi do smanjenja aglutinacije (ponovno nakupljanje globula) zbog adsorpcije kazeinskih micela i submicela na masne globule (Tratnik, 1998; Dalglish i sur., 2005).

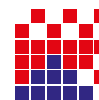
Kao i kod ultrazvuka visokog intenziteta promatran je utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu veličine masnih globula sa osvrtom na promjenu vrijednosti $d(0,5)$; $d(0,9)$ i $d(0,1)$. Statistička obrada rezultata deskriptivne statistike pokazala je da različiti primijenjeni tlakovi i različito vrijeme obrade nemaju statistički značajan utjecaj na vrijednosti

$d(0,9)$ i $d(0,1)$. Dobiveni rezultati podudaraju se sa provedenim istraživanjima Huppertz i sur. (2004) da primjena visokog hidrostatskog tlaka ne izaziva značajne promjene na raspodjelu veličine masnih globula mlijeka. Do značajnog smanjenja promjera masnih globula ne dolazi zbog značajno manjeg utjecaja visokog hidrostatskog tlaka u odnosu na razorno djelovanje ultrazvukom produciranog kavitacijskog mjehurića koji destruktivno djeluje na površinu membrane masne globule što posljedično dovodi do postupnog izduživanja (globula poprima oblik bučice) i u konačnici pucanja globule na veliki broj manjih (Kanno i sur., 1998; Buchheim i sur., 1996; McClements, 2005; Leal – Calderon i sur., 2007). Do statistički značajne promjene tj. povećanja vrijednosti medijana dolazi primjenom viših vrijednosti tlakova (400 i 600 MPa). Medijan promjera masnih globula pri obradi mlijeka tlakom od 200 MPa smanjuje se porastom vremena obrade, pa tako pri obradi od 9 minuta iznosi 2,753 μm . Na povećanje vrijednosti medija-



Slika 5. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na prosječnu veličinu globula

Figure 5. Influence of high hydrostatic pressure on mean particle diameter



Tablica 5. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na kemijski sastav [%] kravljeg mlijeka.
Table 5. Influence of high hydrostatic pressure on chemical composition [%] of cow milk.

Oznaka uzorka Sample code	200_3	200_6	200_9	400_3	400_6	400_9	600_3	600_6	600_9
Masti Fat	3,96	4,03	4,4	4,03	4,03	4,09	4,10	4,02	4,06
Suha tvar (bez masti) Solids non fat	8,04	8,05	8,10	8,08	8,15	8,18	8,17	8,05	8,18
Laktoza Lactose	4,42	4,53	4,45	4,44	4,48	4,50	4,49	4,42	4,48
Pepeo Solids (Ca, P)	0,66	0,68	0,66	0,66	0,67	0,67	0,67	0,66	0,67
Proteini Proteins	2,94	3,02	2,96	2,96	2,99	3,00	3,00	2,95	2,99

na utječe povećanje vrijednosti visokog hidrostatskog tlaka što i dokazuje analizom varijance dobivena pozitivna vrijednost β – standardiziranog koeficijenta utjecaja (2,41171). Pri višim tlakovima (400 i 600 MPa) medijan postupno raste da bi kod tlaka od 600 MPa i vremenu obrade od 9 minuta iznosio 3,073 μm (Slika 5). Najoptimalnija frekvencija učestalosti raspodjele veličine globula u intervalu od 0,1 – 5 μm postižu se pri nižim vrijednostima tlaka od 200 MPa. Smanjenje relativne učestalosti odnosi se na globule u intervalu od 1 – 10 μm . Budući da je medijan po definiciji 50% – tna veličina vidljivo je da se bolja raspodjela globula postiže pri nižim vrijednostima tlaka (Slika 4). Trujillo i sur., 2002 pokazali su da se obradom visokim tlakovima pri temperaturama od 25 – 50 °C pri tlakovima do 500 MPa povećava broj malih globula u rasponu od 1 – 2 μm . Prethodna istraživanja pokazala su da tlakovi do 400 MPa ne utječu na raspodjelu veličine masnih globula, ali pri višim vrijednostima tlaka dolazi do povećanja relativne učestalosti globula većeg promjera kao i do povećanja vrijednosti varijance (Kanno i sur., 1998). Ove promjene dešavaju se radi vezivanja proteina mlijeka, ponajviše kazeina, na površinu membrane masne globule, te se takve globule ponašaju kao velike micle kazeina (Sharma i Singh, 1999).

Mehanizam djelovanja visokog hidrostatskog tlaka primjenom visokih vrijednosti tlaka (600 MPa) kao maksimalno vrijeme obrade (9 minuta) ne dovodi do izraženijih fizikalno – kemijskih promjena na obrađeni uzorak (Tablica 5). Kao i kod ultrazvuka, visoki tlak nije rezultirao promjenom kemijskog sastava mlijeka. Nakon postizanja radnog tlaka u cilindru tijekom obrade temperatura ne prelazi 25°C pri čemu ne dolazi do promjene na osnovnim sastojcima mlijeka kao što su proteini i laktoza kao niti do denaturacije proteina koja se događa na temperaturama višim od 60 °C. Jedina promjena do koje dolazi tijekom obrade visokim tlakom je interakcija između proteina mlijeka i membrane masne globule. Kod homogenizacije visokim tlakovima više dolazi do nakupljanja komponenata mlijeka a manje do klasične homogenizacije kao što je to slučaj kod homogenizacije ultrazvukom.

Zaključci

Primjenom netoplinskih tehnologija postiže se izrazito visoka učinkovitost na promjene promatranih fizikalno – kemijskih svojstava kravljeg mlijeka. Definirani kontinuirani i

diskontinuirani postav ultrazvučnih procesora pri obradi optimalnim procesnim parametrima dovodi do raspodjele veličine globula od 0,3 – 6 μm . Prikazana raspodjela globula odgovara stupnju homogenizacije, odnosno vrijednostima varijance od 0,2 – 0,6. Niže vrijednosti tlakova kao i dulje vrijeme obrade pokazuju značajan utjecaj na smanjenje vrijednosti medijana što bi se moglo okarakterizirati kao mjerodavan parametar deskriptivne statistike koji sa sigurnošću ukazuje na povećanje stabilnosti i sve veću učestalost globula manjeg promjera. Bimodalnost Log – N raspodjele obrađenih uzoraka mlijeka visokim tlakom ukazuje na djelomično homogenizirani uzorak. U konačnici, sve obrađene uzorke promatrajući u intervalima učestalosti promjera masnih globula možemo smatrati stabilnim i homogenim kroz duži vremenski period. Izrazito pozitivna karakteristika ovako obrađenih uzoraka je minimalna promjena kemijskog sastava koje izaziva ultrazvučni kontinuirani postupak pri nižim vrijednostima volumnih protoka i moguće ih je svesti na najmanju moguću mjeru optimizacijom procesa gdje je moguće obraditi i znatno veći volumen uzorka pri čemu se u potpunosti postiže kontrola temperature sustava.

Zahvala

Ovaj rad financijski je potpomognut Razvojnim projektom Sveučilišta u Zagrebu Program: “ŠKOLA” pod nazivom: PRIMJENA ULTRAZVUKA NISKOG INTENZITETA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI voditelja Prof.dr.sc.Mladen Brnčića

Literatura

- Ashokkumar M. (2011) The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18, 864 – 872.
- Bermudez – Aguirre D., Mawson R., Barbosa – Cánovas G.V.(2008) Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*, 73 (7) 325 – 332.
- Bosiljkov T., Tripalo B., Ježek D., Brnčić M., Karlović S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji. *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, 59, (11) 539 – 544.

- Bosiljkov T. (2011) "Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stupanj homogenizacije i fizikalna svojstva sojinog, kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka" Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Bosiljkov T., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Karlović S., Jagušić I. (2011) Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(1), 34-41.
- Brnčić M., Karlović S., Rimac-Brnčić S., Penava A., Bosiljkov T., Ježek D., Tripalo B. (2010) Textural properties of infrared dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment. *African Journal of Biotechnology*, 9(41), 6907-6915.
- Buchheim, W., Schmitt, M., Frede, E. (1996) High pressure effects on emulsified fats. U: Hayashi, R., Balny, C. (ed): High pressure bioscience and biotechnology, str. 331 – 336. Elsevier Amsterdam.
- Cučeval A., Chow R.C.Y. (2008). A study on the emulsification of oil by power ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry*, 15, 916 – 920.
- Dalgleish, D.G., Verespej, E., Alexander, M., Corredig, M. (2005) The ultrasonic properties of skim milk related to the release of calcium from casein micelles during acidification. *International Dairy Journal*, 15, 1105 – 1112.
- De Castro L.M.D., Capote P.F. (2007) Analytical application of ultrasound. Elsevier Science, Langford Lane, Oxford, Great Britain.
- Dickinson, E. (2001) Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 197 – 210.
- Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of Ultrasound in Food Technology. *Acta Scientiarum Polonorum – Technologia Alimentaria*, 6 (3) 89 – 99.
- Huppertz, T., Grosman, S., Fox, P. F., Kelly, A. L. (2004) Heat and ethanol stabilities of high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*, 14, 125 - 133.
- Kanno, C., Uchimura, T., Hagiwara, T., Ametani, M., Azuma, N. (1998) Effect of hydrostatic pressure on the physicochemical properties of bovine milk fat globules and the milk fat globule membrane. U: Isaacs, N.S.(ed): High pressure food science, bioscience and chemistry, str. 182 – 192. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Leal – Calderon F., Thivillers F., Schmitt V. (2007) Structured emulsion, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 206 – 212.
- McClements, J.D. (2005) Food Emulsion: Principale, Practice and Technique CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
- Michalski M.C., Januel C. (2006) Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science and Technology*, 17, 423 – 437.
- Price G.J., Harris N.K. Stewart A.J. (2010) Direct observation of cavitation fields at 23 and 515 kHz. *Ultrasonic Sonochemistry*, 17, 30 – 33.
- Svarovsky, L. (2000) Solid – liquid separation, 4. ed., Butterworth & Co. Ltd., London.
- Sharma R., Singh H. (1999) Heat stability of recombined milk system as influenced by the composition of fat globule surface layers. *Milchwissenschaft*, 54, 193 – 196.
- Singh H. (2006) The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 154 – 163.
- Suslick K.S. (1988) Ultrasound: Its Chemical, Physical, and Biological Effects. VCH Publishers, New York.
- Tratnik, L.J. (1998) Mlijeko - Tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska Mljekarska udruga, Zagreb.
- Trujillo, A. J., Capellas M., Saldo J., Gervilla, R., Guamis, B. (2002) Applications of high – hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 295 – 307.